

Universidade Federal de Minas Gerais  
Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular

**SIMONE BECHO DE CAMPOS**

Estudo de genes da Via Wnt e sua associação  
com o Transtorno Afetivo Bipolar

Belo Horizonte

2013

Universidade Federal de Minas Gerais  
Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular

**SIMONE BECHO DE CAMPOS**

# Estudo de genes da Via Wnt e sua associação com o Transtorno Afetivo Bipolar

Tese apresentada como requisito para  
obtenção do título de doutor junto ao  
Programa de Pós-graduação em Medicina  
Molecular da Universidade Federal de  
Minas Gerais.

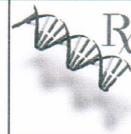
Orientador: Prof. Titular Dr. Humberto Corrêa  
Coorientadora: Profa. Dra. Débora Marques de Miranda

Belo Horizonte

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## FOLHA DE APROVAÇÃO

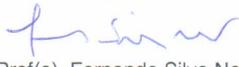
### Estudo de genes da Via Wnt e sua associação com o Transtorno Afetivo Bipolar

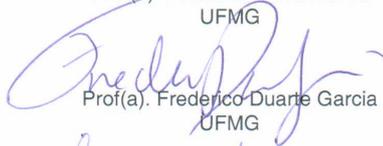
#### SIMONE BECHO DE CAMPOS

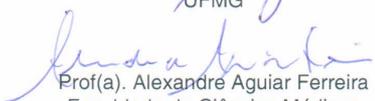
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 31 de outubro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

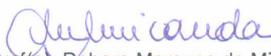
Prof(a). Humberto Correa da Silva Filho - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Fernando Silva Neves  
UFMG

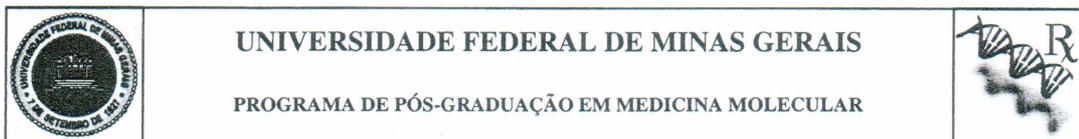
  
Prof(a). Frederico Duarte Garcia  
UFMG

  
Prof(a). Alexandre Aguiar Ferreira  
Faculdade de Ciências Médicas

  
Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
Prof(a). Debora Marques de Miranda  
UFMG

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2013.



## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA SIMONE BECHO DE CAMPOS

Realizou-se, no dia 31 de outubro de 2013, às 15:30 horas, Sala 526, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Estudo de genes da Via Wnt e sua associação com o Transtorno Afetivo Bipolar*, apresentada por SIMONE BECHO DE CAMPOS, número de registro 2009749922, graduada no curso de TERAPIA OCUPACIONAL, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Humberto Correa da Silva Filho - Orientador (UFMG), Prof(a). Fernando Silva Neves (UFMG), Prof(a). Frederico Duarte Garcia (UFMG), Prof(a). Alexandre Aguiar Ferreira (Faculdade de Ciências Médicas), Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues (Universidade Federal de Juiz de Fora), Prof(a). Debora Marques de Miranda (UFMG).

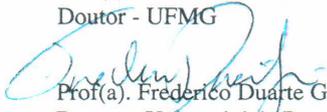
A Comissão considerou a tese:

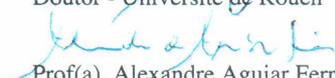
- Aprovada  
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa  
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
 Belo Horizonte, 31 de outubro de 2013.

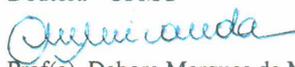
Prof(a). Humberto Correa da Silva Filho  
 Doutor - UFMG

  
 Prof(a). Fernando Silva Neves  
 Doutor - UFMG

  
 Prof(a). Frederico Duarte Garcia  
 Doutor - Université de Rouen

  
 Prof(a). Alexandre Aguiar Ferreira  
 Doutor - UFMG

  
 Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues  
 Doutora - UFMG

  
 Prof(a). Debora Marques de Miranda  
 Doutora - UFMG

  
 CONFERE COM ORIGINAL  
 Centro de Pós-Graduação  
 Faculdade de Medicina - UFMG

*Aos meus pais,  
José Augusto e Maristela*

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Humberto Corrêa, pela compreensão, apoio e ensinamentos nesses 4 anos de doutorado.

À Profa. Dra. Débora Marques de Miranda, minha coorientadora, por estar ao meu lado, me dando força e incentivo para finalizar meu doutorado no período mais difícil da minha vida. Sem você eu não chegaria até aqui.

Aos Profs. Dr. Marco Aurélio Romano Silva e Dr. Luiz Armando de Marco pela oportunidade de conviver e aprender com vocês. Ao Prof. Renan Souza pela disponibilidade e ensinamentos de genética.

A todos os amigos que fiz no laboratório, em especial à Patrícia Araújo, Vitor Bortolo, Antônio Alvim, Alexandre Magno, Manuel Schutze, Karen Torres e Jéssika Bridi por todo suporte e incentivo que me deram, e pela cia nas viagens, congressos, almoços e cafés!!!!

Não poderia deixar de agradecer a “Turma do Balão” e a “Turma OB”, por compreenderem minha ausência nos eventos e encontros.

Agradeço, do fundo do coração, a minha mãe Maristela e ao meu pai José Augusto, por sempre apoiarem as minhas escolhas e torcerem pelo meu sucesso. Sei que meu pai está feliz, “lá de cima”, com mais essa minha vitória. Aos meus irmãos, Alexandre e Henrique, por compreenderem minha ausência e me darem força pra continuar.

Agradeço a CAPES pelo financiamento, sem ele não poderia me dedicar exclusivamente ao doutorado.

Obrigada a todos, que direta ou indiretamente, me ajudaram a conquistar mais esse título!

## Resumo

O Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) é um transtorno psiquiátrico grave, crônico e com progressivo aumento da gravidade dos episódios. O prognóstico para os pacientes com TAB é pobre, com altas taxas de recaída, de sintomas residuais, disfunções cognitivas e de diminuição da qualidade de vida. Um crescente corpo de estudos suporta a hipótese de que o TAB surge de anormalidades em cascatas de plasticidade celular, levando a processamento deficiente de informação nas sinapses e circuitos de mediação de funções afetivas e cognitivas. Várias linhas de evidências sugerem que a via Wnt pode, também, estar envolvida na etiologia do TAB, pois esta via está relacionada a processos de desenvolvimento essenciais tais como crescimento celular, migração e diferenciação celular. Por esse motivo, o objetivo do nosso estudo foi avaliar possíveis associações entre polimorfismos de alguns genes da via Wnt e a susceptibilidade ao TAB e comorbidades. Nossa amostra consistiu de 546 indivíduos, sendo 306 pacientes com TAB e 240 controles saudáveis. Utilizamos os genes WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT7A, APC1 e FZD3. Nas análises de associação entre caso e controle, não encontramos correlação entre os tagSNPs estudados e o TAB. Encontramos associação positiva entre o gene APC1, rs7419262, e tentativa de suicídio violenta e entre o gene WNT2B, rs3790606 e rs351372 e o transtorno de ansiedade generalizada como comorbidade em pacientes com TAB. Concluímos que a via Wnt pode estar associada a susceptibilidade ao TAB e suicídio.

Palavras-chave: Via de Sinalização Wnt, Transtorno Bipolar, Polimorfismo, Psiquiatria, Genética.

## **Abstract**

Bipolar Disorder (BD) is a severe and chronic psychiatric illness with progressive increase in the severity of episodes. The prognosis for patients with BD is poor, with high rates of relapse in residual symptoms, cognitive impairment and decreased quality of life. A growing body of research supports the assumption that BD arises from abnormalities in neuronal plasticity. Several lines of evidence suggests that the Wnt family is involved in this pathway since it is related to key developmental processes such as cell growth, migration and cell differentiation. Therefore, the aim of our study was to evaluate whether genes of the Wnt pathway are associated to BD and its comorbidities. Our sample consisted of 546 individuals: 306 patients with BD and 240 healthy controls. We used the genes WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT7A, APC1 and FZD3. We found no correlation between the studied tagSNPs and BD. However, we found a positive association between APC1 tagSNP, rs7419262, and violent suicide attempt, and between the WNT2B tagSNPs, rs3790606 and rs351372, and generalized anxiety disorder as a comorbidity in patients with BD. We conclude that the Wnt pathway may be associated with susceptibility to BD and suicide.

**Keywords:** Wnt pathway, Bipolar Disorder, Polymorphism, Psychiatry, Genetics.

**Lista de figuras**

Figura 1. Via Wnt.....	26
Figura 2. Esquema ilustrativo do mecanismo da PCR em tempo real.....	39
Figura 3. Resultado ilustrativo da análise da discriminação alélica em uma PCR em tempo real.....	40
Figura 4. Dendograma da interação gene-gene TAB comparado com controles.....	78

## Lista de tabelas

Tabela 1. Informações sobre os marcadores.....	42
Tabela 2. Sequências correspondentes aos polimorfismos estudados.....	43
Tabela 3. Dados demográficos e clínicos da população estudada.....	46
Tabela 4. EHW e MAF dos tagSNPs do estudo.....	47
Tabela 5. Frequências alélica e genotípica do gene APC1 entre grupo caso e controle.....	48
Tabela 6. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B entre grupo caso e controle.....	49
Tabela 7. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A entre grupo caso e controle.....	50
Tabela 8. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A entre grupo caso e controle.....	51
Tabela 9. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3 entre grupo caso e controle.....	52
Tabela 10. Frequências alélica e genotípica do gene APC1 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar tipo I e II.....	53
Tabela 11. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar tipo I e II.....	54
Tabela 12. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar tipo I e II.....	55
Tabela 13. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar tipo I e II.....	56
Tabela 14. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar tipo I e II.....	57
Tabela 15. Frequências alélica e genotípica do gene APC1 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem tentativa de suicídio.....	58
Tabela 16. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem tentativa de suicídio.....	59

Tabela 17. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem tentativa de suicídio.....	60
Tabela 18. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem tentativa de suicídio.....	61
Tabela 19. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem tentativa de suicídio.....	62
Tabela 20. Frequências alélica e genotípica do gene APC1 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com tentativa de suicídio violenta e não violenta.....	63
Tabela 21. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com tentativa de suicídio violenta e não violenta.....	64
Tabela 22. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com tentativa de suicídio violenta e não violenta.....	65
Tabela 23. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com tentativa de suicídio violenta e não violenta.....	66
Tabela 24. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com tentativa de suicídio violenta e não violenta.....	67
Tabela 25. Frequências alélica e genotípica do gene APC1 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de pânico.....	68
Tabela 26. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de pânico.....	69
Tabela 27. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de pânico.....	70
Tabela 28. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de pânico.....	71
Tabela 29. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de pânico.....	72
Tabela 30. Frequências alélica e genotípica do gene APC1 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de TAG.....	73
Tabela 31. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de TAG.....	74

Tabela 32. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de TAG.....75

Tabela 33. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de TAG.....76

Tabela 34. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3 entre grupo de pacientes com transtorno afetivo bipolar com e sem comorbidade de TAG.....77

**Lista de abreviaturas**

APC: *adenomatos poliposis coli*

DVL: proteínas *disheveled*

EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FZD: *Frizzled*

GSK-3 $\beta$ : glicogênio síntase quinase 3 $\beta$

MAF: frequência mínima alélica

MDR: *Multifactor Dimensionality Reduction*

NCS: *National Comorbidity Survey*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

SNC: sistema nervoso central

SNP: polimorfismos de base única

TAB: transtorno afetivo bipolar

TAG: transtorno de ansiedade generalizada

TCF: *T-cell factor*

TP: transtorno de pânico

WNT: *wingless-type MMTV integration site family*

## Sumário

1. Introdução.....	16
1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos do Transtorno Afetivo Bipolar.....	17
1.2. Aspectos fisiopatológicos do TAB.....	18
1.3. TAB e suicídio.....	20
1.4. TAB e comorbidades.....	21
1.5. Aspectos genéticos do TAB.....	23
1.6. Via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina.....	24
1.6.1. Wnts e o desenvolvimento do sistema nervoso central.....	26
1.6.2. Wnts e a orientação axonal.....	27
1.6.3. Wnt e a formação dendrítica.....	27
1.6.4. Sinalização Wnt e a sinapse.....	28
1.7. Via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e o TAB.....	29
1.8. Genes candidatos.....	31
2. Objetivos.....	33
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. Material e Métodos.....	35
3.1. Amostra estudada.....	36
3.2. Extração de DNA.....	36
3.3. Reação em cadeia de polimerase com sonda TaqMan®.....	38
3.4. Escolha dos polimorfismos.....	40
3.5. Análise estatística.....	44

4. Resultados.....	45
4.1. Caracterização amostral.....	46
4.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	47
4.3. Análise de frequências.....	48
4.4. Análise de interação gene-gene.....	78
5. Discussão.....	80
6. Conclusão.....	86
7. Referências bibliográficas.....	88

## 1. Introdução

### **1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos do Transtorno Afetivo Bipolar**

O Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) é um transtorno psiquiátrico grave, crônico e com progressivo aumento da gravidade dos episódios (DEAN; GERNER; GERNER, 2004; GOODWIN; JAMISON, 1990). O TAB é classificado como transtorno do humor pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2000). O prognóstico para os pacientes com TAB é pobre, com altas taxas de recaída, de sintomas residuais, disfunções cognitivas e de diminuição da qualidade de vida (BELMAKER, 2004; KUPFER, 2005).

O Transtorno Afetivo Bipolar consiste em uma alteração cíclica do estado de ânimo, caracterizada por variação extrema do humor, alternando entre fase maníaca ou hipomaníaca e fases depressivas (BELMAKER, 2004). O transtorno é classificado em transtorno afetivo bipolar tipo I (caracterizado por um ou mais episódios maníacos ou episódios mistos), tipo II (ocorrem um ou mais episódios depressivos maiores acompanhados por, pelo menos, um episódio hipomaníaco) e ciclotímico (caracterizado por perturbação crônica e flutuante do humor envolvendo numerosos períodos de sintomas ligeiros de hipomania e depressão, mas que não preenchem os critérios de depressão maior) (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2000; BELMAKER, 2004).

O transtorno afeta igualmente homens e mulheres, iniciando sua manifestação clínica, geralmente, entre 15-30 anos de idade (GOODWIN; JAMISON, 1990). Sua prevalência ao longo da vida é de 0,5% a 7,5%, dependendo da amplitude dos critérios diagnósticos com a introdução do conceito de espectro bipolar (ANGST et al., 2003; JUDD; AKISKAL, 2003). TAB tipo I atinge aproximadamente 0,8% da população adulta, e o TAB tipo II afeta cerca de 0,5% da população.

Ao quadro clínico, associa-se alta incidência de tentativa de suicídio, comportamentos de alto risco, como promiscuidade sexual e abuso de

substâncias, dificuldades nas relações interpessoais e múltiplas hospitalizações (FOUNTOULAKIS et al., 2009; POMPILI et al., 2008). Várias comorbidades clínicas e psiquiátricas, como transtorno do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, hipo e hipertireoidismo, hipertensão, diabetes também se associam ao TAB (KAWA et al., 2005; NAKAGAWA et al., 2008).

O transtorno afetivo bipolar é um transtorno do humor altamente incapacitante e com altas taxas de comorbidades psiquiátricas, as quais chegam a mais de 60% ao longo da vida (SASSON et al., 2003). McElroy et al. (2001) mostrou em seu estudo que 65% dos pacientes com TAB apresentavam pelo menos uma comorbidade psiquiátrica ao longo da vida, sendo que 42% apresentaram dois ou mais diagnósticos e 24% apresentaram três ou mais comorbidades.

Atualmente, acredita-se que muitos pacientes com TAB apresentam um predomínio da polaridade maníaca ou depressiva durante o curso da sua doença, o que tem importantes implicações clínicas e terapêuticas. Pacientes com predomínio de episódios depressivos apresentam maior número de anos sem diagnóstico, uma maior duração da doença e mais riscos de suicídio, enquanto os com predominância maníaca apresentam mais sintomas psicóticos, história de abuso de drogas e pior funcionalidade cognitiva (COLOM et al., 2006; DABAN et al., 2006).

## **1.2. Aspectos fisiopatológicos do TAB**

O substrato neurobiológico do TAB ainda não foi completamente compreendido. Nos últimos 40 anos, estudos neurobiológicos tiveram seus focos nos neurotransmissores monoaminérgicos serotonina, noradrenalina e dopamina (MARTINOWICH; SCHLOESSER; MANJI, 2009). Um acúmulo de evidências demonstra que os sistemas neuronais monoaminérgicos apresentam diversas e extensas conexões com estruturas do sistema límbico,

do córtex pré-frontal e com circuitos estriatais que, presume-se serem responsáveis pelas manifestações comportamentais dos transtornos do humor (DREVETS, 2000).

Entretanto, nos últimos anos, a pesquisa relacionou transtornos do humor com deficiências estruturais e funcionais relacionadas com a neuroplasticidade em várias regiões do SNC (ALTSHULER et al., 1990; MANJI; LENOX, 2000). De fato, estudos pós-morte demonstraram diminuição significativa de células gliais no córtex pré-frontal e sistema límbico e de células neuronais no córtex pré-frontal e hipocampo de indivíduos com TAB (RAJKOWSKA, 2002) corroborando os achados de alterações anatômicas e funcionais observados nos estudos de neuroimagem (BRAMBILLA et al., 2002; FRANGOU; RAYMONT; BETTANY, 2002; STRAKOWSKI et al., 2000).

Além disso, estudos farmacológicos evidenciaram atividade neuroprotetora dos estabilizadores de humor diante de uma série de modelos de neurotoxicidade (CHUANG et al., 2002) e pesquisas recentes identificaram que a ação terapêutica desses fármacos envolve a regulação de diversos sistemas de sinalização intracelulares, segundos mensageiros e regulação da expressão gênica (LI; KETTER; FRYE, 2002; SCHLOESSER et al., 2008).

Um crescente corpo de estudos suporta a hipótese de que o TAB surge de anormalidades em cascatas de plasticidade celular, levando a processamento deficiente de informação nas sinapses e circuitos de mediação de funções afetivas, cognitivas, motoras e neurovegetativas (EINAT; MANJI, 2006; POST, 2007; YOUNG, 2007). De fato, em um estudo de GWAS (*genome-wide association study*) com TAB, todas as associações de risco significativas são implicadas com cascatas de sinalização (BAUM et al., 2008).

Assim, a neurobiologia do TAB pode relacionar-se mais com alterações sinápticas e de neurocircuitos do que simplesmente com um desequilíbrio de neurotransmissores (MARTINOWICH; SCHLOESSER; MANJI, 2009).

Em suma, as anormalidades estruturais, assim como a diminuição no número de células neuronais e gliais observadas nos transtornos de humor poderia indicar uma alteração do balanço entre neurogênese e morte neuronal no cérebro adulto.

### **1.3. Transtorno Afetivo Bipolar e o suicídio**

Um milhão de pessoas morrem anualmente, por suicídio, em todo mundo (BERTOLOTE; FLEISCHMANN, 2002). No Brasil, em 2005, a taxa de suicídio aumentou 21% quando comparado com o período de 1980 a 2000. Segundo o Data SUS, ocorrem 6000 suicídios por ano no Brasil, colocando-o entre os 10 primeiros países no mundo em números absolutos de morte por suicídio ([www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)).

Segundo dois autores que avaliaram estudos de autópsia psicológica, os transtornos psiquiátricos estão presentes em praticamente 100% dos suicídios completos (ARSENAULT-LAPIERRE; KIM; TURECKI, 2004; BERTOLOTE et al., 2004). O suicídio pode ser compreendido como um desfecho desfavorável para aqueles casos mais severos de transtornos psiquiátricos (MANN, 2002). Apesar disso, o suicídio é potencialmente prevenível e todos os esforços clínicos devem ser feitos nesse sentido (ANGST et al., 2005; YEREVANIAN; KOEK; MINTZ, 2003).

O risco de suicídio em pacientes com TAB 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 TAB é de aproximadamente 3,9% anualmente ou aproximadamente 3 vezes maior que a

taxa de suicídio completo (1,4% anualmente) (TONDO; ISACSSON; BALDESSARINI, 2003). A letalidade dos atentados suicidas em pacientes com TAB é 10 vezes maior que na população em geral (BALDESSARINI; POMPILI; TONDO, 2006).

#### **1.4. Transtorno Afetivo Bipolar e comorbidades**

O termo comorbidade é formado pelo prefixo “cum”, que significa contiguidade, 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 TAB com outros transtornos psiquiátricos e com doenças clínicas é frequente e está associada à pior resposta ao tratamento (COLE et al., 1993; GOODWIN; JAMISON, 1990). Os índices de comorbidade entre pacientes bipolares variam de 30% a quase 100%, conforme a metodologia e amostra selecionada (KESSLER et al., 1997; VIETA et al., 2001).

Sharma et al. (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 frequentes ao longo da vida (60% e 30%, respectivamente).

Os pacientes bipolares que apresentam comorbidade com transtornos de ansiedade e consumo de substâncias estão associados a piores desfechos no TAB, taxas mais elevadas de tentativas de suicídio, tempo mais prolongado para atingir remissão e maior risco de novos episódios (KAPCZINSKI et al., 2008; POST, 2007).

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

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

A ligação entre TAB e TP também tem sido demonstrada através de estudos genéticos (MACKINNON et al., 1997, 1998). MacKinnon et al. (2002) estudaram 203 famílias com TAB e demonstraram que a história familiar de TAB é fator de risco para TP. Essa idéia também foi reforçada por Doughty et al. (2004) 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 TAB. Esse achado clínico é corroborado por estudos que encontraram associação da comorbidade TP e marcadores no braço longo cromossomo 18 em pacientes com TAB (VIETA et al., 2001). Rotondo et al. (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 TAB sem TP.

Pesquisas e estudos clínicos nessa área são necessários para elucidar a fisiopatologia dessas associações e, conseqüentemente, propiciar um tratamento mais específico para esse subgrupo de pacientes, com bases em evidências mais consistentes.

### 1.5. Aspectos genéticos do TAB

Diversas evidências corroboram para demonstrar a importância de fatores genéticos na vulnerabilidade para o TAB. Resultados de estudos com famílias, gêmeos e adoção demonstram essa base genética (CRADDOCK; JONES, 1999).

Angst, em 1966 na Suíça, e Perris, no mesmo ano na Suécia, independentemente, apresentaram os primeiros resultados de estudos sistemáticos em famílias. Ambos demonstraram agregação familiar das alterações do humor, encontrando maior frequência de bipolares entre os familiares de bipolares e de unipolares entre os parentes de depressivos unipolares.

A concordância entre gêmeos monozigóticos varia de 60% a 80% e o risco de desenvolver TAB em parentes de primeiro grau de um portador situa-se entre 2% e 15% (CARDNO et al., 1999). Bertelsen et al. (1977) investigaram 123 pares de gêmeos e encontraram uma concordância, com relação à doença bipolar, de 79% para gêmeos monozigóticos e de 19% para gêmeos dizigóticos.

Mendlewicz & Rainer (1977) verificaram 29 adotados com TAB e observaram uma prevalência de transtornos afetivos em 31% dos pais biológicos desses indivíduos, comparado a uma prevalência de 12% nos pais adotivos. Wender et al. (1986) investigaram uma amostra dinamarquesa de 71 adotados afetados por transtornos de humor e relataram uma prevalência oito vezes maior de casos de depressão unipolar e quinze vezes maior de casos de suicídio nos pais biológicos desses indivíduos, comparados aos seus pais adotivos.

Esses dados sugerem que o TAB 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.

## 1.6. Via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina

O primeiro gene Wnt foi descoberto a 30 anos atrás, quando Nusse & Varmus (1982) relataram que um vírus induzia tumores nas glândulas mamárias de rato através da ativação da expressão de um gene até então desconhecido, o qual deram o nome de *integration 1* (Int1). Rijsewijk et al. (1987) relataram que o gene Int1 era homólogo ao gene *wingless* (Wg) da drosófila descrito por Sharma em 1973. Hoje, o termo Wnt é, portanto, uma junção de Wg e Int (NUSSE et al., 1991).

Há 19 ligantes Wnt em seres humanos e um número semelhante em outros mamíferos. Os genes Wnts codificam uma família de glicoproteínas secretoras, as quais possuem um papel central na sinalização molecular intracelular, tanto durante o desenvolvimento dos neurônios quanto no SNC maduro. Desta maneira, tais proteínas participam de diversos processos, incluindo padronização de células embrionárias e regulação da proliferação de células, polarização e determinação de processos de sobrevivência (LOVESTONE et al., 2007; WODARZ; NUSSE, 1998). A via Wnt induz células a proliferarem, diferenciarem e sobreviverem e, além disso, induz fortemente mudanças no citoesqueleto de axônios em desenvolvimento (KOZLOVSKY; BELMAKER; AGAM, 2002).

A diferenciação sináptica e a arborização terminal de axônios são reguladas por sinais retrógrados, os quais são proteínas secretórias da família Wnt. Uma diminuição na extensão do axônio combinada com um aumento cônico em seu tamanho leva a esta diferença morfológica. Tais mudanças estão fortemente relacionadas com a glicogênio sintase quinase  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ), pois proteínas Wnt sinalizam por meio desta molécula. Consistente com suas funções no tecido cerebral, a cascata Wnt é essencial para o remodelamento correto dos terminais pré-sinápticos nesse órgão (SALINAS, 2005). Paralelamente a isso, esta é uma cascata crucial para a formação e organização de neurônios do

mesencéfalo (CASTELO-BRANCO et al., 2003). Além disso, a via Wnt é certamente vital para a regionalização do cérebro dos mamíferos (SCHAFFER; WIEDAU-PAZOS; GESCHWIND, 2003), além da padronização cortical e adesão celular (FUENTEALBA et al., 2004; TORO; DEAKIN, 2007).

Embora não seja completamente conhecido como ocorre a sinalização da via Wnt, é possível que essas proteínas promovam interações com a família *frizzled* de receptores, levando à ativação das proteínas *dishevelled* (DVL) (BHANOT et al., 1996; NOORDERMEER et al., 1994). Após tal processo, a DVL inativa um complexo proteico, que contém GSK-3 $\beta$ . Tal fato, em contrapartida, leva à estabilização, acumulação e translocação nuclear de  $\beta$ -catenina (BROWN; MOON, 1998; IKEDA et al., 1998; POLAKIS, 1997; VAN LEEUWEN; SAMOS; NUSSE, 1994). Um complexo nuclear que consiste de *T-cell factor* (TCF) interage com a  $\beta$ -catenina e esta interação modifica a transcrição de genes contendo um ou mais elementos promotores do TCF (HUBER et al., 1996). No estado inativo, o complexo GSK-3/axina/APC se liga e fosforila a  $\beta$ -catenina levando esta estrutura à degradação (IKEDA et al., 1998) (Figura 1).

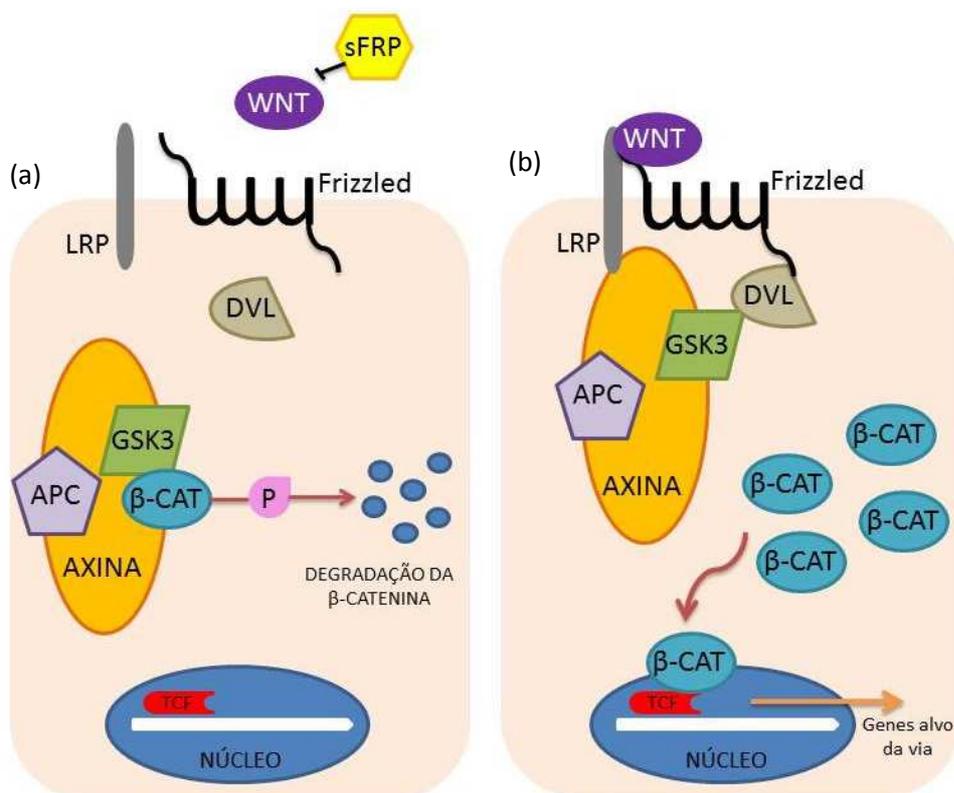


Figura 1 – Via Wnt - (a) Na ausência de WNT, a  $\beta$ -catenina é degradada e os genes-alvo estão num estado reprimido. (b) Se a sinalização Wnt está ativa, a  $\beta$ -catenina se acumula, entra no núcleo, liga-se ao TCF e ativa a transcrição.

### 1.6.1. Wnts e o desenvolvimento do sistema nervoso central

Nos vertebrados, os Wnts tem papéis bem definidos no desenvolvimento cerebral, desde a descoberta de que nocaute do gene Wnt1 em ratos produz hipotrofia dramática do cerebelo e mesencéfalo (THOMAS; CAPECCHI, 1990). A sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina é crítica para a especificação do hipocampo (GALCERAN et al., 2000; LEE et al., 2000) e para a proliferação de precursores neuronais (ZHOU et al., 2006), bem como para direcionar a migração de neurônios no córtex (ZHOU; ZHAO; PLEASURE, 2004).

### **1.6.2. Wnts e a orientação axonal**

A sinalização Wnt é importante para o desenvolvimento e a orientação axonal (BOVOLENTA; RODRIGUEZ; ESTEVE, 2006; ZOU, 2004). Geralmente, a sinalização Wnt-Fzd regula sinais positivos (LYUKSYUTOVA et al., 2003; WANG et al., 2006), enquanto a sinalização Wnt-Ryk regula sinais negativos (KEEBLE et al., 2006; LIU et al., 2005) para o crescimento dos axônios.

Especificamente, a sinalização Wnt4-Fzd3 direciona a projeção axonal dos neurônios da medula espinhal após cruzar a linha média (LYUKSYUTOVA et al., 2003), enquanto a interação Wnt5a-Ryk ajuda a direcionar axônios encaminhados através do corpo caloso (KEEBLE et al., 2006) e trato corticoespinhal (LIU et al., 2005).

Além de fornecer sinais de orientação, a sinalização Wnt regula a dinâmica do citoesqueleto do cone de crescimento e durante a ramificação axonal. O Wnt7a controla a propagação do cone de crescimento e a ramificação axonal no cerebelo (HALL; LUCAS; SALINAS, 2000; LUCAS; SALINAS, 1997), assim como o Wnt3a os neurônios da medula espinhal (KRYLOVA et al., 2002; PURRO et al., 2008).

### **1.6.3. Wnt e a formação dendrítica**

O papel da via de sinalização Wnt no desenvolvimento dos dendritos é menos conhecido. Estudos com culturas de neurônios de hipocampo mostraram que um aumento no Wnt7b (ROSSO et al., 2005) ou em Wnt2 estão associados com o aumento da complexidade das árvores dendríticas e que a transcrição do Wnt2 é regulada por atividade neuronal (WAYMAN et al., 2006).

#### 1.6.4. Sinalização Wnt e a sinapse

A sinalização Wnt também está implicada na formação e manutenção das sinapses (BUDNIK; SALINAS, 2011). A primeira evidência de que a sinalização Wnt contribui para o desenvolvimento da sinapse veio de um estudo envolvendo Wnt7a na extensão do axônio e na agregação de proteínas pré-sinápticas nos neurônios granulares cerebelares (LUCAS; SALINAS, 1997). A via Wnt também pode estar envolvida na formação de sinapses no hipocampo e no cerebelo de mamíferos (FARÍAS et al., 2010; SPEESE; BUDNIK, 2007; TANG, 2007).

O hipocampo foi intensamente estudado como um modelo para a formação de sinapses em neurônios do prosencéfalo de mamíferos devido à sua anatomia e relativa facilidade de obtenção de populações adequadamente puras de neurônios em cultura, em adição à sua importância comportamental na formação da memória (GOSLIN; BANKER, 1989). Wnt3, Wnt5a, Wnt7a e Wnt7b estão todos presentes no hipocampo dos mamíferos, apesar de Wnt3 não ser amplamente expresso (DAVIS; ZOU; GHOSH, 2008; ROSSO et al., 2005). Os receptores de Wnt Fzd3, Fzd5, Fzd8 e Fzd9 também são expressos no hipocampo pós-natal (DAVIS; ZOU; GHOSH, 2008; ZHOU et al., 2010). Estes Wnts e Fzds são, portanto, candidatos naturais para considerar o papel da via de sinalização Wnt nas sinapses de mamíferos.

O conhecimento atual sobre o papel dos Wnts "canônicos" - aqueles associados com a sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina - na formação de sinapses é simples. Evidências disponíveis concordam que Wnt3a, Wnt7a, e Wnt7b aumentam os níveis nucleares de  $\beta$ -catenina e promovem a organização dos sítios pré-sinápticos no cerebelo (AHMAD-ANNUAR et al., 2006; LUCAS; SALINAS, 1997), bem como em cultura de células hipocámpais (DAVIS; ZOU; GHOSH, 2008).

Através da sinalização Wnt, Wnt7a/7b em ratos também se mostrou aumentada pela exposição a um ambiente de estímulos enriquecidos, com aumento da complexidade do terminal sináptico de neurônios hipocampais (GOGOLLA et al., 2009). Estas alterações, no entanto, parecem ser através de algum outro mecanismo que não a via completa de sinalização canônica Wnt/ $\beta$ -catenina, pois o resultado da sua sinalização, tanto quanto é atualmente conhecida, não é por regulação da transcrição mediada por  $\beta$ -catenina. Elas tem sido associadas a mudanças na organização dos microtúbulos (HALL; LUCAS; SALINAS, 2000), no agrupamento da proteína APC (FARÍAS et al., 2007) e na adesão célula-célula mediada por  $\beta$ -catenina (BAMJI et al., 2003), o último, dos quais não tenha sido mostrado para ser disparado por via de sinalização Wnt / FZD / Dvl.

### **1.7. Via Wnt/ $\beta$ -catenina e o TAB**

Os Wnts compreendem uma classe de proteínas secretadas que controlam processos de desenvolvimento essenciais tais como crescimento celular, migração e diferenciação celular (MIKELS; NUSSE, 2006). Anormalidades nestas vias têm sido implicadas em inúmeras doenças crônicas, como câncer (MOON et al., 2004), e mais recentemente, em alguns distúrbios psiquiátricos, como a esquizofrenia (ALEKSIC et al., 2010; KATSU et al., 2003).

Várias linhas de evidências sugerem que a via Wnt pode, também, estar envolvida na etiologia do TAB (GOULD; MANJI, 2002; SCHLOESSER et al., 2008). Primeiro, a via de sinalização Wnt influencia a neuroplasticidade (SCHLOESSER et al., 2008), a sobrevivência celular, e a neurogênese no adulto. Estudos recentes tem sugerido prejuízo nessas funções no TAB. Por exemplo, verificou-se que o Wnt7a é crítico para o remodelamento e crescimento axonal no cerebelo (HALL; LUCAS; SALINAS, 2000); camundongos com gene Wnt1 inativos tiveram o desenvolvimento de regiões do cérebro afetadas (MCMAHON;

BRADLEY, 1990), e o Wnt3 aumentou a neurogênese no hipocampo de rato adulto (LIE et al., 2005).

A sinalização Wnt regula, em todos os organismos multicelulares, a proliferação, diferenciação, migração e morfogênese celular (WODARZ; NUSSE, 1998). Além disso, a expressão de ligantes Wnt e os mecanismos de sinalização Wnt no sistema nervoso maduro (SHIMOGORI et al., 2004; TISSIR; GOFFINET, 2006) sugerem que a via Wnt desempenha um papel na neuroproteção e na plasticidade sináptica. Notavelmente, todas estas funções estão significativamente envolvidas na fisiopatologia dos graves transtornos de humor recorrentes. Assim, a cascata Wnt parece ser bem adequada como via molecular relevante que regula as funções do cérebro e sua desregulação pode estar envolvida na fisiopatologia do TAB. Estudos sobre a via Wnt são relativamente novos na literatura psiquiátrica, particularmente aqueles que aproximam a via Wnt e suas aplicações clínicas no TAB.

Segundo, fármacos estabilizadores do humor e antipsicóticos utilizados para tratar o transtorno afetivo bipolar afetam a via de sinalização Wnt, particularmente através do GSK-3 $\beta$ , uma enzima chave nesta via. O Lítio é considerado um importante fármaco no tratamento do TAB, tanto para a fase aguda como na profilaxia de episódios maníacos e depressivos recorrentes (MANJI et al., 1999). Diversos são os benefícios desse fármaco, incluindo ação antimaniaca e antidepressiva, além de profilaxia a longo prazo e efeitos anti-suicida (MANJI et al., 1999). Ações terapêuticas do lítio incluem propriedades neuroprotetoras significativas. Foi demonstrado por diversos investigadores que o lítio inibe a atividade de GSK-3 $\beta$  e que o efeito neurotrófico e benéfico do lítio pode estar relacionado com o seu efeito sobre o GSK-3 $\beta$  (KLEIN; MELTON, 1996; MANJI; MOORE; CHEN, 1999; PANDEY et al., 2010). O lítio inibe esta enzima, levando à ativação da via de sinalização Wnt (KLEIN; MELTON, 1996). Variações genéticas no gene da GSK-3 $\beta$  estão associadas ao risco de TAB (LIN; HUANG; LIU, 2013) e variação no número de cópias de segmentos de DNA

(*copy number variations*) no gene GSK-3 $\beta$  estão aumentadas em pacientes bipolares (LACHMAN et al., 2007). Por isso, recentemente, essa via tem aparecido no campo da pesquisa psiquiátrica, uma vez que o lítio é conhecido por afetar a sinalização Wnt.

Em terceiro, foi mostrado que gêmeos monozigóticos discordantes para o transtorno afetivo bipolar apresentaram expressão diferente de genes da via de sinalização Wnt (MATIGIAN et al., 2007). Entre 292 genes com expressão diferenciada, 8 eram da via de sinalização Wnt. Um destes foi o TCF7, um fator de transcrição ativado pela  $\beta$ -catenina. Isto sugere o papel da via de sinalização Wnt na patofisiologia do TAB.

Embora não haja evidência direta de que as anormalidades da via Wnt estejam associadas com o TAB, estudos recentes sugerem um possível envolvimento da presente sinalização no cérebro de pacientes com TAB (PANDEY et al., 2010; ZANDI et al., 2008). Recente entendimento das proteínas de sinalização Wnt aponta fortemente para um envolvimento dessas moléculas na regulação de muitos eventos que parecem ser primordiais na fisiopatologia do TAB, tais como controle da progressão do ciclo celular e crescimento celular (JIN; GEORGE FANTUS; SUN, 2008).

### **1.8. Genes candidatos**

Os estudos de genes candidatos tem como objetivo localizar genes associados a alguma patologia, e a escolha desses genes é feita a partir de hipóteses neurobiológicas da patologia. O estudo de genes candidatos é um tipo de estudo de associação, onde verifica-se se a frequência de determinadas variações na estrutura do DNA, chamadas polimorfismos de base única (SNPs), são significativamente diferentes entre a população de afetados e a de não afetados.

Os SNPs são trocas ocorridas no DNA onde um nucleotídeo é trocado por outro (PENNISI, 1998). Essas modificações pontuais nas sequências de DNA são encontradas tanto nas regiões do genoma codificantes de proteínas (éxons) quanto nas não codificantes (íntrons). Os SNPs nas regiões codificantes são chamados de SNPs funcionais e os SNPs nas regiões não codificantes são chamados de SNPs silenciosos.

A maior parte dos SNPs identificados em genes humanos não resulta em alterações na sequência proteica (SNPs silenciosos) devido a sua localização em regiões não traduzidas. Assim, apenas uma pequena parcela dos SNPs têm a capacidade de alterar a composição das proteínas, o que por sua vez poderia levar à modificações da sua atividade biológica. Porém, Komar (2007) mostrou em seu estudo a grande importância de se estudar os SNPs silenciosos, pois eles podem conduzir à síntese de proteína, com a mesma sequência de aminoácidos, mas com propriedades estruturais e funcionais diferentes. Assim, um SNPs silencioso não deve ser negligenciado na determinação de susceptibilidade no desenvolvimento de doenças.

O tagSNP é um representante de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em uma região com alto desequilíbrio de ligação. Isto significa que todos os polimorfismos desta região estão altamente ligados e que permanecem juntos na divisão celular. O tagSNP é o seu representante mais importante e ao se estudar o comportamento do tagSNP se estuda todos os polimorfismos desta região. É possível identificar a variação genética sem genotipar cada SNP em uma região cromossômica.

Ainda são poucos os estudos relacionando genes da via Wnt e o TAB, e por esse motivo nosso estudo irá caracterizar geneticamente os pacientes com TAB utilizando os genes WNT2b, WNT3a, WNT5a, WNT7a, APC1 e FZD3, todos pertencentes a via de sinalização Wnt e expressos no SNC.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar possíveis associações de susceptibilidade entre polimorfismos dos genes WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT7A, APC1 e FZD3, todos pertencentes a via Wnt, e o transtorno afetivo bipolar.

### **2.2. Objetivos específicos**

Analisar as frequências gênicas de polimorfismos de genes da via Wnt em um grupo de pacientes com transtorno bipolar comparando-os a um grupo controle.

Investigar se as frequências dos polimorfismos de genes da via Wnt estão associadas a dados clínicos como comportamento suicida e transtorno do pânico como comorbidade.

Avaliar se há efeito sinérgico entre os tagSNPs selecionados na amostra de TAB.

### **3. Material e Métodos**

### **3.1. Amostra estudada**

Participaram deste estudo, 546 indivíduos, sendo 306 pacientes com transtorno bipolar tipo I e II e 240 controles. Todos os indivíduos do estudo são caucasianos autodeclarados e foram selecionados no Ambulatório de Transtorno Bipolar (Instituto de Previdência do Estado de Minas Gerais). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Previdência do Estado de Minas Gerais. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento esclarecido após uma explicação clara e detalhada sobre os procedimentos a serem realizados no estudo.

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. O comportamento suicida foi avaliado através de entrevista clínica e análise de prontuários médicos.

### **3.2. 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), modificado por (SALAZAR et al., 1998), como segue:

- Homogeneizou-se delicadamente a amostra no tubo contendo EDTA para, em seguida, transferir o sangue colhido para um tubo falcon de 50 mL;
- Adicionou-se a solução tampão TKM1 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM EDTA) para lavagem do sangue, retirando o

excesso de plasma e de hemácias da amostra. O volume de TKM1 adicionado é correspondente ao volume de sangue coletado;

- 500  $\mu\text{L}$  do reagente Triton X-100 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ) foram adicionados para lise celular dos leucócitos. O conteúdo foi agitado vigorosamente e centrifugado por 15 min a 4 °C (2600 rpm). Desprezou-se o sobrenadante e o pellet (parte sedimentada na centrifugação contendo o DNA) foi mantido;
- O pellet foi lavado novamente com TKM1 para retirada do Triton X-100. O conteúdo foi agitado vigorosamente e centrifugado por 10 min a 4°C (1600 rpm). Desprezou-se o sobrenadante;
- Ressuspendeu-se o pellet em 1600  $\mu\text{L}$  de solução tampão de TKM2 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4 M NaCl; 20 mM EDTA) e 100  $\mu\text{L}$  de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% para reafirmar a lise dos leucócitos;
- O conteúdo foi agitado vigorosamente com o auxílio de um vórtex, para fragmentação do pellet;
- Incubou-se o tubo falcon em banho maria a 55 °C durante 10 a 20 min;
- Depois, 900  $\mu\text{L}$  de cloreto de sódio 6 M foram adicionados para precipitação das proteínas;
- Centrifugou-se o tubo falcon por 15 min a 4 °C (15000 rpm);
- O sobrenadante foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, contendo 5 mL de etanol absoluto para precipitação do DNA;
- O DNA foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta Pasteur e mergulhado em outro tubo falcon de 15 mL, contendo 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. O tubo foi deixado aberto para secagem do etanol;
- O DNA foi ressuspendido em 500  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 a 8,0) e acondicionado a 4°C, devidamente identificado.

A quantificação do DNA foi realizada no aparelho de espectrofotômetro e, posteriormente, sua concentração foi ajustada para 50 ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.3. 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 sequências 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 sequências 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 sequência 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 sequência 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 (Figura 2).

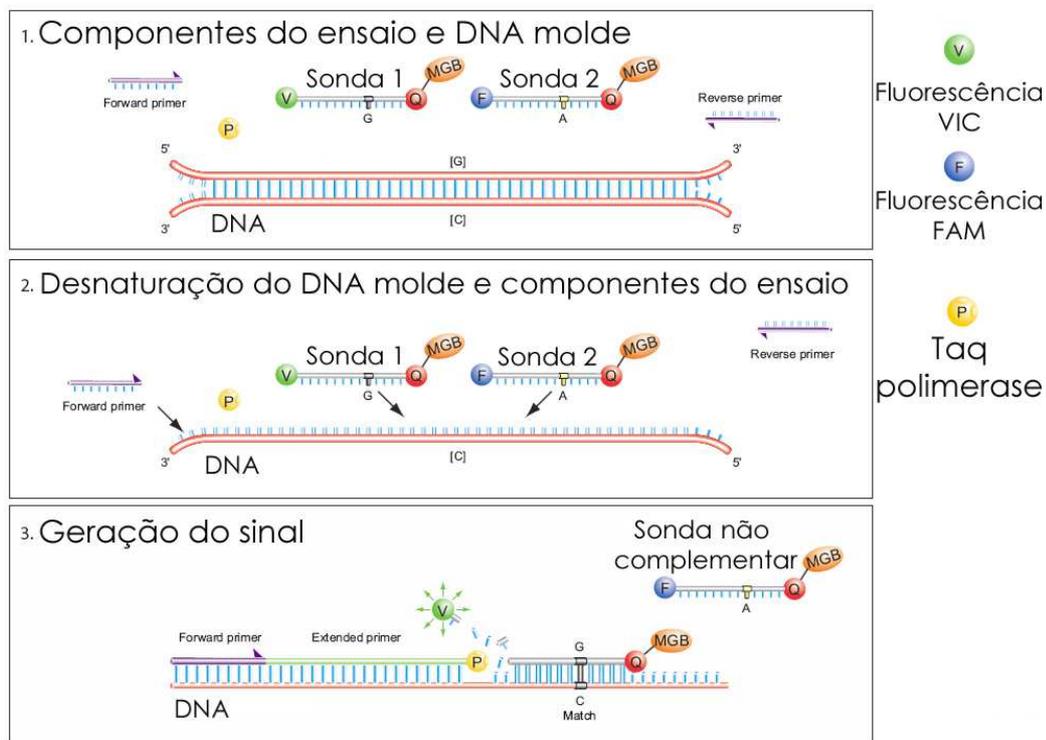


Figura 2. Esquema ilustrativo do mecanismo da PCR em tempo real

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. A leitura da fluorescência é feita ao final de cada ciclo. Para a análise dos produtos da reação, foi utilizado o modo de discriminação alélica (Figura 3) do software que acompanha o aparelho.

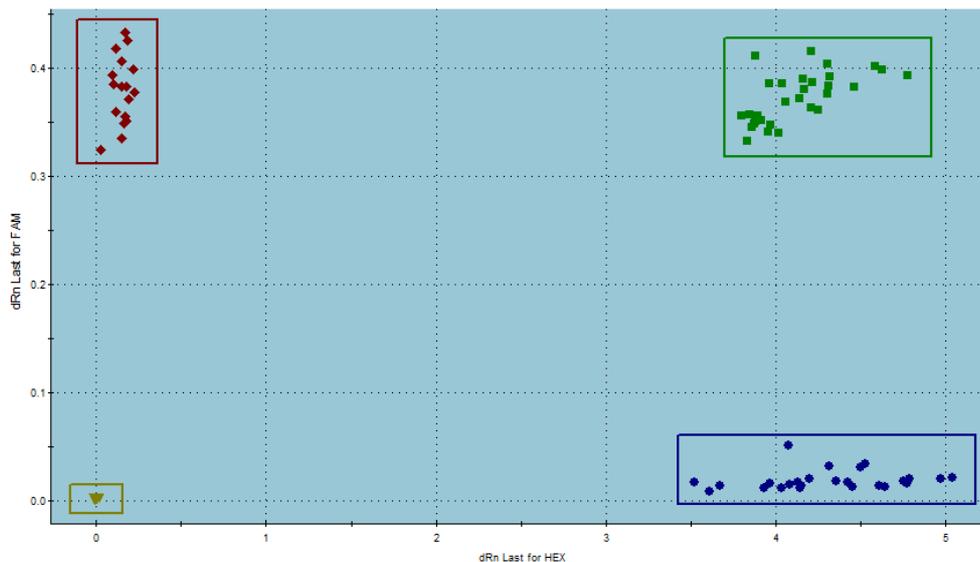


Figura 3 - Resultado ilustrativo da análise da discriminação alélica em uma PCR em tempo real

Cada ponto é o resultado de uma amostra, os pontos em vermelho no canto superior esquerdo são homocigotos para o alelo marcado com a fluorescência FAM, os pontos em azul no canto inferior direito representam os indivíduos homocigotos para o alelo marcado com a fluorescência HEX e os pontos em verde no canto superior direito são heterocigotos (um alelo marcado com a fluorescência FAM e o outro com a HEX). Os pontos em marrom no canto inferior esquerdo são os controles negativos.

Dez por cento das amostras foram genotipadas novamente, de forma aleatória, como controle de qualidade, para garantir a exclusão de possíveis erros laboratoriais.

### 3.4. Escolha dos polimorfismos

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 rs351370, rs3790606, rs351372, rs3121310, rs708122, rs3121309, rs1745423, rs7622120, rs566926, rs11128663, rs1433354, rs9863149, rs12634816, rs3762720, rs7419262, rs4447635, rs10503830, rs352203. As informações referentes aos marcadores estão na tabela 1 e as sequências correspondentes aos SNPs estudados na tabela 2.

Tabela 1. Informações sobre os marcadores estudados

Gene	SNPs	Localização	Posição	Alelos*
WNT2B	rs3790606	Chr.1	112853709	G>C
	rs351370	Chr.1	112856182	C>T
	rs351372	Chr.1	112860743	A>T
WNT3A	rs708122	Chr.1	226283620	G>T
	rs3121309	Chr.1	226289659	G>A
	rs1745423	Chr.1	226290776	C>A
	rs3121310	Chr.1	226291447	G>A
WNT5A	rs7622120	Chr.3	55479770	G>A
	rs566926	Chr.3	55495818	C>A
WNT7A	rs12634816	Chr.3	13847271	G>A
	rs9863149	Chr.3	13858361	T>C
	rs3762720	Chr.3	13870818	C>G
	rs1433354	Chr.3	13872246	A>G
	rs11128663	Chr.3	13887851	G>C
APC1	rs4447635	Chr.2	255970	C>G
	rs7419262	Chr.2	263621	G>C
FZD3	rs10503830	Chr.8	28448462	T>G
	rs352203	Chr.8	28450620	T>C

\* (alelo ancestral &gt; alelo polimórfico)

Tabela 2. Sequências correspondentes aos polimorfismos estudados

Gene	SNPs	Sequência [vic/fam]
WNT2B	rs3790606	CTTCGACGGGTTGGAGACGATTCCGG[C/G]CAGGACTGTCACTGAAATCTGAAGT
	rs351370	TGTTCAAAGTTCTATATGTGCTGGG[C/T]TGAATCATGTACACTAGGGGCTGTA
	rs351372	GGAGCTTAGGAATGCCTAGGGTCAA[A/T]CAGGTGCGTGAAGAGTCTTCACATA
WNT3A	rs708122	CGTTCTGGGGTAGAGGACACAGATC[A/C]CACCCTCGATGGAGCATCAAGGTC
	rs3121309	AGAATCACTGTGACAAAGCAGAGAC[A/G]TGAACCTTGGCAGCCTGGCTCCAAA
	rs1745423	CATATCCTCACACCTCCTGCTTTCA[G/T]CCCCATCTGCCGTCCACCTGGCCTG
	rs3121310	AGTAAGTGTGCTCCCACTCCC[A/G]GTGGACACTCCCAGAGCCCTGGGG
WNT5A	rs7622120	TATTCCTTCATTACCAGAAGTCTT[A/G]TGTTGCCTTCTTAAAAATTCTTCC
	rs566926	CCCCTTTTTCTCAAAAATCAAAT[G/T]GTTTGCAGAACGGGTGGTGCACCA
WNT7A	rs12634816	CCTCCAGGGCAGACAGAGCTCCCA[A/G]TGTTGCCAGCCCTAAGGCCTTTTTA
	rs9863149	GGAAGCAGCGAGACAGACTGGAGGG[C/T]GAGTTCAAATATGGTGGTCAGGAAA
	rs3762720	GAGTAACATTCAATTCGTCTTAAGG[C/G]AGACTCAATTATCCAACCTCTTCAG
	rs1433354	AAAGCAACCTATGGGAAGCCCTGTG[C/T]GTGGTATAAGCCCTGAGGAGCACTG
	rs11128663	GGAGGAGCGCAGTGACCCTAAATGT[C/G]ATGCTTGCTTCTTGATGTCTGGAG
ACP1	rs4447635	GCCTTTTTATTTTATAAAGTCAAAC[C/G]TAAATATTCCTCCTTTGCTTTCCC
	rs7419262	TCTGCAGCACTGGTTTTTATATGG[C/G]GTTTCTAGTTGTTTTAGTAGTAGG
FZD3	rs10503830	TTTGCTAAAAACCAATAAGGTTGC[G/T]TAACAGTTATCTCTCACATTACAGA
	rs352203	TGCCAGAAAATATTACAGAATACGA[C/T]ATGAAGGAAACATAGACTATTATAG

### 3.5. Análise Estatística

As análises de associação de alelos, genótipos, estimativa de risco determinada pela presença dos polimorfismos (odds ratio, OR) e 1000 permutações (teste de correção de falsos positivos – erro tipo I) foram feitas no programa UNPHASED (DUDBRIDGE, 2008). O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado utilizando o programa Haploview 4.1 (BARRETT et al., 2005). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

A fim de investigar a existência de uma interação entre os genes selecionados na susceptibilidade ao transtorno afetivo bipolar empregou-se o software MDR, versão 2.0 beta 8.4. Os resultados provenientes das suas análises foram representados sob forma de dendograma, uma das ferramentas visuais para interpretação dos modelos de interação gene-gene (MOORE et al., 2006). É importante ressaltar que o uso deste software reduz as chances de falsos positivos, em função da estratégia de validação cruzada empregada no método (MOORE et al., 2006; RITCHIE, 2011). Neste modelo o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$  e também foi aplicada a análise das 1000 permutações.

## **4. Resultados**

#### 4.1. Caracterização amostral

A amostra foi constituída por 546 indivíduos, subdividindo-se em 306 pacientes com TAB e 240 controles saudáveis. Destes, 93 sujeitos eram do sexo masculino, com média de idade de  $20,28 \pm 14,44$  e 213 eram do sexo feminino, com média de  $42,97 \pm 12,95$ . Não tivemos acesso a idade de 9 pacientes.

Dos 240 controles, 76 indivíduos eram do sexo masculino, com média de idade de  $41,19 \pm 16,59$ , e 156 do sexo feminino, com média de  $45,68 \pm 20,00$ . Oito indivíduos não foram identificados quanto ao sexo e não tivemos acesso a idade de 36 indivíduos.

Os dados demográficos e clínicos encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos da população estudada

	<b>Casos (n=306)</b>	<b>Controles (n=240)</b>
<b>Sexo (F/M)</b>	213/93	156/76
<b>TAB tipo I</b>	259	NA
<b>História de tentativa de suicídio</b>	132	NA
<b>História de suicídio violento</b>	53	NA
<b>Presença de comorbidade de pânico</b>	54	NA
<b>Presença de comorbidade de transtorno de ansiedade generalizada</b>	90	NA

## 4.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A tabela 4 mostra os valores de p para Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), nos grupos caso e controle individualmente. Os grupos com valor de p menor que 0.05 estão fora de EHW.

Nesta mesma tabela encontram-se os valores da frequência do menor alelo (MAF) na nossa população e as frequências na população caucasiana européia (MAF CEU) que são disponibilizados no banco de dados do HapMap e do NCBI.

Tabela 4. EHW e MAF dos tagSNPs do estudo

TagSNP	Caso	Controle	MAF (%)	MAF CEU (%)
<b>ACP1</b>	$\chi^2$ -valor de p			
rs4447635	0.80	0.55	0.27	0.36
rs7419262	<b>0.002</b>	0.06	0.45	0.32
<b>WNT2B</b>				
rs3790606	<b>0.0003</b>	0.10	0.26	0.31
rs351370	0.66	0.92	0.37	0.38
rs351372	0.51	0.52	0.48	0.45
<b>WNT5A</b>				
rs7622120	0.79	0.17	0.42	0.47
rs566926	<b>0.02</b>	0.80	0.18	0.27
<b>WNT7A</b>				
rs12634816	<b>0.000012</b>	0.17	0.32	0.30
rs9863149	<b>0.02</b>	<b>0.0014</b>	0.36	0.27
rs3762720	<b>0.00000</b>	<b>0.00002</b>	0.37	0.23
rs1433354	0.23	0.17	0.43	0.27
rs11128663	<b>0.00003</b>	<b>0.00001</b>	0.40	0.43
<b>WNT3A</b>				
rs708122	0.15	<b>0.02</b>	0.29	0.36
rs3121309	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	0.22	0.27
rs1745423	<b>0.03</b>	0.45	0.35	0.38
rs3121310	0.51	0.84	0.34	0.29
<b>FZD3</b>				
rs10503830	<b>0.006</b>	<b>0.01</b>	0.22	0.33
rs352203	0.45	0.90	0.38	0.40

### 4.3. Análise de frequências

#### 4.3.1. Caso / Controle

Para o gene ACP1, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica entre os grupos caso e controle (Tabela 5).

Tabela 5. Frequências alélica e genotípica do gene ACP1

<i>Frequência</i>							
SNP	Alelos	TAB N (%)	Controles N (%)	$X^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)	
ACP1	rs4447635	G*	163 (26.81)	135 (28.36)	0.32 (1)	0.5702	1.00 (ref.)
		C	445 (73.19)	341 (71.64)			1.08 (0.82-1.41)
	rs7419262	GG	21 (6.90)	21 (8.82)	0.68 (2)	0.7113	1.00 (ref.)
		GC	121 (39.80)	93 (39.08)			1.30 (0.67-2.52)
CC		162 (53.29)	124 (52.10)	1.30 (0.68-2.49)			
rs7419262	G	318 (52.13)	272 (56.67)	2.22 (1)	0.1355	1.00 (ref.)	
		C*	292 (47.87)			208 (43.33)	1.20 (0.94-1.52)
	rs7419262	GG	96 (31.48)	84 (35.00)	2.31 (2)	0.3135	1.00 (ref.)
		GC	126 (41.31)	104 (43.33)			1.06 (0.71-1.56)
CC		83 (27.21)	52 (21.67)	1.39 (0.88-2.19)			

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT2B, encontramos diferenças significativas na frequência alélica do rs3790606 entre os grupos caso e controle (Tabela 6). O alelo polimórfico está mais frequente no grupo de pacientes bipolares. Porém, após o teste de correção de 1000 permutações a significância não se manteve.

Tabela 6. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	TAB N (%)	Controles N (%)	$X^2(df)$	Valor p (+)	OR (95%CI)
<b>WNT2B</b>						
rs3790606	G	429 (71.50)	363 (76.91)	4.02 (1)	<b>0.044</b> (0.061)	1.00 (ref.)
	C*	171 (28.50)	109 (23.09)			1.32 (1.00-1.75)
	GG	166 (55.33)	144 (61.02)	4.31 (2)	0.1158	1.00 (ref.)
	GC	97 (32.33)	75 (31.78)			1.12 (0.77-1.63)
	CC	37 (12.33)	17 (7.20)			1.88 (1.02-3.49)
rs351370	T*	354 (62.32)	286 (62.72)	0.01 (1)	0.8966	1.00 (ref.)
	C	214 (37.68)	170 (37.28)	1.01 (0.78-1.31)		
	TT	112 (39.44)	90 (39.47)	0.06 (2)	0.9685	1.00 (ref.)
	TC	130 (45.77)	106 (46.49)			0.98 (0.67-1.43)
	CC	42 (14.79)	32 (14.04)			1.05 (0.61-1.80)
rs351372	T	323 (53.12)	237 (49.38)	1.51 (1)	0.2191	1.00 (ref.)
	A	285 (46.88)	243 (50.62)	0.86 (0.67-1.09)		
	TT	83 (27.30)	61 (25.42)	2.33 (2)	0.3105	1.00 (ref.)
	TA	157 (51.64)	115 (47.92)			1.00 (0.66-1.51)
	AA	64 (21.05)	64 (26.67)			0.73 (0.45-1.18)

\*alelo polimórfico; (+) valor de p corrigido por 1000 permutações

Para o gene WNT5A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica entre os grupos caso e controle (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	TAB N (%)	Controles N (%)	$X^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT5A</b>						
rs7622120	G	341 (56.83)	271 (57.66)	0.07 (1)	0.7862	1.00 (ref.)
	A*	259 (43.17)	199 (42.34)			1.03 (0.81-1.32)
	GG	98 (32.67)	73 (31.06)	1.52 (2)	0.4671	1.00 (ref.)
	GA	145 (48.33)	125 (53.19)			0.86 (0.58-1.27)
	AA	57 (19.00)	37 (15.74)			1.14 (0.68-1.91)
rs566926	A	116 (19.14)	84 (17.72)	0.35 (1)	0.5504	1.00 (ref.)
	C*	490 (80.86)	390 (82.28)			0.90 (0.66-1.24)
	AA	17 (5.61)	8 (3.37)	1.61 (2)	0.4463	1.00 (ref.)
	AC	82 (27.06)	68 (28.69)			0.44 (0.20-1.00)
	CC	204 (67.33)	161 (67.93)			0.41 (0.19-0.89)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT3A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica entre os grupos caso e controle (Tabela 8).

Tabela 8. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	TAB N (%)	Controles N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT3A</b>						
rs708122	G	397 (72.71)	307 (68.83)	1.78 (1)	0.1813	1.00 (ref.)
	T*	149 (27.29)	139 (31.17)			0.82 (0.62-1.09)
	GG	149 (20.48)	113 (31.06)	2.01 (2)	0.3655	1.00 (ref.)
	GT	99 (47.10)	81 (43.40)			0.92 (0.63-1.35)
TT	25 (32.42)	29 (25.53)	0.65 (0.36-1.17)			
rs3121309	G	448 (76.71)	352 (78.22)	0.33 (1)	0.5646	1.00 (ref.)
	A*	136 (23.29)	98 (21.78)			1.09 (0.81-1.46)
	GG	190 (65.07)	150 (66.67)	0.28 (2)	0.8670	1.00 (ref.)
	GA	68 (23.29)	52 (23.11)			1.03 (0.67-1.57)
AA	34 (11.64)	23 (10.22)	1.16 (0.65-2.06)			
rs1745423	A*	199 (33.17)	178 (37.39)	2.08 (1)	0.1491	1.00 (ref.)
	C	401 (66.83)	298 (62.61)			1.20 (0.93-1.54)
	AA	41 (13.67)	36 (15.13)	2.65 (2)	0.2652	1.00 (ref.)
	AC	117 (39.00)	106 (44.54)			0.96 (0.57-1.62)
CC	142 (47.33)	96 (40.34)	1.29 (0.77-2.17)			
rs3121310	G	387 (64.29)	318 (66.25)	0.45 (1)	0.5002	1.00 (ref.)
	A*	215 (35.71)	162 (33.75)			1.09 (0.84-1.40)
	GG	127 (42.19)	106 (44.17)	0.52 (2)	0.7697	1.00 (ref.)
	GA	133 (44.19)	106 (44.17)			1.04 (0.72-1.50)
AA	41 (13.62)	28 (11.67)	1.22 (0.70-2.10)			

\*alelo polimórfico

Para o gene FZD3, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica entre os grupos caso e controle (Tabela 9).

Tabela 9. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3

<i>Frequência</i>						
SNP	Genótipo	TAB N (%)	Controles N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>FZD3</b>						
rs10503830	T	443 (77.18)	371 (78.60)	0.30 (1)	0.5808	1.00 (ref.)
	G*	131 (22.82)	101 (21.40)			1.08 (0.80-1.45)
	TT	179 (62.37)	152 (62.37)	0.26 (2)	0.8764	1.00 (ref.)
	TG	85 (29.62)	67 (29.62)			1.07 (0.73-1.58)
GG	23 (8.01)	17 (7.20)	1.14 (0.59-2.23)			
rs352203	T	372 (61.79)	284 (60.17)	0.29 (1)	0.5879	1.00 (ref.)
	C*	230 (38.21)	188 (39.83)	0.93 (0.72-1.19)		
	TT	118 (39.20)	85 (36.02)	0.63 (2)	0.7286	1.00 (ref.)
	TC	136 (45.18)	114 (48.31)			0.85 (0.59-1.24)
	CC	47 (15.61)	37 (15.68)			0.91 (0.54-1.52)

\*alelo polimórfico

## 4.3.2. Tipo de TAB

Para o gene ACP1, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB tipo I com o tipo II (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências alélica e genotípica do gene ACP1

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	TAB II N (%)	TAB I N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>ACP1</b>						
rs4447635	G*	30 (29.41)	135 (26.26)	0.42 (1)	0.5153	1.00 (ref.)
	C	72 (70.59)	379 (73.74)			0.85 (0.53-1.36)
	GG	7 (13.73)	15 (5.83)	4.13 (2)	0.1263	1.00 (ref.)
	GC	16 (31.37)	105 (40.86)			0.32 (0.11-0.92)
	CC	28 (54.90)	137 (53.31)			0.43 (0.16-1.73)
rs7419262	G	50 (49.02)	271 (52.52)	0.41 (1)	0.5181	1.00 (ref.)
	C*	52 (50.98)	245 (47.48)			1.15 (0.75-1.75)
	GG	17 (33.33)	80 (31.01)	2.83 (2)	0.2420	1.00 (ref.)
	GC	16 (31.37)	111 (43.02)			0.67 (0.32-1.42)
	CC	18 (35.29)	67 (25.97)			1.26 (0.60-2.64)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT2B, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB tipo I com o tipo II (Tabela 11).

Tabela 11. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	TAB II N (%)	TAB I N (%)	$X^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT2B</b>						
rs3790606	G	66 (67.35)	367 (72.53)	1.06 (1)	0.3027	1.00 (ref.)
	C*	32 (32.65)	139 (27.47)			1.28 (0.80-2.03)
	GG	25 (51.02)	143 (56.52)	0.96 (2)	0.6169	1.00 (ref.)
	GC	16 (32.65)	81 (32.02)			1.13 (0.57-2.24)
CC	8 (16.33)	29 (11.46)	1.57 (0.64-3.84)			
rs351370	T*	57 (59.38)	301 (62.97)	0.43 (1)	0.5085	1.00 (ref.)
	C	39 (40.62)	177 (37.03)			1.16 (0.74-1.82)
	TT	16 (33.33)	97 (40.59)	1.00 (2)	0.6043	1.00 (ref.)
	TC	25 (52.08)	107 (44.77)			1.41 (0.71-2.81)
CC	7 (14.58)	35 (14.64)	1.21 (0.46-3.19)			
rs351372	T	56 (54.90)	272 (52.92)	0.13 (1)	0.7136	1.00 (ref.)
	A	46 (45.10)	242 (47.08)			0.92 (0.60-1.41)
	TT	11 (21.57)	73 (28.40)	5.90 (2)	0.0521	1.00 (ref.)
	TA	34 (66.67)	126 (49.03)			1.79 (0.85-3.74)
AA	6 (11.76)	58 (22.57)	0.68 (0.23-1.96)			

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT5A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB tipo I com o tipo II (Tabela 12).

Tabela 12. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	TAB II N (%)	TAB I N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT5A</b>						
rs7622120	G	52 (52.00)	292 (57.48)	1.01 (1)	0.3134	1.00 (ref.)
	A*	48 (48.00)	216 (42.52)			1.24 (0.81-1.91)
	GG	12 (24.00)	87 (34.25)	2.22 (2)	0.3280	1.00 (ref.)
	GA	28 (56.00)	118 (46.46)			1.72 (0.82-3.57)
AA	10 (20.00)	49 (19.29)	1.48 (0.59-3.67)			
rs566926	A	17 (16.67)	101 (19.73)	0.46 (1)	0.4674	1.00 (ref.)
	C*	85 (83.33)	411 (80.27)			1.22 (0.69-2.16)
	AA	1 (1.96)	16 (6.25)	1.91 (2)	0.3847	1.00 (ref.)
	AC	15 (29.41)	69 (26.95)			3.47 (0.42-28.29)
	CC	35 (68.63)	171 (66.80)			3.27 (0.42-25.51)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT3A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB tipo I com o tipo II (Tabela 13).

Tabela 13. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	TAB II N (%)	TAB I N (%)	$X^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT3A</b>						
rs708122	G	61 (67.78)	342 (74.03)	1.44 (1)	0.2287	1.00 (ref.)
	T*	29 (32.22)	120 (25.97)			1.35 (0.83-2.20)
	GG	23 (20.48)	129 (31.06)	2.40 (2)	0.3001	1.00 (ref.)
	GT	15 (47.10)	84 (43.40)			1.00 (0.49-2.02)
TT	7 (32.42)	18 (25.53)	2.18 (0.81-5.80)			
rs3121309	G	75 (76.53)	379 (76.72)	0.001 (1)	0.9676	1.00 (ref.)
	A*	23 (23.47)	115 (23.28)			1.01 (0.60-1.68)
	GG	160 (67.35)	160 (64.78)	0.90 (2)	0.6371	1.00 (ref.)
	GA	59 (18.37)	59 (23.89)			0.73 (0.33-1.63)
AA	28 (14.29)	28 (11.34)	1.21 (0.48-3.00)			
rs1745423	A*	39 (39.00)	162 (31.89)	1.86 (1)	0.1716	1.00 (ref.)
	C	61 (61.00)	346 (68.11)			0.73 (0.47-1.14)
	AA	9 (13.67)	32 (15.13)	1.67 (2)	0.4330	1.00 (ref.)
	AC	21 (39.00)	98 (44.54)			0.76 (0.31-1.83)
CC	20 (47.33)	124 (40.34)	0.57 (0.23-1.37)			
rs3121310	G	60 (58.82)	332 (65.35)	1.55 (1)	0.2127	1.00 (ref.)
	A*	42 (41.18)	176 (34.65)			1.32 (0.85-2.03)
	GG	19 (37.25)	110 (43.31)	1.74 (2)	0.4139	1.00 (ref.)
	GA	22 (43.14)	112 (44.09)			1.13 (0.58-2.21)
AA	10 (19.61)	32 (12.60)	1.80 (0.76-4.28)			

\*alelo polimórfico

Para o gene FZD3, encontramos diferença significativa na frequência genotípica do rs10503830 ( $p_{\text{corrigido}}=0.046$ ) quando comparamos o grupo de pacientes com TAB tipo I com o tipo II (Tabela 14).

Tabela 14. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3

<i>Frequência</i>						
SNP	Genótipo	TAB II N (%)	TAB I N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p (corrigido)	OR (95%CI)
<b>FZD3</b>						
rs10503830	T	77 (81.91)	370 (76.13)	1.55 (1)	0.2118	1.00 (ref.)
	G*	17 (18.09)	116 (23.87)			0.70 (0.40-1.23)
	TT	35 (74.47)	146 (60.08)	6.29 (2)	<b>0.0429 (0.0469)</b>	1.00 (ref.)
	TG	7 (14.89)	78 (32.10)			0.37 (0.15-0.88)
	GG	5 (10.64)	19 (7.81)			1.09 (0.38-3.14)
rs352203	T	60 (60.00)	317 (62.16)	0.16 (1)	0.6854	1.00 (ref.)
	C*	40 (40.00)	193 (37.84)			1.09 (0.70-1.69)
	TT	20 (40.00)	100 (39.22)	0.98 (2)	0.6111	1.00 (ref.)
	TC	20 (40.00)	117 (45.88)			0.85 (0.43-1.67)
	CC	10 (20.00)	38 (14.90)			1.31 (0.56-3.06)

\*alelo polimórfico; (+) valor de p corrigido por 1000 permutações

### 4.3.3. Tentativa de suicídio

Para o gene ACP1, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com e sem histórico de tentativa de suicídio (Tabela 15).

Tabela 15. Frequências alélica e genotípica do gene ACP1

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença Tent Suic N (%)	Ausência Tent Suic N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>ACP1</b>						
rs4447635	G*	75 (28.63)	76 (24.84)	1.03 (1)	0.3085	1.00 (ref.)
	C	187 (71.37)	230 (75.16)			0.82 (0.56-1.96)
rs7419262	GG	13 (9.92)	8 (5.22)	2.27 (2)	0.3208	1.00 (ref.)
	GC	49 (37.40)	60 (39.22)			0.50 (0.19-1.31)
	CC	69 (52.67)	85 (55.56)			0.49 (0.19-1.27)
rs7419262	G	139 (53.05)	157 (50.97)	0.24 (1)	0.6204	1.00 (ref.)
	C*	123 (46.95)	151 (49.03)			0.92 (0.66-1.28)
rs7419262	GG	44 (33.59)	46 (29.87)	0.50 (2)	0.7783	1.00 (ref.)
	GC	51 (38.93)	65 (42.21)			0.82 (0.47-1.42)
	CC	36 (27.48)	43 (27.92)			0.87 (0.47-1.60)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT2B, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com e sem histórico de tentativa de suicídio (Tabela 16).

Tabela 16. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença Tent Suic N (%)	Ausência Tent Suic N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT2B</b>						
rs3790606	G	191 (75.20)	209 (69.21)	2.46 (1)	0.1162	1.00 (ref.)
	C*	63 (24.80)	93 (30.79)			0.74 (0.50-1.07)
rs351370	GG	77 (60.63)	77 (50.99)	2.60 (2)	0.2722	1.00 (ref.)
	GC	37 (29.13)	55 (36.42)			0.67 (0.39-1.13)
	CC	13 (10.24)	19 (12.58)			0.68 (0.31-1.48)
	T*	164 (65.08)	173 (61.35)			0.79 (1)
rs351372	C	88 (34.92)	109 (38.65)	2.53 (2)	0.2808	0.85 (0.59-1.21)
	TT	52 (41.27)	57 (40.43)			1.00 (ref.)
	TC	60 (47.62)	59 (41.84)			1.11 (0.66-1.87)
	CC	14 (11.11)	25 (17.73)			0.61 (0.28-1.30)
rs351372	T	130 (49.24)	168 (55.26)	2.05 (1)	0.1517	1.00 (ref.)
	A	134 (50.76)	136 (44.74)			1.27 (0.91-1.77)
rs351372	TT	31 (23.48)	44 (28.95)	2.23 (2)	0.3263	1.00 (ref.)
	TA	68 (51.52)	80 (52.63)			1.20 (0.68-2.11)
	AA	33 (25.00)	28 (18.42)			1.67 (0.84-3.30)

\*

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT5A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com e sem histórico de tentativa de suicídio (Tabela 17).

Tabela 17. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença Tent Suic N (%)	Ausência Tent Suic N (%)	$X^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT5A</b>						
rs7622120	G	140 (53.44)	177 (58.61)	1.52 (1)	0.2167	1.00 (ref.)
	A*	122 (46.56)	125 (41.39)			1.23 (0.88-1.72)
	GG	36 (27.48)	53 (35.10)	1.91 (2)	0.3843	1.00 (ref.)
	GA	68 (51.91)	71 (47.02)			1.41 (0.82-2.41)
	AA	27 (20.61)	27 (17.88)			1.47 (0.74-2.90)
rs566926	A	47 (17.94)	65 (21.38)	1.05 (1)	0.3042	1.00 (ref.)
	C*	215 (82.06)	239 (78.62)			1.24 (0.81-1.89)
	AA	6 (04.58)	11 (07.23)	1.09 (2)	0.5783	1.00 (ref.)
	AC	35 (26.72)	43 (28.29)			1.49 (0.50-4.43)
	CC	90 (68.70)	98 (64.47)			1.68 (0.59-4.74)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT3A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com e sem histórico de tentativa de suicídio (Tabela 18).

Tabela 18. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença Tent Suic N (%)	Ausência Tent Suic N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT3A</b>						
rs708122	G	189 (76.83)	190 (70.90)	2.34 (1)	0.1260	1.00 (ref.)
	T*	57 (23.17)	78 (29.10)			0.73 (0.49-1.09)
	GG	73 (59.35)	71 (52.99)	2.80 (2)	0.2455	1.00 (ref.)
	GT	43 (34.96)	48 (35.82)			0.87 (0.51-1.47)
TT	7 (05.69)	15 (11.19)	0.45 (0.17-1.17)			
rs3121309	G	197 (77.56)	222 (75.00)	0.49 (1)	0.4819	1.00 (ref.)
	A*	57 (22.44)	74 (25.00)			0.86 (0.58-1.28)
	GG	83 (65.35)	94 (63.51)	0.71 (2)	0.6999	1.00 (ref.)
	GA	31 (24.41)	34 (22.97)			1.03 (0.58-1.82)
AA	13 (10.24)	20 (13.51)	0.73 (0.34-1.57)			
rs1745423	A*	92 (35.94)	93 (30.59)	1.79 (1)	0.1806	1.00 (ref.)
	C	164 (64.06)	211 (69.41)			0.78 (0.55-1.11)
	AA	24 (18.75)	14 (09.21)	5.94 (2)	0.0511	1.00 (ref.)
	AC	44 (34.37)	65 (42.76)			0.39 (0.18-0.84)
CC	60 (46.88)	73 (48.03)	0.47 (0.22-1.00)			
rs3121310	G	161 (62.40)	200 (65.79)	0.69 (1)	0.4041	1.00 (ref.)
	A*	97 (37.60)	104 (34.21)			1.15 (0.81-1.63)
	GG	50 (38.76)	68 (44.74)	1.04 (2)	0.5918	1.00 (ref.)
	GA	61 (47.29)	64 (42.11)			1.29 (0.78-2.15)
AA	18 (13.95)	20 (13.16)	1.22 (0.58-2.55)			

\*alelo polimórfico

Para o gene FZD3, encontramos diferença significativa na frequência alélica do rs10503830 ( $p_{\text{corrigido}}=0.044$ ) quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com e sem histórico de tentativa de suicídio (Tabela 19).

Tabela 19. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3

<i>Frequência</i>						
SNP	Genótipo	Presença Tent Suic N (%)	Ausência Tent Suic N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p (+)	OR (95%CI)
<b>FZD3</b>						
rs10503830	T	205 (81.35)	208 (73.24)	5.01 (1)	<b>0.025 (0.044)</b>	1.00 (ref.)
	G*	47 (18.65)	76 (26.76)			0.62 (0.41-0.94)
	TT	88 (69.84)	80 (56.34)	5.25 (2)	0.0721	1.00 (ref.)
	TG	29 (23.02)	48 (33.80)			0.54 (0.31-0.95)
	GG	9 (07.14)	14 (09.85)			0.58 (0.23-1.42)
rs352203	T	164 (62.12)	184 (61.33)	0.03 (1)	0.8476	1.00 (ref.)
	C*	100 (37.88)	116 (38.67)			0.96 (0.68-1.35)
	TT	52 (39.39)	59 (39.33)	0.13 (2)	0.9349	1.00 (ref.)
	TC	60 (45.45)	66 (44.00)			1.03 (0.61-1.72)
	CC	20 (15.15)	25 (16.67)			0.90 (0.45-1.82)

\*alelo polimórfico; (+) valor de p corrigido por 1000 permutações

#### 4.3.4. Tipo de tentativa de suicídio

Para o gene ACP1, encontramos diferenças significativas na frequência alélica ( $p_{\text{corrigido}}=0.003$ ) e genotípica ( $p_{\text{corrigido}}=0.009$ ) do rs7419262 quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com histórico de tentativa de suicídio violenta com não violenta (Tabela 20).

Tabela 20. Frequências alélica e genotípica do gene ACP1

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Violenta N (%)	Não violenta N (%)	$X^2(df)$	Valor p (+)	OR (95%CI)
<b>ACP1</b>						
rs4447635	G*	36 (33.96)	41 (25.95)	1.95 (1)	0.1619	1.00 (ref.)
	C	70 (66.04)	117 (74.05)			0.68 (0.39-1.16)
rs7419262	GG	8 (15.09)	5 (6.32)	2.75 (2)	0.2519	1.00 (ref.)
	GC	20 (37.74)	31 (39.24)			0.40 (0.11-1.40)
	CC	25 (47.17)	43 (54.43)			0.36 (0.10-1.23)
	G	69 (65.09)	71 (44.94)			10.46 (1)
rs7419262	C*	37 (34.91)	87 (55.06)	10.03 (2)	<b>0.006 (0.009)</b>	0.43 (0.26-0.72)
	GG	26 (49.06)	18 (22.78)			1.00 (ref.)
	GC	17 (32.08)	35 (44.30)			0.33 (0.14-0.77)
	CC	10 (18.87)	26 (32.91)			0.26 (0.10-0.68)

\*alelo polimórfico; (+) valor de p corrigido por 1000 permutações

Para o gene WNT2B, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com histórico de tentativa de suicídio violenta com não violenta (Tabela 21).

Tabela 21. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Violenta N (%)	Não violenta N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT2B</b>						
rs3790606	G	74 (75.51)	118 (74.68)	0.02 (1)	0.8818	1.00 (ref.)
	C*	24 (24.49)	40 (25.32)			0.95 (0.53-1.71)
	GG	30 (61.22)	47 (59.49)	0.04 (2)	0.9759	1.00 (ref.)
	GC	14 (28.57)	24 (30.38)			0.91 (0.40-2.03)
CC	5 (10.20)	8 (10.13)	0.97 (0.29-3.27)			
rs351370	T*	70 (68.63)	96 (63.16)	0.81 (1)	0.3677	1.00 (ref.)
	C	32 (31.37)	56 (36.84)			0.78 (0.46-1.33)
	TT	24 (47.06)	29 (38.16)	0.99 (2)	0.6075	1.00 (ref.)
	TC	22 (43.14)	38 (50.00)			0.69 (0.32-1.48)
CC	5 (09.80)	9 (11.84)	0.67 (0.19-2.27)			
rs351372	T	47 (44.34)	84 (52.50)	1.70 (1)	0.1925	1.00 (ref.)
	A	59 (55.66)	76 (47.50)			1.38 (0.84-2.27)
	TT	9 (16.98)	23 (28.75)	2.50 (2)	0.2862	1.00 (ref.)
	TA	29 (54.72)	38 (47.50)			1.95 (0.78-4.84)
AA	15 (28.30)	19 (23.75)	2.01 (0.72-5.62)			

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT5A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com histórico de tentativa de suicídio violenta com não violenta (Tabela 22).

Tabela 22. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Violenta N (%)	Não violenta N (%)	$X^2(df)$	Valor de p	OR (95%CI)
<b>WNT5A</b>						
rs7622120	G	57 (53.77)	84 (53.16)	0.009 (1)	0.9225	1.00 (ref.)
	A*	49 (46.23)	74 (46.84)			0.97 (0.59-1.59)
	GG	14 (26.42)	22 (27.85)	0.23 (2)	0.8892	1.00 (ref.)
	GA	29 (54.72)	40 (50.63)			1.13 (0.50-2.59)
AA	10 (18.87)	17 (21.52)	0.92 (0.33-2.58)			
rs566926	A	18 (16.98)	31 (19.62)	0.29 (1)	0.5872	1.00 (ref.)
	C*	88 (83.02)	127 (80.38)			1.19 (0.62-2.26)
	AA	3 (05.66)	3 (03.79)	1.41 (2)	0.4922	1.00 (ref.)
	AC	12 (22.64)	25 (31.65)			0.48 (0.08-2.74)
	CC	38 (71.70)	51 (64.56)			0.74 (0.14-3.89)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT3A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com histórico de tentativa de suicídio violenta com não violenta (Tabela 23).

Tabela 23. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Violenta N (%)	Não violenta N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT3A</b>						
rs708122	G	74 (75.51)	116 (77.33)	0.10 (1)	0.7406	1.00 (ref.)
	T*	24 (24.49)	34 (22.67)			1.10 (0.60-2.01)
	GG	29 (59.18)	44 (58.67)	1.06 (2)	0.5857	1.00 (ref.)
	GT	16 (32.65)	28 (37.33)			0.86 (0.40-1.87)
	TT	4 (08.16)	3 (04.00)			2.02 (0.42-9.71)
rs3121309	G	76 (74.51)	122 (79.22)	0.77 (1)	0.3800	1.00 (ref.)
	A*	26 (25.49)	32 (20.78)			1.30 (0.72-2.35)
	GG	33 (64.71)	50 (64.94)	3.49 (2)	0.1738	1.00 (ref.)
	GA	10 (19.61)	22 (28.57)			0.68 (0.28-1.63)
AA	8 (15.69)	5 (06.49)	2.42 (0.72-8.05)			
rs1745423	A*	39 (38.24)	56 (35.90)	0.14 (1)	0.7036	1.00 (ref.)
	C	63 (61.76)	100 (64.10)			0.90 (0.53-1.51)
	AA	9 (17.65)	16 (20.51)	1.46 (2)	0.4814	1.00 (ref.)
	AC	21 (41.18)	24 (30.77)			1.55 (0.56-4.24)
	CC	21 (41.18)	38 (48.72)			0.98 (0.37-2.60)
rs3121310	G	64 (62.75)	97 (61.39)	0.04 (1)	0.8263	1.00 (ref.)
	A*	38 (37.25)	61 (38.61)			0.94 (0.56-1.57)
	GG	18 (35.29)	32 (40.51)	2.74 (2)	0.2536	1.00 (ref.)
	GA	28 (54.90)	33 (41.77)			1.50 (0.70-3.24)
	AA	5 (09.80)	14 (17.72)			0.63 (0.19-2.05)

\*alelo polimórfico

Para o gene FZD3, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos o grupo de pacientes com TAB com histórico de tentativa de suicídio violenta com não violenta (Tabela 24).

Tabela 24. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3

<i>Frequência</i>						
SNP	Genótipo	Violenta N (%)	Não violenta N (%)	$X^2(df)$	Valor de p	OR (95%CI)
<b>FZD3</b>						
rs10503830	T	86 (84.31)	119 (78.29)	1.45 (1)	0.2284	1.00 (ref.)
	G*	16 (15.69)	33 (21.71)			0.67 (0.34-1.29)
	TT	38 (74.51)	49 (64.47)	1.44 (2)	0.4843	1.00 (ref.)
	TG	10 (19.61)	21 (27.63)			0.61 (0.25-1.45)
GG	3 (05.88)	6 (07.89)	0.64 (0.15-2.74)			
rs352203	T	71 (66.98)	95 (59.38)	1.58 (1)	0.2083	1.00 (ref.)
	C*	35 (33.02)	65 (40.62)			0.72 (0.43-1.20)
	TT	25 (47.17)	28 (35.00)	1.96 (2)	0.3748	1.00 (ref.)
	TC	21 (39.62)	39 (48.75)			0.60 (0.28-1.28)
	CC	7 (13.21)	13 (16.25)			0.60 (0.20-1.75)

\*

\*alelo polimórfico

#### 4.3.5. Comorbidade pânico

Para o gene ACP1, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno do pânico (Tabela 25).

Tabela 25. Frequências alélica e genotípica do gene ACP1

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TP N (%)	Ausência TP N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>ACP1</b>						
rs4447635	G*	29 (26.85)	121 (26.89)	6.07e-005 (1)	0.9937	1.00 (ref.)
	C	79 (73.15)	329 (73.11)			1.00 (0.62-1.60)
	GG	5 (9.25)	16 (7.11)	0.512 (2)	0.7738	1.00 (ref.)
	GC	19 (35.19)	89 (39.56)			0.68 (0.22-2.09)
rs7419262	CC	30 (55.56)	120 (53.33)			0.80 (0.27-2.35)
	G	56 (51.85)	234 (51.77)	0.0002 (1)	0.9877	1.00 (ref.)
	C*	52 (48.15)	218 (48.23)			0.99 (0.65-1.51)
	GG	19 (35.19)	68 (30.09)	1.84 (2)	0.3980	1.00 (ref.)
	GC	18 (33.33)	98 (43.36)			0.65 (0.32-1.34)
	CC	17 (31.48)	60 (26.55)			1.01 (0.48-2.12)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT2B, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno do pânico (Tabela 26).

Tabela 26. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TP N (%)	Ausência TP N (%)	$X^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT2B</b>						
rs3790606	G	70 (67.31)	322 (72.85)	1.24 (1)	0.2637	1.00 (ref.)
	C*	34 (32.69)	120 (27.15)			1.30 (0.82-2.06)
	GG	23 (44.23)	128 (57.92)	4.86 (2)	0.0877	1.00 (ref.)
	GC	24 (46.15)	66 (29.86)			2.02 (1.06-3.85)
	CC	5 (9.61)	27 (12.22)			1.03 (0.35-2.95)
rs351370	T*	54 (56.25)	275 (64.25)	2.11(1)	0.1457	1.00 (ref.)
	C	42 (43.75)	153 (35.75)			1.39 (0.89-2.19)
	TT	14 (29.17)	92 (42.99)	3.26 (2)	0.1957	1.00 (ref.)
	TC	26 (54.17)	91 (42.52)			1.87 (0.92-3.82)
	CC	8 (16.67)	31 (14.49)			1.69 (0.64-4.42)
rs351372	T*	56 (51.85)	239 (53.11)	0.05 (1)	0.8139	1.00 (ref.)
	A	52 (48.15)	211 (46.89)			1.05 (0.69-1.60)
	TT	11 (20.37)	65 (28.89)	3.72 (2)	0.1555	1.00 (ref.)
	TA	34 (62.96)	109 (48.44)			1.84 (0.87-3.88)
	AA	9 (16.67)	51 (22.67)			1.04 (0.40-2.70)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT5A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno do pânico (Tabela 27).

Tabela 27. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TP N (%)	Ausência TP N (%)	$X^2(df)$	Valor de p	OR (95%CI)
<b>WNT5A</b>						
rs7622120	G	59 (55.66)	252 (56.25)	0.01 (1)	0.9124	1.00 (ref.)
	A*	47 (44.34)	196 (43.75)			1.02 (0.66-1.56)
	GG	13 (24.53)	74 (33.04)	4.41 (2)	0.1100	1.00 (ref.)
	GA	33 (62.26)	104 (46.43)			1.80 (0.89-3.66)
AA	7 (13.21)	46 (20.54)	0.86 (0.32-2.33)			
rs566926	A	16 (14.81)	97 (21.65)	2.66 (1)	0.1026	1.00 (ref.)
	C*	92 (85.19)	351 (78.35)			1.58 (0.89-2.82)
	AA	1 (01.85)	16 (03.37)	3.18 (2)	0.2031	1.00 (ref.)
	AC	14 (25.93)	65 (28.69)			3.44 (0.42-28.18)
	CC	39 (72.22)	143 (67.93)			4.36 (0.56-33.93)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT3A, encontramos diferenças significativas na frequência alélica ( $p_{\text{corrigido}}=0.0189$ ) quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno do pânico (Tabela 28). O alelo polimórfico está mais frequente no grupo sem comorbidade de transtorno do pânico.

Tabela 28. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TP N (%)	Ausência TP N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p (+)	OR (95%CI)
<b>WNT3A</b>						
rs708122	G	81 (82.65)	290 (71.43)	5.48 (1)	<b>0.0191 (0.0189)</b>	1.00 (ref.)
	T*	17 (17.35)	116 (28.57)			0.52 (0.29-0.92)
	GG	34 (69.39)	107 (52.71)	5.07 (2)	0.0789	1.00 (ref.)
	GT	13 (26.53)	76 (37.44)			0.53 (0.26-1.08)
TT	2 (4.08)	20 (9.85)	0.31 (0.06-1.41)			
rs3121309	G	79 (77.45)	331 (75.57)	0.16 (1)	0.6874	1.00 (ref.)
	A*	23 (22.55)	107 (24.43)			0.90 (0.53-1.50)
	GG	34 (66.67)	139 (63.47)	0.20 (2)	0.9048	1.00 (ref.)
	GA	11 (21.57)	53 (24.20)			0.84 (0.40-1.79)
AA	6 (11.76)	27 (12.33)	0.90 (0.34-2.37)			
rs1745423	A*	36 (33.96)	148 (33.18)	0.02 (1)	0.8786	1.00 (ref.)
	C	70 (66.04)	298 (66.82)			0.96 (0.61-1.51)
	AA	7 (13.21)	32 (14.35)	0.26 (2)	0.8745	1.00 (ref.)
	AC	22 (41.51)	84 (37.67)			1.19 (0.46-3.07)
CC	24 (45.28)	107 (47.98)	1.02 (0.40-2.59)			
rs3121310	G	65 (61.32)	289 (64.80)	0.44 (1)	0.5039	1.00 (ref.)
	A*	41 (38.68)	157 (35.20)			1.16 (0.75-1.79)
	GG	21 (39.62)	96 (43.05)	0.48 (2)	0.7864	1.00 (ref.)
	GA	23 (43.40)	97 (43.50)			1.08 (0.56-2.08)
AA	9 (16.98)	30 (13.45)	1.37 (0.56-3.31)			

\*alelo polimórfico

Para o gene FZD3, encontramos diferença significativa na frequência genotípica do rs10503830 ( $p_{\text{corrigido}}=0.003$ ) quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno do pânico (Tabela 29).

Tabela 29. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3

<i>Frequência</i>						
SNP	Genótipo	Presença TP N (%)	Ausência TP N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p (+)	OR (95%CI)
<b>FZD3</b>						
rs10503830	T	85 (83.33)	322 (75.59)	2.95 (1)	0.0854	1.00 (ref.)
	G*	17 (16.67)	104 (24.41)			0.61 (0.35-1.09)
	TT	40 (78.43)	126 (59.15)	12.67 (2)	<b>0.0017 (0.0039)</b>	1.00 (ref.)
	TG	5 (9.80)	70 (32.86)			0.22 (0.08-0.59)
	GG	6 (11.76)	17 (7.98)			1.11 (0.41-3.01)
rs352203	T	62 (58.49)	281 (62.72)	0.64 (1)	0.4215	1.00 (ref.)
	C*	44 (41.51)	167 (37.28)			1.19 (0.77-1.83)
	TT	20 (37.74)	90 (40.18)	1.10 (2)	0.5757	1.00 (ref.)
	TC	22 (41.51)	101 (45.09)			0.98 (0.50-1.91)
	CC	11 (20.75)	33 (14.73)			1.50 (0.64-3.46)

\*alelo polimórfico

## 4.3.6. Comorbidade TAG

Para o gene ACP1, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno de ansiedade generalizada (Tabela 30).

Tabela 30. Frequências alélica e genotípica do gene ACP1

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TAG N (%)	Ausência TAG N (%)	$X^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>ACP1</b>						
rs4447635	G*	50 (27.78)	102 (26.56)	0.09 (1)	0.7621	1.00 (ref.)
	C	130 (72.22)	282 (73.44)			0.94 (0.63-1.39)
rs7419262	GG	7 (7.77)	15 (7.81)	0.16 (2)	0.9190	1.00 (ref.)
	GC	36 (40.00)	72 (37.50)			1.07 (0.40-2.86)
	CC	47 (52.22)	105 (54.69)			0.95 (0.36-2.50)
	C*	88 (48.89)	185 (47.93)			1.03 (0.72-1.48)
rs7419262	G	92 (51.11)	201 (52.07)	0.74 (2)	0.6885	1.00 (ref.)
	C*	88 (48.89)	185 (47.93)			1.03 (0.72-1.48)
	GG	29 (32.22)	59 (30.57)			1.00 (ref.)
	GC	34 (37.78)	83 (43.01)			0.83 (0.45-1.51)
	CC	27 (30.00)	51 (26.42)			1.07 (0.56-2.05)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT2B, encontramos diferenças significativas na frequência alélica dos rs3790606 ( $p_{\text{corrigido}}=0.036$ ) e rs351372 ( $p_{\text{corrigido}}=0.042$ ) quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno de ansiedade generalizada (Tabela 31).

Tabela 31. Frequências alélica e genotípica do gene WNT2B

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TAG N (%)	Ausência TAG N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p (corrigido)	OR (95%CI)
<b>WNT2B</b>						
rs3790606	G	115 (65.34)	282 (75.00)	5.42 (1)	<b>0.019 (0.036)</b>	1.00 (ref.)
	C*	61 (34.66)	94 (25.00)			1.59 (1.07-2.34)
	GG	41 (46.59)	112 (59.57)	4.63 (2)	0.0985	1.00 (ref.)
	GC	33 (37.50)	58 (30.85)			1.55 (0.89-2.71)
CC	14 (15.91)	18 (9.57)	2.12 (0.96-4.65)			
rs351370	T*	101 (59.41)	233 (64.72)	1.38 (1)	0.2386	1.00 (ref.)
	C	69 (40.59)	127 (35.28)			1.25 (0.86-1.82)
	TT	32 (37.65)	76 (42.22)	1.70 (2)	0.4264	1.00 (ref.)
	TC	37 (43.53)	81 (45.00)			1.08 (0.61-1.91)
CC	16 (18.82)	23 (12.78)	1.65 (0.77-3.53)			
rs351372	T	84 (46.67)	214 (55.73)	4.03 (1)	<b>0.044 (0.042)</b>	1.00 (ref.)
	A	96 (53.33)	170 (44.27)			1.43 (1.00-2.05)
	TT	16 (17.78)	60 (31.25)	5.96 (2)	0.0507	1.00 (ref.)
	TA	52 (57.78)	94 (48.96)			2.07 (1.08-3.96)
AA	22 (24.44)	38 (19.79)	2.17 (1.01-4.64)			

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT5A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno de ansiedade generalizada (Tabela 32).

Tabela 32. Frequências alélica e genotípica do gene WNT5A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TAG N (%)	Ausência TAG N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT5A</b>						
rs7622120	G	93 (52.25)	220 (57.59)	1.40 (1)	0.2361	1.00 (ref.)
	A*	85 (47.75)	162 (42.41)			1.24 (0.86-1.77)
	GG	22 (24.72)	65 (34.03)	2.58 (2)	0.2750	1.00 (ref.)
	GA	49 (55.06)	90 (47.12)			1.60 (0.88-2.91)
AA	18 (20.22)	36 (18.85)	1.47 (0.70-3.10)			
rs566926	A*	35 (19.44)	79 (20.68)	0.11 (1)	0.7331	1.00 (ref.)
	C	145 (80.56)	303 (79.32)			1.08 (0.69-1.68)
	AA	3 (3.33)	14 (7.33)	2.46 (2)	0.2922	1.00 (ref.)
	AC	29 (32.22)	51 (26.70)			2.65 (0.70-10.00)
	CC	58 (64.44)	126 (65.97)			2.14 (0.59-7.76)

\*alelo polimórfico

Para o gene WNT3A, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno de ansiedade generalizada (Tabela 33).

Tabela 33. Frequências alélica e genotípica do gene WNT3A

<i>Frequência</i>						
SNP	Alelos	Presença TAG N (%)	Ausência TAG N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>WNT3A</b>						
rs708122	G	119 (72.56)	256 (73.99)	0.11 (1)	0.7333	1.00 (ref.)
	T*	45 (27.44)	90 (26.01)			1.07 (0.70-1.63)
	GG	45 (54.88)	97 (56.07)	0.19 (2)	0.9082	1.00 (ref.)
	GT	29 (35.37)	62 (35.84)			1.00 (0.57-1.77)
TT	8 (9.75)	14 (8.09)	1.23 (0.48-3.14)			
rs3121309	G	140 (79.55)	276 (74.59)	1.64 (1)	0.2000	1.00 (ref.)
	A*	36 (20.45)	94 (25.41)	0.75 (0.48-1.16)		
	GG	61 (69.32)	115 (62.16)	1.35 (2)	0.5071	1.00 (ref.)
	GA	18 (20.45)	46 (24.86)			0.73 (0.39-1.38)
AA	9 (10.23)	24 (12.97)	0.70 (0.30-1.61)			
rs1745423	A*	60 (33.71)	126 (33.16)	0.01 (1)	0.8978	1.00 (ref.)
	C	118 (66.29)	254 (66.84)	0.97 (0.66-1.42)		
	AA	15 (16.85)	24 (12.63)	1.73 (2)	0.4192	1.00 (ref.)
	AC	30 (33.71)	78 (41.05)			0.61 (0.28-1.33)
CC	44 (49.44)	88 (46.32)	0.80 (0.38-1.67)			
rs3121310	G	118 (66.29)	239 (62.89)	0.61 (1)	0.4346	1.00 (ref.)
	A*	60 (33.71)	141 (37.11)	0.86 (0.59-1.25)		
	GG	40 (44.94)	77 (40.53)	0.58 (2)	0.7457	1.00 (ref.)
	GA	38 (42.70)	85 (44.74)			0.86 (0.50-1.47)
AA	11 (12.36)	28 (14.74)	0.75 (0.34-1.67)			

\*alelo polimórfico

Para o gene FZD3, não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparamos pacientes com TAB com e sem comorbidade de transtorno de ansiedade generalizada (Tabela 34).

Tabela 34. Frequências alélica e genotípica do gene FZD3

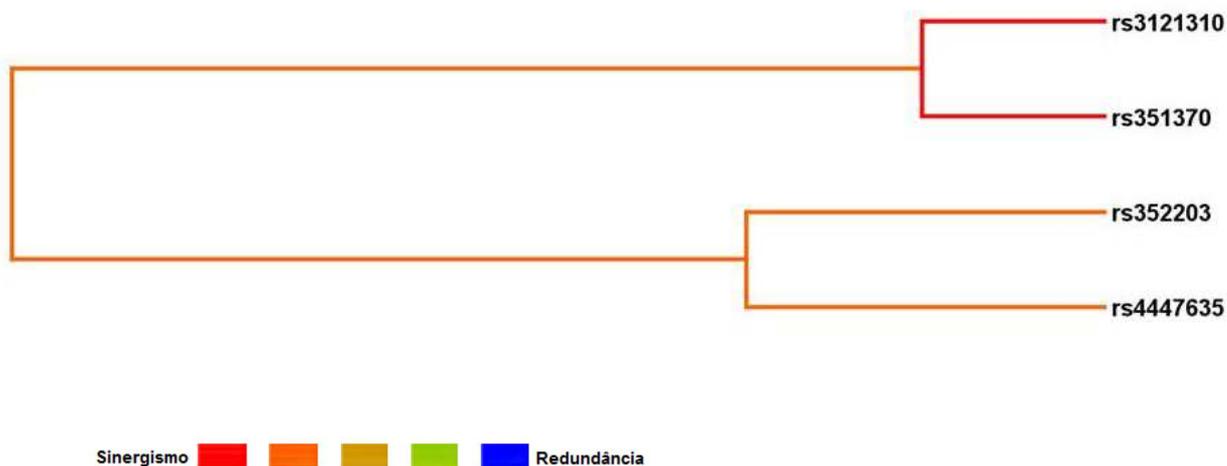
<i>Frequência</i>						
SNP	Genótipo	Presença TAG N (%)	Ausência TAG N (%)	$\chi^2(df)$	Valor p	OR (95%CI)
<b>FZD3</b>						
rs10503830	T	134 (77.01)	277 (76.94)	0.0002 (1)	0.9862	1.00 (ref.)
	G*	40 (22.99)	83 (23.06)			0.99 (0.64-1.53)
	TT	58 (66.67)	109 (60.56)	5.78 (2)	0.0553	1.00 (ref.)
	TG	18 (20.69)	59 (32.78)			0.57 (0.30-1.06)
GG	11 (12.64)	12 (6.66)	1.72 (0.71-4.14)			
rs352203	T	111 (62.36)	235 (61.52)	0.03 (1)	0.8486	1.00 (ref.)
	C*	67 (37.64)	147 (38.48)			0.96 (0.66-1.39)
	TT	39 (43.82)	72 (37.70)	2.86 (2)	0.2383	1.00 (ref.)
	TC	33 (37.08)	91 (47.64)			0.66 (0.38-1.16)
CC	17 (19.10)	28 (14.66)	1.12 (0.54-2.29)			

\*alelo polimórfico

#### 4.4. Análise de interação gene-gene

No intuito de avaliar se existe interação entre os polimorfismos dos genes estudados na susceptibilidade para o transtorno afetivo bipolar, foi feita uma análise de interação gene-gene com o auxílio do programa estatístico MDR (Figura 4). Se a interação entre os *tagSNPs* promover um ganho de informação, isto é aumenta-se o poder de predição do TAB, admite-se que ocorreu sinergismo (representado no dendograma pelas cores vermelha e laranja). Por sua vez, quando a combinação dos polimorfismos provocar uma perda de informação, ou seja, diminui o poder de predição da doença, sugere-se uma correlação ou redundância (coloração azulada no dendograma).

Figura 4 - Dendograma da interação gene-gene TAB comparado com controles. As cores da legenda compreendem um espectro representando a transição de sinergismo para redundância. As cores vermelha e laranja representam sinergismo e, verde e azul, redundância. Em amarelo admite-se que os *tagSNPs* possuem efeitos independentes.



Através desta análise, podemos identificar um modelo de interação que prediz a susceptibilidade para o TAB. O *rs3121310* (*WNT3A*) e o *rs351370* (*WNT2B*) demonstraram um espectro de sinergismo, assim como o *rs352203* (*FZD3*) e *rs4447635* (*ACP1*). Este resultado sugere que a combinação desses dois

conjuntos de *tagSNPs* promovem um ganho de informação genética, isto é aumenta-se o poder de predição do TAB.

O melhor modelo gerado pelo MDR é composto pelo *rs3121310 (WNT3A)* e o *rs351370 (WNT2B)*, com acurácia de 52.23% e consistência de 9/10. Isto significa que este modelo é capaz de predizer o TAB de um indivíduo em 52.23% dos casos. Contudo, após as 1000 permutações, o valor de  $p$  não se sustentou.

## **5. Discussão**

Nosso estudo envolveu 546 indivíduos, sendo 306 pacientes com TAB e 240 indivíduos controle. Os pacientes com TAB foram divididos em 4 subgrupos: presença e ausência de tentativa de suicídio (N=132 e 154, respectivamente), tentativa de suicídio violenta e não violenta (N=53 e 80, respectivamente), presença e ausência de comorbidade de transtorno do pânico (N=54 e 227, respectivamente) e presença e ausência de comorbidade de transtorno de ansiedade generalizada (N=90 e 194). Nosso objetivo foi verificar possíveis associações de susceptibilidade entre polimorfismos de genes da via Wnt e o transtorno afetivo bipolar, no grupo caso-controle e em subgrupos de pacientes com TAB.

Na análise de EHW encontramos os seguintes tagSNPs em EHW: gene ACP1, rs4447635; gene WNT2B, rs351370 e rs351372; WNT5A, rs7622120; WNT3A, rs3121310 e FZD3, rs352203.

Em outro grupo de tagSNPs encontramos EHW apenas no grupo controle, são eles: ACP1, rs7419262; WNT2B, rs3790606; WNT5A, rs566926 e WNT3A, rs1745423. Uma vez que o desvio ocorreu apenas no grupo de pacientes e não no grupo controle atribuímos este desvio a um possível papel dos genes na predisposição à doença (HOLLENBACH et al., 2009; WITTKÉ-THOMPSON; PLUZHNIKOV; COX, 2005).

Entretanto, com relação aos tagSNPs dos genes WNT3A, rs3121309 e FZD3, rs10503830 que apresentaram desvio no EHW tanto nos casos quanto nos controles, acreditamos que este esteja relacionado a alguma característica específica da população estudada, pois as genotipagens foram reavaliadas e algumas refeitas e não houve discrepância nos resultados. Recentemente, foram descobertas regiões do genoma humano que contêm desvios do EHW, apresentando aumento de heterozigose ou homozigose (Vine & Curtis, 2009), o que pode ser um motivo para os desvios em nossa amostra. Os desvios existem mas os mecanismos ainda não são claros.

Existem outros motivos que levam a desvios no EHW, são eles: estratificação da população, viés de seleção da amostra ou erros de genotipagem (ZINTZARAS; LAU, 2008; ZINTZARAS, 2010). A estratificação populacional inclui diferenças entre grupos de origens étnicas distintas ou diferenças entre grupos de origem étnica similar, mas com limitada mistura racial (WITTKÉ-THOMPSON; PLUZHNIKOV; COX, 2005). Neste caso, desvios no EHW ocorrem quando indivíduos são selecionados de duas populações geneticamente diferentes e em proporções distintas entre casos e controles (ZINTZARAS; LAU, 2008). Neste estudo, todos os indivíduos foram selecionados em Belo Horizonte, e se autodeclararam caucasianos, porém não foi realizada análise de ancestralidade dos indivíduos e sabemos que a população brasileira apresenta elevado grau de miscigenação (FAUSTO, 1999).

Com relação a viés de seleção da amostra ressaltamos que a seleção da amostra foi realizada com extremo rigor, por profissionais extremamente capacitados e treinados, com aplicação de questionários com acurácia pré-estabelecida para os diagnósticos, o que descarta ou reduz erro de seleção amostral.

Realizamos um controle de qualidade da nossa genotipagem refazendo 10% das genotipagens, de forma aleatória, e não encontramos diferenças nos resultados. Para os tagSNPs que estão fora de EHW, foi feita novamente a genotipagem de 20% das amostras e também não encontramos discrepâncias, o que exclui do nosso estudo erros de genotipagem.

Finalizando, encontramos desvio no EHW apenas no grupo controle do rs708122, do gene WNT3A. Não iremos descartar essa associação positiva devido ao desvio de EHW, pois desvios de EHW em controles só são descartados ao nível de significância  $\alpha=10^{-3}$  ou  $10^{-4}$  (BALDING, 2006), o que não é nosso caso. Porém, ficamos cientes de que esse resultado de associação deve

ser observado e analisado com cautela, porém, não há necessidade de invalidar o resultado por este motivo.

Com relação ao gene *WNT7A*, foi necessária a sua exclusão do estudo, pois para todos os 5 tagSNPs estudados, houve desvio muito significativo no EHW, tanto no grupo de casos quanto no controle. Como ainda não tem estudos que mostrem se esse gene é um gene fora de EHW ou não, achamos mais adequado excluí-lo.

A frequência do menor alelo observada neste estudo foi similar à frequência encontrada na população caucasiana europeia listada no HapMap e NCBI (tabela 4), com exceção dos rs4447635, rs7419262, rs7622120 e rs566926. Esta diferença pode ser atribuída ao perfil étnico da amostra estudada, pois os indivíduos foram classificados como caucasianos apenas por características fenotípicas, e sabendo-se que no Brasil o grau de miscigenação é elevado, as características genotípicas podem não condizer com a herança genética do indivíduo (PENA et al., 2011). Sabe-se que loci com pequena MAF (< 10 %) apresentam baixo poder de detecção de genótipos de risco quando comparado a loci com MAF > 40% (ARDLIE; LUNETTA; SEIELSTAD, 2002). Nenhum dos nossos resultados apresentou MAF < 10 % (tabela 4).

Na análise do MDR, excluímos da análise todos os tagSNPs que estavam fora de EHW. O melhor modelo gerado foi composto pelos *rs3121310 (WNT3A)* e o *rs351370 (WNT2B)*, o que permite concluir que este modelo é capaz de determinar corretamente a ocorrência do TAB em até 52,23% dos casos. Contudo, este dado não se sustentou após o teste das mil permutações. Desta forma, não se pode afirmar que os genes selecionados apresentam relação de epistasia entre si, embora não seja indicado excluir totalmente uma possível interação entre os genes, visto que, apenas alguns polimorfismos foram estudados.

Nas análises de associação entre caso e controle, não encontramos correlação entre os tagSNPs estudados e o TAB. O estudo de Zandi et al. (2008), que avaliou vários genes iguais ao nosso, também não encontrou diferenças significativas entre os grupos.

Encontramos 3 resultados positivos para o gene FZD3, *rs 10503830*, porém este tagSNP encontra-se fora de EHW, tanto no grupo caso quanto no controle, sendo necessário excluí-lo da discussão.

No gene ACP1, *rs7419262*, encontramos diferenças alélica e genotípica significativas entre o grupo de pacientes com tentativa de suicídio violenta e não violenta. O alelo polimórfico C está mais frequente no grupo de pacientes com tentativa de suicídio não violenta ( $p_{\text{corrigido}}=0.003$ ). Os pacientes com genótipo CC apresentam mais chances de tentativa de suicídio não violenta ( $p_{\text{corrigido}}=0.009$ ). Até o presente momento não existem estudos que associem o gene ACP1 com tipo de tentativa de suicídio. Um único estudo associou ACP1 com tentativa de suicídio em pacientes bipolares e encontrou níveis de ACP1 significativamente aumentados em cérebros de pacientes que cometeram suicídio (WILLOUR et al., 2012). O gene ACP1 regula os níveis de  $\beta$ -catenina, sendo assim, quantidades aumentadas de ACP1 resultam em diminuição de  $\beta$ -catenina no citoplasma (TADDEI et al., 2002), que é o efeito oposto da administração do lítio, o que torna o ACP1 um gene candidato na participação no comportamento suicida.

Não encontramos nenhuma outra associação do gene ACP1 com suicídio, e algumas limitações podem explicar esse fato. Avaliamos apenas tagSNPs, sendo necessário avaliar outras formas de alterações no gene, como “copy number variants”. Considerando que nosso estudo é uma coorte transversal, precisamos considerar que é possível que alguns indivíduos, que foram classificados como não apresentando comportamento suicida no momento do

estudo, possam vir a apresentar comportamento suicida futuramente (ANGST et al., 2005).

Para o gene WNT3A, encontramos diferenças significativas na frequência alélica do rs708122. O alelo polimórfico T está mais frequente nos indivíduos sem transtorno do pânico. Não existem estudos que avaliam a associação de polimorfismos no gene WNT3A e indivíduos com TAB e comorbidade pânico.

O gene WNT2B apresenta dois tagSNPs com diferenças alélicas significativas, o rs3790606 e rs351372, no grupo de indivíduos com e sem comorbidade de TAG. O alelo polimórfico C, do rs3706606 está mais presente nos indivíduos com TAG, com OR de 1.59, ou seja, 1.59 vezes mais chance de desenvolver TAG. O alelo polimórfico T, do rs351372 está mais frequente nos indivíduos sem TAG. O estudo de Zandi et al. (2008) suporta nosso achado, pois também encontrou associação do rs3790606 com o TAB, em um subgrupo de indivíduos com TAB com pobre funcionalidade.

Todos os nossos achados necessitam de replicação, pois este é o primeiro estudo a avaliar polimorfismos em alguns genes da via Wnt e a susceptibilidade ao TAB e comorbidades nesses indivíduos.

Uma importante limitação do nosso estudo é o tamanho amostral dos subgrupos de pacientes com TAB. A subdivisão reduz o N amostral, fazendo com que o poder da análise diminua. Estudos maiores são necessários para confirmar nossos achados.

## **6. Conclusão**

A partir dos resultados deste estudo podemos concluir que desregulação na via de sinalização Wnt pode estar envolvida na susceptibilidade ao TAB e suicídio. Apesar das limitações do estudo, como estratificação da população, tamanho amostral reduzido nos subgrupos e não avaliação de fatores ambientais, nossos resultados condizem com outros achados que associam a via Wnt a transtornos de humor e suicídio. Nossos achados precisam ser confirmados por replicação em outras populações e com tamanho amostral maior, aumentando assim o poder do estudo.

## **7. Referências bibliográficas**

AHMAD-ANNUAR, A. et al. Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. **The Journal of cell biology**, v. 174, n. 1, p. 127–39, 3 jul. 2006.

ALEKSIC, B. et al. Genetic association study of KREMEN1 and DKK1 and schizophrenia in a Japanese population. **Schizophrenia research**, v. 118, n. 1-3, p. 113–7, maio. 2010.

ALTSHULER, L. L. et al. The hippocampus and parahippocampus in schizophrenia, suicide, and control brains. **Archives of general psychiatry**, v. 47, n. 11, p. 1029–34, nov. 1990.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 4A. ed. Washington DC: [s.n.].

ANGST, J. et al. Toward a re-definition of subthreshold bipolarity: epidemiology and proposed criteria for bipolar-II, minor bipolar disorders and hypomania. **Journal of affective disorders**, v. 73, n. 1-2, p. 133–46, jan. 2003.

ANGST, J. et al. Suicide in 406 mood-disorder patients with and without long-term medication: a 40 to 44 years' follow-up. **Archives of suicide research : official journal of the International Academy for Suicide Research**, v. 9, n. 3, p. 279–300, jan. 2005.

ARDLIE, K. G.; LUNETTA, K. L.; SEIELSTAD, M. Testing for population subdivision and association in four case-control studies. **American journal of human genetics**, v. 71, n. 2, p. 304–11, ago. 2002.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781–91, out. 2006.

BAMJI, S. X. et al. Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. **Neuron**, v. 40, n. 4, p. 719–31, 13 nov. 2003.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 2, p. 263–5, 15 jan. 2005.

BAUM, A. E. et al. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. **Molecular psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 197–207, fev. 2008.

BELMAKER, R. H. Bipolar disorder. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 5, p. 476–86, 29 jul. 2004.

BERTELSEN, A.; HARVALD, B.; HAUGE, M. A Danish twin study of manic-depressive disorders. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 130, p. 330–51, abr. 1977.

BHANOT, P. et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 225–30, 18 jul. 1996.

BOVOLENTA, P.; RODRIGUEZ, J.; ESTEVE, P. Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. **Development (Cambridge, England)**, v. 133, n. 22, p. 4399–408, nov. 2006.

BRAMBILLA, P. et al. Anatomical MRI study of subgenual prefrontal cortex in bipolar and unipolar subjects. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 5, p. 792–9, nov. 2002.

BROWN, J. D.; MOON, R. T. Wnt signaling: why is everything so negative? **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 2, p. 182–7, abr. 1998.

BUDNIK, V.; SALINAS, P. C. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. **Current opinion in neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 151–9, fev. 2011.

CARDNO, A. G. et al. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. **Archives of general psychiatry**, v. 56, n. 2, p. 162–8, fev. 1999.

CASTELO-BRANCO, G. et al. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 22, p. 12747–52, 28 out. 2003.

CHUANG, D.-M. et al. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. **Bipolar disorders**, v. 4, n. 2, p. 129–36, abr. 2002.

COLOM, F. et al. Clinical and therapeutic implications of predominant polarity in bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 93, n. 1-3, p. 13–7, jul. 2006.

CRADDOCK, N.; JONES, I. Genetics of bipolar disorder. **Journal of medical genetics**, v. 36, n. 8, p. 585–94, ago. 1999.

DABAN, C. et al. Clinical correlates of first-episode polarity in bipolar disorder. **Comprehensive psychiatry**, v. 47, n. 6, p. 433–7, 2006.

DAVIS, E. K.; ZOU, Y.; GHOSH, A. Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. **Neural development**, v. 3, p. 32, jan. 2008.

DEAN, B. B.; GERNER, D.; GERNER, R. H. A systematic review evaluating health-related quality of life, work impairment, and healthcare costs and utilization in bipolar disorder. **Current medical research and opinion**, v. 20, n. 2, p. 139–54, jan. 2004.

DREVETS, W. C. Neuroimaging studies of mood disorders. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 813–29, 15 out. 2000.

DUDBRIDGE, F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. **Human heredity**, v. 66, n. 2, p. 87–98, jan. 2008.

EINAT, H.; MANJI, H. K. Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1160–71, 15 jun. 2006.

FARÍAS, G. G. et al. Wnt-7a induces presynaptic colocalization of alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors and adenomatous polyposis coli in hippocampal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 20, p. 5313–25, 16 maio. 2007.

FARÍAS, G. G. et al. Wnt signaling modulates pre- and postsynaptic maturation: therapeutic considerations. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 239, n. 1, p. 94–101, jan. 2010.

FAUSTO, B. **História do Brasil**. São Paulo: [s.n.].

FOUNTOULAKIS, K. N. et al. Psychotherapeutic intervention and suicide risk reduction in bipolar disorder: a review of the evidence. **Journal of affective disorders**, v. 113, n. 1-2, p. 21–9, fev. 2009.

FRANGO, S.; RAYMONT, V.; BETTANY, D. The Maudsley bipolar disorder project. A survey of psychotropic prescribing patterns in bipolar I disorder. **Bipolar disorders**, v. 4, n. 6, p. 378–85, dez. 2002.

FUENTEALBA, P. et al. Synaptic interactions between thalamic and cortical inputs onto cortical neurons in vivo. **Journal of neurophysiology**, v. 91, n. 5, p. 1990–8, maio. 2004.

GALCERAN, J. et al. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 3, p. 469–82, fev. 2000.

GOGOLLA, N. et al. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 510–25, 28 maio. 2009.

GOODWIN, F. K.; JAMISON, K. R. **Manic-Depressive Illness**. New York: Oxford University Press, 1990.

GOSLIN, K.; BANKER, G. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. **The Journal of cell biology**, v. 108, n. 4, p. 1507–16, abr. 1989.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 8, n. 5, p. 497–511, 1 out. 2002.

HALL, A. C.; LUCAS, F. R.; SALINAS, P. C. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 525–35, 3 mar. 2000.

HOLLENBACH, J. A. et al. Susceptibility to Crohn's disease is mediated by KIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand. **Immunogenetics**, v. 61, n. 10, p. 663–71, out. 2009.

HUBER, O. et al. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. **Mechanisms of development**, v. 59, n. 1, p. 3–10, set. 1996.

IKEDA, S. et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. **The EMBO journal**, v. 17, n. 5, p. 1371–84, 2 mar. 1998.

JIN, T.; GEORGE FANTUS, I.; SUN, J. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. **Cellular signalling**, v. 20, n. 10, p. 1697–704, out. 2008.

JUDD, L. L.; AKISKAL, H. S. The prevalence and disability of bipolar spectrum disorders in the US population: re-analysis of the ECA database taking into account subthreshold cases. **Journal of affective disorders**, v. 73, n. 1-2, p. 123–31, jan. 2003.

KATSU, T. et al. The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia. **Neuroscience letters**, v. 353, n. 1, p. 53–6, 15 dez. 2003.

KAWA, I. et al. Gender differences in bipolar disorder: age of onset, course, comorbidity, and symptom presentation. **Bipolar disorders**, v. 7, n. 2, p. 119–25, abr. 2005.

KEEBLE, T. R. et al. The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 21, p. 5840–8, 24 maio. 2006.

KLEIN, P. S.; MELTON, D. A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 16, p. 8455–9, 6 ago. 1996.

KOMAR, A. A. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 8, p. 1075–80, ago. 2007.

KOZLOVSKY, N.; BELMAKER, R. H.; AGAM, G. GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 13–25, fev. 2002.

KRYLOVA, O. et al. WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. **Neuron**, v. 35, n. 6, p. 1043–56, 12 set. 2002.

KUPFER, D. J. The increasing medical burden in bipolar disorder. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 20, p. 2528–30, 25 maio. 2005.

LACHMAN, H. M. et al. Increase in GSK3beta gene copy number variation in bipolar disorder. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 144B, n. 3, p. 259–65, 5 abr. 2007.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 11 out. 1991.

LEE, S. M. et al. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 3, p. 457–67, fev. 2000.

LI, X.; KETTER, T. A.; FRYE, M. A. Synaptic, intracellular, and neuroprotective mechanisms of anticonvulsants: are they relevant for the treatment and course of bipolar disorders? **Journal of affective disorders**, v. 69, n. 1-3, p. 1–14, maio. 2002.

LIE, D.-C. et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1370–5, 27 out. 2005.

LIN, Y.-F.; HUANG, M.-C.; LIU, H.-C. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  gene polymorphisms may be associated with bipolar I disorder and the therapeutic response to lithium. **Journal of affective disorders**, v. 147, n. 1-3, p. 401–6, maio. 2013.

LIU, Y. et al. Ryk-mediated Wnt repulsion regulates posterior-directed growth of corticospinal tract. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 9, p. 1151–9, set. 2005.

LOVESTONE, S. et al. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 4, p. 142–9, abr. 2007.

LUCAS, F. R.; SALINAS, P. C. WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. **Developmental biology**, v. 192, n. 1, p. 31–44, 1 dez. 1997.

LYUKSYUTOVA, A. I. et al. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5652, p. 1984–8, 12 dez. 2003.

MANJI, H. K. et al. Modulation of CNS signal transduction pathways and gene expression by mood-stabilizing agents: therapeutic implications. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 60 Suppl 2, p. 27–39; discussion 40–1, 113–6, jan. 1999.

- MANJI, H. K.; LENOX, R. H. The nature of bipolar disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 61 Supp 13, p. 42–57, jan. 2000.
- MANJI, H. K.; MOORE, G. J.; CHEN, G. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? **Biological psychiatry**, v. 46, n. 7, p. 929–40, 1 out. 1999.
- MARTINOWICH, K.; SCHLOESSER, R. J.; MANJI, H. K. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 4, p. 726–36, abr. 2009.
- MATIGIAN, N. et al. Expression profiling in monozygotic twins discordant for bipolar disorder reveals dysregulation of the WNT signalling pathway. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 9, p. 815–25, set. 2007.
- MCELROY, S. L. et al. Axis I psychiatric comorbidity and its relationship to historical illness variables in 288 patients with bipolar disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 158, n. 3, p. 420–6, mar. 2001.
- MCMAHON, A P.; BRADLEY, A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. **Cell**, v. 62, n. 6, p. 1073–85, 21 set. 1990.
- MENDLEWICZ, J.; RAINER, J. D. Adoption study supporting genetic transmission in manic–depressive illness. **Nature**, v. 268, n. 5618, p. 327–9, 28 jul. 1977.
- MIKELS, A. J.; NUSSE, R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. **Oncogene**, v. 25, n. 57, p. 7461–8, 4 dez. 2006.
- MOON, R. T. et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 9, p. 691–701, set. 2004.
- MOORE, J. H. et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. **Journal of theoretical biology**, v. 241, n. 2, p. 252–61, 21 jul. 2006.
- NAKAGAWA, A. et al. Comorbid anxiety in bipolar disorder: does it have an independent effect on suicidality? **Bipolar disorders**, v. 10, n. 4, p. 530–8, jun. 2008.
- NOORDERMEER, J. et al. Dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. **Nature**, v. 367, n. 6458, p. 80–3, 6 jan. 1994.
- NUSSE, R. et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 231, 25 jan. 1991.

NUSSE, R.; VARMUS, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 99–109, nov. 1982.

PANDEY, G. N. et al. Glycogen synthase kinase-3beta in the platelets of patients with mood disorders: effect of treatment. **Journal of psychiatric research**, v. 44, n. 3, p. 143–8, fev. 2010.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e17063, jan. 2011.

PENNISI, E. A closer look at SNPs suggests difficulties. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5384, p. 1787–9, 18 set. 1998.

POLAKIS, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1332, n. 3, p. F127–47, 7 jun. 1997.

POMPILI, M. et al. Suicide risk in depression and bipolar disorder: Do impulsiveness-aggressiveness and pharmacotherapy predict suicidal intent? **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 4, n. 1, p. 247–55, fev. 2008.

POST, R. M. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 31, n. 6, p. 858–73, jan. 2007.

PURRO, S. A et al. Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 34, p. 8644–54, 20 ago. 2008.

RAJKOWSKA, G. Cell pathology in bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 4, n. 2, p. 105–16, abr. 2002.

RIJSEWIJK, F. et al. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. **Cell**, v. 50, n. 4, p. 649–57, 14 ago. 1987.

RITCHIE, M. D. Using biological knowledge to uncover the mystery in the search for epistasis in genome-wide association studies. **Annals of human genetics**, v. 75, n. 1, p. 172–82, jan. 2011.

ROSSO, S. B. et al. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 34–42, jan. 2005.

- SALAZAR, L. A. et al. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical chemistry**, v. 44, n. 8 Pt 1, p. 1748–50, ago. 1998.
- SALINAS, P. C. Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. **Biochemical Society transactions**, v. 33, n. Pt 6, p. 1295–8, dez. 2005.
- SASSON, Y. et al. Bipolar comorbidity: from diagnostic dilemmas to therapeutic challenge. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 6, n. 2, p. 139–44, jun. 2003.
- SCHAFFER, B.; WIEDAU-PAZOS, M.; GESCHWIND, D. H. Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in neural and non-neural tissues. **Gene**, v. 302, n. 1-2, p. 73–81, 2 jan. 2003.
- SCHLOESSER, R. J. et al. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 110–33, jan. 2008.
- SHIMOGORI, T. et al. Members of the Wnt, Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. **The Journal of comparative neurology**, v. 473, n. 4, p. 496–510, 7 jun. 2004.
- SPEESE, S. D.; BUDNIK, V. Wnts: up-and-coming at the synapse. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 6, p. 268–75, jun. 2007.
- STRAKOWSKI, S. M. et al. Neuroimaging in bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 2, n. 3 Pt 1, p. 148–64, set. 2000.
- TADDEI, M. L. et al. Beta-catenin interacts with low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase. **Cancer research**, v. 62, n. 22, p. 6489–99, 15 nov. 2002.
- TANG, S. The synaptic Wnt signaling hypothesis. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 61, n. 10, p. 866–8, out. 2007.
- THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. **Nature**, v. 346, n. 6287, p. 847–50, 30 ago. 1990.
- TISSIR, F.; GOFFINET, A. M. Expression of planar cell polarity genes during development of the mouse CNS. **The European journal of neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 597–607, fev. 2006.

TORO, C. T.; DEAKIN, J. F. W. Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal early brain development? **Schizophrenia research**, v. 90, n. 1-3, p. 1–14, fev. 2007.

VAN LEEUWEN, F.; SAMOS, C. H.; NUSSE, R. Biological activity of soluble wingless protein in cultured *Drosophila* imaginal disc cells. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 342–4, 24 mar. 1994.

WANG, Y. et al. Axonal growth and guidance defects in *Frizzled3* knock-out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 2, p. 355–64, 11 jan. 2006.

WAYMAN, G. A et al. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of *Wnt-2*. **Neuron**, v. 50, n. 6, p. 897–909, 15 jun. 2006.

WENDER, P. H. et al. Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. **Archives of general psychiatry**, v. 43, n. 10, p. 923–9, out. 1986.

WILLOUR, V. L. et al. A genome-wide association study of attempted suicide. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 4, p. 433–44, abr. 2012.

WITKE-THOMPSON, J. K.; PLUZHNIKOV, A.; COX, N. J. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. **American journal of human genetics**, v. 76, n. 6, p. 967–86, jun. 2005.

WODARZ, A; NUSSE, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 14, p. 59–88, jan. 1998.

YEREVANIAN, B. I.; KOEK, R. J.; MINTZ, J. Lithium, anticonvulsants and suicidal behavior in bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 73, n. 3, p. 223–8, fev. 2003.

YOUNG, L. T. Is bipolar disorder a mitochondrial disease? v. 32, p. 160–1, 2007.

ZANDI, P. P. et al. Association study of Wnt signaling pathway genes in bipolar disorder. **Archives of general psychiatry**, v. 65, n. 7, p. 785–93, jul. 2008.

ZHOU, C.-J. et al. Neuronal production and precursor proliferation defects in the neocortex of mice with loss of function in the canonical Wnt signaling pathway. **Neuroscience**, v. 142, n. 4, p. 1119–31, 3 nov. 2006.

ZHOU, C.-J.; ZHAO, C.; PLEASURE, S. J. Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 121–6, 7 jan. 2004.

ZHOU, W. et al. A transgenic Cre mouse line for the study of cortical and hippocampal development. **Genesis (New York, N.Y. : 2000)**, v. 48, n. 5, p. 343–50, maio. 2010.

ZINTZARAS, E. Impact of Hardy-Weinberg equilibrium deviation on allele-based risk effect of genetic association studies and meta-analysis. **European journal of epidemiology**, v. 25, n. 8, p. 553–60, ago. 2010.

ZINTZARAS, E.; LAU, J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. **Journal of clinical epidemiology**, v. 61, n. 7, p. 634–45, jul. 2008.

ZOU, Y. Wnt signaling in axon guidance. **Trends in neurosciences**, v. 27, n. 9, p. 528–32, set. 2004.