

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Maria Aparecida Camargos Bicalho

**ESTUDO DE POLIMORFISMO DO GENE DA TRIPTOFANO
HIDROXILASE 2 (TPH2) EM IDOSOS COM DEPRESSÃO DE
INÍCIO TARDIO**

**Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de mestre junto ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia Bioquímica e
Molecular da Universidade Federal de
Minas Gerais.**

Orientador: Professor Luiz Armando de Marco
Co-orientador: Professor Edgar Nunes de Moraes

Ao Marco Aurélio, Lucas e Arthur.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus pais, exemplos de perseverança e dedicação.

À Tininha e à Cláudia, pela ajuda incondicional.

Ao Marco Aurélio, companheiro em todos os momentos. Ao Lucas e ao Arthur, presentes em todos os momentos, participantes das etapas mais críticas.

Ao mestre, Professor Luiz Armando de Marco, pela dedicação, apoio e disponibilidade.

À Professora Wolfanga Lentz Boson, pela paciência de ensinar, pela dedicação e competência.

Ao Professor Marco Aurélio Romano Silva responsável pela consolidação de grandes projetos.

À Débora, pelo incentivo e apoio desde o início.

Ao Professor Edgar Nunes de Moraes pela dedicação aos idosos, ao Centro de Referência do Idoso e à geriatria.

Ao Professor Marcus Vinícius Gomes, pela dedicação à ciência, exemplo para todos nós.

Aos colegas de laboratório, Juliana Drummond, Juliana Garcia, Dani, Karen, Bruno e Renan, pela ajuda inestimável.

Aos alunos da iniciação científica, Guilherme e Gabriela, sempre dispostos a enfrentar os desafios da ciência.

Aos residentes de geriatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que facilitaram a coleta dos dados e tornaram mais agradável a realização desse trabalho.

À Maura pelo apoio, cuidado e carinho dispensado aos idosos e a todos os membros do Centro de Referência do Idoso.

A todos os idosos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do nosso trabalho.

LISTA DE FIGURAS:

| | |
|--|----|
| Figura 1 - a hipótese das neurotrofinas | 25 |
| Figura 2 - modelo da interação dos fatores de risco no desenvolvimento dos transtornos depressivos | 37 |
| Figura 3 - estrutura química da serotonina | 37 |
| Figura 4 - organização dos neurônios serotoninérgicos no tronco cerebral | 39 |
| Figura 5 - síntese da serotonina | 41 |
| Figura 6 - níveis séricos e tissulares de 5-HT encontrados em linhagens de camundongos selvagens (<i>wildtype</i>) e deficientes (<i>knockout</i>) para TPH | 48 |
| Figura 7 - SNP G1463A da TPH2 humana | 51 |
| Figura 8 - gel de poliacrilamida com produtos de PCR do exon 11 da TPH2 | 63 |
| Figura 9 - sequenciamento do exon 11 da TPH2 – 1463G | 64 |

LISTA DE TABELAS:

| | |
|---|----|
| Tabela 01 - taxa de depressão anual e ao longo da vida e média de idade de início da depressão em 10 países diferentes | 21 |
| Tabela 02 - categorias diagnósticas da depressão | 29 |
| Tabela 03 - escala de depressão geriátrica – versão 15 itens | 34 |
| Tabela 04 - sumário dos resultados encontrados em indivíduos portadores do SNP (G1463A) da TPH2 | 50 |
| Tabela 05 - protocolo de coloração pela prata | 58 |
| Tabela 06 - número de indivíduos nos grupos controle e pacientes com relação ao gênero | 61 |
| Tabela 07 - número de indivíduos nos grupos controle e pacientes com relação à raça | 61 |

ABREVIATURAS:

A - adenina (nucleotídeo)

A - alanina (aminoácido)

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

AMPc - *cyclic adenosine monophosphate* (monofosfato de adenosina cíclica).

Arg - arginina

AVC - acidente vascular cerebral

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

C - citosina (nucleotídeo)

C - cisteína (aminoácido)

Ca²⁺ - íon cálcio

CID - Classificação Internacional de Doenças

Cl⁻ - íon cloro

Cm - centímetros

CREB - *response element binding protein* (elemento ligante responsivo ao AMPc)

CRF - fator liberador de corticotropina

DAC - doença arterial coronariana

DE - desvio padrão

DNA - ácido desoxirribonucleico

dATP – desoxi-adenosinatrifosfato

dCTP –desoxi-citosinatrifosfato

dGTP – desoxi-guanidinatrifosfato

dNTP - desoxi-nucleotídeo trifosfato

dTTP – desoxi-timidinatrifosfato

ddNTP - dideoxi-nucleotídeo trifosfato

DSM-IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

g - gramas

G - guanina (nucleotídeo)

G - glicina (aminoácido)

GDS - *geriatric depression scale* (escala de depressão geriátrica)

GR - receptor de glicocorticóide

EDTA - ácido tetra etileno diamínico

H - histidina (aminoácido)

HF - história familiar
His - histidina
HHA - hipotálamo-hipófise-adrenal
5-HT - 5-hidroxitriptamina
5-HTT- 5- *hydroxytryptamine transporter* (transportador da serotonina)
5-HTP - 5-hidroxitriptofano
5-HTTLPR - polimorfismo da região promotora do gene 5-HTT
hTPH2 - TPH2 humana
K⁺ - íon potássio
Kb - kilobase
KCl - cloreto de potássio
MAO - monoamina oxidase
MgCl₂ - cloreto de magnésio
mg - miligramas
ml - mililitros
mM - milimolar
mRNA - ácido ribonucléico (RNA) mensageiro
μl - microlitro
Na⁺ - íon sódio
NE - noradrenalina
Ng - nanogramas
OMS - Organização Mundial de Saúde
P - prolina (aminoácido)
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
PAH - phenilalanina hidroxilase (fenilalanina hidroxilase)
pb - pares de bases
PCR - *polymerase chain reaction* (reação da polimerase em cadeia)
PKA - *cAMP-dependent protein kinase* (proteína kinase dependente de AMPc)
PET - tomografia com emissão de pósitron
pmoles- picomoles
R - arginina (aminoácido)
RR - risco relativo
SERT - transportador de serotonina
SLC6A4 - transportador de serotonina (solute carrier family 6 member 4)

SNC - sistema nervoso central

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

SSRI - *selective serotonin reuptake inhibitors* (inibidores seletivos da recaptação de serotonina)

T - timina (nucleotídeo)

T - treonina (aminoácido)

TDM - Transtorno Depressivo Maior

TH - tirosina hidroxilase

TPH - triptofano hidroxilase

TPH2 - Triptofano hidroxilase-2

TrekB - *tyrosine receptor kinase B* (receptor da tirosina kinase B)

TSR - *template supression reagent*

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VNTR - repetição em *tandem* em número variável

RESUMO:

A depressão é uma doença de elevada prevalência, que determina sofrimento, incapacidade e desordem social e eleva a taxa de mortalidade de doenças associadas, como a doença arterial coronariana.

A população idosa é especialmente comprometida pela doença, apesar de ser frequentemente subdiagnosticada em decorrência das manifestações próprias nesta faixa etária. Nestes pacientes, ela se associa frequentemente à incapacidade cognitiva e outros comprometimentos funcionais. A depressão de início tardio é um subtipo especial de depressão, cujo início ocorre após os 60 anos de idade. Apresenta fisiopatologia e características clínicas diferentes da depressão de início precoce.

Inúmeros estudos apontam o papel da serotonina nos distúrbios do humor e alterações em sua síntese poderiam levar à depressão maior. A TPH2 é uma enzima limitante da síntese deste neurotransmissor. Assim, alterações moleculares no gene TPH2 foram consideradas como associadas aos fenômenos comportamentais incluindo transtornos do humor, suicídio, traços de personalidade e dependência química por álcool e drogas.

Em 2005, Zhang et al. demonstraram que os níveis de 5-HT foram reduzidos em 80% quando a mutante Arg441His era expressa em células PC-12, indicando uma perda significativa da função da enzima mutante. Além disso, este SNP funcional foi observado em nove indivíduos dentre 87 portadores de depressão maior refratária ao tratamento medicamentoso e com idade superior a 60 anos. Entretanto, vários grupos, após estudarem mais de 5000 indivíduos de diversos grupos étnicos, não conseguiram encontrar a variante acima descrita. Estes grupos haviam incluído em suas amostras indivíduos com depressão grave, necessitando eletroconvulsoterapia, como os descritos por Zhang et al. (2005). Porém, nenhum grupo estudou pacientes idosos com o objetivo de analisar se a variável em questão encontrava-se associada à depressão de início tardio.

Após analisarmos o exon 11 da TPH2 em uma amostra de 164 indivíduos idosos (103 portadores de depressão de início tardio e 61 controles) não observamos a presença da variante descrita. Sendo assim,

concluimos que a variante descrita por Zhang é uma forma rara e que, provavelmente, esteja relacionada à origem étnica da população estudada.

ABSTRACT:

Depression is a disorder of great prevalence, which inflicts suffering, incapacity, social problems and increases mortality from associated illnesses as coronary arterial disease.

The elderly population is especially affected by the illness which is less recognized owing to some typical manifestations at this age. In these patients, the disease is frequently associated with the cognitive impairment. Late onset depression is a particular kind of depression, whose beginning is set after sixths. It presents a different ethiopathogenesis and clinical aspects from the early onset depression.

Some studies have pointed the importance of serotonin in mood disorders. And alterations in its synthesis could led to major depression. TPH2 is the rate-limiting enzyme of the synthesis of this neurotransmitter. Thus, molecular modifications in TPH2 gene had been thought to be involved in behavioral impairments like mood disorders, suicide, traces of personalities and chemical dependence for alcohol and drugs.

In 2005, Zhang et al. (2005 a) shown that the levels of 5-HT were reduced in up to 80% when the Arg441His mutant was expressed in cells PC-12, indicating a significant loss of the function of the mutant enzyme. Moreover, this functional SNP was observed in nine individuals at a cohort study of 87 carriers of unipolar major depression patients refractory to drug therapy and older than 60 years of age. However, some groups, which studied approximately 5000 individuals from multiple ethnic groups, did not found the variant described by Zhang et al. (2005 a). These groups enclosed in its samples individuals with severe depression, needing electrical convulsive therapy, as described by Zhang et al. (2005 a). However, no group had studied elderly patients trying to find if variant in question was associated with the late onset depression. After investigating the exon 11 of TPH2 in 164 samples from elderly patients (103 with late onset depression and 61 in control group) we did not find the variant described by Zhang et al. (2005 a). Therefore, we conclude that the variant described by Zhang et al. (2005) is rare and, probably, related to the ethnic origin of the studied population.

SUMÁRIO:

| | |
|--|------|
| Lista de figuras: | vi |
| Lista de tabelas: | vii |
| Abreviaturas: | viii |
| Resumo: | xi |
| Abstract: | xiii |
| Sumário: | xiv |
| 1. Introdução: | 16 |
| 1.1 – Depressão: | 17 |
| 1.1.1 – Histórico: | 17 |
| 1.1.2 – Importância: | 18 |
| 1.1.3 – Epidemiologia: | 20 |
| 1.1.4 – Etiologia: | 21 |
| 1.1.5 – Fisiopatologia: | 23 |
| 1.1.5.1 – Teoria das monoaminas: | 24 |
| 1.1.5.2 – Hipótese das neurotrofinas: | 24 |
| 1.1.5.3 – Sistema hipotálamo-hipófise-adrenal: | 26 |
| 1.1.6 – Quadro clínico e evolução da doença: | 27 |
| 1.1.7 – Depressão em idosos: | 31 |
| 1.1.7.1 – Depressão de início tardio: | 35 |
| 1.2 – Serotonina e depressão: | 37 |
| 1.3 – O gene candidato: | 46 |
| 1.4 – Objetivos: | 52 |
| 1.4.1 – Objetivo geral: | 52 |
| 1.4.2 – Objetivos específicos: | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 2 – Materiais e métodos: | 53 |
| 2.1 – Amostra estudada: | 54 |
| 2.2 – Genotipagem: | 55 |
| 2.2.1 – Extração do DNA: | 55 |
| 2.2.2 – Amplificação da DNA: | 55 |
| 2.2.3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida: | 57 |
| 2.2.4 – Coloração pela Prata: | 58 |
| 2.2.5 – Purificação do produto de PCR: | 59 |
| 2.2.6 – Sequenciamento automático: | 59 |
| 2.2.7 – Análise estatística: | 61 |
| 3 – Resultados: | 62 |
| 3.1 – Análise da amostra estudada: | 63 |
| 3.2 – Resultados genotípicos: | 63 |
| 4 – Discussão: | 65 |
| 5 – Conclusão: | 75 |
| 6 – Referências bibliográficas: | 77 |
| 7- Anexos: | 89 |
| Anexo 1 | 90 |
| Anexo 2 | 92 |
| Anexo 3 | 93 |
| Anexo 4 | 94 |
| Anexo 5 | 95 |
| Anexo 6 | 96 |
| Anexo 7 | 97 |

1- INTRODUÇÃO:

1.1 – DEPRESSÃO:

1.1.1 - HISTÓRICO:

“ Pesar e culpa, quando prolongados, provocam melancolia.”

Hipócrates, 460-377 AC.

μελαγχολια (melancolia, do grego, bile negra) é a única patologia que manteve a nomenclatura da classificação hipocrática baseada nos quatro humores. Hipócrates acreditava que a melancolia era causada pelo humor “bile negra” e que seu tratamento consistia na depuração e remoção do sangue (Wong & Licínio, 2001).

As primeiras descrições sobre depressão - estado mental, orgânico e espiritual previamente conhecido como melancolia - datam da antiguidade. Há três mil anos, os escritos egípcios refletiam a condição humana, o envelhecimento e a morte de forma muito pessimista. Porém, somente na era de Hipócrates o termo melancolia (bile negra) foi usado para denominar um dos quatro humores. As investigações científicas a respeito dos distúrbios do humor iniciaram-se há apenas 150 anos. No século XIX, Emil Kraepelin descreveu e classificou a “insanidade maníaco-depressiva”. Esse autor, baseado em conceitos clínicos e anatômicos, considerou a depressão como uma doença (Costa e Silva, 2005; Hamet & Tremblay, 2005).

Entretanto, no mesmo período, Sigmund Freud reconheceu a depressão como uma manifestação da internalização de raiva ou perda (Wong & Licínio, 2001). O pensamento freudiano influenciou profundamente gerações de psiquiatras, muito embora algumas de suas hipóteses tenham sido testadas experimentalmente apenas recentemente. Lerer e colaboradores (1999) demonstraram que o óbito precoce de um dos pais é um fator preditivo altamente significativo de depressão ao longo da vida, sendo que o óbito materno determina um risco maior para o desenvolvimento de depressão do que o paterno. Além disso, observaram que a separação dos pais apresenta uma associação mais forte com o desenvolvimento de depressão do que o óbito de um dos pais.

Dois grupos britânicos, Maudsley e Newcastle (Lewis AJ, 1934 citado por Wong & Licinio, 2001; Garside et al, 1971), apresentaram contribuição significativa para a compreensão das manifestações clínicas da depressão, classificando-a como endógena ou reativa.

A definição atual de depressão baseia-se nos resultados do *United Kingdom Diagnostic Project* e do estudo colaborativo da psicobiologia da depressão do *National Institute of Mental Health*. Estes resultados sustentam a distinção entre os transtornos unipolar (depressão) e bipolar (maníaco-depressivo), descritas no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) e na Classificação Internacional de Doenças (CID).

Na classificação contemporânea das desordens psiquiátricas (DSM-IV), melancolia é definida como um subtipo de depressão maior.

1.1.2 - IMPORTÂNCIA:

A depressão é a segunda condição clínica mais comum na prática médica geral, sendo secundária apenas à hipertensão arterial sistêmica (Whooley & Simon, 2000). Os transtornos depressivos são comuns, graves e, em alguns casos, ameaçadores à vida. Causam sofrimento, incapacidade e desordem social, frequentemente levando à ruptura das atividades de vida diária dos pacientes e familiares próximos. É ainda a principal causa mundial de incapacidade em indivíduos entre 15 e 44 anos (Hamet & Tremblay, 2005).

O fardo econômico para a sociedade é considerável e comparável àquele determinado por outras doenças como a doença arterial coronariana. Por atingir indivíduos relativamente jovens, a depressão representa um custo econômico elevado por um prolongado período de tempo, acarretando um impacto elevado na produtividade. A depressão é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema maior de saúde pública.

Além disso, pacientes deprimidos apresentam um risco aumentado de morte precoce. O índice de mortalidade em indivíduos com mais de 55 anos com Transtorno Depressivo Maior (TDM) pode ser quatro vezes maior do que na população geral. Uma possível explicação para a redução da expectativa de vida nestes indivíduos é a doença cardiovascular, já que o risco de

desenvolvimento de infarto do miocárdio é quatro vezes maior nestes pacientes. Também, após o infarto do miocárdio, os sintomas depressivos aumentam a mortalidade e as complicações clínicas e psicológicas, mesmo após o controle da doença arterial coronariana (Wong & Licinio, 2001).

Indivíduos com depressão maior também apresentam um risco elevado para co-morbidades psiquiátricas, como abuso de substâncias e distúrbio de ansiedade (Weissman et al., 1996).

É importante considerar que pacientes portadores de depressão freqüentemente tentam suicídio. Este representa aproximadamente 0,9% das causas de morte em todo o mundo. Estima-se que 85 a 90% das vítimas de suicídio apresentam um distúrbio psiquiátrico, sendo a depressão grave o distúrbio mais freqüente. Aproximadamente 21% dos pacientes com transtorno depressivo recorrente tentarão suicídio (OMS, 2001). Quinze por cento dos indivíduos com Transtorno Depressivo Maior grave morrem por suicídio (DSM IV). É interessante ressaltar que a história familiar positiva para suicídio constitui fator de risco independente do diagnóstico psiquiátrico do paciente (Trémeau et al., 2005) e associa-se com tentativas de auto-extermínio mais violentas e letais (Viana et al., 2006).

A seguir encontram-se descritos os principais fatores de risco para suicídio em pacientes com depressão maior (Whooley & Simon, 2000):

- Idade maior do que 65 anos;
- Sexo masculino;
- Raça branca;
- Estado civil: solteiro, divorciado, separado ou viúvo (especialmente sem filhos);
- Desemprego;
- História pessoal ou familiar de distúrbio psiquiátrico;
- Abuso de álcool ou drogas;
- Graves eventos estressantes de vida em passado recente;
- Ataques de pânico ou ansiedade grave;
- Doença orgânica grave (especialmente de início recente);
- Desesperança ou anedonia¹ grave;

¹ Anedonia: perda da capacidade de sentir prazer.

- Planejamento elaborado de suicídio (especialmente com elevado potencial de letalidade);
- Acesso a armas de fogo ou outros meios letais;

1.1.3 - EPIDEMIOLOGIA:

É uma das doenças psiquiátricas mais comuns. Apresenta prevalência de aproximadamente 5% na população geral. Entretanto, a prevalência ao longo da vida chega a 20%. O risco para TDM durante a vida em amostras comunitárias tem variado de 10 a 25% para as mulheres e de 5 a 12% para os homens. Estudo epidemiológico populacional envolvendo 10 países mostrou uma taxa de depressão ao longo da vida variando de 1.5 a 19.0 casos a cada 100 adultos e uma taxa anual de 0.8 a 5.8 casos para cada 100 adultos, dependendo da região, conforme demonstrado na tabela 1 (Weissman et al., 1996). Os índices de prevalência para o TDM parecem não ter relação com etnia, educação, situação sócio-econômica ou estado civil (DSM IV).

Acomete 10% dos indivíduos que buscam os serviços de saúde por motivos diversos. E, pelo menos, 20% dos pacientes portadores de doenças crônicas, como patologias cardiovasculares e diabetes melito, sofrem de transtornos depressivos, embora o diagnóstico seja feito em uma pequena minoria (cerca de um terço dos casos) (Wong & Licinio, 2001). Um terço dos pacientes após infarto agudo do miocárdio evoluem com depressão maior num período de 12 meses. Dentre os pacientes portadores de câncer, um quarto sofre de depressão. Aproximadamente metade dos pacientes com doenças neurológicas apresenta sintomas depressivos. É especialmente comum em pacientes hospitalizados e durante o processo de recuperação de doenças agudas (Costa e Silva, 2005; Ebmeier et al., 2006). A incidência da depressão está aumentando e a faixa etária de acometimento está reduzindo (Wong & Licinio, 2001).

Tabela 1: taxa de depressão anual e ao longo da vida e média de idade de início da depressão em 10 países diferentes:

| Localidade | Taxa anual / 100 (DP) | Taxa ao longo da vida/100 (DP) | Média de idade em anos (DP) |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| EUA | 3.0 (0.8) | 5.2 (0.24) | 25.6 (0.30) |
| Edmonton, Alberta | 5.2 (0.45) | 9.6 (0.6) | 24.8 (0.52) |
| Porto Rico | 3.0 (0.49) | 4.3 (0.59) | 29.5 (1.19) |
| Paris, França | 4.5 (0.65) | 16.4 (1.16) | 29.2 (0.52) |
| Alemanha Ocidental | 5.0 (1.13) | 9.2 (1,5) | 29.7 (1.18) |
| Florença, Itália | – | 12.4 (1.33) | 34.8 (1.12) |
| Beirut, Líbano | – | 19.0 (1,76) | 25.2 (1.0) |
| Taiwan | 0.8 (0.09) | 1.5 (0.12) | 29.3 (1.04) |
| Korea | 2.3 (0.22) | 2.9 (0.24) | 29.3 (0.88) |
| Christchurch, Nova Zelândia | 5.8 (0.70) | 11.6 (0.96) | 27.3 (0.58) |

DE: desvio padrão.

Modificado de: Weissman et al. (1996)

1.1.4 - ETIOLOGIA:

A depressão, conforme atualmente diagnosticada pelo DSM-IV, provavelmente representa um conjunto heterogêneo de desordens de múltiplas causas. O desenvolvimento de um sistema diagnóstico baseado na etiologia constitui um dos objetivos das pesquisas atuais (Charney & Manji, 2004). Embora a etiologia precisa da depressão não seja bem compreendida, um amplo espectro de fatores envolvidos nesta desordem encontra-se bem conhecido, como fatores biológicos, psicológicos e sócio-culturais (Kalia, 2005).

Não existem dúvidas quanto à importância dos fatores genéticos na etiologia da depressão. Episódios recorrentes de depressão de início precoce associam-se com maior agregação familiar (Ebmeier et al., 2006). Estudos baseados em agregação familiar demonstram uma herança em torno de até 50% (Hamet & Tremblay, 2005; Kendler et al., 2005; Levinson, 2006;

Wurtman, 2005). O risco relativo (RR) para familiares de primeiro grau de indivíduos portadores de TDM é de 2 a 3 (Weissman et al., 1984; Maier et al., 1992).

Os fatores genéticos poderiam predispor à depressão afetando a neurotransmissão através do aumento ou redução da liberação, ação ou duração da atividade do neurotransmissor (Wurtman, 2005).

Os episódios de depressão maior frequentemente se seguem a um evento psicossocial severo, como a morte de um ente querido ou divórcio. Estes eventos exercem papel mais significativo na precipitação do primeiro ou segundo episódio de depressão maior do que como fator precipitante de episódios subseqüentes.

Problemas psicossociais como baixo nível sócio-econômico, distúrbios orgânicos, incapacidade, isolamento social e institucionalização podem determinar uma desordem de ajustamento que cursa com humor deprimido ou desencadear síndromes depressivas mais graves. Durante os primeiros anos de luto, 10 a 20% das mulheres desenvolvem sintomas de depressão e a prevalência persiste elevada no segundo ano. Além disso, 14% dos idosos viúvos apresentam depressão maior (Alexopoulos, 2005).

Existe uma forte correlação entre eventos estressantes e depressão. Entretanto, parte dessa associação é não causal, pois os fatores de risco genético para alguns eventos estressantes também se correlacionam com uma maior predisposição para o desenvolvimento de depressão maior. Os eventos não são experimentados ao acaso. Alguns indivíduos apresentam uma persistente tendência para envolver-se em situações cuja probabilidade para produzir eventos estressantes é elevada. Postula-se que a combinação de fatores genéticos e eventos estressantes poderiam determinar a resposta individual ao stress e a vulnerabilidade aos distúrbios psiquiátricos, dentre eles a depressão (Kendler et al., 1999).

Além disso, efeitos neurotóxicos (possivelmente relacionados ao excesso de atividade de corticotropina e/ou aos efeitos antiinflamatórios das citocinas) danificam ou matam as células do hipocampo, determinando deficiente função dos peptídeos neuroprotetores e sintomas depressivos subseqüentes. Fatores genéticos poderiam alterar o equilíbrio entre as

respostas neurotóxicas e neuroprotetoras ao stress, enquanto os antidepressivos aumentariam os efeitos neuroprotetores (Levinson, 2006).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma dessas proteínas neuroprotetoras. BDNF e outros fatores neurotróficos são necessários para sobrevivência e função dos neurônios. Desta forma, a redução desses fatores poderia afetar a viabilidade neuronal. Estudos preliminares apontam para a redução do BDNF no TDM (Manji et al., 2001).

Estudos de neuroimagem funcional revelam múltiplas anormalidades no fluxo sanguíneo cerebral regional e no metabolismo de glicose nas estruturas do sistema límbico e do córtex pré-frontal nos distúrbios do humor. Em indivíduos com depressão maior familiar não tratada, o fluxo sanguíneo cerebral e o metabolismo estão aumentados na amígdala, córtex orbital, tálamo medial e reduzidos no córtex pré-frontal ântero-lateral, médio-dorsal e córtex ventral cingulado anterior ao corpo caloso (Charney & Manji, 2004).

A depressão maior associa-se com ativação de regiões relacionadas com o stress e a emoção (por exemplo, amígdala, que determina emoções em resposta a estímulos adversos). Por outro lado, áreas que inibem a expressão da emoção (como o córtex orbital posterior) contêm anormalidades histológicas que podem interferir com a modulação da emoção e da resposta ao stress (Drevets, 2001). Assim, lesões (como acidentes vasculares cerebrais e tumores) envolvendo o córtex pré-frontal ou o estriado (principais vias de projeção eferente do córtex pré-frontal) e doenças degenerativas afetando o estriado (como doenças de Huntington e de Parkinson) associam-se a um risco elevado para o desenvolvimento de depressão (Starkstein, 1996). Anormalidades do hipocampo também poderiam predispor a depressão, já que a redução de seu volume correlaciona-se com a duração do quadro. Alterações do hipocampo são relevantes principalmente na população idosa, uma vez que a estrutura é particularmente vulnerável ao envelhecimento.

1.1.5 - FISIOPATOLOGIA:

A depressão é considerada como uma desordem multifatorial, que envolve múltiplos genes. Segundo Urani et al. (2005), os episódios depressivos desenvolvem-se quando fatores patogênicos alcançam dimensões extremas ou ocorrem simultaneamente. Estes fatores induzem disfunções transitórias ou persistentes em várias regiões ou sistemas cerebrais.

Três teorias principais tentam definir seus mecanismos bioquímicos e moleculares: hipóteses das monoaminas, das neurotrofinas e do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).

1.1.5.1 - TEORIA DAS MONOAMINAS:

Segundo esta teoria, a depressão seria secundária a uma alteração da neurotransmissão de serotonina, noradrenalina e dopamina. A deficiência monoaminérgica poderia resultar de vários mecanismos, tais como a redução da síntese ou aumento da degradação de neurotransmissores, alteração da função dos receptores dos neurotransmissores e alteração dos sistemas de transdução do sinal ativados pelos receptores pós-sinápticos.

As monoaminas produzem seus efeitos através de mudanças bioquímicas complexas nos neurônios pós-sinápticos no sistema nervoso central (SNC), através da interação com proteínas sinalizadoras (proteínas G) nas membranas celulares pós-sinápticas. Estas proteínas G, ligadas a receptores, após serem estimulados pelas monoaminas, produzem mudanças na forma como os neurônios pós-sinápticos respondem aos neurotransmissores clássicos (glutamato e ácido aminobutírico).

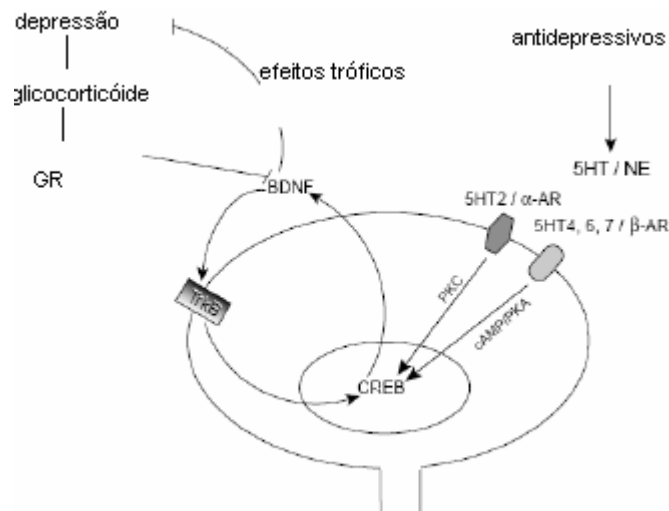
É importante ressaltar que o número de neurônios monoaminérgicos no SNC é muito pequeno (< 1 em 200.000). Entretanto, esses neurônios enviam axônios para todo o cérebro, formando um sistema modulatório intrínseco que altera a responsividade total do cérebro (Kalia, 2005).

1.1.5.2 - HIPÓTESE DAS NEUROTROFINAS:

Pela hipótese das neurotrofinas, o BDNF e outras neurotrofinas influenciam a plasticidade estrutural e apresentam efeitos tróficos nos neurônios. Sendo assim, a deficiência de BDNF contribuiria para a fisiopatologia da depressão.

A figura 1 mostra a via CREB (elemento ligante responsivo ao AMPc - *response element binding protein*) - BDNF-TrkB (receptor da tirosina kinase B - *tyrosine receptor kinase B*), que encontra-se envolvida na fisiopatologia e no tratamento da depressão. A geração de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) resulta na ativação de proteína kinase dependente de AMPc (PKA), que por sua vez, ativa o fator de transcrição CREB, através de fosforilação. CREB, uma vez ativado, aumenta a transcrição de muitos genes alvos, incluindo o BDNF, que exerce seu efeito pela ativação de seu receptor específico - TrkB (Urani et al, 2005)

Figura 1: a hipótese das neurotrofinas:



GR - receptor de glicocorticoide; NE - noradrenalina

Adaptado de: Urani et al.(2005).

O stress crônico e o subsequente aumento dos níveis séricos de corticosteróides são considerados fatores de risco importantes para o desenvolvimento de um episódio depressivo. O stress ou a corticoterapia,

através da ativação de receptores de glicocorticóides, causa redução de RNA mensageiro (mRNA) do BDNF no hipocampo e em outras regiões cerebrais consideradas importantes na patogênese da depressão. O stress e a depressão determinam redução da atividade da via CREB-BDNF-TrekB, enquanto os antidepressivos levam a uma ativação desta cascata de sinalização.

1.1.5.3 - SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA):

O stress é considerado como um importante fator patogênico para o desenvolvimento de episódios depressivos. Sob condições fisiológicas, o sistema HHA é ativado por estressores internos e externos, de forma a regular as necessidades energéticas em situações críticas ou ameaçadoras ao organismo. O hipotálamo produz fator liberador de corticotropina (CRF) que estimula a produção de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, determinando assim, a síntese e liberação de glicocorticóides pelas supra-renais. A liberação de cortisol exerce um *feedback* negativo no hipotálamo para manter o equilíbrio do sistema.

Muitos pacientes com episódios depressivos graves apresentam alteração da secreção circadiana do cortisol, determinando níveis séricos significativamente maiores do que em indivíduos normais. Esses níveis usualmente retornam ao normal com a remissão do quadro depressivo. Embora esses dados sugiram uma hiper-atividade do sistema HHA na etiologia dos distúrbios do humor, os mecanismos de sua desinibição na depressão não estão elucidados e parecem envolver vários níveis anatômicos de regulação, dos centros cerebrais mais altos à supra-renal. Os receptores de glicocorticóides apresentam papel fundamental na regulação do sistema HHA, pois eles acionam o *feedback* negativo dos glicocorticóides no hipotálamo e hipocampo. Uma disfunção desses receptores poderia explicar a super-ativação do eixo observada nos pacientes deprimidos (Young, 2006). Alternativamente, uma super-regulação primária do CRF poderia levar a desinibição do sistema HHA e sub-regulação do receptor de corticosteróide resultando em níveis excessivos de cortisol plasmático. Assim, a hipercortisolemia pode ter um papel central na patogênese da depressão.

1.1.6 - QUADRO CLÍNICO E EVOLUÇÃO DA DOENÇA:

A depressão se caracteriza por uma tríade de sintomas: humor deprimido, anedonia e fadiga.

O transtorno depressivo maior apresenta, essencialmente, curso clínico caracterizado por um ou mais episódios depressivos maiores e ausência de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos². Nos episódios típicos de cada um dos três graus de depressão (leve, moderada ou grave), o paciente apresenta um rebaixamento do humor, redução de energia, e diminuição da atividade. Existe redução da capacidade de experimentar prazer, perda de interesse, diminuição da concentração, associadas em geral à fadiga importante, mesmo após um esforço mínimo. Esses sintomas são denominados somáticos. Observam-se em geral alterações do sono, com despertar matinal precoce e redução do apetite. A insônia e a perda de energia estão presentes na maioria dos pacientes com depressão. Existe quase sempre uma diminuição da auto-estima e da autoconfiança e, freqüentemente, idéias de culpa e/ou indignidade, mesmo nas formas leves (Weissman et al., 1996).

Segundo o DSM IV, a Depressão Maior é diagnosticada quando se satisfazem os seguintes critérios:

- Cinco ou mais dos sintomas descritos abaixo presentes durante o mesmo período de duas semanas, representando uma alteração a partir do funcionamento anterior; sendo pelo menos um dos sintomas (1) humor deprimido ou (2) perda de interesse ou prazer. Sintomas nitidamente secundários a condição médica geral ou alucinações não relacionadas ao distúrbio do humor não devem ser incluídos. A seguir relacionamos os sintomas que permitem o diagnóstico:
 1. Humor deprimido na maior parte do dia, durante quase todos os dias, indicado por relato subjetivo (por exemplo, sente-se triste ou vazio) ou observação feita por outros (chora muito). Em crianças ou adolescentes pode se manifestar como humor irritável;

² Episódios hipomaníacos - é uma crise de hipomania, transtorno caracterizado pela presença de uma elevação ligeira, mas persistente do humor, da energia e da atividade, associada em geral a um sentimento intenso de bem-estar e de eficácia física e psíquica.

2. Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos por todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, durante quase todos os dias (indicado por relato subjetivo ou observação feita por outros);
 3. Perda ou ganho significativo e involuntário de peso (por exemplo, mais de 5% do peso corporal em um mês) ou, diminuição ou aumento do apetite durante quase todos os dias. Em crianças, considerar ausência do ganho ponderal esperado;
 4. Insônia ou hipersonia durante quase todos os dias;
 5. Agitação ou retardo psicomotor durante quase todos os dias (observáveis por outros; não significa sensações subjetivas de inquietação ou lentidão);
 6. Fadiga ou perda de energia durante quase todos os dias;
 7. Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada (que pode ser delirante), durante quase todos os dias (não meramente auto-incriminação ou culpa por estar doente);
 8. Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão, durante quase todos os dias (por relato subjetivo ou observação feita por outros);
 9. Pensamentos de morte recorrentes (não apenas medo de morrer), ideação suicida recorrente sem um plano específico, tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio;
- Os sintomas não satisfazem os critérios para um episódio misto;
 - Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de determinadas substâncias (por exemplo, abuso de drogas ou medicamentos) ou de uma condição médica geral (por exemplo, hipotireoidismo);
 - Os sintomas não se devem ao luto, ou seja, após o óbito de um ente querido eles persistem por mais de dois meses ou se caracterizam por acentuado prejuízo funcional, preocupação mórbida com desvalia, ideação suicida ou retardo psicomotor;

A gravidade da doença varia de leve a grave (tabela 2), definida de acordo com o número e a gravidade dos sintomas.

Tabela 2 - categorias diagnósticas da depressão:

| CATEGORIA DIAGNÓSTICA | CRITÉRIO | DURAÇÃO DOS SINTOMAS |
|-----------------------|---|----------------------|
| Depressão menor | 2 a 4 sintomas depressivos, incluindo humor deprimido ou anedonia. | ≥2 semanas |
| Distimia | 3 ou 4 sintomas distímicos (humor deprimido, redução ou excesso de apetite, distúrbio do sono, perda de energia, baixa auto-estima, prejuízo da concentração e desesperança), incluindo humor deprimido. | ≥2 anos |
| Depressão Maior | <p>≥5 sintomas depressivos, incluindo humor deprimido ou anedonia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leve <ul style="list-style-type: none"> • Poucos sintomas além daqueles necessários para o diagnóstico; mínima alteração funcional; • Moderada <ul style="list-style-type: none"> • Maior número e intensidade dos sintomas depressivos, moderada alteração funcional; • Grave <ul style="list-style-type: none"> • Intensidade marcante e persistência dos sintomas depressivos, substancial alteração funcional. | ≥2 semanas |

Adaptado de: Whooley & Simon (2000)

O episódio depressivo grave pode cursar com sintomas psicóticos. Neste caso além dos sintomas correspondentes ao de um episódio

depressivo grave, ele se acompanha por alucinações, idéias delirantes, lentidão psicomotora ou estupor de extrema gravidade. Todas as atividades sociais normais tornam-se impossíveis e existe risco de óbito por suicídio, desidratação ou desnutrição.

A depressão pode ser classificada em múltiplos subtipos clínicos (Wong & Licinio, 2001):

- Início: precoce, pós-parto, tardio;
- Curso: episódio único, recorrente, crônico;
- Gravidade: leve, moderada, grave;
- Remissão: parcial ou total;
- Características psicóticas: presentes ou ausentes;
- Características catatônicas: presentes ou ausentes;
- Características atípicas: presentes ou ausentes;
- Características melancólicas: presentes ou ausentes;
- Padrão sazonal;
- Secundária a doenças clínicas.

Alguns sintomas depressivos podem ser confundidos com os de outros problemas clínicos. Por exemplo, a perda de peso e a fadiga também podem manifestar-se em doenças como diabetes, câncer e doenças da tireóide. A história e o exame clínico devem nortear as hipóteses diagnósticas. O diagnóstico é clínico e nenhum exame laboratorial se faz necessário, embora a dosagem do hormônio estimulante da tireóide (TSH) esteja indicado em mulheres acima de 65 anos e em pacientes com sinais e sintomas sugestivos de hipotireoidismo.

Alguns medicamentos podem estar associados com o desenvolvimento do transtorno depressivo, como os benzodiazepínicos e narcóticos. Entretanto, poucos medicamentos não psicotrópicos, exceto glicocorticóides e reserpina, causam sintomas depressivos. Os beta-bloqueadores não causam depressão (Whooley & Simon, 2000).

Seu início pode ocorrer em qualquer faixa etária, porém a média de idade situa-se em torno dos 25 anos. Tipicamente, seu curso é recorrente e os pacientes apresentam períodos sintomáticos alternados com períodos de

remissão. A maioria dos pacientes recupera-se dos episódios depressivos maiores (Wong & Licinio, 2001). Alguns indivíduos apresentam episódios isolados permanecendo muitos anos livres de sintomatologia, enquanto outros têm episódios agrupados e outros, episódios progressivamente mais freqüentes à medida que envelhecem. Algumas evidências sugerem que os períodos de remissão, em geral, apresentam duração mais prolongada no curso inicial do transtorno.

Uma proporção substancial dos doentes apresenta um curso crônico. Em acompanhamento prospectivo durante cinco e 10 anos, 12 e 7% deles, respectivamente, ainda encontram-se deprimidos. Dos pacientes que se recuperam, há uma alta taxa de recorrência e aproximadamente 75% deles experimentarão mais de uma recorrência dentro de um período de 10 anos (Costa e Silva, 2005). O número de episódios prévios é fator determinante da probabilidade de desenvolver um episódio depressivo maior subsequente. Aproximadamente 50 a 60% dos indivíduos com episódio único de TDM têm um segundo episódio. Indivíduos com dois episódios têm uma probabilidade de 70% de apresentarem um terceiro e, aqueles que apresentaram três episódios apresentam probabilidade de 90% de evoluírem para um quarto episódio. Cerca de 5 a 10% dos indivíduos que apresentam episódio único de TDM desenvolve, subsequente, um episódio maníaco³ (transtorno bipolar I). Dentre os idosos existe uma forte tendência à recorrência, com taxas que variam de 50 a 90% em dois a três anos (Reynolds et al., 2000).

Os episódios depressivos maiores podem regredir (cerca de dois terços dos casos) parcial ou completamente ou, não regredir (cerca de um terço dos casos). Os indivíduos que evoluem com remissão parcial apresentam maior probabilidade de desenvolverem novos episódios e de continuarem com um padrão de recuperação parcial entre os episódios.

1.1.7 - DEPRESSÃO EM IDOSOS:

Em pacientes idosos é uma síndrome heterogênea quanto à etiologia e aos aspectos relacionados ao tratamento. Assim como em adultos mais

³ Episódio maníaco - Presença de uma elevação do humor fora de proporção com a situação do sujeito, podendo variar de uma jovialidade descuidada a uma agitação praticamente incontrolável.

jovens, sua causa freqüentemente é multifatorial e fatores biológicos e psicossociais desempenham papel fundamental. Afeta, principalmente, portadores de doenças crônicas, declínio cognitivo ou incapacidades. Causa sofrimento, desordem familiar e incapacidade. Piora a evolução das doenças orgânicas e determina aumento da mortalidade (Alexopoulos, 2005).

Os idosos estão expostos a vários possíveis fatores de risco que contribuem para a elevada prevalência da depressão (Forlenza, 2000). Entretanto, tanto a prevalência quanto a incidência são habitualmente subestimadas, em função, principalmente, de sua manifestação atípica neste período da vida. Também, em portadores de doenças crônicas, seus sintomas podem ser desvalorizados e considerados como secundários à doença de base. Dessa forma, é importante a utilização de critérios diagnósticos apropriados para a faixa etária (Shoog, 2004; VanItallie, 2005).

A prevalência da doença em idosos, institucionalizados ou não, varia entre 1 a 16%, sendo de 0,9 a 9,4% entre aqueles que residem em domicílio e de 14 a 42% entre idosos institucionalizados. Essas variações se devem a diferenças metodológicas entre os estudos epidemiológicos e da região estudada. Nos Estados Unidos da América (EUA), a prevalência global de depressão maior entre indivíduos acima de 65 anos é de 5,7%. Tanto a prevalência quanto a incidência de depressão dobram na faixa etária compreendida entre 70 a 85 anos. Em pessoas acima de 85 anos é muito prevalente e associa-se fortemente com incapacidade cognitiva e funcional (Stek et al., 2004). Chega a acometer 40% dos idosos hospitalizados.

Os principais fatores predisponentes são: sexo feminino, doenças crônicas, incapacidade cognitiva, incapacidade funcional, perda ou redução do contato social e história prévia de depressão (Alexopoulos, 2005; Djernes, 2006). Schoevers et al. (2000) ressaltaram a importância do luto como fator desencadeador da depressão de início tardio. Apesar da participação destes fatores de risco na etiologia da depressão, em faixas etárias mais elevadas eles parecem não apresentar importância tão significativa quanto na depressão em adultos jovens (Stek et al., 2004; Blazer & Hybels, 2005).

Os idosos apresentam risco aumentado de morrer em decorrência de tentativa de auto-extermínio. A incidência de suicídio nesta população é praticamente duas vezes mais alta do que na população geral, sendo que as

taxas de suicídio são especialmente elevadas no sexo masculino. As síndromes depressivas estão presentes em 80% dos indivíduos acima de 74 anos que cometem suicídio. Desta forma, especialmente neste grupo de pacientes, a depressão maior assim como o abuso de substâncias são fatores de risco para o suicídio.

O padrão de sintomas depressivos que ocorre em idosos é absolutamente diferente daquele manifestado por grupos etários mais jovens. Relato espontâneo de problemas como “ansiedade, stress e depressão” é menos freqüente. O reconhecimento dos sintomas depressivos é, muitas vezes, dificultado pela presença de doenças orgânicas. Além disso, sintomas de depressão em idosos podem ser equivocadamente considerados como conseqüências naturais do envelhecimento e de eventos adversos da vida (Stek, 2004; Yang & George, 2005).

Muitas dificuldades diagnósticas são superadas pela utilização de instrumentos diagnósticos específicos para a idade, como a escala de depressão geriátrica (GDS, versão 15 itens) (Sheikh & Yesavage, 1986). Almeida e Almeida (1998) validaram a versão reduzida (GDS-15) em língua portuguesa como um indicador relativamente estável do humor do entrevistado. Dessa forma, a GDS-15 pode ser utilizada para detecção de casos de depressão no idoso e monitoramento da gravidade dos sintomas ao longo do tempo. A versão em português dessa escala encontra-se descrita na tabela 3. O ponto de corte 4/5 (não caso/caso) apresenta elevados índices de sensibilidade e especificidade, devendo ser considerado na pontuação final para o diagnóstico do transtorno em idosos (Almeida & Almeida, 1998).

Idosos não dementes portadores de depressão frequentemente apresentam dificuldades na concentração, velocidade do processamento mental e nas funções executivas. A depressão em idosos pode ser um sintoma de demência incipiente (Skoog, 2004). Os sintomas de depressão frequentemente precedem o declínio cognitivo e a demência. Muitos idosos manifestam quadro demencial durante um episódio de depressão que regride após a remissão do quadro depressivo (pseudo-demência). A maioria destes pacientes apresenta depressão de início tardio. Entretanto, uma grande proporção de indivíduos com demência reversível mantém algum grau de incapacidade cognitiva após remissão do episódio depressivo e cerca de 40%

desenvolve demência irreversível dentro de três anos de seguimento. A depressão ocorre em 17% dos pacientes com doença de Alzheimer e é mais freqüente nas demências subcorticais⁴. Desta forma, a demência reversível é uma manifestação precoce freqüente de um transtorno irreversível e constitui um indicador para progredir a investigação com o objetivo de se identificar uma demência passível de tratamento (Alexopoulos, 2005).

Tabela 3: Escala de depressão geriátrica - versão 15 itens

| Escala de depressão geriátrica (GDS-15) | Sim | Não |
|---|-----|-----|
| 1- Você está basicamente satisfeito com sua vida? | 0 | 1 |
| 2- Você se aborrece com freqüência? | 1 | 0 |
| 3- Você se sente um inútil nas atuais circunstâncias? | 1 | 0 |
| 4- Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas? | 1 | 0 |
| 5- Você sente que sua situação não tem saída? | 1 | 0 |
| 6- Você tem medo que algum mal vá lhe acontecer? | 1 | 0 |
| 7- Você acha que sua situação é sem esperança? | 1 | 0 |
| 8- Você acha maravilhoso estar vivo? | 0 | 1 |
| 9- Você sente que sua vida está vazia? | 1 | 0 |
| 10- Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você? | 1 | 0 |
| 11- Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria? | 1 | 0 |
| 12- Você perdeu muitos de seus interesses e atividades? | 1 | 0 |
| 13- Você se sente de bom humor a maior parte do tempo? | 1 | 0 |
| 14- Você se sente cheio de energia? | 0 | 1 |
| 15- Você se sente feliz a maior parte do tempo? | 0 | 1 |
| Pontuação: | | |

Pontos de corte: normal (0-4), acima de 5 sugere o diagnóstico de depressão.

⁴ Demência subcortical – síndrome clínica que apresenta como características principais: bradifrenia (lentificação do pensamento), anormalidades de memória, perda da habilidade em manipular o conhecimento previamente adquirido e alterações do humor e personalidade (especialmente apatia, depressão e irritabilidade). Pode ocorrer na doença de Parkinson, doença de Huntington, paralisia supranuclear progressiva, calcificação idiopática dos núcleos da base, síndromes degenerativas talâmicas e espinocerebelares, entre outras (Haddad, 2000).

1.1.7.1 - DEPRESSÃO DE INÍCIO TARDIO:

Refere-se às síndromes depressivas definidas pelo DSM IV da *American Psychiatric Association* e CID-10 que acometem idosos após os 65 anos. Krishman et al. (1995) sugerem 50 anos como o ponto de corte para a depressão de início tardio. Os pacientes caracterizam-se por apresentar elevadas taxas de incapacidade cognitiva, alterações psicomotoras, anedonia; maior risco para o desenvolvimento de demência; pior desempenho em testes neuropsicológicos; fatores de risco para doença cerebrovascular e/ou evidência de lesão estrutural comprometendo vias fronto-subcorticais em estudos de neuroimagem e história familiar de depressão menos freqüente.

Indivíduos que apresentam doença cerebrovascular, particularmente de pequenos vasos, apresentam risco mais elevado para o desenvolvimento de depressão de início tardio, neste caso, denominada “depressão vascular” (Hickie et al., 2001). A depressão maior também compromete entre 25 a 50% dos pacientes após acidente vascular cerebral (AVC). A doença cerebrovascular pode predispor, precipitar ou perpetuar as síndromes depressivas de início tardio. A fluência verbal e a nomeação de objetos são as funções cognitivas mais afetadas na depressão vascular. Os indivíduos acometidos apresentam mais frequentemente apatia, lentidão e perda do *insight*⁵ e, menos frequentemente, agitação e sentimento de culpa do que idosos deprimidos sem fatores de risco vasculares. Além disso, existe maior grau de incapacidade e comprometimento cognitivo (Alexopoulos, 2005). As alterações cerebrovasculares à ressonância nuclear magnética (RNM) aparecem como sinal de hiper-intensidade de sinal em imagens de T2, designadas leucoencefalopatia, infartos silenciosos e leucoaraiose⁶.

Define-se por síndrome depressão-disfunção executiva a depressão maior associada com disfunção fronto-estriatal proeminente. Caracteriza-se por retardo psicomotor, redução de interesse por atividades, incapacidade para execução de atividades instrumentais da vida diária, redução do *insight* e

⁵ *Insight* – habilidade de um indivíduo para encontrar soluções para os seus problemas.

⁶ Leucoaraiose - rarefação da substância branca por degeneração arteriolar levando a infartos incompletos.

presença de sinais vegetativos⁷. A disfunção fronto-estriatal altera a apresentação e o curso da depressão maior de início tardio através de maior retardo psicomotor, com conseqüente aumento da apatia. A disfunção executiva, expressão clínica das anormalidades fronto-estriatais, é comum na depressão de início tardio e persiste após melhora dos sintomas relacionados ao humor. As alterações subcorticais que comprometem as vias fronto-estriatais são frequentemente complicadas por depressão e disfunção executiva (Alexopoulos, 2005).

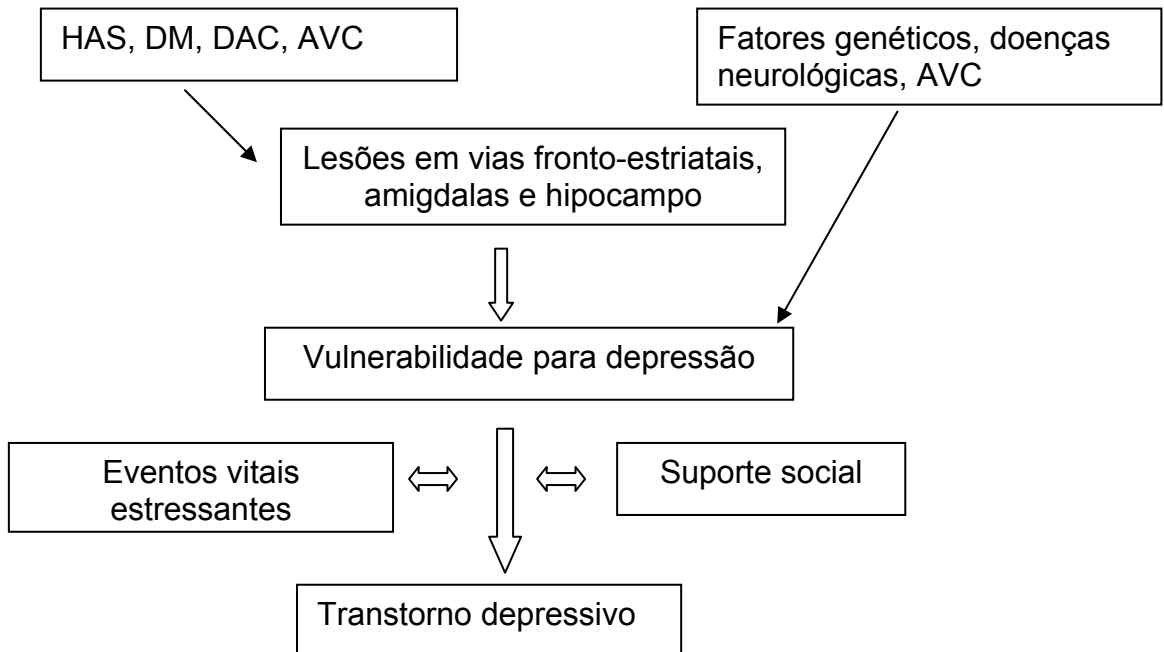
Os fatores biológicos provavelmente interagem com fatores psicossociais, como empobrecimento, incapacidades, isolamento, institucionalização, atividade como cuidador e óbito de um ente querido. Esses contribuem para alterações fisiológicas que, por sua vez, aumentam a susceptibilidade à depressão ou desencadeiam depressão em idosos vulneráveis.

A figura 2 resume os fatores de risco que levam ao transtorno depressivo, principalmente na depressão de início tardio.

Existem evidências sugerindo uma associação entre o transtorno depressivo maior de início precoce (recorrente) e a redução do volume do hipocampo (Bell et al., 2002; Sheline et al., 2003). Episódios depressivos recorrentes poderiam determinar uma disfunção do lobo temporal que determinaria, ao longo do tempo, redução da neurogênese no hipocampo. Raap et al. (2005) sugerem que, dentro das síndromes de depressão geriátricas, o transtorno depressivo maior geriátrico recorrente pode representar um subtipo fenomenológico distinto da depressão geriátrica de início tardio. Estando a disfunção específica do lobo frontal associada à depressão de início tardio e a disfunção do lobo temporal à depressão maior recorrente. A doença cerebrovascular, principalmente a doença isquêmica de pequenos vasos, seria um importante fator na patogênese da depressão de início tardio.

⁷ Sinais vegetativos - ou somáticos, inclui alterações no sono (insônia ou hipersonia), no apetite e no peso, perda da libido, constipação e fadiga.

Figura 2: modelo da interação dos fatores de risco no desenvolvimento dos transtornos depressivos.



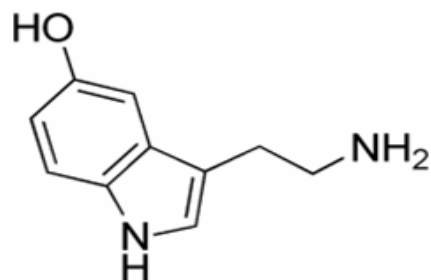
Hipertensão arterial sistêmica (HÁS), diabetes melito (DM), doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular cerebral (AVC).

Modificado de: Krishnan (2002).

1.2 - SEROTONINA E DEPRESSÃO:

Em 1940, Rapport e colaboradores isolaram, purificaram e identificaram a serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), como uma substância que aumenta o tônus vascular (figura 3).

Figura 3: estrutura química da serotonina



Nos tecidos periféricos, a 5-HT, além de regular o tônus vascular, controla a motilidade intestinal, a hemostasia primária e a resposta imune celular. É uma substância hidrofílica e, como tal, ela não atravessa a barreira hematoencefálica. Assim, seu isolamento no cérebro indica que ela é sintetizada no cérebro.

A neurotransmissão serotoninérgica está envolvida em inúmeras funções fisiológicas do SNC e sistema nervoso periférico. Como neurotransmissor, a 5-HT apresenta papel importante nas funções cerebrais e muitas doenças neuropsiquiátricas, como depressão, esquizofrenia, autismo, agressão e comportamento suicida estão relacionados à disfunção serotoninérgica no SNC (Lesch, 2004; Malhotra et al., 2004). Medicamentos que agem em neurônios serotoninérgicos e seus receptores são utilizados no tratamento de doenças como depressão, transtorno de ansiedade e esquizofrenia.

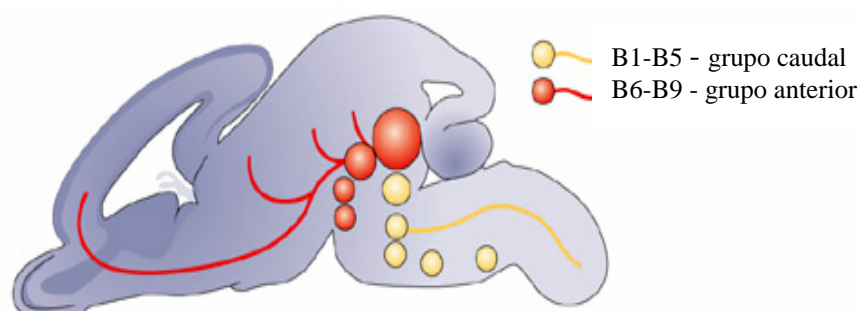
Também, existem evidências crescentes do papel dos neurotransmissores no desenvolvimento cerebral, atuando na modulação da construção e na neuroplasticidade⁸. A serotonina foi o primeiro neurotransmissor ao qual foi atribuído um papel no desenvolvimento cerebral. A 5-HT é liberada pelos axônios antes mesmo do estabelecimento das sinapses convencionais. Além disso, modelos genéticos que apresentam como alvo o sistema serotoninérgico mostram que alterações transitórias na homeostase da serotonina podem causar mudanças permanentes no comportamento adulto e modificar a fina rede de conexões cerebrais. E, abordagens de genética molecular através de estudos animais demonstram que diferentes receptores de serotonina, agindo em diferentes estágios do desenvolvimento cerebral, modulam diferentes processos de desenvolvimento cerebral, como neurogênese, apoptose, ramificações axonais e dendritogênese (Gasper et al., 2003).

Os corpos celulares de neurônios que produzem serotonina localizam-se numa zona restrita do tronco encefálico. A maioria encontra-se nos núcleos da rafe, na linha média do rombencéfalo, e um pequeno número localiza-se

⁸ Neuroplasticidade - capacidade dos sistemas neuronais de adaptar suas atividades ou funções de acordo com o aumento da demanda.

na formação reticular. Alguns corpos celulares serotoninérgicos encontram-se fora dos núcleos da rafe e apenas 40 a 50% dos corpos celulares dos núcleos da rafe são serotoninérgicos (Frazer & Hensler, 1999). Os neurônios contendo 5-HT são conhecidos como grupo de células B1-B9 e se aglomeram em dois subgrupos: a divisão caudal (B1-B5, correspondendo a rafe *palidus*, *magnus*, *obscurus* e ponte) e a divisão anterior (B6-B9, correspondendo aos núcleos da rafe medial e dorsal). O número total de neurônios serotoninérgicos é pequeno; entretanto, eles promovem uma inervação relativamente extensa à medida que seus axônios enviam amplas projeções para o córtex cerebral, amígdala, hipocampo, hipotálamo e para a medula (figura 4). Os terminais serotoninérgicos fazem sinapse com neurônios alvos e liberam serotonina após estimulação nervosa (Gaspar et al., 2003).

Figura 4: Organização dos neurônios serotoninérgicos no tronco cerebral



Os neurônios serotoninérgicos compreendem nove grupos (B1-B9). O grupo de células serotoninérgicas caudais, B1-B5 (amarelo) projeta-se para o tronco cerebral e medula, enquanto o grupo de células anterior, B6-B9 (vermelho) envia ramificações terminais difusas para o diencéfalo e o telencéfalo.

Adaptado de: Gaspar et al. (2003).

Ao nível periférico, a serotonina pode determinar vasoconstrição na presença de lesões ateroscleróticas encontrando-se envolvida na fisiopatologia da hipertensão essencial, hipertensão pulmonar, agregação plaquetária, formação de trombo e ateroma. Essas ações fisiopatológicas poderiam explicar a relação entre o aumento da mortalidade das doenças

cardiovasculares na presença de depressão (Whyte et al., 2001; Ramasubbu, 2003).

Nos neurônios que sintetizam 5-HT, o passo inicial da síntese é facilitado pelo transporte do aminoácido L-triptofano do sangue para o cérebro. A proteína alimentar é a fonte primária de triptofano. Outros aminoácidos neutros, como fenilalanina, leucina e metionina são transportados da mesma forma para o cérebro. O transporte de triptofano para o cérebro não se relaciona apenas com sua concentração sanguínea, mas também com sua concentração em relação à dos aminoácidos neutros. Sendo assim, baixas concentrações dietéticas de triptofano associadas ao consumo elevado de aminoácidos que competem com o triptofano pelo transporte através da barreira hematoencefálica, reduzem o conteúdo de 5-HT no cérebro e alteram certos comportamentos associados à função da serotonina. A síntese de serotonina pode aumentar em resposta à elevação das concentrações cerebrais de triptofano através do aporte dietético.

Os neurônios serotoninérgicos contêm a enzima triptofano hidroxilase (TPH) que converte triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este é um passo limitante na síntese de serotonina. No SNC esta enzima é sintetizada nos corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe e é encontrada apenas nos neurônios que sintetizam serotonina. Sua distribuição cerebral é semelhante àquela da serotonina. A enzima TPH contém 444 aminoácidos, correspondendo a um peso molecular em torno de 51000, com 50% de homologia com a tirosina hidroxilase, enzima limitante da síntese de catecolaminas. As maiores homologias residem nas regiões centrais e C-terminais dessas enzimas.

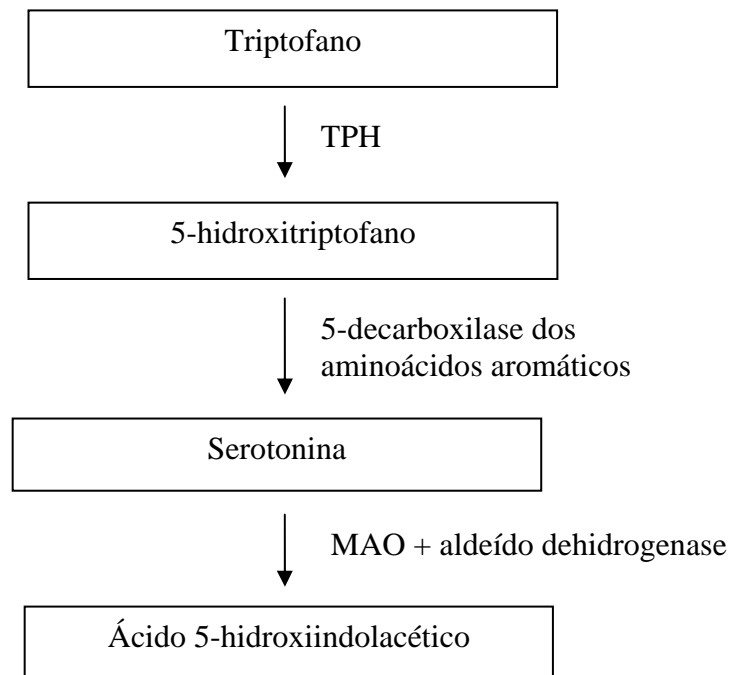
A TPH, enzima limitante da síntese de serotonina, pertence à superfamília das hidroxilases de aminoácidos aromáticos, assim como a fenilalanina hidroxilase (PAH) e a tirosina hidroxilase (TH). Ela é detectada principalmente no tronco encefálico e nas células intestinais enterocromafins.

A administração de triptofano (precursor da serotonina), associada ou não à medicação antidepressiva, apresenta efeitos benéficos no tratamento da depressão. Além disso, pacientes com depressão maior em remissão evoluem com sintomas depressivos quando submetidos à depleção aguda de triptofano (Leyton et al., 2000). Booij et al. (2005) observaram que a depleção

dietética de triptofano resulta em novo episódio de depressão em pacientes previamente tratados com SSRI (inibidores seletivos da recaptação de serotonina).

Outra enzima envolvida na síntese da serotonina é a decarboxilase dos aminoácidos aromáticos que converte 5-HTP em 5-HT. Sob condições fisiológicas, a decarboxilase não é saturada pelo 5-HTP. Conseqüentemente, é possível aumentar o conteúdo de 5-HT no cérebro também através do aumento de aporte de 5-HTP. A figura 5 resume a síntese da serotonina.

Figura 5: síntese da serotonina



TPH - triptofano hidroxilase; MAO - monoamina oxidase.

Modificado de: Frazer & Hensler (1999).

Após a síntese, a serotonina é estocada em vesículas por meio de transporte ativo a partir do citoplasma. Os transportadores vesiculares usam o gradiente eletroquímico gerado pela ATPase- H^+ , de forma que o consumo de 5-HT é acoplado ao efluxo de hidrogênio.

A liberação da serotonina ocorre por exocitose⁹ dependente de cálcio (Ca^{2+}). O influxo de Ca^{2+} aumenta a liberação de 5-HT. Esse íon estimula a fusão da membrana vesicular com a membrana plasmática.

O transportador da serotonina (SERT, 5-HTT, SLC6A4) é responsável pelo transporte ativo de 5-HT nos neurônios, células enterocromafins, plaquetas e outras células. No cérebro, situa-se nas membranas pré-sinápticas dos terminais nervosos e nas árvores dendríticas em proximidade aos corpos celulares contendo serotonina no mesencéfalo e nos núcleos da rafe do tronco encefálico. Opera, primariamente, alternando o mecanismo de acesso ao sódio (Na^+), cloro (Cl^-) e 5-HT através de um sítio único de ligação, que dá acesso ao exterior da célula. Quando esse sítio encontra-se saturado desencadeia-se uma mudança conformacional que o fecha para acesso ao meio externo e o abre para a superfície citoplasmática da membrana. Após a dissociação de 5-HT, Na^+ e Cl^- , o potássio (K^+) liga-se ao mesmo sítio de ligação para facilitar a mudança conformacional que torna disponível o meio extracelular. Neste processo, um sítio de ligação multifuncional é responsável pelo movimento de íons e 5-HT. A disponibilidade da serotonina é regulada unicamente pela ação do transportador de serotonina (5-HTT). Ele captura as moléculas de 5-HT e as transporta de volta para o terminal nervoso, tornando-as disponíveis para reciclagem dentro das vesículas sinápticas. Consequentemente, a atividade da serotonina nos receptores é inversamente proporcional ao número de moléculas funcionais de 5-HTT presente na membrana pré-sináptica. A atividade do 5-HTT regula a concentração de 5-HT na sinapse e, por sua vez, influencia a transmissão sináptica (Murphy et al., 2004; Sibille & Lewis, 2006).

O gene do 5-HTT localiza-se no braço longo do cromossomo 17 (cromossomo 17q11.2) e é composto por 14 exons que codificam uma proteína de 630 aminoácidos. Dois polimorfismos comuns no gene 5-HTT foram descritos: o polimorfismo de repetição em *tandem* em número variável¹⁰ (VNTR) localizado no intron 2 e; uma deleção-inserção de extensão variável na região 5', localizada a aproximadamente uma kilobase do início da zona de

⁹ Exocitose - descarga do conteúdo celular a partir da vesícula de estocagem.

¹⁰ Repetições em tandem em número variável (VNTR) - ocorrência de repetições adjacentes, em número variável, de uma sequência repetitiva.

transcrição, denominada região de polimorfismo ligada ao gene 5-HTT (5-HTTLPR), na região de controle transcricional. Ambos os polimorfismos parecem apresentar uma pequena, mas significativa influência, na resposta ao tratamento com os SSRI (Lotrich & Pollock, 2004).

Em células embrionárias, o polimorfismo VNTR no intron 2 que contém nove (STin2.9), 10 (STin2.10) ou 12 (STin2.12) repetições em *tandem* pode afetar a atividade transcricional. Existem duas variantes comuns na região promotora¹¹ do gene, ambas normais. Um alelo¹² compostos por 14 (alelo “curto” ou “S”) e outro por 16 (alelo “longo” ou “L”) elementos repetitivos, cada um deles contem de 20 a 23 pares de bases. Raramente ocorrem alelos com um número maior de elementos repetitivos (“super-longo”, “XL” e “XXL”, com até 20 repetições). A frequência alélica observada nas populações norte americana e européia é a seguinte: 55 a 63% para o alelo “L” e 36 a 45% para o alelo “S” (Ramasubbu, 2003); com uma distribuição genotípica de 32% “LL”, 49% “LS” e 19% “SS” (Murphy et al., 2004). As variantes “S” e “L” modulam a atividade transcricional da região promotora da SERT, determinando diferenças no seu mRNA e na densidade protéica.

Existem evidências a favor da participação do 5-HTT na fisiopatologia da depressão. Parsey et al. (2006) demonstraram, em estudo de neuroimagem, que indivíduos com episódios de depressão maior apresentam menor potencial de ligação do transportador da serotonina na amígdala e no mesencéfalo quando comparados com indivíduos normais.

O alelo “S” associa-se a uma redução de aproximadamente 50% na expressão da proteína transportadora de serotonina, assim como maior vulnerabilidade para desenvolvimento de transtornos do humor (ansiedade e depressão) e resposta inadequada aos SSRI, que agem através da inibição do 5-HTT (Hariri & Brown, 2006). Hoegfgen et al. (2004) observaram que a frequência alélica de “S” era maior numa grande amostra de pacientes alemães com depressão maior do que no grupo controle. Caspi et al. (2003) demonstraram que indivíduos homocigotos para o alelo longo são relativamente resistentes aos eventos estressores, enquanto aqueles

¹¹ Região promotora - região do gene que controla o início da produção da proteína.

¹² Alelo - uma das várias formas alternativas do gene no mesmo locus.

homozigotos para o alelo curto são relativamente sensíveis a eles. Estes achados foram confirmados por outros autores (Eley et al., 2004; Kendler et al., 2005; Wilhelm et al., 2006; Zalsman et al., 2006). Grabe et al. (2005) e Sjoberg et al. (2006) observaram que mulheres portadoras do alelo curto eram mais vulneráveis aos efeitos dos fatores ambientais adversos. Mulheres com história familiar positiva para depressão, portadoras do alelo “S” apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de sintomas depressivos durante a depleção de triptofano (Neumeister et al., 2002). Correa et al. (2004) observaram uma associação entre o polimorfismo de 5-HTTLPR e comportamento suicida numa amostra de brasileiros portadores de TDM e esquizofrenia. Neves et al. (2007) também demonstraram uma associação entre o alelo “S” e comportamento suicida, desvinculado da presença de transtorno bipolar.

Esses resultados sugerem uma interação gene-ambiente na qual a resposta do indivíduo aos insultos ambientais seria modificada por sua carga genética. Entretanto, outros estudos apresentam resultados conflitantes. Taylor et al. (2006) encontraram associação entre o alelo “L” (e não o “S”), na presença de fatores ambientais e o desenvolvimento de sintomas depressivos. Surtees et al. (2005) não observaram interação entre o polimorfismo de 5-HTTLPR, fatores ambientais e o desenvolvimento de depressão.

Taylor et al. (2005) demonstraram que indivíduos portadores de depressão de início tardio, homozigotos para o alelo “L”, exibiam menor volume do hipocampo, enquanto a depressão de início precoce associava-se a menores volumes de hipocampo em indivíduos portadores do alelo “S”. Possíveis explicações para esses achados incluem as interações entre o sistema serotoninérgico e os fatores neurotróficos ou a resposta do cortisol ao stress, cada um deles podendo afetar os volumes do hipocampo.

Alguns estudos atribuem a resposta terapêutica e a incidência de efeitos adversos à medicação antidepressiva à existência de polimorfismos genéticos no sistema serotoninérgico. A presença do alelo “S” pode determinar redução da eficácia à fluvoxamina em pacientes com depressão maior (Smeraldi et al., 1998; Zanardi et al., 2001). Resultado semelhante foi observado em relação à resposta ao tratamento com paroxetina em pacientes

com depressão maior de início tardio (Pollock et al., 2000). Smits et al. (2004), em uma meta-análise, concluíram que, em pacientes caucasianos, a resposta aos SSRI parece ser mais favorável na presença do genótipo “SS”.

O polimorfismo de 5-HTTLPR também parece estar relacionado com o desenvolvimento de efeitos adversos aos SSRI. Murphy et al. (2004) observaram que a presença do alelo “S” do 5-HTTLPR está associado com maior incidência de efeitos adversos e menor aderência ao tratamento com paroxetina. Neste mesmo estudo, um segundo grupo de pacientes recebeu mirtazapina. Dentre estes, os portadores do alelo “L” apresentaram maior incidência de efeitos colaterais. Considerando-se que a mirtazapina induz a liberação central não apenas de serotonina (como a paroxetina), mas também de noradrenalina, estes resultados sugerem que as diferenças nos mecanismos de ação das duas substâncias, associadas ao polimorfismo de 5-HTTLPR, podem determinar diferentes padrões de efeitos adversos.

Malhotra et al. (2004) concluíram que o efeito do polimorfismo na região promotora do 5-HTT no tratamento com SSRI é o principal achado da farmacogenética anti-depressiva até o momento.

Após descrição dos polimorfismos genéticos envolvidos no transportador da serotonina, retomamos aos processos de síntese e metabolização da mesma. A monoamina oxidase (MAO) converte o neurotransmissor em 5-hidroxiindolacetaldeído e, este, pela ação da aldeído desidrogenase, é convertido em ácido 5-hidroxiindolacético (figura 5).

Após liberação pelas vesículas sinápticas dos terminais nervosos no espaço extracelular, a serotonina liga-se a vários tipos de receptores pré e pós sinápticos. Estes, por sua vez, ativam ou reprimem diversas cascatas de transdução e, assim, alteram o estado funcional dos neurônios alvos, enquanto induzem, também, a alterações estruturais prolongadas através da regulação da expressão genética. O receptor 5-HT_{2A} localiza-se em neurônios pós-sinápticos e pode ser importante no desenvolvimento de efeitos adversos aos antidepressivos (Cusin et al., 2002).

1.3 - O GENE CANDIDATO:

Várias linhas de evidência têm demonstrado que os sintomas depressivos estão associados com alteração funcional do sistema serotoninérgico, o qual se encontra envolvido na regulação do humor em humanos. Por exemplo, muitos antidepressivos de uso corrente estão direcionados contra receptores e enzimas deste sistema, o retardo da neurotransmissão de serotonina pela depleção de triptofano pode precipitar o surgimento de sintomas depressivos. Anormalidades na função dos receptores e do transportador de serotonina cerebrais são demonstradas em pacientes deprimidos. Dessa forma, os genes envolvidos na síntese, transporte e degradação de serotonina têm recebido especial atenção no esforço de desvendar as bases genéticas da depressão (Christiansen, 2007).

A triptofano hidroxilase é a enzima limitante na via da síntese da serotonina. Como tal, é um gene candidato para uma variedade de fenômenos comportamentais incluindo transtornos do humor, suicídio e traços de personalidade.

O gene para uma forma da triptofano hidroxilase (TPH1, cromossomo 11p15.3-p16) foi clonado, minuciosamente examinado para polimorfismos e submetido a inúmeros estudos de associação genética. Nenhum destes estudos demonstrou associação robusta entre os polimorfismos da TPH1 e algum fenômeno comportamental (Breidenthal et al., 2004). Serretti et al. (2001) estudaram o polimorfismo A218C (localizado na região não codificadora¹³ do gene da triptofano hidroxilase) e mostraram que o alelo A associava-se a uma resposta terapêutica ruim em 217 pacientes deprimidos tratados com fluvoxamina e em 121 tratados com paroxetina. Em função da variante A218C não alterar a expressão ou estrutura da proteína triptofano hidroxilase, seu efeito farmacogenético poderia estar relacionado a outro polimorfismo funcional em proximidade.

Durante muitos anos, acreditou-se que um único gene codificando a TPH fosse responsável pela biossíntese de serotonina. Entretanto, Walther et al. (2003) demonstraram a existência de dois genes TPH distintos. Esses

¹³ Região não codificadora - ocorre nos introns (regiões não codificantes) dos genes.

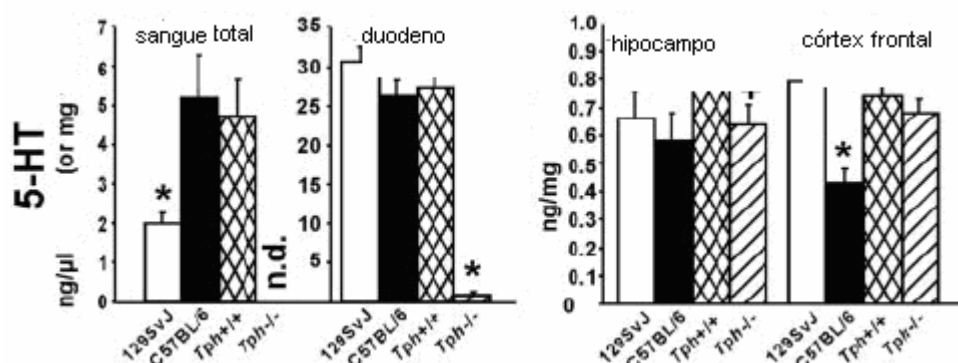
autores observaram que camundongos *knockout*¹⁴ para TPH1 apresentavam níveis cerebrais normais de serotonina, sugerindo que a TPH1 não era a enzima limitante da síntese de serotonina no SNC. Após a identificação da TPH2, o grupo demonstrou que ela possui atividade triptofano hidroxilase e se expressa exclusivamente no SNC. A figura 6 demonstra os níveis séricos e tissulares de 5HT encontrados por Walther et al. (2003). Em humanos, os genes da TPH1 e TPH2 localizam-se nos cromossomos 11 e 12, respectivamente, e codificam duas enzimas diferentes. Elas apresentam identidade seqüencial de 71%, comparada a 52% entre a TPH1 e a PAH, outro membro da família das hidroxilases dos aminoácidos aromáticos (Mckinney et al., 2005). Todas as seqüências estrutural e funcionalmente importantes da TPH1 são conservadas na TPH2. Seu gene localiza-se no cromossomo 12q21.1, compreende 11 exons e cobre uma região de aproximadamente 93,5 kilobases (kb). A TPH1 é expressa periféricamente (coração, pulmão, rim, duodeno, fígado e supra-renal) e na pineal, enquanto a TPH2 é responsável pela síntese de serotonina em outras regiões cerebrais, como córtex frontal, tálamo, hipocampo, hipotálamo, amígdala e no tronco encefálico (principal localização dos neurônios produtores de serotonina). Esses achados sugerem que esta isoforma da enzima, e não a TPH1, seja relevante para o comportamento humano. A seqüência genética da TPH2 encontra-se descrita no anexo 1.

Peters et al. (2004) observaram que pacientes com diagnóstico de depressão maior unipolar portadores de SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) na TPH2 apresentaram melhor resposta à fluoxetina.

Zill et al. (2004a) relataram uma associação entre um SNP não funcional (rs1386494), localizado no intron 5, com o transtorno depressivo maior, observando uma freqüência maior do alelo G entre os casos. Além disso, Zill et al. (2004b) observaram uma associação entre um bloco de haplótipos, localizado entre os exons 5 e 7, e suicídio, sugerindo um possível envolvimento de polimorfismos na região reguladora do gene, ou genes adjacentes, na etiologia dos distúrbios do humor e do suicídio.

¹⁴ *Knockout* - do inglês, silenciado, mutante na qual um gene funcional foi substituído por uma forma não funcional ou silenciosa.

Figura 6: Níveis séricos e tissulares de 5-HT encontrados em linhagens de camundongos selvagens (*wildtype*) e deficientes (*knockout*) para TPH.



Camundongos TPH+/+: *wildtype* (selvagem) e TPH-/-: *knockout* (deficientes) para TPH. Níveis tissulares de 5-HT não se alteram no hipocampo e córtex pré-frontal, tanto nos *knockout* quanto nos *wildtype*, ao contrário do que é observado no sangue periférico e duodeno.

Modificado de: Walther et al. (2003).

Zhou et al. (2005) sequenciaram os 11 exons da TPH2, incluindo as regiões intrônicas não codificadoras de cada exon, a região promotora e, 0.5 kb na região 3' não transcrita de 190 indivíduos. A análise foi realizada procurando por 15 SNPs, com extensão de 106 kb. Os autores demonstraram uma associação entre um bloco de haplótipo da TPH2 (localizado entre os introns 5 e 8, com pelo menos 52 kb) em relação ao suicídio e à depressão maior.

Brown et al. (2005), ao examinar uma amostra de 31 voluntários saudáveis através de ressonância nuclear magnética funcional e análise do SNP (G(-844)T) localizado na região reguladora da TPH2 sobre a reatividade da amígdala, mostraram uma maior atividade da amígdala em portadores do alelo T em comparação com o alelo G.

Van Den Bogaert et al. (2006) observaram uma associação protetora do alelo A de rs11178997 (SNP localizado na região 5' promotora de TPH2) em pacientes com depressão maior. Também, na análise baseada em haplótipos, demonstraram um efeito protetor nestes pacientes e em pacientes com transtorno bipolar. Estes resultados sugerem que os haplótipos protetores aumentam a expressão de TPH2 e, conseqüentemente, aumentam os níveis de serotonina no cérebro. Sendo assim, um aumento da expressão

de TPH2 poderia proteger contra o desenvolvimento de depressão maior e transtorno bipolar.

Zhang et al. (2004) identificaram o primeiro SNP funcional (C1473G), resultando na substituição de uma prolina por arginina na posição 447 da TPH2 de camundongos. A expressão da TPH2 mutante (P447R) em células PC12¹⁵ revelou uma redução de 55% nos níveis de 5-HT quando comparado à TPH2 selvagem (*wild-type*). Além disso, camundongos homocigotos para o alelo mutante (1473G) mostraram diminuição de 50 a 70% nas taxas de síntese cortical e estriatal, acompanhada por redução de 40% do conteúdo de serotonina tissular quando comparados com camundongos homocigotos para o alelo selvagem (1473C). Estes animais mostravam comportamentos significativamente diferentes e resposta alterada aos antidepressivos. Estas observações sustentaram evidências diretas do papel fundamental da TPH2 na síntese cerebral de 5-HT e incitaram o interesse por mutações semelhantes na TPH2 humana (hTPH2) que fossem capazes de alterar a homeostase da serotonina no SNC em determinadas condições neuropsiquiátricas.

Zhang et al. (2005a) relataram uma variante funcional da hTPH2 (G1463A) associada com um risco aumentado para depressão maior unipolar. O alelo de risco, encontrado em 1.4% dos controles (n=219) e 10.3% dos casos (n=87), codifica uma variante da TPH2 (R441H) que apresenta redução de 80% na atividade enzimática. A redução da atividade foi medida através da dosagem dos níveis de 5-HT nas células PC-12 transfectadas¹⁶ com a TPH2 mutante. A maioria dos indivíduos portadores do alelo de risco também apresentava história familiar positiva para doença psiquiátrica e resposta reduzida aos SSRI. Dos controles que apresentaram a variante, um apresentava sintomas de ansiedade e, dois, depressão leve. Estes achados sugerem que a variante 441H da TPH2 poderia predispor a várias condições psiquiátricas e modular a resposta farmacológica a muitas classes de medicamentos que apresentam como alvo o sistema serotoninérgico cerebral. Além disso, as alterações funcionais previamente encontradas em camundongos sustentam a hipótese que a TPH2 apresenta papel

¹⁵ Células PC 12 - células de feocromocitoma

¹⁶ Células transfectadas - células eucariotas que absorvem DNA.

fundamental na regulação dos níveis de 5-HT no cérebro. Desta forma, a reduzida atividade da variante R441H de hTPH2 poderia contribuir para a fisiopatologia de um amplo espectro de desordens psiquiátricas e teria um papel fundamental no tratamento das mesmas. A tabela 4 resume os resultados encontrados por Zhang et al. (2005a).

Tabela 4: sumário dos resultados encontrados em indivíduos portadores do SNP (G1463A) da TPH2

| Pacientes com TDM | Paciente | Sexo | Idade | Alelo | HF | Tendência suicida | Ansiedade | Resposta SSRI | Nota |
|--------------------------|----------|------|-------|-------|----|-------------------|-----------|---------------|-------|
| N=87 | 1202 | F | 72 | A/A | - | + | - | + | ↑SSRI |
| | 1204 | M | 80 | G/A | + | + | - | - | ↑SSRI |
| | 1406 | M | 74 | A/A | - | - | + | + | |
| | 1745 | M | 71 | G/A | + | - | + | - | |
| | 1747 | M | 82 | G/A | + | + | - | - | |
| | 1830 | F | 69 | G/A | + | - | - | - | |
| | 1861 | F | 65 | G/A | + | + | - | - | |
| | 1902 | F | 77 | A/A | + | + | + | - | |
| | 1975 | M | 64 | G/A | + | + | + | - | |
| Controles | | | | | | | | | |
| N=219 | 1174 | F | 76 | A/A | - | | + | | A |
| | 1541 | F | 80 | G/A | + | | - | | DL |
| | 1996 | F | 75 | G/A | + | | - | | DL |

TDM - transtorno depressivo maior; HF - história familiar; SSRI - inibidores seletivos da recaptção de serotonina; ↑SSRI - doses elevadas de SSRI, A - ansiedade; DL- depressão leve.

Adaptado de Zhang et al. (2005a).

O polimorfismo G1463A foi observado na região codificadora do gene, com substituição de Arg441 (CGT) por His (CAT) (figura 7). A comparação das seqüências entre os vários genes da mesma família, TH, PAH, TPH1 e TPH2, revelou que Arg441 é altamente conservada e fundamental para manutenção da atividade enzimática. Interessante ressaltar que uma mutação R408W em posição correspondente da PAH abole a atividade enzimática e leva a fenilcetonúria, a forma mais grave da hiperfenilalaninemia.

Figura 7: SNP G1463A da TPH2 humana

| | | | | | |
|--------------------|-------------|-------------|---------|--------------|-----------------|
| | 142 | | 1463 | | 1614 |
| hTPH2 alelo R441/G | ↓ | | ↓ | | ↓ |
| | ATG.....TCA | ATT ACC | CGT CCC | TTC TCA..... | TGA |
| hTPH2 alelo H441/A | | ATG.....TCA | ATT ACC | CAT CCC | TTC TCA.....TGA |

Vários autores (Glatt et al., 2005; Van Den Bougaert et al., 2005; Zhou et al., 2005) tentaram replicar os resultados de Zhang et al (2005a) sem sucesso. Ao todo, foram investigados mais de 5000 indivíduos, entre grupo controle, portadores de depressão grave (inclusive resistentes ao tratamento) e de distúrbio bipolar.

Baseado nos resultados encontrados por Zhang et al. (2005 a) e na possibilidade do SNP funcional descrito associar-se com a depressão em pacientes idosos (baseado nas características da população estudada) consideramos importante estudar o polimorfismo na depressão de início tardio.

1.4 - OBJETIVOS

1.4.1 - OBJETIVO GERAL:

Avaliar a existência do SNP G1463A de TPH2 em uma amostra da população brasileira.

1.4.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a existência de G1463A na TPH2 em uma população de pacientes com depressão de início tardio.
- Avaliar a existência de G1463A na TPH2 em uma população de idosos sem história pessoal e familiar de doenças neuropsiquiátricas
- Elucidar se existe correlação entre G1463A da TPH2 e a depressão de início tardio.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1 – AMOSTRA ESTUDADA:

Cento e sessenta e quatro indivíduos participaram deste estudo, sendo 103 pacientes portadores de depressão de início tardio (87 mulheres e 16 homens, com idade entre 62 e 96 e média de 77,2 +/- 7,3 anos) e 61 indivíduos pertencentes ao grupo controle (43 mulheres e 18 homens, com idade entre 60 e 97, com média de 70,8 +/- 9,1 anos). Foram selecionados pacientes portadores de depressão maior de início tardio atendidos no Centro de Referência do Idoso do Estado de Minas Gerais Professor Caio Benjamin Dias. Todos os indivíduos foram orientados a respeito do protocolo de pesquisa e assinaram o termo de consentimento esclarecido para participação do trabalho.

O diagnóstico de depressão foi feito baseado nos critérios do DSM IV e da escala de depressão geriátrica (Sheikh & Yesavage, 1986; Almeida & Almeida, 1998). Indivíduos com diagnóstico de demência não foram incluídos na amostra. Sete destes pacientes encontravam-se institucionalizados. Todos foram submetidos à avaliação multidimensional do idoso segundo protocolo do Centro de Referência do Idoso. Além disso, realizamos revisão de prontuário de todos os casos.

Os indivíduos pertencentes ao grupo controle foram criteriosamente selecionados entre pacientes em controle clínico no mesmo centro de referência. Através de entrevista, selecionamos aqueles que não apresentavam história pessoal ou familiar (parentes de primeiro grau) de doenças neuropsiquiátricas possivelmente associadas com o polimorfismo definidas como depressão, desordem do pânico, autismo, transtorno obsessivo-compulsivo, esquizofrenia e alcoolismo. Também participaram como integrantes deste grupo indivíduos com as mesmas características previamente descritas que integravam programa de atividade física supervisionada para a terceira idade na escola de educação física da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.2 - GENOTIPAGEM:

2.2.1 - EXTRAÇÃO DO DNA:

Após exame clínico, todos os participantes foram submetidos à coleta de sete e meio mililitros de sangue venoso periférico em tubos contendo o anti-coagulante EDTA. Após a coleta, o sangue era armazenado a -20°C até a extração do DNA. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total por meio do kit da Promega (*Wizard® Genomic Blood DNA Purification Kit, Promega, USA*) de acordo com as normas do fabricante.

2.2.2 – AMPLIFICAÇÃO DO DNA:

Realizamos a amplificação do exon 11 da TPH2 a partir da técnica de PCR (*polimerase chain reaction*), descrita por Seiki et al. (1988), que consiste na replicação “in vitro” de fragmentos específicos de DNA pela enzima *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase. Para isso são utilizados pares de *primers* (iniciadores), ou seja, seqüências curtas de oligonucleotídeos (18-22), complementares às regiões 5' e 3', que delimitam o segmento de DNA a ser amplificado e funcionam como os iniciadores da reação. O método é programado para permitir a amplificação seletiva de uma seqüência alvo de DNA a partir de uma coleção heterogênea de seqüências de DNA.

A amplificação pela PCR consiste nos seguintes passos:

1. Desnaturação (separação da fita dupla) do DNA a 94°C ou 95°C ;
2. Anelamento dos iniciadores – os *primers* formam híbridos com o DNA nas regiões de seqüência complementar. A temperatura de anelamento é variável para cada par de iniciador;
3. Extensão da fita de DNA a partir dos *primers* anelados pela taq polimerase - após o anelamento, o material é aquecido até 72°C , temperatura ideal para a atividade da Taq polimerase. E, assim, os deoxi-nucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados aos *primers*, formando uma nova fita de seqüência complementar à fita molde;

4. Repetição das etapas 1 a 3. Estas etapas são repetidas geralmente entre 25 a 35 vezes. A cada ciclo sucessivo, duplica-se a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior, resultando em um acúmulo exponencial (2^n) dos fragmentos a serem amplificados, em que n representa o número de ciclos;
5. Extensão final: esta etapa de incubação prolongada tem por objetivo assegurar que toda a população de DNA amplificada encontre-se como uma fita dupla e de tamanho completo;
6. Incubação a 4°C até análise dos resultados.

Desde que se utilizem condições adequadas, o produto de amplificação obtido é bastante específico para a região do DNA genômico a ser estudada.

Para amplificação do exon 11 da TPH2 foram utilizados pares de *primers* específicos. Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) foram definidos usando o *software Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), manufacturados pela *Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)* e encontram-se descritos a seguir:

Primer TPH2 11F

Seqüência de oligonucleotídeos 5'→3': CCT CGT ACC AAT GAG GGT TG

Primer TPH2 11R

Seqüência de oligonucleotídeos 5'→3': GCT GCT AAG CCC CAA AAA G

O anexo 2 mostra o exon 11 da TPH2 com as respectivas localizações dos iniciadores F e R.

O DNA foi amplificado em volume final de 50µl de reação contendo: de 100 a 300 ng de DNA, 1,5 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 10 picomoles de cada *primer*, 1,25 µl da enzima Taq DNA polimerase, 2,5 mM MgCl₂ e, 10 % de volume final de tampão de incubação.

As soluções utilizadas para a reação de PCR encontram-se descritas no anexo 3.

A amplificação foi realizada em um termociclador (*Mastercycle gradient thermocycler, Eppendorf AG, Hamburg*) com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de

desnaturação a 95°C durante 30 segundos, anelamento a 59°C durante 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e, uma extensão final com duração de 10 minutos.

Logo:

1. 95°C - 5 minutos;
2. 95°C - 30 segundos;
3. 59°C - 30 segundos;
4. 72°C – 1 minuto;
5. Ir ao passo 2: repetir 35 vezes;
6. 72°C - 10 minutos;
7. 4°C - indeterminado

Para cada reação foi feito um controle negativo, contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA.

A amplificação dos fragmentos de PCR foi confirmada através da eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.2.3 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA:

A amplificação dos fragmentos de PCR foi confirmada através da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). O método consiste na migração do fragmento de DNA através de uma matriz inerte, sob a ação de um campo elétrico. A matriz é um polímero de acrilamida que confere resistência suficiente ao meio, dificultando a mobilidade do DNA em relação ao seu tamanho, sendo capaz de separar fragmentos de até 1 Kb. Foi utilizado gel na concentração de 6,5% para obter uma faixa de separação de 50-100 pares de base, abrangendo a faixa de tamanho dos fragmentos em estudo.

Três microlitros de cada produto de PCR, misturados a 1 µl de tampão de corrida (*gel loading buffer*) foram aplicados em cada canaleta do gel. Foi aplicado em uma canaleta do gel, 1,0 µl de padrão de peso molecular (100 pb DNA *ladder* 0,06 µg/µl- Gibco BRL) para determinação do peso molecular do fragmento amplificado. A corrida foi realizada em tampão TBE 1X pH 8,3 a 160 V, durante 30 a 40 minutos, em gel de 8 x 10 x 0,75 cm , utilizando-se

uma cuba específica (*mini vertical gel eletrophoresis unit, Sigma*) (Maniatis et al., 1982).

As soluções utilizadas na eletroforese em gel de poliácridamida encontram-se descritas no anexo 4.

2.2.4 – COLORAÇÃO PELA PRATA:

Após o término da corrida, o gel foi submetido à coloração pela prata para visualização do material amplificado (adaptação do método descrito por Bassam et al., 1991). Esse método baseia-se na capacidade da prata se ligar ao DNA fixo em uma matriz, sendo posteriormente oxidada, produzindo uma coloração que vai do amarelo escuro ao preto e permitindo a identificação de fragmentos de DNA que migram no gel, de acordo com o seu peso molecular.

O protocolo de coloração pela prata encontra-se descrito na tabela 5.

Tabela 5: Protocolo de coloração pela prata:

| Reagente | Tempo | Condições |
|----------------------------|------------------------|----------------------|
| 1. Ácido acético a 10% | 10 minutos | sob agitação |
| 2. Água destilada | 3 minutos | sob agitação |
| 3. Solução de prata* | 8 minutos | sob agitação |
| 4. Água destilada | 30 segundos | sob agitação |
| 5. Revelador** | até coloração aparecer | sob agitação |
| 6. Ácido acético | 5 minutos | agitação opcional |
| 7. Água destilada | 5 minutos | agitação opcional |
| 8. Secar em papel celofane | 12-24 horas | |

* 8 ml de solução de nitrato de prata: 20,38 mg/ml, 75 µl de formaldeído 37%, 50 ml de água destilada. ** 1,5 g de carbonato de sódio, 75 µl de formaldeído 37%, 20 µl de tiosulfato de sódio e 50 ml de água destilada.

As soluções utilizadas na coloração pela prata encontram-se descritas no anexo 5.

2.2.5 – PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR:

Consiste na purificação do material amplificado, eliminando fragmentos inespecíficos, de baixo peso molecular, como, por exemplo, excesso de iniciadores, que podem inibir a reação de seqüenciamento.

Produtos de PCR foram purificados utilizando-se o Kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England)*, seguindo protocolo do fabricante. Foram utilizados 100 µl de produto de PCR e obtidos como produto final 20µl de DNA concentrado e purificado.

2.2.6 – SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO:

A reação de seqüenciamento segue os princípios descritos por Sanger em 1981. Baseia-se na síntese de uma fita de DNA pela DNA polimerase, a partir de um molde de fita simples. Segue o mesmo princípio básico do PCR, porém difere em duas características: apenas um iniciador é usado e utiliza 2'3'-dideoxynucleotídeos (ddNTPs) além dos dNTPs. Os ddNTPs são análogos aos dNTPs normais, porém diferem pelo fato de não possuírem um grupamento hidroxila no carbono da posição 3', bem como no carbono 2', o que impede uma ligação fosfodiéster com outro dNTP, interrompendo assim a extensão da nova fita de DNA que se forma, causando uma terminação abrupta na síntese da cadeia.

Os ddNTPs são marcados com fluoro cromos. São utilizados 4 diferentes fluoro cromos e, uma vez excitados, emitem luz em diferentes comprimentos de onda. Os produtos da reação de seqüenciamento, ao serem submetidos à eletroforese, passam pelo feixe de laser, promovendo a excitação dos fluoro cromos. É possível identificar, assim, a cor da última base fluorescente adicionada e a informação é processada através de um programa de computador.

A reação de sequenciamento automático foi realizada utilizando *Big Dye Terminator Kit (ABI Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)*.

Foram utilizados os seguintes componentes, com as respectivas quantidades:

- Produto de PCR – 100 µl;
- *Primer* - 3,2 pmoles;
- Tampão de diluição - 4 µl;
- *Terminator ready reaction mix* - 4 µl.

A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100-60, seguindo os seguintes parâmetros, após desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, para 25 ciclos:

1. 96° por 30 segundos;
2. 50° por 15 segundos;
3. 60° por 4 minutos.

Finalizada a amplificação, o produto da reação foi precipitado com 80 µl de isopropanol 75% por 15 minutos em temperatura ambiente e, centrifugado por 25 minutos a 16.000 x g, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 150 µl de etanol 70% ao precipitado e, novamente foi centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o produto foi submetido à temperatura de 80°C por 2 minutos. Posteriormente, foi ressuscitado em 12 µl da solução de TSR (*Template Supression Reagent, ABI PRISM, USA*). O produto final foi armazenado a 4° C até ser analisado no aparelho de sequenciamento automático ABI PRISM 310 (*Genetic Analyser with Power Machintosh Controllers*), que utiliza o processo de cromatografia em coluna capilar para separar os produtos da reação. A interpretação dos resultados foi realizada em *Software Sequencing Analysis*.

A leitura do gráfico foi realizada com o programa *Chromas (Technelysium)*.

As soluções utilizadas no sequenciamento encontram-se descritas no anexo 6.

2.2.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Para análise da diferença de idade entre os grupos utilizamos o *Mann-Whitney Rank Sum Test* e para avaliação das diferenças entre os grupos com relação a sexo e raça utilizamos o *Chi-square test*.

As tabelas 6 e 7 resumem os dados relativos a gênero e raça, respectivamente, em ambos os grupos.

Tabela 6: número de indivíduos nos grupos controle e pacientes com relação ao gênero.

| GRUPO | FEMININO | MASCULINO | TOTAL |
|-----------|----------|-----------|-------|
| CONTROLE | 43 | 18 | 61 |
| PACIENTES | 87 | 16 | 103 |
| TOTAL | 130 | 34 | 164 |

P= 0,095

Tabela 7: número de indivíduos nos grupos controle e pacientes com relação à raça.

| GRUPO | MELANODERMA | FAIODERMA | LEUCODERMA | TOTAL |
|-----------|-------------|-----------|------------|-------|
| CONTROLE | 7 | 20 | 34 | 61 |
| PACIENTES | 10 | 50 | 43 | 103 |
| TOTAL | 17 | 70 | 77 | 164 |

P= 0,16

3 – RESULTADOS:

3.1 – ANÁLISE DA AMOSTRA ESTUDADA:

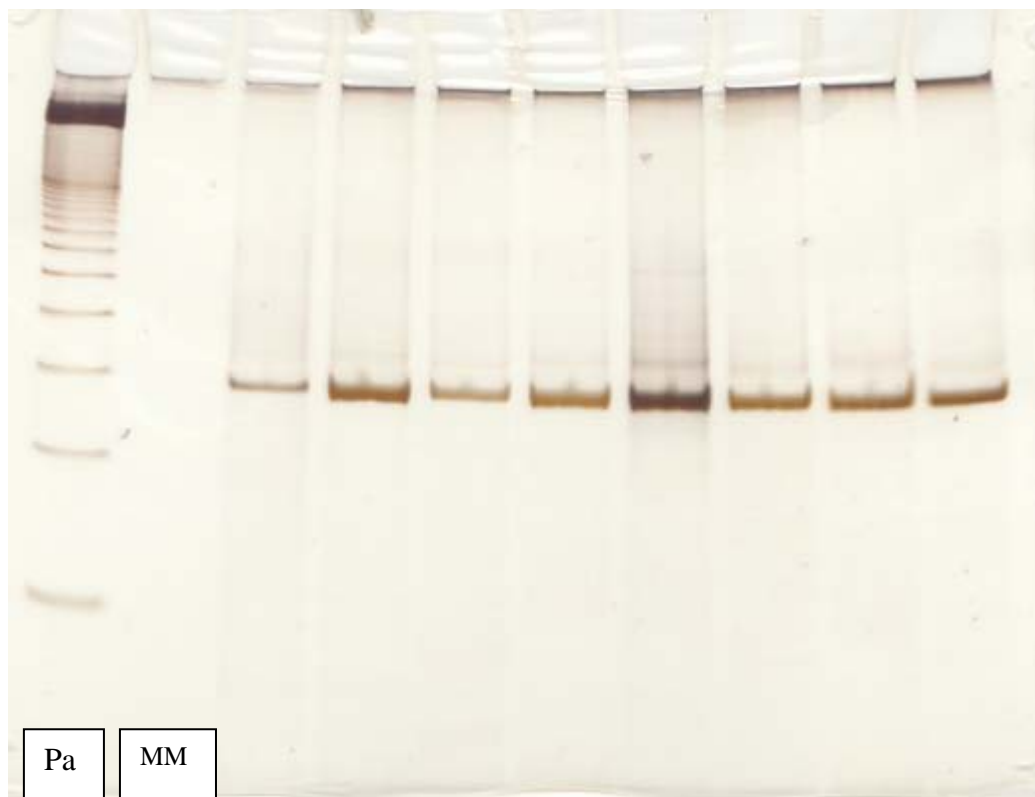
Os grupos eram semelhantes quanto à raça e gênero, porém encontramos diferença estatisticamente significativa com relação à idade de inclusão no estudo ($p < 0,001$).

3.2 – RESULTADOS GENOTÍPICOS:

Não foi encontrado nenhum polimorfismo no exon 11 da TPH2 nos 164 indivíduos estudados (103 pacientes portadores de depressão de início tardio e 61 controles).

A figura 8 demonstra um gel de poliacrilamida com os produtos de PCR do exon 11 da TPH2, com formação de banda em torno de 300 pb:

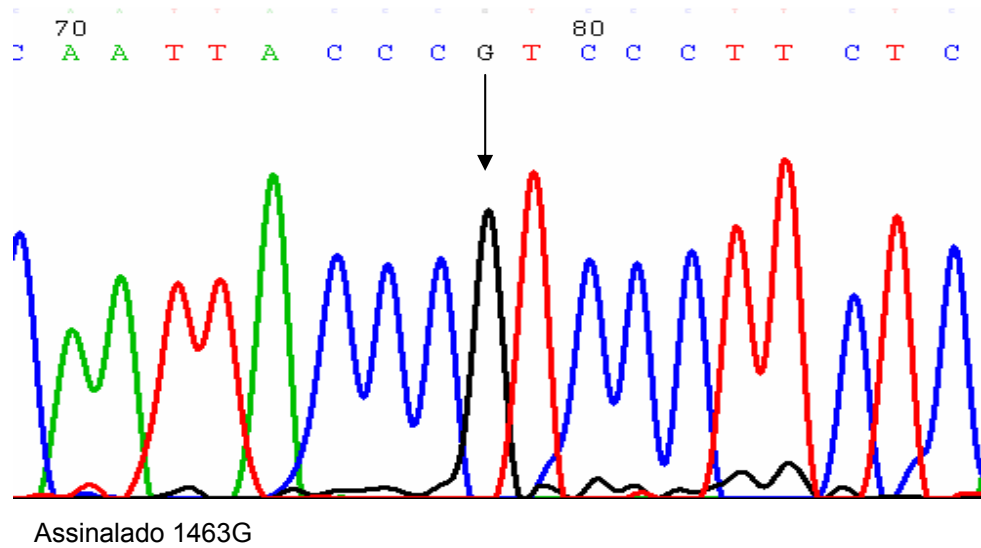
Figura 8: gel de poliacrilamida com produtos de PCR do exon 11 da TPH2.



Pa: padrão; MM: controle negativo.

A figura 9 demonstra o sequenciamento do exon 11 da TPH2 - 1463G.

Figura 9 : sequenciamento do exon 11 da TPH2, 1463G.



4 – DISCUSSÃO:

A depressão maior é uma das doenças psiquiátricas mais comuns, com uma prevalência total estimada entre 5% e 17%, dependendo da população estudada e dos critérios utilizados para o diagnóstico da doença. Segundo dados da OMS, é a maior causa de incapacidade mundial. Para o ano de 2020 a previsão é que se torne a segunda causa de incapacidade, perdendo apenas para a doença cardíaca isquêmica.

Além das elevadas taxas de morbidade clínica, relaciona-se com um aumento da mortalidade principalmente quando associada à doença arterial coronariana (DAC). Além disso, até 15% dos pacientes com transtorno depressivo maior grave morrem vítimas de suicídio. Entretanto, observa-se que muitos indivíduos com depressão que poderiam ser tratados de forma eficaz não procuram ou obtêm tratamento.

Apesar da elevada prevalência e do grande impacto econômico para a sociedade, pouco se sabe a respeito da etiologia da doença. Embora os estudos epidemiológicos demonstrem um componente ambiental indiscutível, os fatores genéticos também são importantes (Abkevich et al., 2003). Existe uma crescente aceitação da interação entre genética e o ambiente. Tais interações levariam à expressão dos eventos ambientais apenas na presença de uma base genética permissiva (Lesch, 2004).

Embora a era pós-genética ainda esteja na infância vários marcos já foram alcançados: a variação na expressão genética já foi confirmada como de fundamental importância nas diferenças individuais, as interações gene-ambiente têm sido estabelecidas em humanos e modelos primatas não humanos, as correlações gene-fenótipo têm sido fundamentadas por neuroimagem funcional e, o conceito de redes de genes que controlam o desenvolvimento cerebral está em crescente reconhecimento. Considerando-se a complexidade etiológica e psicobiológica dos transtornos do humor, não é surpreendente que a identificação de fatores genéticos específicos seja extremamente difícil e continue a figurar entre as fronteiras do conhecimento genético (Lesch, 2004).

Os estudos genéticos têm contribuído para esclarecer os fatores etiológicos relacionados com a depressão. A genética promove uma forma de esclarecer correlações causais entre os achados biológicos (níveis de substâncias no plasma, fluido cerebrospinal, urina; neuroimagem,

alterações em linfócitos) e as doenças psiquiátricas. Existem duas estratégias básicas para o estabelecimento da etiologia genética: estudos de ligação (*linkage analysis*) (traço→gene), associando uma região cromossômica com um traço ou doença; e, os estudos de associação (gene→traço), estabelecendo uma frequência aumentada de uma variante natural (um polimorfismo ou alelo susceptível) dentro de uma região do gene entre os casos portadores do traço ou doença comparado a um grupo controle pareado. O maior desafio para o esclarecimento de traços complexos e doenças psiquiátricas tem sido a heterogeneidade genética, quer dizer, diferentes vias genéticas para uma só patologia (Gershenfeld et al., 2005).

O esclarecimento dos fatores genéticos determinantes da depressão pode contribuir para o desenvolvimento da medicina “preditiva” ou personalizada, que tem emergido como uma tendência futura, incluindo a área da farmacogenética¹⁷. Esta tem por objetivo individualizar o tratamento, judiciosamente combinado ao perfil biológico único do indivíduo, proporcionando maior eficácia e segurança ao tratamento.

A variação na resposta clínica individual ao tratamento psicotrópico permanece um problema crítico na condução de pacientes com doenças mentais graves. Embora uma minoria de pacientes apresente remissão completa dos sintomas, uma grande proporção continua a apresentar sintomas psiquiátricos significativos. Além disso, muitos pacientes desenvolvem eventos adversos induzidos por medicamentos, que variam desde problemas leves até ameaçadores à vida. Também, a eficácia dos medicamentos psicotrópicos geralmente demanda algumas semanas de tratamento. Assim, o período de tempo necessário para se concluir a respeito da ineficácia do fármaco e se indicar uma farmacoterapia alternativa pode ser demasiadamente longo para alguns pacientes com distúrbios graves do humor, especialmente para os idosos. Durante este período, os pacientes em tratamento podem experimentar sintomas psiquiátricos contínuos, perda de emprego, disfunção social, morbidades clínicas e, também, cometer suicídio. Esforços precoces para identificar fatores preditivos da resposta aos

¹⁷ Farmacogenética – estudo das diferenças interindividuais determinadas geneticamente em resposta aos agentes farmacológicos.

medicamentos psicotrópicos baseados apenas em parâmetros clínicos têm sucesso limitado. A farmacogenética usa a informação genética para guiar a farmacoterapia e promover decisões terapêuticas individualizadas cientificamente embasadas.

Atualmente, existe um interesse crescente no uso de variantes genéticas para prever a resposta ao tratamento medicamentoso. Este interesse é muito maior no tratamento farmacológico dos transtornos psiquiátricos, os quais, em geral, ainda são tratados empiricamente e apresentam taxa inaceitável de falência ao tratamento de primeira escolha. Uma grande quantidade de variantes do DNA, na forma de SNPs e a tecnologia da genotipagem torna mais compreensível as variantes genéticas nos genes de interesse para a resposta terapêutica (Peters et al., 2003). Assim, estudos de associação genômica em larga escala agregados à informação genética podem auxiliar a psiquiatria a entrar no mundo da medicina “preditiva”. Esta determinação com biomarcadores (“bioassinatura”) pode prognosticar eficácia, segurança e risco do tratamento farmacológico, limitando a exposição a efeitos adversos graves e potencialmente letais entre indivíduos susceptíveis (Gershenfeld et al., 2005).

Considerando-se os efeitos deletérios do tratamento inadequado ou das reações adversas na população idosa, a determinação de biomarcadores em idosos com TDM seria de fundamental importância para garantir uma terapêutica específica.

Considerando-se o limitado poder dos estudos de ligação para detecção de pequenos efeitos genéticos, a pesquisa da genética molecular na depressão depende de estudos de associação usando variantes de DNA (ácido desoxirribonucléico) dentro ou próximo aos genes candidatos de relevância etiológica ou fisiopatológica. As variantes genéticas de impacto significativo na funcionalidade dos componentes de neurotransmissão cerebral, como o sistema da serotonina, são um ponto de início racional. O envolvimento da 5-HT e a expressão dos genes serotoninérgicos nos vários processos presentes no desenvolvimento cerebral, assim como na neuroplasticidade sináptica na vida adulta, sugerem que a predisposição à depressão parece ser influenciada pela variabilidade genética da função da 5-HT.

A serotonina está associada ao controle do humor e a uma grande variedade de funções, incluindo a regulação do sono, percepção de dor, temperatura corporal, atividade hormonal, cognição, percepção e atenção, agressividade, “interesse sexual”, apetite e nível de energia. Muitas destas funções são relevantes para a etiologia do transtorno depressivo e, por isso, existem hipóteses que preconizam que os distúrbios da atividade da 5-HT são cruciais na etiologia desta condição. A 5-HT e/ou seus metabólitos na urina e no SNC encontram-se reduzidos em pacientes com transtorno do humor. A quantidade de 5-HT em cérebros de vítimas de suicídio está reduzida quando comparada aos controles.

Embora a deficiência isolada da serotonina não possa explicar a fisiopatologia dos distúrbios do humor, a interação de baixos níveis de serotonina no cérebro com outros sistemas neurotransmissores no SNC é considerada importante na etiologia da depressão e outros distúrbios do humor (Kalia, 2005).

O esclarecimento dos mecanismos genéticos envolvidos nas alterações das vias serotoninérgicas, assim como suas interações com fatores ambientais na etiologia do transtorno depressivo, visa permitir, em futuro próximo, uma melhor abordagem diagnóstica baseada nos fatores de risco e definir abordagens terapêuticas mais adequadas, baseadas em marcadores genéticos.

Inúmeros genes envolvidos nas vias serotoninérgicas, incluindo síntese, transporte e transmissão de sinais têm sido estudados com objetivo de elucidar a etiologia e a fisiopatologia da depressão e suas possíveis implicações na farmacoterapia da mesma. Assim, inúmeros polimorfismos foram descritos no 5-HTT, receptores da serotonina e TPH. Esta é a enzima limitante da via biossintética de 5-HT, responsável pela regulação de seus níveis. Numerosos estudos genéticos e funcionais têm investigado o papel do gene da isoforma 1 da TPH (TPH1) no transtorno depressivo, desordem bipolar, esquizofrenia, alcoolismo, abuso de drogas, agressão e suicídio. Porém, nenhum deles levou a evidências convincentes sobre o envolvimento da TPH1 na patogênese destas doenças (Breidenthal et al., 2001; Serreti et al., 2001).

Em 2003, Walther et al. demonstraram que camundongos *knockout* homozigotos para TPH1 continuavam a produzir 5-HT no cérebro, enquanto a sua expressão nos tecidos encontrava-se ausente ou significativamente reduzida. Esta produção ocorria por intermédio da nova isoforma descoberta, a TPH2. Sua homologia em humanos, localizada no cromossomo 12q21.1, passou então a ser considerada como uma possível candidata para a etiologia do transtorno depressivo (Abkevich et al., 2003). No cérebro humano, existem níveis elevados de mRNA da TPH2 nos núcleos da rafe, região onde os neurônios serotoninérgicos são os principais componentes (Gasper et al., 2003).

Possíveis interações entre TPH1 e TPH2 devem ser consideradas como mecanismos moduladores na patogênese do comportamento suicida e desordens relacionadas com distúrbios do sistema serotoninérgico. Isto poderia também explicar os resultados conflitantes do gene TPH1 em vários distúrbios psiquiátricos (Serretti et al., 2001; Peters et al., 2004).

Desde sua descoberta, numerosos estudos têm investigado a TPH2 e seu envolvimento nos transtornos do humor (Eley et al., 2004). Zhang et al. (2004) encontraram uma variante Pro447Arg em várias linhagens de camundongos, que resultava em redução dos níveis de 5-HT cerebral. Zhang et al. (2005a) também relataram uma variante funcional na região correspondente da TPH2 humana, Arg441His, ligada à depressão maior. A variante foi descrita após a investigação dos 11 exons da TPH2 numa amostra de 48 indivíduos, à procura por possíveis polimorfismos. A partir daí, foi identificado um polimorfismo singular na região codificante do gene, G1463A. Posteriormente, os autores encontraram este SNP em nove dentre 87 pacientes idosos portadores de depressão maior grave, refratária ao tratamento, contra três indivíduos do grupo controle (n=219). A descoberta desta variante funcional na TPH2 humana associada à depressão era o anúncio de uma grande oportunidade para substituir uma correlação de causalidade por uma hipótese serotoninérgica funcional estruturada como fator etiológico da depressão.

Considerando-se que a replicação dos resultados em uma população etnicamente heterogênea como a brasileira é essencial para compreender a importância dos resultados iniciais, nós investigamos o exon 11 da TPH2 em

uma amostra de pacientes do Centro de Referência do Idoso em Belo Horizonte. Os pacientes portadores de depressão de início tardio pertenciam a grupos étnicos diversos. O grupo controle, de origem étnica semelhante à dos pacientes, compreendia indivíduos idosos que não apresentavam história pessoal ou familiar de transtornos neuro-psiquiátricos. Após amplificação do exon 11 da TPH2 utilizando a reação de PCR e, a seguir, seu sequenciamento não encontramos nenhum polimorfismo tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes estudados (Bicalho et al., 2006).

Outros grupos tentaram replicar os resultados em amostras de diversas etnias e não encontraram a variante previamente descrita, tanto em seus grupos controles quanto nos pacientes deprimidos, totalizando quase 5000 amostras seqüenciadas (Glatt et al., 2005; Van Den Bogaert et al., 2005; Zhou et al., 2005). Vale lembrar que os resultados obtidos por Zhang et al. (2005a) foram validados por outros grupos, utilizando as mesmas amostras (Blakely, 2005).

Ressaltamos que os indivíduos estudados por Zhang et al. (2005a) eram idosos e, muitos deles, gravemente deprimidos. Daqueles que apresentavam o SNP descrito, a grande maioria apresentava história familiar positiva para doença mental ou abuso de álcool ou drogas, sintomas de ansiedade, ideação suicida e ausência de resposta ou resposta apenas parcial a elevadas doses de SSRI. O fato dos controles portadores do SNP apresentarem sintomas de ansiedade ou depressão menor sugere uma possível susceptibilidade aumentada para determinados distúrbios neuropsiquiátricos na presença do alelo mutante (1463A).

Os autores sugerem que a substituição Arg441His esteja ligada à depressão grave, refratária à medicação convencional, necessitando eletroconvulsoterapia. Entretanto, diversos grupos incluíram indivíduos portadores de depressão grave em suas amostras e obtiveram resultados negativos. Considerando que o grupo de pacientes estudados pertencia à faixa etária de idosos, outra possibilidade seria que esta característica se manifestasse apenas tardiamente no ciclo da vida.

Com relação à população geriátrica, algumas dúvidas persistem: os genes e os fatores ambientais associados à depressão em adultos jovens seriam os mesmos a afetar a população geriátrica? Em qual extensão os

genes associados à depressão, ansiedade, neuroses poderiam se sobrepor aos genes para susceptibilidade ao stress?

Blakely (2005) considera que, até o momento, a variante de G1463A da TPH2, assim como outras descritas não seja um determinante de risco genético para depressão maior. Outros alelos, por exemplo, na região promotora, ainda devem ser explorados já que evidências sugerem que algumas formas variantes dentro ou próximo ao lócus TPH2 associam-se mais extensamente com depressão maior (Zill et al., 2004a). Porém, a raridade da mutação Arg441His não é isenta de valor, uma vez que ela pode ser o ponto inicial que poderá levar a importantes descobertas.

Vários outros autores procuraram pelo SNP descrito por Zhang et al. (2005a), em amostras variadas quanto à gravidade da depressão; etnia e faixa etária dos indivíduos selecionados. Também foram estudados indivíduos portadores de transtorno bipolar, sem sucesso.

Zhou et al. (2005a) estudaram 2167 indivíduos portadores de depressão e 352 controles. Nenhum deles apresentava o alelo His441. Os autores sugerem que, pelo fato das amostras estudadas por Zhang pertencerem à população geriátrica, o SNP poderia estar relacionado à depressão de início tardio.

Van Den Bogaert et al. (2005) sugerem que a elevada frequência do alelo 1463A, relatada por Zhang et al. (2005a), seria o resultado de uma estratificação populacional baseada na idade de inclusão e/ou falência terapêutica dos SSRI.

Glatt et al. (2005) concluíram que a ausência do alelo A de G1463A em uma amostra de 1023 indivíduos deprimidos pertencentes a diversas etnias se deve à raridade do SNP.

Zhang et al. (2005b) explicam seus resultados baseando-se na amostra selecionada, constituída por pacientes idosos e portadores de depressão refratária ao tratamento. A variante R441H na TPH2 poderia representar uma mutação rara que seria importante para um subtipo de depressão grave e, poderia promover as bases genéticas para todos os casos de depressão. É provável que uma mutação funcional adicional na TPH2 possa ser identificada e que a presença de múltiplos genes susceptíveis e/ou múltiplas mutações

num único gene possa contribuir para a natureza poligênica e para o amplo espectro de manifestações clínicas da depressão.

Zhou et al. (2005b) sugerem que para identificação de um locus funcional da TPH2 é importante avaliar criteriosamente o significado das variantes da seqüência em regiões não codificadoras, que poderiam alterar a expressão do gene ao nível do DNA e RNA.

Garriock et al. (2005) investigaram o exon 11 do TPH2 em 376 indivíduos com distribuição étnica e por gênero semelhantes aos pesquisados por Zhang et al. (2005a), sendo 182 portadores de TDM unipolar resistente ao tratamento, oito deprimidos bipolares resistentes ao tratamento e 186 controles. Não foi observado nenhum polimorfismo, tanto no grupo de indivíduos portadores de depressão quanto no grupo controle, em relação aos três SNPs em análise, G1463A, C1487G ou T1578G.

Entretanto, nenhum destes estudos selecionou amostra exclusiva de pacientes idosos, como a amostra estudada por Zhang et al. (2005a). E, considerando-se as peculiaridades da depressão de início tardio, que apresenta mecanismos fisiopatológicos diversos da depressão em adultos jovens, existe a probabilidade que a variante em questão se correlacione exclusivamente com este subtipo de depressão.

Assim, nossos resultados (Bicalho et al., 2006), bem como outros citados anteriormente, indicam que a variante rara da TPH2 descrita por Zhang et al. (2005a) não é um determinante de risco genético para depressão de início tardio, como previamente sugerido. E, provavelmente está relacionada à origem étnica da população estudada e não à depressão maior, de forma isolada. Nosso trabalho encontra-se disponível no anexo 7.

Nesta mesma população, cujos resultados apresentamos nesse trabalho, nós também analisamos os fatores ambientais associados com a depressão e sua relação com o polimorfismo de 5HTTLPR, mas os resultados são preliminares e não foram motivo de apresentação e/ou discussão nessa dissertação de mestrado.

Considerando as características fisiopatológicas específicas da depressão de início tardio, pretendemos continuar investigando outros

prováveis SNPs da TPH2, assim como bloco de haplótipos e outros genes possivelmente associados a este tipo de depressão na população geriátrica.

5 – CONCLUSÃO:

Considerando-se o papel da serotonina nos distúrbios do humor e, a TPH2 como enzima limitante da síntese de serotonina, existe uma possibilidade que variantes genéticas desta enzima estejam envolvidas na etiologia da depressão maior. Entretanto, apesar dos resultados encontrados por Zhang et al. (2005a), correlacionando a variante funcional da TPH2 G1463A com a depressão maior grave e refratária ao tratamento em uma população de idosos, nenhum outro grupo, incluindo o nosso trabalho (após análise de mais de 5000 indivíduos, de diversas origens étnicas, portadores de depressão grave ou transtorno bipolar) confirmou estes resultados. Nosso objetivo foi avaliar se o SNP em questão se relaciona à depressão de início tardio, uma vez que os indivíduos estudados por Zhang et al. (2005a) tinham idade maior ou superior a 60 anos. Porém, nenhum dos 164 indivíduos estudados por nós (controles ou portadores de depressão de início tardio) revelou a mutante previamente descrita. Assim, concluímos que a presença desta variante rara não deve estar associada com a depressão de início tardio, mas, provavelmente se relaciona à origem étnica da população estudada, merecendo assim, um incremento da amostra inicial com indivíduos portadores de características semelhantes aos descritos por Zhang et al (2005a).

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abkevich V, Camp Nj, Hensel CH, Nell CD, Russell DL, Hughes DC, Pleenk AM, Lowry MR, Richards RL, Carter C, French GC, Stone S, Rowe K, Chau CA, Cortado K, Hunt A, Luce K, O'Neil G, Porch J, Poulsen GH, Saxton H, Bernat-Setak M, Thompson V, Gutin A, Skolnick MH, Shattuck D, Cannon-Albright L (2003) Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22-12q23.3. *Am J Hum Genet* **73**: 1271-1281.
- Almeida OP, Almeida AA (1998) Confiabilidade da versão brasileira da escala de depressão geriátrica (GDS) versão reduzida. *Arq Bras Neuro-psiq* **57(2B)**: 421-426.
- Alexopoulos GS (2005) Depression in the elderly. *Lancet* **365**: 1961-1970.
- Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B (1999) Environmental and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parent loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* **4**: 163-172.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* **196 (1)**: 80-83.
- Bell-McGinty S, Butters MA, Meltzer CC, Greer PJ, Reynolds CF, Becker JT (2002) Brain morphometric abnormalities in geriatric depression: long-term neurobiological effects of illness duration. *Am J Psychiatry* **159**: 1424-1427.
- Bicalho MA, Pimenta GJ, Neves FS, Correa H, de Moraes EN, De Marco L, Romano-Silva MA (2006) Genotyping of G1463A (Arg441His) TPH2 polymorphism in a geriatric population of patients with major depression. *Molecular Psychiatry* **11**:799-800.
- Blakely RD (2005) Overview: a rare opportunity or just one less reason to be depressed. *Neuron* **48**: 701-702.
- Blazer DG, Hybels CF (2005) Origins of depression in later life. *Psychol Med* **35**: 1241-1252.
- Booij L, Van der Does AJ, Haffmans PM, Riedel WJ (2005) Acute tryptophan depletion in depressed patients treated with a selective serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor: augmentation of antidepressant response? *J Affect Disord* **86**: 305-311.

- Breidenthal SE, White DJ, Glatt CE (2004) Identification of genetic variants in the neuronal form of tryptophan hydroxylase (TPH2). *Psychiatr Genetics* **14**: 69-72.
- Brown SM, Peet E, Manuck SB, Williamson DE, Dahl RE, Ferrell RE, Hariri AR (2005) A regulatory variant of the human tryptophan hydroxylase-2 gene biases amigdala reactivity. *Mol Psychiatry* **10**: 884-888.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* **301**: 386-389.
- Charney DS, Manji HK (2004) Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* (**225**): re5.
- Correa H, Campi-Azevedo AC, De Marco L, Boson W, Vianna MM, Guimaraes MM, Costa E, Miranda DM, Romano-Silva MA (2004) Familial suicide behaviour: association with probands suicide attempt characteristics and 5-HTTLPR polymorphism. *Acta Psychiatr Scand* **110**: 459-464.
- Costa e Silva JA. (2005) Depression: Genetics, Pathophysiology, and clinics Manifestations. Overview of the field. *Metabolism*. **54** (5). Suppl 1: 5-9.
- Cusin C, Serretti A, Zanardi R, Lattuada E, Rossini D, Lilli R, Lorenzi C, Smeraldi E (2002) Influence of monoamine oxidase A and serotonin receptor 2A polymorphisms in SSRI antidepressant activity. *Int J Neuropsychopharmacol* **5**: 27-35.
- Christiansen L, Tan Q, Lachina M, Bathum L, Kruse TA, McGue M, Christensen K (2007) Candidate gene polymorphisms in the serotonergic pathway: influence on depression symptomatology in an elderly population. *Biol Psychiatry* **61**: 223-230.
- Djernes JK (2006) Prevalence and predictors of depression in populations of elderly: a review. *Acta Psychiatr Scand* **113**: 372-387.
- Diagnostic and Statistics Manual of Mental Disorders, 4th ed.: DSM-IV. Washington, DC: American Psychiatry Association, 2000.

- Drevets WC (2001) Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 24-249.
- Ebmeier KP, Donaghey C, Steele JD. (2006) Recent developments and current controversies in depression. *Lancet* **367**:153-167.
- Eley TC, Sugden K, Corsico A, Gregory AM, Sham P, McGuffin P, Plomin R, Craig IW (2004). Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression. *Mol Psychiatry* **9**: 1-8.
- Forlenza OV (2000) Transtornos depressivos em idosos. In: FORLENZA OV, CARAMELLI P. *Neuropsiquiatria geriátrica*. Primeira edição. São Paulo: Editora Atheneu, Cap.23, 299-308.
- Frazer A, Henscher J (1999) Serotonin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fischer SK, Uhler MD. *Basic neurochemistry: molecular, celular and medical aspects*. Sexta edição. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, cap. 13, 263-291.
- Garside RF, Kay DW, Wilson IC, Deaton ID, Roth M (1971) Depressive syndromes and the classification of patients. *Psychol Med* **1**: 333-338.
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* **4**: 1002-1012.
- Garriock HA, Allen JJ, Delgado P, Nahaz Z, Kling MA, Carpenter L, Burke M, Burke W, Schwartz T, Marangell LB, Husain M, Erickson RP, Moreno FA. (2005) Lack of association of TPH2 exon XI polymorphisms with major depression and treatment resistance. *Mol Psychiatry* **10**: 976-977.
- Goldberg D (2006) The aetiology of depression. *Psychol Med* **36**: 1341-1347.
- Gershenfeld HK, Philibert RA, Boehm GW (2005) Looking forward in geriatric anxiety and depression. *Am J Geriatr Psychiatry* **13**: 1027-1040.
- Glatt CE, Carlson E, Taylor TR, Risch N, Reus VI, Schaefer CA (2005) Response to Zhang et al. (2005) loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* **48**: 704-705.

- Grabe HJ, Lange M, Wolff B, Volzke H, Lucht M, Freyberger HJ, John U, Cascorbi I (2005) Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden. *Mol. Psychiatry* **10**: 220-224.
- Haddad MS (2000) Demências subcorticais. In: FORLENZA OV, CARAMELLI P. *Neuropsiquiatria geriátrica*. Primeira edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. Cap.20, 243-251.
- Hariri AR, Broiwn SM HARIRI (2006) Serotonin. *Am J Psychiatry* **163**: 12.
- Hamet P, Tremblay J (2005) Genetics and genomics of depression. *Metabolism* **54** (Suppl 1): 10-15.
- Hickie I, Scott E, Naismith S, Ward PB, Turner K, Parker G, Mitchell P, Wilhelm K. (2001) Late-onset depression: genetic, vascular and clinical contributions. *Psychol Med* **31**: 1403-1412.
- Hoefgen B, Schulze TG, Ohlraun S, von Widdern O, Höfels S, Gross M, Heidmann V, Kovalenko S, Eckermann A, Kölsch H, Metten M, Zobel A, Becker T, Nöthen MM, Propping P, Heun R, Maier W, Rietschel M (2005) The power of sample size and homogenous sampling: association between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **57**: 247-251.
- Kalia M (2005) Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism* **54**(Suppl 1): 24-27.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Casual relationship between stressful life events and onset of major depression. *Am J Psychiatry* **156**: 837-841.
- Kendler KS, Kuhn JW, Vittum J, Prescott CA, Riley B (2005). The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch Gen Psychiatry* **62**, 529-535.
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO (2001) Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry* **158**: 582-586.

- Krishnan KR (2002) Biological risk factors in late life depression. *Biol Psychiatry* **52**: 185-192.
- Krishnan KR, Hays JC, Tupler LA, George LK, Blazer DG (1995) Clinical and phenomenological comparisons of late-onset and early-onset depression. *Am J Psychiatry* **152**: 785-788.
- Lenfant C (2005) Medical and psychiatric illness: different but concurrent! *Metabolism* **54**: 53-54.
- Lesch KP (2004) Gene-environment interaction and genetics of depression. *Rev Psychiatr Neurosci* **29**: 174-184.
- Levinson DF (2006) The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry* **60**: 84-92.
- Leyton M, Ghadirian AM, Young SN, Palmour RM, Blier P, Helmers KF, Benkelfat C (2000) Depressive relapse following acute tryptophan depletion in patients with major depressive disorder. *J Psychopharmacol* **14**: 284-287.
- Lotrich FE, Pollock BG (2004) Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders. *Psychiatr Genet* **14**: 121-129.
- Maier W, Lichtermann D, Minges J, Heun R, Halmayer J, Benkert O (1992) Schizoaffective disorder and affective disorders with mood-incongruent psychotic features: keep separate or combine? Evidence from a family study. *Am J Psychiatry* **149**: 1666-1673.
- Malhotra AK, Murphy GM, Kennedy AJ (2004) Pharmacogenetics of psychotropic drug response. *Am J Psychiatry* **161**: 780-796.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* **7**: 541-547.
- Matiatis T, Fritsch Ef, Sambrook J (1982) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Primeira edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Cap. 5, p. 173-178.
- McKinney J, Knappskog PM, Haavik J (2005) Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J Neurochem* **9**: 311-320.
- Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP (2004) Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular Interventions* **4**: 109-123.

- Murphy GM, Hollander SB, Rodrigues HE, Kremer C, Sschatzberg AF (2004) Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on mirtazapine and paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression. *Arch Gen Psychiatry* **61**: 1163-1169.
- Neves FS, Silveira G, Romano-Silva MA, Malloy-Diniz L, Ferreira AA, De Marco L, Correa H (2007) Is the 5-HTTLPR polymorphism associated with bipolar disorder or with suicidal behavior of bipolar disorder patients? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (DOI 10.1002/ajmg.b.30563).
- Neumeister A, Konstantinidis A, Stastny J, Schwarz MJ, Vitouch O, Willeit M, Praschak-Rieder N, Zach J, de Zwaan M, Bondy B, Ackenheil M, Kasper S (2002) Association between serotonin transporter gene promoter polymorphism (5HTTLPR) and behavioral responses to tryptophan depletion in healthy women with and without family history of depression. *Arch Gen Psychiatry* **59**: 613-619
- Nucleo de Geriatria e Gerontologia Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Minas Gerais. Protocolo de avaliação multidimensional do idoso do Centro de Referência do Idoso - Professor Caio Benjamin Dias. Disponível em: <http://www.hc.ufmg.br/geriatria> Acesso em 20 de junho de 2007.
- Organização Mundial de Saúde (2001) *The World Health Report - Mental Health: New understanding*, WHO, Geneve.
- Parsey RV, Hastings RS, Oquendo MA, Huang YY, Simpson N, Arcement J, Huang Y, Ogden RT, Van Heertum RL, Arango V, Mann JJ (2006) Lower serotonin transporter binding potential in the human brain during major depressive episodes. *Am J Psychiatry* **163**: 52-58.
- Peters EJ, Slager SL, McGrath PJ, Knowles JA, Hamilton SP (2004) Investigation of serotonin-related genes in antidepressant response. *Mol Psychiatry* **9**: 879-889.
- Pollock BG, Ferrell RE, Mulsant BH, Mazumdar S, Miller M, Sweet RA, Davis S, Kirshner MA, Houck PR, Stack JA, Reynolds CF, Kupfer DJ (2000) Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects onset of paroxetine treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology* **23**: 587-590.

- Ramasubbu R (2003) Serotonin transporter gene functional polymorphism: a plausible candidate gene for increased vascular risk in depression. *Med Hypotheses* **61**: 36-44.
- Rapp MA, Dahlman K, Sano M, Grossman HT, Haroutunian V, Gorman JM (2005) Neuropsychological differences between late-onset and recurrent geriatric major depression. *Am J Psychiatry* **162**: 691-698.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *J Bio. Chem.* **176**: 1243-1251.
- Reynolds CF, Dew MA, Pollock BG, Mulsant BH, Frank E, Miller MD, Houck PR, Mazumdar S, Butters MA, Stack JA, Schlernitzauer MA, Whyte EM, Gildengers A, Karp J, Lenze E, Szanto K, Bensasi S, Kupfer DJ (2006) Maintenance treatment of major depression in old age. *N Engl J Med* **354**: 1130-1138.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stofell S, Scharf ST, Higuchi R, Horn GT, Mullis B, Erlich HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sanger F (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**: 1205-1210.
- Schoevers RA, Beekman AT, Deeg DJ, Geerlings MI, Jonker C, Van Tilburg W (2000) Risk factors for depression in later life; results of a prospective community based study (AMSTEL). *Journal of affective disorders* **59**: 127-137.
- Serreti A, Zanardi R, Cusin C, Rossini D, Lorenzi C, Smeraldi E (2001) Tryptophan hydroxylase gene associated with paroxetine antidepressant activity. *Eur Neuropsychopharmacol* **11**: 375-380.
- Serreti A, Zanardi R, Rossini D, Cusin C, Lilli R, Smeraldi E (2001) Influence of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter genes on fluvoxamine antidepressant activity. *Mol Psychiatry* **6**: 586-592.
- Sibille E, Lewis DA (2006) SERT-only involved in depression, but when? *Am J Psychiatry* **163**: 8-11.
- Sjöberg RL, Nilsson KW, Nordquist N, Ohrvik J, Leppert J, Lindström L, Orelund L (2006) Development of depression: sex and the interaction between

- environment and a promoter polymorphism of serotonin transporter gene. *Int J Neuropsychopharmacol* **9**: 443-449
- Sheikh JL, Yesavage JA (1986) Geriatric depression scale (GDS): recent evidence and development of a shorter version. In: BRINK TL. *Clinical gerontology: guide to assessment and intervention*. Haworth, New York. 163-173.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC (2003) Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* **160**: 1516-1518.
- Skoog I (2004) Psychiatric epidemiology of old age: the H70 study – the NAPE lecture 2003. *Acta Psychiatr Scand* **109**: 4-18
- Smeraldi E, Zanardi R, Benedetti F, Di Bella D, Perez J, Catalano M. (1998) Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. *Mol Psychiatry* **3**: 508-511.
- Smits KM, Smits LJ, Schouten JS, Stelma FF, Nelemans P, Prins MH (2004) Influence of SERTPR and STin2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a systematic review. *Mol Psychiatry* **9**: 433-441.
- Stek ML, Gussekloo J, Beekman AT, van Tilburg W, Westendorp RG (2004) Prevalence, correlates and recognition of depression in the oldest old: the Leiden 85-plus study.. *J Affect Disord* **78**: 193-200
- Surtess PG, Wainwright NWJ, Willis-Owen SA, Luben R, Day NE, Flint J (2005) Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **59**: 224-229.
- Taylor SE, Way BM, Welch WT, Hilmert CJ, Lehman BJ, Eisenberger NI (2006) Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology. *Biol Psychiatry* **60**: 671-676
- Taylor WD, Steffens DC, Payne ME, MacFall JR, Marchuk DA, Svenson IK, Krishnan RR (2005) Influence of serotonin transporter promoter region polymorphisms on hippocampal volumes in late-life depression. *Arch Gen Psychiatry* **62**: 537-544.
- Tremeau F, Staner L, Duval F, Correa H, Crocq MA, Darre A, Czobor P, Dessoubrais C, Macher JP (2005) Suicide attempts and family history of

- suicide in three psychiatric populations. *Suicide Life Threat Behav.* **35** (6): 702-713.
- Urani A, Choubaji S, Gass P (2005) Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neurosci Biobehav Rev* **29**: 805-828.
- Van Den Bogaert A, De Zutter S, Heyman L, Mendlewicz J, Adolfsson R, Broeckhoven C, Del-Favero J (2005) Response to Zhang et al. (2005) loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* **48**: 704.
- Van Den Bogaert A, Slegers K, De Zutter S, Heyrman L, Norrback KF, Adolfsson R, Van Broeckhoven C, Del-Favero J (2006) Association of brain-specific tryptophan hydroxylase, TPH2, with unipolar and bipolar disorder in a Northern Swedish, isolated population. *Arch Gen Psychiatry* **63**: 1103-1110.
- VanItallie TB (2005) Subsyndromal depression in the elderly: underdiagnosed and undertreated. *Metabolism* **54**: 39-44.
- Viana MM, De Marco L, Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H (2006) Investigation of A218C tryptophan hydroxylase polymorphism: association with familial suicide behavior and proband's suicide attempt characteristics. *Genes Brain Behav* **5**: 340-5.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* **299**: 76.
- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lellouch J, Lépine JP, Newman SC, Rubio-Stipec M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen H, Yeh EK (1996) Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA* **276**: 293-299
- Weissman MM, Gershon ES, Kidd KK, Prusoff BA, Leckman JF, Dibble E, Hamovit J, Thompson WD, Pauls DL, Guroff JJ (1984). Psychiatric disorders in the relatives of probands with affective disorders: the Yale NIMH collaborative family study. *Arch Gen Psychiatry* **41**: 13-21
- Whyte EM, Pollock BG, Wagner WR, Mulsant BH, Ferrell RE, Mazumdar S, Reynolds CF (2001) Influence of serotonin-transporter-linked promoter region

- polymorphism on platelet activation in geriatric depression. *Am J Psychiatry* **158**: 2074-2076
- Whooley MA, Simon GE (2000) Primary care: managing depression in medical outpatients. *N Engl J Med* **343**: 1942-1950.
- Wilhelm K, Mitchell PB, Niven H, Finch A, Wedgwood L, Scimone A, Blair IP, Parker G, Schofield PR. (2006) Life events, first depression onset and the serotonin transporter gene. *Br J Psychiatry* **188**: 210-215.
- Wong ML, Licinio J (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* **2**: 343-351.
- Wurtman RJ (2005) Genes, stress, and depression. *Metabolism* **54**: 16-19.
- Yang Y, George LK (2005) Functional disability, disability transitions, and depressive symptoms in late life. *J Aging Health* **17**: 263-292.
- Young AH (2006) Antigluco-corticoid treatments for depression. *Aust N Z J Psychiatry* **40**: 402-405.
- Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, Burke AK, Hu X, Brent DA, Ellis SP, Goldman D, Mann JJ (2006). Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. *Am J Psychiatry* **163**: 1588-1593.
- Zanardi R, Serreti A, Rossini D, Franchini L, Cusin C, Lattuada E, Dotoli D, Smeraldi E (2001) Factors affecting fluvoxamine antidepressant activity: influence of pindolol and 5-HTTLPR in delusional and nondelusional depression. *Biol Psychiatry* **50**: 323-330.
- Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* **305**: 217.
- Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krishnan KR, Caron MG (2005a) Loss-of-function mutant in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* **45**: 11-16.
- Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krishnan KR, Caron MG (2005b) Response to Zhang et al.

loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* **48**: 705-706.

Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schüle C, Eser D, Rupprecht R, Möller HJ, Bondy B, Ackenheil M (2004) SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol Psychiatry* **9**: 1030-1036

Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Möller HJ, Bondy B, Ackenheil M (2004) Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol Psychiatry* **56**: 581-586.

Zhou Z, Peters EJ, Hamilton SP, McMahon F, Thomas C, McGrath PJ, Rush J, Trivedi MH, Charney DS, Roy A, Wisniewski S, Lipsky R, Goldman D (2005a) Response to Zhang et al. (2005) loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* **48**: 702-703.

Zhou Z, Roy A, Lipsky R, Kuchipudi K, Zhu G, Taubman J, Enoch MA, Virkkunen M, Goldman D (2005b) Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. *Arch Gen Psychiatry* **62**: 1109-1118

7- ANEXOS:

ANEXO 1:
TPH2 – SEQUÊNCIA AMPLIFICADA:

Exon 1

CTTCCTCTCAATCTCCGCCAGCGCTGCTACTGCCCTCTAGTACCCCCTGCTGC
AGAGAAAGAATATTACA
CCGGGATCC
CAGCCAGCAATGATGATGTTTTCCAGTAAATACTGGGCACGGAGAGGGTTTTCC
CTGG
ATTCAGCAGTGCCCGAAGAGCATCAGCTACTTGGCAGCTCAACAgtgagtactacgtac
ctggcactatggagaattatTTTTtaggg
tgtgaccatcttctcctc

Exon 2

ggaggattctggaaccctaacTAATATTTTTGTTTTATTATGCTTCGACATTCCTGAAGCTAA
ATAAACCTAACTCTGGC
AAAAATGACGACAAAGGCAACAAGGGAAGCAGCAAACGTGAAGCTGCTACCGA
AAGTGGCAAGACAGC
AGTTGTTTTCTCCTTGAAGAATGAAGTTGGTGGATTGGTAAAAGCACTGAGGCT
CTTTCAGGtgaatgtgaaatc
attacataatTTAAAAGtgaccgtgtgcctgggtacaaacctg

Exon 3/4

ggtgatttccagatgctcgtgtttccacaggAAAAACGTGTCAACATGGTTCATATTGAATCCAGG
AAATCTCGGCGAAGAA
GTTCTGAGGTTGAAATCTTTGTGGACTGTGAGTGTGGGAAAACAGAATTCAATG
AGCTCATTGAGTTGCT
GAAATTTCAAACCACTATTGTGACGCTGAATCCTCCAGAGAACATTTGGACAGA
GGAAGAAGgcaaggggtgctc
ttagctgtcgggtaactttgcaatctgacaaatattgcaaaggggaaaacacaatctgtgaactaatTTTTgaacctg
cactgtttcaacagAGCTAGAGGATGT
GCCCTGGTTCCCTCGGAAGATCTCTGAGTTAGACAAATGCTCTCACAGAGTTCT
CATGTATGGTTCTGAGC
TTGATGCTGACCACCCAGtaagtgctccagtaaaatctatttctcacatgctctttcagctc

Exon 5

tctgcagctaatttccagcactttgttaaataacttaactctttttgtgtttaaggGATTTAAGGACAATGTCTATC
GACAGAGAAGAAAGTATT
TTGTGGATGTGGCCATGGGTTATAAATAgtaagtagctgtataactcttctgtcactggctagtagg
aaaacacatgctgtgttaacaaacctgt
catctctcactttaac

Exon 6

tgtgataggtattgaggtgagaaaataacttaactcagtgattcaaagtagattcatttagtttctctctcctgcctagTGG
TCAGCCCATTCCCAGGGTGA
GTATACTGAAGAAGAACTAAAACCTGGGGTGTATTCCGGGAGCTCTCAA
ACTCTATCCCACATCAT
GCTTGCCGAGAGTATTTGAAAACCTCCCTCTGCTGACTAAATACTGTGGCTACA
GAGAGGACAATGTGC

CTCAACTCGAAGATGTCTCCATGTTTCTGAAAGgtaagatttcacacaggctgtctcttattagca
 atatcctcaattgcctccaagga

Exon 7

cctcaagtcttgctgggtaaatatttagttggccttttctgtgccttttag
 AAAGGTCTGGCTTCACGGTGAGGCCGGTGGCTGGATACCTGAGCCCACGAGAC
 TTTCTGGCAGGACTGGC
 CTACAGAGTGTTCACACTGTACCCAGTACATCCGGCATGGCTCAGATCCCCTCTA
 CACCCAGAACC
 Gtgagtacctacattaaagcccaggccaccacaccataaagtggt

Exon 8

ccagtggtaattaaagcttctatttaacacgtctttgtgatgtctttttgtcagAGACACATGCCATGAACTCT
 TGGGACATGTTCCACTACT
 TGC GGATCCTAAGTTTGCTCAGTTTTCCACAAGAAATAGGTCTGGCGTCTCTGGG
 AGCATCAGATGAAGAT
 GTTCAGAAACTAGCCACGgtgagttcattttcaactaaaaccagttctatttatgtccatttgaaggtaaaga
 aagcttcagg

Exon 9

gggtgccatttaaatcctatcaaataactcattgaccagttcactgaatatgtgttcgttttcttcagTGCTATTTCTTC
 ACAATCGAGTTTGGCCTTTG
 CAAGCAAGAAGGGCAACTGCGGGCTTATGGAGCAGGACTCCTTTCCCTCCATTG
 GAGAATTAAGGtatgaagc
 tgtgaatgaaaatacccttcccatgcaaactgggt

Exon 10/11

gtgatgtcatggagcttcggaagtctcattacagagtttaacaggttttgtggatattttgcagCACGCCCTTTCT
 GACAAGGCATGTGTGAAAGC
 CTTTGACCCAAAGACAACCTTGCTTACAGGAATGCCTTATCACCACCTTCCAGGAA
 GCCTACTTTGTTTCA
 GAAAGTTTTGAAGAAGCCAAAGAAAAGATGAGGaaacttttttctcctagctagagaaaataa
 cttttattttctgtctctattccttctttat
 ctatccctcgtaccaatgaggggtgatcacatctcttctactctgtttattctgcaggGACTTTGCAAAGTCAAT
 TACCCGTCCCTTCTCAGTA
 TACTTCAATCCCTACACACAGAGTATTGAAATTCTGAAAGACACCAGAAGTATTG
 AAAATGTGGTGCAGG
 ACCTTCGCAGCGACTTGAATACAGTGTGTGATGCTTTAAACAAAATGAACCAATA
 TCTGGGGATT TG
 CCTGGA ACTATGTTGTTGCCAGCATGATCTTTTTGGGGCTTAGCAGCAGTTCAG
 TC

Seqüência de exons em letras maiúsculas, seqüência de introns em letras minúsculas.

Adaptado de :Breidenthal et al. Psychiatric Genetics 2004, 14:69-72.

ANEXO 2:

EXON 11 DA TPH2 COM RESPECTIVOS INICIADORES F E R:

aaacttttttctcctagctagagaaaataactttttttttctgtctctattccttcttttatctatccctcgtaccaatgaggggtgatcacat
ctctttctacttctgtttattctgcaggGACTTTGCAAAGTCAATTACCCGTCCCTTCTCAGTATACTT
CAATCCCTACACACAGAGTATTGAAATTCTGAAAGACACCAGAAGTATTGAAAAT
GTGGTGCAGGACCTTCGCAGCGACTTGAATACAGTGTGTGATGCTTTAAACAAAA
TGAACCAATATCTGGGGATTTGCCTGGA ACTATGTTGTTGCCAGCATGATCTTTT
GGGGCTTAGCAGCAGTTCAGTC

Intron em letras minúsculas, exon em letras maiúsculas. Regiões dos iniciadores em vermelho.

Adaptado de: Breidenthal et al. *Psychiatric Genetics* 2004, **14**:69-72.

ANEXO 3:**SOLUÇÕES UTILIZADAS NA REAÇÃO DE PCR:****Tampão de incubação IB:**

- 50mM KCl
- 10mM Tris cloridrato pH 8,4,
- 0,1% Triton X-100,
- 1,5mM de MgCl₂.

Solução de dNTP:

- | | |
|----------------|--------|
| • dATP 100 mM | 10 µl |
| • dCTP 100 mM | 10 µl |
| • dGTP 100 mM | 10 µl |
| • dTTP 100 mM | 10 µl |
| • água estéril | 760 µl |

ANEXO 4:
SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA:

Solução de Acrilamida /Bisacrilamida 30%

| | |
|-----------------------|--------|
| Acrilamida | 29 g |
| Bisacrilamida | 1g |
| Água destilada q.s.p. | 100 ml |

Tampão TBE 10 x pH 8,3

| | |
|-----------------------------|---------|
| Tris base | 60,50 g |
| Ácido bórico | 30,85 g |
| EDTA dissódico bi-hidratado | 3,72 g |
| Água destilada q.s.p. | 1000 ml |

Gel de poliacrilamida a 6,5%

| | |
|---|----------|
| Solução de Acrilamida/Bisacrilamida 30% | 1,079 ml |
| TBE 10x | 0,65 ml |
| Água destilada | 3,22 ml |
| Persulfato de amônio 10% | 40 µl |
| TEMED | 4 µl |

Tampão TBE 1x

| | |
|-----------------------|--------|
| TBE 10 x | 10 ml |
| Água destilada q.s.p. | 100 ml |

Tampão de amostra (*Gel loading buffer*)

| | |
|-----------------------|--------|
| Azul de bromoferol | 0.25% |
| Xileno cianol | 0,25% |
| Glicerol | 30% |
| Água destilada q.s.p. | 100 ml |

ANEXO 5:
SOLUÇÕES UTILIZADAS NA COLORAÇÃO PELA PRATA:

Solução de prata (estoque)

| | |
|------------------|---------|
| Nitrato de prata | 20,38 g |
| Água destilada | 100 ml |

Solução de prata (uso)

| | |
|--------------------|--------|
| Solução do estoque | 10 ml |
| Água destilada qsp | 100 ml |
| Formaldeído 37% | 150 µl |

Revelador

| | |
|------------------------------|--------|
| Carbonato de sódio | 2,97 g |
| Água destilada qsp | 100 ml |
| Formaldeído 37% | 150 µl |
| Tiosulfato de sódio 10 mg/ml | 40 µl |

Deve ser utilizado quando em temperatura entre 10°C e 18°C.

Solução fixadora

| | |
|-----------------------|---------|
| Ácido acético glacial | 100 ml |
| Água destilada qsp | 1000 ml |

Solução de Tiosulfato de sódio

| | |
|---------------------|-------|
| Tiosulfato de sódio | 10 mg |
| Água destilada | 1 ml |

ANEXO 6:
SOLUÇÕES UTILIZADAS NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO:

Solução de *terminator ready reaction mix*:

- “A-Dye Terminator, marcado com dicloro [R6G]”
- “C-Dye Terminator, marcado com dicloro [ROX]”
- “G-Dye Terminator, marcado com dicloro [R110]”
- “T-Dye Terminator, marcado com dicloro [TAMPRA]”
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- AmpliTaq DNA polimerase
- MgCl₂,
- Pirofosfatos termo-estáveis e
- tampão tris-HCL pH: 9,0

Soluções de precipitação:

400 mM de tris-HCl pH9.0 + 10 mM de MgCl₂
ABI PRISM 310 Genetic analyser Buffer with EDTA
Template Supression Reagent (TSR)
Álcool isopropílico 75%
Etanol 70%



ANEXO 7:

Genotyping of the G1463A (Arg441His) TPH2 polymorphism in a geriatric population of patients with major depression:

Genotyping of the G1463A (Arg441His) TPH2 polymorphism in a geriatric population of patients with major depression

Molecular Psychiatry (2006) 11, 799 - 800.
doi:10.1038/sj.mp.4001861

Tryptophan hydroxylase (TPH) is a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of 5-HT with two isoforms. TPH1 is mainly expressed in peripheral tissues whereas TPH2 is preferentially expressed in the brain serotonergic neurons from the raphe nuclei. Therefore, molecular alterations of the TPH2 gene (chromosome 12q15) have been proposed as a candidate gene associated with many behavioral phenomena including mood disorders, suicide, personality traits and substance abuse.

Recently, Zhang et al.^{1,2} identified a functional (G1463A) single-nucleotide polymorphism (SNP) in the TPH2 gene. This alteration results in substitution of a highly conserved arginine residue at position

441 by a histidine (Arg441His). They demonstrated that the levels of 5-HT were 80% lower in PC-12 cells expressing the Arg441His mutant, indicating a severe loss of the mutant's enzyme function to synthesize 5-HT. They also described nine subjects carrying this functional SNP in a cohort of 87 unipolar major depression patients, all over the age of 60 years and from multiple ethnic groups.

More recently, Blakely et al.³ pointed out that several groups did not find the variant described by Zhang et al.² after studying nearly 5000 patients.⁴⁻⁶ To add to this puzzle, DNA from the patients with the G1463A polymorphism were kindly made available by Dr Caron's lab to those groups who confirmed the presence of that SNP. However, these data suggest an association of the G1463A variant with severe depression that is refractory to conventional medication, necessitating electrical convulsive therapy (ECT).^{2,7} Moreover, the elderly nature of the cohort raises the possibility that these traits could be related to late onset depression.

Based on these findings, and considering that replication of genotyping data in populations with ethnically heterogeneous background is essential for the understanding of the importance of the initial report, we investigated exon 11 of the TPH2 gene in samples of patients from a Geriatric Reference Center in Belo Horizonte, Brazil. Our cohort comprised 102 patients (87 females, 15 males, age 62-94 years, the mean age at inclusion was 77.3 years), from many ethnic backgrounds, with the diagnosis of late onset major depression according to the Diagnostic and Statistical Manual-IV and the Geriatric Depression Scale, some of them with severe depression. We also analyzed environmental factors frequently related to depression diagnosis like death, socioeconomic problems, concurrent diseases, physical disabilities, caregiver stress and institutionalization. There were 57 subjects in our control group (34 females, 23 males, all 60 years-old or older, the mean age at inclusion was 67.9 years), without personal or familial history of psychiatric disorders. This study was approved by the local Ethics Committee and all subjects signed an informed consent. After DNA extraction (two independent extractions), exon 11 of the TPH2 gene was amplified by PCR (primers available on request) and directly sequenced (in duplicate, both forward and reverse directions) in an ABI 310 automatic sequencer. We did not find the A-allele (His441) in any of the 102 patients or in the controls. Therefore, our data support the notion that this rare TPH2 variant is also not a major determinant of genetic risk for depression in geriatric patients. The high frequency of the minor allele previously found in a geriatric sample² might be the result of population stratification. However, considering the failure to replicate their findings in a large independent sample (over 5000 subjects from different populations)⁴⁻⁶ and the frequency of the observation of the His441 variant in the initial sample, including a few homozygotes,² possible technical artefacts, other than genotype readings cannot be ruled out.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq-Brazil.

MA Bicalho¹, GJ Pimenta¹, FS Neves¹, H Correa²,
EN de Moraes³, L De Marco¹ and
MA Romano-Silva¹ *Department of Pharmacology,
Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte-MG, Brazil;* ²*Department of Mental
Health, Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte-MG, Brazil and* ³*Department of
Clinical Medicine, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil*
E-mail: romano-silva@ufmg.br

References

- Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. *Science* 2004; 305: 217.
- Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB et al. *Neuron* 2005a; 45: 11-16.
- Blakely RD. *Neuron* 2005; 48: 701-702.
- Glatt CE, Carlson E, Taylor TR, Risch N, Reus VI, Schaefer CA. *Neuron* 2005; 48: 704-705.
- Van Den Bogaert A, De Zutter S, Heyrman L, Mendlewicz J, Adolfsson R, Van Broeckhoven C et al. *Neuron* 2005; 48: 704.
- Zhou Z, Peters EJ, Hamilton SP, McMahon F, Thomas C, McGrath PJ et al. *Neuron* 2005; 48: 702-703.
- Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB et al. *Neuron* 2005b; 48: 705-706.

Reduced brain leptin in patients with major depressive disorder and in suicide victims

Molecular Psychiatry (2006) 11, 800 - 801.
doi:10.1038/sj.mp.4001862

The aetiology of major depressive disorder (MDD) has been linked, variously, to brain monoaminergic neuronal dysfunction, alterations in monoamine receptor sensitivity and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In an effort to unify these observations, Duman et al.¹ recently proposed the neurotrophic hypothesis of depression. Duman posits that vulnerability to depression induced by stress-induced activation of the HPA-axis and the therapeutic action of antidepressant treatments are both due to intracellular mechanisms that decrease or increase, respectively, neurotrophic factors necessary for the survival and function of particular neurons.¹ While most attention has focused on brain-derived neurotrophic factor, in an elegant study, leptin was recently demonstrated to act as a neurotrophic factor in the mouse hypothalamus,

rapidly influencing neuronal arborisation.² With this as a basis, and given that we have previously demonstrated leptin production by the brain in healthy subjects,^{3,4} we hypothesised that patients with MDD, controlled for gender, age and obesity, would exhibit a reduction in brain leptin production.

Twenty patients (8 males/12 females, aged 45.73 years, body mass index (BMI) 27.71) fulfilling the DSM-IV diagnostic criteria for MDD and 20 healthy subjects (10 males/10 females, aged 40.72 years, BMI 26.71) were recruited following local media advertisement. Patients with depression were either newly diagnosed or currently untreated after a recent relapse. Following initial telephone screening, patients were interviewed by a psychiatrist utilising a structured clinical interview (Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI)). Hamilton Depression Scale (17 item) and Beck Depression Inventory (BDI-1) were used to monitor severity. Eligibility for entry was determined by HamD > 18, BDI > 18, positive for major depression on MINI and assessed as having a significant major depression as the primary illness on interview by a psychiatrist. Patients with comorbid panic or anxiety disorders were included in the study if the primary diagnosis was depression and any panic/anxiety was secondary to their depression. All participants had a general medical review and examination by a medical practitioner to exclude any previously undiagnosed medical conditions. Exclusion criteria included coexistent physical illness and comorbid psychotic disorders, eating disorders, mental retardation, high suicide risk, cluster borderline personality disorders and epilepsy. The research protocol conformed to the relevant guidelines of the National Health and Medical Research Council of Australia and was approved by the Alfred Hospital Ethics Review Committee. Written informed consent was obtained from each subject prior to the study. The process of consent, to which an honest, open, and explicit patient information sheet was central, preserved the autonomy of the participants. Healthy volunteers were paid a nominal amount of US\$75 for their participation. Following the study patients with MDD were referred to a psychiatrist for clinical management.

Blood samples were obtained simultaneously from the right internal jugular vein and brachial artery using percutaneously placed catheters as previously described.⁵ Data are expressed as mean \pm s.e.m. For comparing data between patients and healthy subjects, Student's t-test or the Mann-Whitney test were used as appropriate. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Brain leptin mRNA expression was determined from biopsy material obtained at autopsy from 10 subjects (age: 46.75; BMI: 26.71) at the Victorian Institute of Forensic Medicine (VIFM). The informed consent of the donor's next-of-kin was obtained before the autopsy and the VIFM Ethics Review Committee