Patrícia de Araújo Pereira

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE TRIPTOFANO HIDROXILASE 2 E A DEPRESSÃO DE INÍCIO TARDIO

Orientadora: Prof[a]. Dra. Débora Marques de Miranda

Coorientação: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano Silva

Belo Horizonte

UFMG

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Patrícia de Araújo Pereira

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE TRIPTOFANO HIDROXILASE 2 E A DEPRESSÃO DE INÍCIO TARDIO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau mestre

Orientação: Prof[a]. Dra. Débora Marques de Miranda

Coorientação: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano-Silva

Belo Horizonte

2010

SUMÁRIO

Sumário.....iii

Agradecimentos.....v

Lista de figuras.....vii

Lista de tabelas.....viii

Abreviaturas.....ix

Resumo.....1

Resumo em inglês.....3

1. Introdução

1.1 Epidemiologia da depressão.....5

1. 2 Depressão no idoso.....6

1. 3 Depressão de início tardio.....7

1.4 Etiologia da depressão.....8

1.5 Característica clínica, diagnóstico e tratamento.....10

1.6 Sistema serotoninérgico e depressão.....11

1.7 Gene *TPH2*.....14

2. Objetivos

2. 1 Objetivo geral.....21

2. 2 Objetivos específicos.....21

3. Materiais e métodos

3.1

Pacientes.....23

3.2 Polimorfismos estudados.....24

3.3 Genotipagem.....24

3.4 Análise.....26

4. Resultados.....27

5. Discussão.....34

6. Referências bibliográficas.....38

7. Anexos

Anexo 7.1 Questionário dos pacientes.....49

Anexo 7.2 Protocolo de extração de DNA de sangue.....52

Anexo 7.3 Sondas.....56

Anexo 7.4 Artigo.....57

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marlene e Hélbio, pelo apoio, amor e educação.

À Tia Marisa e Tia Marilda (in memóriam) pelo incentivo.

À minha Orientadora e mãe científica, Débora Marques de Miranda, pela dedicação, carinho e disponibilidade. Tenho certeza de que muitas “Patrícias” passarão sobre sua orientação, mas não sei se terei o privilégio de outra Débora em minha vida profissional. Muito Obrigada.

Ao Professor Marco Aurélio Romano Silva pela oportunidade, receptividade e por ter propiciado condições para realização deste trabalho.

Ao Professor Luiz Armando de Marco pelo estímulo e apoio, ele teve um papel importante neste mestrado.

À Cidinha, pelo incentivo, amizade e colaboração desde o início.

Aos Colegas do Centro de Referência do Idoso.

Aos membros de laboratório, Marcus Gómez, Humberto Correa, Vânia Prado e Wolfanga que tiveram um papel importante na minha formação.

Aos meus amigos e amigas do “Lab” que sempre estiveram ao meu lado, Karenzinha, Magno (Meu rei), Vitico, Mone, Kel, Bruno Pentelho e Erika.

Aos meus colegas de laboratório.

Aos amigos de fora do mundo científico.

A todos os idosos sadios ou doentes que colaboraram com este estudo e que tiveram fundamental importância.

À banca examinadora.

Obrigada!

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Medicina Molecular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molécular da serotonina.....12

Figura 2. Esquema representativo dos receptores, transportadores, enzimas que degradam e sintetizam a serotonina.....13

Figura 3. Síntese da Serotonina.....16

Figura 4. Mecanismo de ação das enzimas TPH1 e TPH2.....17

Figura 5. Gráfico de plotagem do PCR Real Time.....25

Figura 6. Desequilíbro de ligação dos tagSNPs do gene *TPH2* utilizados na pesquisa obtidos pelo programa Haploview 4.1.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das oito sondas utilizadas para detectar os tagSNP do gene *TPH2* nos participantes do estudo.....28

Tabela 2. Distribuição alélica dos tagSNPs do gene *TPH2* - Unphased 3.0.13 Dudbridge F (2008).....29

Tabela 3. Distribuição genotípica dos tagSNPs do gene TPH2 – Unphased 3.0.13 Dudbridge F (2008).....30

Tabela 4. Distribuição haplotípica por permutação – Unphased 3.0.13 Dudbridge F (2008).....33

ABREVIATURAS

DSM-IV – Manual de diagnóstico e estatística de transtornos mentais da Sociadade Americana de Psiquatria – Quarta Edição (American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition)

TPH1 – gene da Triptofano hidroxilase – 1

TPH2 – gene da Triptofano hidroxilase – 2

TH – Tirosina hidroxilase

Tph – proteína triptofano hidroxilase

PCR - reação em cadeia da polimerase

SNP - polimorfismo de único nucleotídeo

SERT - transportador de serotonina

5-HTT – transportador de serotonina

SNC – sistema nervoso central

Pro206Ser – substituição de um resíduo de Prolina por um resíduo de Serina na posição 206

G1463A – substituição de um resíduo de Guanina por um resíduo de Alanina no códon 1463

Arg441His – substituição de um resíduo de Arginina por um resíduo de Histidina na posição 441

MEEM - Mini Exame do Estado Mental

OR – Odds Ratio

IC - intervalo de confiança

rs – número de referência do SNP

DIT – Depressão de início tardio

FAM – 6-carboxifluoresceína

HEX – hexacloro-6-carboxifluoresceína

ISRS – inibidor seletivo de recaptação de serotonina

Resumo

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas com uma das maiores prevalências na população em geral, atingindo cerca de 20% dos indivíduos ao longo da vida. A sua alta prevalência associada com mudanças signigicativas no comportamento acarreta em um importante prejuízo socio-econômico e individual. Quando o primeiro episódio atinge indivíduos com mais de 60 anos é considerada depressão de início tardio (DIT). A população acima desta faixa etária tem aumentado significativamente no Brasil e estima-se que alcance, no ano de 2025, cerca de 32 milhões de idosos. Várias linhas de pesquisas sugerem que a depressão está associada com alterações do sistema serotoninérgico. Nesta via, os genes envolvidos na síntese, transporte e degradação de serotonina têm recebido especial atenção nos estudos que tentam desvendar as bases genéticas da depressão. A enzima triptofano hidroxilase-2 (Tph2) está envolvida na biosíntese de serotonina no cérebro e polimorfismos no gene *TPH2* podem promover alterações na síntese deste neurotransmissor. Apesar de algumas variantes genéticas do *TPH2* já estarem associadas à diversas doenças psiquiátricas, em especial à depressão maior e suicídio, poucos estudos investigaram a associação de polimorfismos deste gene e a susceptibilidade à depressão de início tardio. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar se existe associação entre um ou mais polimorfismos do *TPH2* e a DIT em uma população idosa do município de Belo Horizonte. Foram convocados 84 pacientes idosos com DIT e 79 idosos não portadores de nenhum distúrbio psiquiátrico atendidos no Centro de Referência do Idoso Professor Caio Benjamin Dias do Estado de Minas Gerais. Para a

genotipagem foram selecionados previamente oito tagSNPs do *TPH2*, os quais foram identificados através do método de PCR em tempo real TaqMan seguindo o protocolo do fabricante. Nossos resultados mostraram uma associação genotípica entre dois tagSNPs do gene *TPH2, rs4565946* e *rs11179000,* e a depressão de início tardio. Para o tagSNP *rs11179000* foi observado maior risco para o desenvolvimento de depressão de início tardio para indivíduos portando o alelo ancestral. Nossos resultados reforçam a hipótese neurobiológica do envolvimento do sistema serotoninérgico na etiopatogênese da depressão de início tardio.

Abstract

Major depression is one of the most common psychiatric disorders, and in elderly its prevalence impact in terms of high rates of suicide and worst prognosis in comorbidities. Major depression that happens after 60 years is considered late-onset depression. The population above this age has increased significantly in Brazil, and it is estimated that in 2025 will reach approximately 32 million elderly. Many studies suggest that early-onset depression and late-onset depression have many different clinical and also genetic aspects. Some tryptophan hydroxylase type II gene (*TPH2*) variants have been associated with many psychiatric disorders in special with the major depression. TPH2 is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of serotonin. Polymorphisms in *TPH2* might promote changes in brain serotonin synthesis. Thus, we aimed to investigate the frequencies of *TPH2* polymorphisms in a group of elderly patients with late-onset depression in a brazilian population and whether these frequencies are associated with depressive events. Here, we genotyped eight tagSNPs from the gene *TPH2* in 84 samples with late-onset depression and 79 controls. Genotyping was performed using TaqMan *Real Time* PCR. Unphased 3.0.13 program was used for genetic association. Overall, we identified an association between tagSNPs *rs4565946 (C/T)* and *rs11179000(A/A)* and late-onset depression. For allelic association of tagSNP *rs11179000* we observed a strong association of allele A and risk of late-onset depression. Our findings suggest the involvement of genetic variants in the *TPH2* gene in the etiology of late onset depression in brazilian population.

I.INTRODUÇÃO

I.I Epidemiologia da Depressão

A depressão é um importante problema de saúde pública que está associada com a alta morbidade e mortalidade, atingindo todas as faixas etárias com alta prevalência e acarretando sérias repercussões sociais e individuais (Hamet, 2005). Estudos epidemiológicos conduzidos recentemente têm proporcionado uma compreensão mais ampla da ocorrência e do curso de transtornos depressivos. Além disso permitem a caracterização de fatores relacionados com curso clínico da doença, particularmente aqueles ligados ao prejuízo individual, familiar e social, os quais se associam de forma clara e consistente com transtornos depressivos (Kessler e cols., 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão maior é a quarta causa de incapacidade em todo o mundo e será a segunda causa até o ano de 2020 (Murray & Lopez, 1996).

Estima-se que a depressão atinja 20% da população mundial (Gillespie, 2005), ou seja, espera-se que uma a cada cinco pessoas terão diagnóstico de depressão em algum momento de suas vidas (Kessler, 2003). Mundialmente, entre a população acometida por depressão estima-se uma proporção de cinco mulheres acometidas para cada dois homens, sugerindo uma influência de gênero na depressão (Wong e Licinio, 2001). No Brasil, no estado da Bahia, Aguiar e Dunningham relataram prevalência semelhante a 15% de sintomas depressivos em idosos na comunidade. Nos Estados Unidos a prevalência estimada de depressão ao longo da vida é de 21% nas mulheres e 12% nos homens (Blazer, 1994).

I.II Depressão em Idoso

A população acima dos 60 anos de idade tem aumentado significativamente no Brasil. Em 1980, havia sete milhões de pessoas idosas; atualmente a população idosa é de aproximadamente 20 milhões, correspondendo a 10,5 % da população total (IBGE-Pesquisa Nacional de Amostras de Domicílio, 2008). A expectativa de vida do brasileiro atualmente é de aproximadamente 72,86 anos, sendo de 76,71 para as mulheres e de 69,11 para os homens (IBGE-2008). Estima-se que, para o ano 2025, haverá, em nosso país, cerca de 32 milhões de idosos (Tamai, 1999).

O crescimento da população idosa está associado a um aumento da prevalência de doenças crônico-degenerativas, entre elas aquelas que comprometem o funcionamento do sistema nervoso central, como as doenças psiquiátricas, particularmente a depressão (Krishman e cols, 1995). A depressão piora a qualidade de vida e aumenta o risco de morte em especial nos idosos (Blazer e cols, 2001; Blazer, 2005).

A prevalência da depressão em idosos 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 (Stek cols, 2004).

Em um estudo sobre impacto das adversidades da vida entre pacientes idosos com depressão maior, pacientes com distimia e controles sadios foi observado que os pacientes com depressão maior apresentavam significativa dificuldade em lidar com o estresse (Devanand e cols. 2002).

Estudos mostram que pacientes idosos com depressão apresentam diferentes déficits comparados com os pacientes deprimidos mais jovens, mostrando que a depressão de início tardio pode estar relacionada a

comorbidades ligadas ao envelhecimento, como a isquemia cerebrovascular (Drevets, 2001). Depressão em idosos está associada com déficits neuropsicológicos em todos os domínios de funcionamento executivo, memória e velocidade de processamento. A natureza e extensão dos déficits são bastante heterogêneas (Hickie e cols, 2003).

I.III Depressão de Início Tardio

Depressão de início tardio difere das outras por acometer idosos após os 65 anos e, conceitualmente, estes não devem ter apresentado sintomas depressivos em fase anterior da vida. Esta doença está associada a incapacidade física, cognitiva e social e também a uma auto-negligência (Hickie 2003). Hickie e colaboradores (2001) relataram que idosos com depressão de início tardio estão mais suceptíveis a eventos vasculares, incluindo histórico de acidente vascular cerebral, embora esta conclusão não se confirme em alguns estudos (Brodaty e cols, 2001). Pesquisas relatam que idosos com depressão de início tardio apresentam, concomitantemente, comprometimento cognitivos ou desenvolvem demência (Schweitzer e cols 2002). O termo “depressão vascular” foi usado para explicar estes sintomas, mas foi logo substituido pelo termo “síndrome da disfunção executiva da depressão de início tardio” em idosos, para englobar disfunções que não podem ser exclusivamente causadas por doença vascular (Alexopoulos, 2005).

I.IV Etiologia da Depressão

Apesar da etiologia da depressão ainda não ser bem compreendida, um amplo espectro de fatores causais implicados no desenvolvimento deste transtorno já foram elucidados, particularmente os biológicos, psicológicos e sócio-culturais (Kalia, 2005).

Dentre os fatores biológicos, diversos estudos em genética epidemiológica tem mostrado que aproximadamente 40% a 50% da depressão é herdável (Fava e Kendler, 2000), e desta forma, reforçam a hipótese da influência genética para o transtorno depressivo. Apesar do enorme número de estudos que tentaram investigar o risco conferido de genes específicos na etiologia da depressão, poucos resultados foram conclusivos. Contudo, apesar de os efeitos individuais da variação genética serem relativamente pequenos, as interações entre genes e o meio ambiente podem contribuir significativamente para o desvendamento da vulnerabilidade à depressão (Castrén, 2005).

Pelo fato da intervenção farmacológica na depressão estar baseada na regulação dos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos, disseminou-se a idéia de que a depressão seria decorrente de um déficit desses neurotransmissores. Desta forma, foi difundida a hipótese de que possa haver uma alteração funcional que envolva alguns neurotransmissores (hipótese monoaminérgica). Neste sentido, estudos recentes tem direcionado o foco para a elucidação de como a alteração genética pode predispor à depressão, particularmente no impacto de alterações de genes relacionados com a neurotransmissão (Wurtman, 2005). Uma vez que várias etapas deste processo podem ser afetadas, envolvendo genes diferentes, é possível que variações genéticas individuais produzam um efeito fraco, porém aditivo no desenvolvimento da depressão.

Apesar de evidências recentes mostrarem uma maior influência genética na etiologia de diversos transtornos psiquiátricos, um amplo espectro de outros fatores de risco tem se associado de maneira significativa no transtorno depressivo dentre eles inclui-se: estresse, doenças vasculares, hospitalização, traumas emocionais e infecções virais (Akiskal, 2000; Nestler e cols., 2002).

Estudos apoiam-se em evidências de que alguns fatores estressores são os responsáveis por desencadear uma resposta fisiológica do sistema hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) de forma a regular fisiologicamente o organismo (Claes, 2009). O hipotálamo produz o fator liberador de corticotropina (CRF) que estimula a produção de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, determinando assim, a síntese e liberação de glicocorticóides pelas glândulas supra-renais (Claes, 2009). Os glicocorticóides, especificamente cortisol em humanos, modulam a sobrevivência neuronal, neurogênese, aquisição de novas memórias e regulam a resposta a eventos emocionais (Herbert, 2006). O cortisol liberado exerce um *feedback* negativo no hipocampo e hipotálamo, reduzindo o nível de cortisol para manter o equilíbrio do sistema (Herbert, 2006). Muitos pacientes com episódios depressivos graves apresentam alteração na secreção do cortisol, com níveis séricos significativamente maiores do que em indivíduos normais (Nemeroff, 2005). Uma disfunção do "*feedback"* negativo, que consiste na regulação negativa da secreção de cortisol, parece ser responsável pela hipercortisolemia. Os níveis usualmente retornam ao normal com a remissão do quadro depressivo, sugerindo que a hipercortisolemia pode ter um papel central na depressão.

I.V Características clínicas, diagnóstico e tratamento

Segundo o Manual Diagnóstivo e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), os sintomas básicos de um episódio depressivo maior são os mesmos em adultos, adolescentes e crianças, embora existam dados sugerindo que a predominância de sintomas característicos pode mudar com a idade. Já a Classificação Internacional das Doenças (CID-10) lida com os transtornos depressivos de forma idêntica em todos os grupos etários.

Os sintomas clínicos que caracterizam a depressão são humor deprimido ou irritável, interesse ou prazer acentuadamente diminuídos, sentimento de culpa, fracasso e perda de energia. Outros sintomas, como distúrbios na alimentação e sono, pessimismo, auto-estima baixa, tendência ao suicídio também podem estar presentes (DSM-IV).

A depressão é diagnosticada com base em avaliação clínica dos sintomas e segue os critérios do DSM-IV (anexo 1). Um diagnóstico de depressão é feito com base nas respostas obtidas diante dos questionários (MINI-PLUS e GDS-15) e pela presença de sintomas por mais de duas semanas. Além disso, a depressão é classificada nos seguintes tipos: Depressão Menor, Distimia e Depressão Maior, podendo ser classificada em subtipos como depressão de início precoce e depressão de início tardio (Wong & Licinio, 2001).

O enfoque farmacológico revolucionou o tratamento dos transtornos depressivos e afetou o curso dos transtornos de humor, além de reduzir os custos impostos à sociedade. Os principais fármacos usados no tratamento da depressão (antidepressivos) partilham a capacidade de inibir a captação neuronal de monoaminas. Entre eles, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) aumentam a concentração extracelular do neurotransmissor serotonina ao inibir a sua recaptação pelo neurônio pré-sináptico, aumentando

o nível de serotonina disponível para se ligar ao receptor pós-sináptico. A deficiência desta via de neurotransmissores poderia ser resultante de vários mecanismos, tais como a redução da síntese de monoaminas ou aumento da degradação de neurotransmissores, alteração da função dos receptores e alteração dos sistemas de sinalização ativados pelos receptores pós-sinápticos (Hensler, 2003; Blier e Ward, 2003).

I.VI Sistema Serotoninérgico e Depressão

A serotonina (5-HT) (Fig.1) é um dos mais antigos neurotransmissores na escala evolutiva e estima-se ter surgido a 700–800Mi de anos em células eucariontes. Os receptores de 5-HT são encontrados em várias espécies como planárias, *Ceanoharbitids elegans*, drosofila, camundongos e homem (Hannon, 2008; Hoyer, 2002).

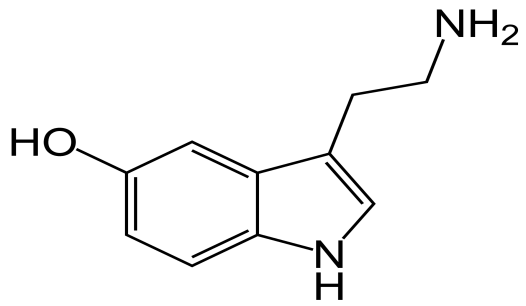


Figura1. Molécula Serotonina (http://pt.wikipedia.org/wiki/Serotonina 2010)

A serotonina foi identificada no cérebro por volta dos anos de 1950 (Twarog, 1953) e estudos posteriores mostraram que sua síntese ocorre nos corpos celulares de poucos neurônios localizados no Núcleo da Rafe, estrutura integrante do tronco cerebral, cujas projeções alcançam as estruturas corticais, subcorticais (amígdala, hipocampo, hipotálamo, dentre outras) e a medula.

Atualmente conhecidos como neuronios serotoninérgicos, estes terminais fazem sinapse com neurônios alvos e liberam serotonina após estimulação nervosa (Gaspar e cols, 2003).

De forma simplificada e clássica, o funcionamento da neurotransmissão serotoninérgica depende de três processos: (1) síntese e degradação da serotonina, na qual as funções chave são feitas pelas enzimas triptofano hidroxilase (TPH) e monoamina oxidase A (MAOA), respectivamente; (2) recaptação da serotonina sináptica, mediada pelos transportadores, e (3) ligação aos receptores de serotonina (Popova, 2006), mostrado na figura 2.

No corpo celular, a serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano adquirido via alimentação, processo esse que envolve duas enzimas, triptofano hidroxilase-1 e triptofano hidroxilase-2 (Walther, 2003). Com a chegada do sinal estimulatório, a serotonina é transportada em vesículas e liberada a partir do influxo de Ca^{+2}, íon que estimula a fusão da membrana vesicular com a membrana plasmática e que permite a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica.

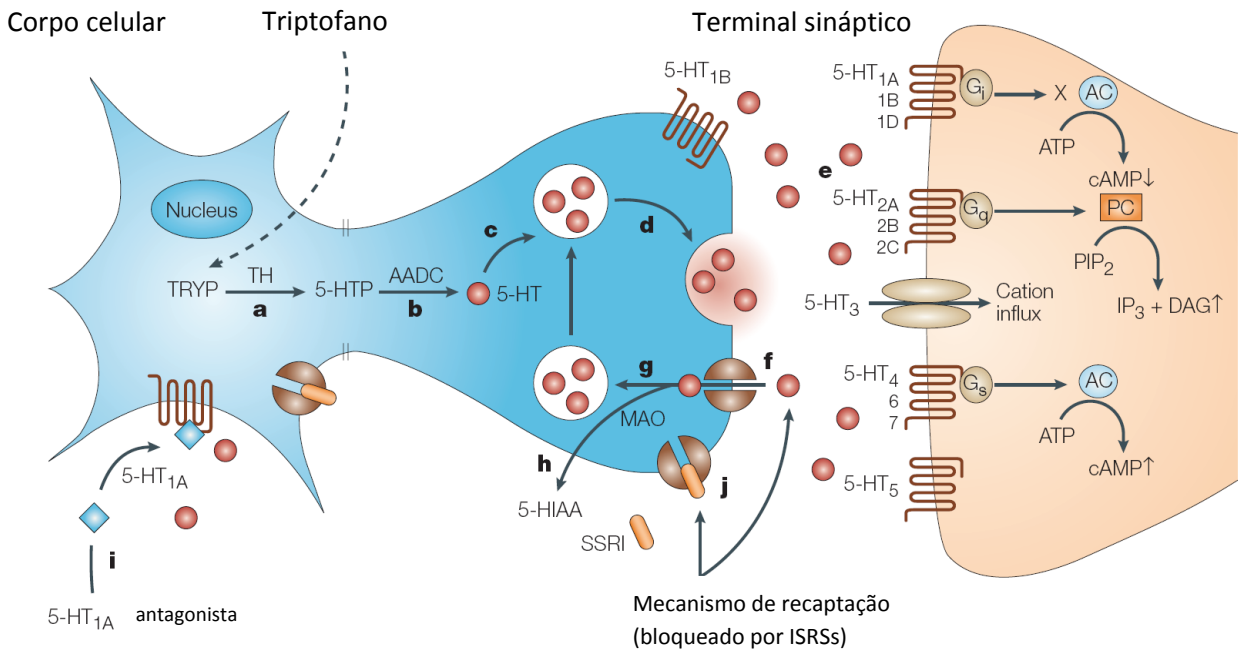


Figura 2. Esquem ntativo dos re ores, enzimas que degradam e s a serotonina – Wong e cols., 2005.

Estudos em animais demonstraram que diferentes receptores de serotonina, agindo em diferentes estágios do desenvolvimento neuronal, modulam diferentes processos como neurogênese, apoptose, ramificações axonais e dendritogênese (Gaspar e cols, 2003). Com exceção do receptor 5-HT3 que é ionotrópico, os outros receptores são metabotrópicos. No total estima-se que existam 14 receptores para a serotonina, tornando esta família de receptores muito complexa (Hoyer, 2002, Hensler, 2003). Os receptores serotoninérgicos ligados a proteína G desencadeiam uma cascata de sinalização, que pode ser tanto inibitória quanto estimulatória e promovem a resposta celular através de enzimas alvo tal como a fosfolipase C (PLC) e adenilato ciclase.

O sistema serotoninérgico chamou a atenção dos pesquisadores pela observação de que medicamentos que atuavam neste sistema funcionavam como bons antidepressivos. A associação do déficit de serotonina no cérebro com a depressão, com o argumento de que os ISRS atuam sobre esse neurotransmissor, consistiu de uma das principais hipóteses que relaciona a serotonina como um fator causal da depressão. Já que a serotonina influencia diversos espectros de funções cerebrais, como o controle do comportamento, o sono, apetite, humor e cognição (Lucki, 1998), a desregulação do sistema serotoninérgico é implicada em vários transtornos psiquiátricos além da depressão maior (Zhang e cols, 2005), tais como o transtorno afetivo bipolar (Cichon, 2008), esquizofrenia e autismo.

Neste sentido, diversas investigações foram conduzidas no intuito de avaliar o impacto da desregulação do sistema serotoninérgico, sendo uma das alterações ligadas com a regulação da principal enzima na síntese da serotonina, a triptofano hidroxilase.

I.VII Gene *TPH2*

Vários genes candidatos têm sido investigados em estudo de associação com a depressão, sendo um deles o gene da enzima triptofano hidroxilase (*TPH*). Walther e cols., em 2003, organizaram um estudo para analisar o impacto fisiológico da diminuição da síntese de serotonina utilizando camundongos geneticamente deficientes de TPH (*Tph*-/-). Surpreendentemente, os camundongos apresentaram expressão de serotonina em regiões cerebrais. A partir desse estudo foi sugerido que uma segunda

isoforma de TPH seria expressa preferencialmente no cérebro. Walther e colaboradores propuseram um esquema que respresentasse a função da enzima triptofano hidroxilase-1 e triptofano hidroxilase-2 (Fig.3).

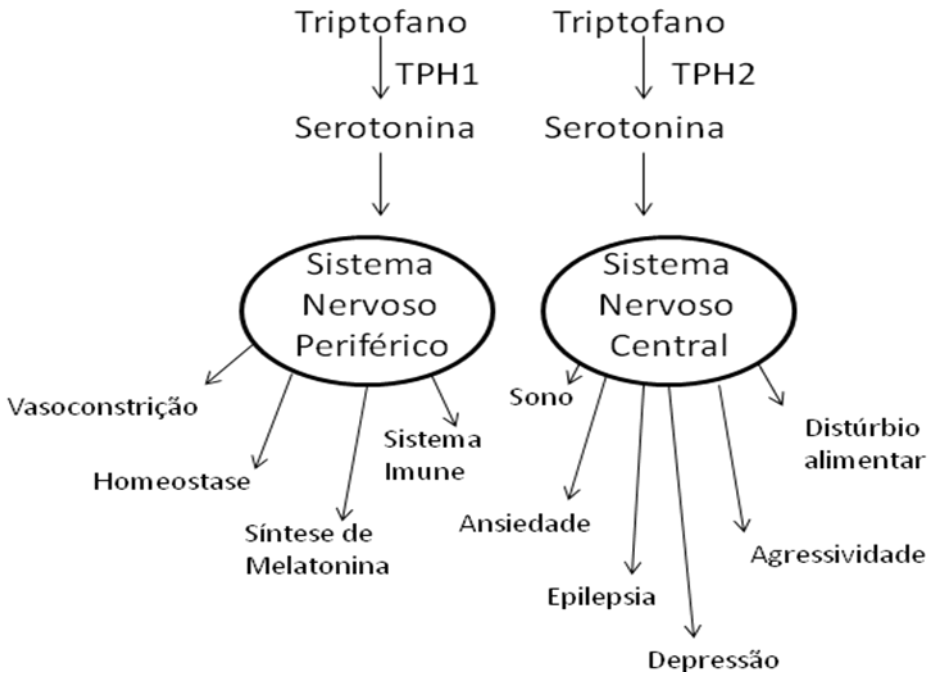


Figura 3. Efeito da enzima TPH1 e TPH2 no organismo – Walther e cols, 2003 (Modificado – Traduzido)

Como foi esperado, esta isoforma foi identificada e o grupo ainda demonstrou que esta enzima possui atividade triptofano hidroxilase e o gene que codifica essa enzima expressa-se preferencialmente no SNC. A partir de então, a isoforma expressa no cérebro ficou conhecida como TPH2, enquanto a expressa na periferia, como TPH1 (Cote e cols., 2003). Em virtude de a TPH2 mostrar-se predominantemente expressa nos neurônios serotoninérgicos originários do Núcleo da Rafe (Patel e cols., 2004), seu gene é um forte candidato para fenômenos comportamentais.

O gene do *TPH2* humano localiza-se no braço longo do cromossomo 12, possui 11 exons e 93.5 Kilobases (Zill, 2004). Este gene codifica a proteína Triptofano hidroxilase 2 (Tph2) que pertence a superfamília das hidroxilases aromáticas, incluindo a tirosina hidroxilase (TH) e a fenilalanina hidroxilase (PAH). A Tph2 é altamente homóloga com a Tph1, com 71% de homologia (Walther e cols., 2003). A Tph2 é uma enzima limitante na síntese do neurotransmissor serotonina no sistema nervoso central (SNC) (Walther e cols., 2003). Esta enzima catalisa a hidroxilação do triptofano em 5-hidroxitriptofano que será posteriormente descarboxilado para formação da serotonina. TPH usa Fe^{2+} como um cofator e o O_2 e o tetrahidrobiofterina (BH4) como co-substrato para hidroxilar o triptofano gerando 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (Fig. 4).

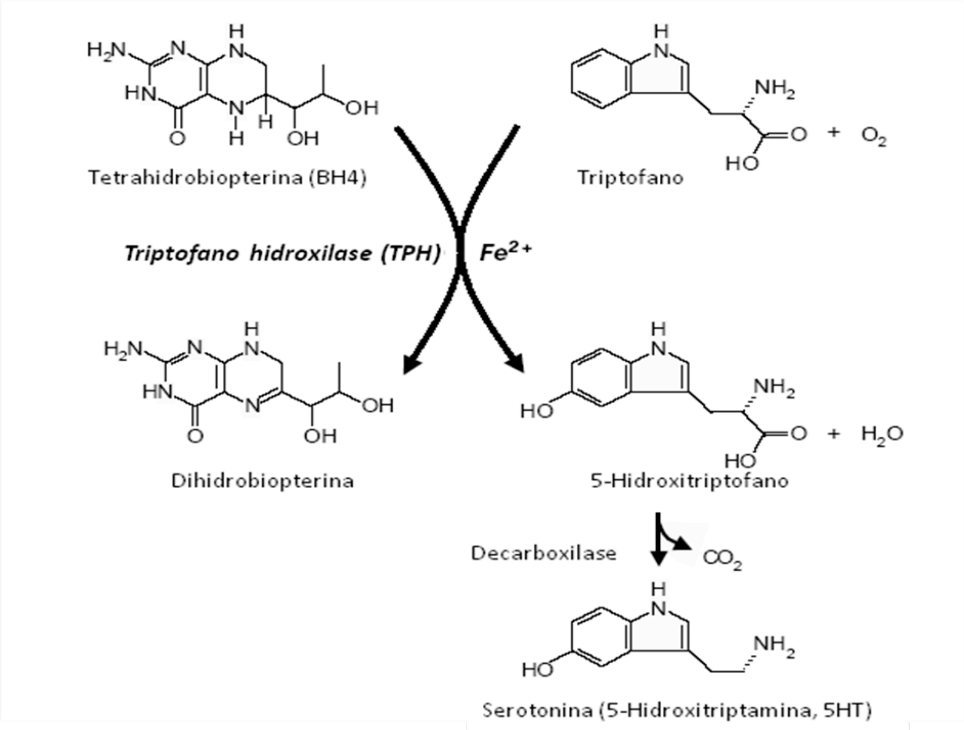


Figura 4. Síntese de serotonina pela enzima TPH – Esquema adaptado e traduzido de: Walther e cols., 2003

Vários estudos vêm tentando elucidar alterações genéticas que podem modificar a função e a regulação da Tph2 na depressão. Polimorfismos no gene *TPH2* foram associados com a redução dos níveis de serotonina no SNC, sugerindo que certos polimorfismos possuem a capacidade de alterar o funcionamento da via serotoninérgica (Zhang e cols, 2004). Anttila e cols., (2009) identificaram um polimorfismo no *TPH2* que pode estar envolvido com a resistência ao tratamento farmacológico da depressão. Em outro estudo, um polimorfismo intrônico (*rs17110690*) do *TPH2* foi associado a um grupo específico de pacientes com depressão que apresentam um alto risco de desenvolver síndrome metabólica (Kloiber, e cols. 2009). Outros achados sugerem a influência de polimorfismos intrônicos (*rs4448731 e rs4641527*) envolvidos na predisposição ao suicídio em pacientes com depressão maior (de Lara e cols., 2007). A identificação do polimorfismo G1463A, que troca o aminoácido Arg441His, resulta na redução da atividade da enzima (Zhang, 2005). Em um outro estudo, Walther e cols. observaram que o polimorfismo *rs11178997* na região promotora do gene *TPH2* apresenta significante redução da atividade transcricional, 22% e 7% em neurônios de cultura primária e em células SHP-77, respectivamente. Estes dados sugerem que este polimorfismo-*rs11178997*- altera a expressão gênica, podendo implicar em alterações no desenvolvimento e na função do sistema serotoninérgico no cérebro (Scheuch, 2007).

Os idosos possuem um perfil fisiológico distinto, sendo acometidos por patologias características dessa faixa etária, tornando-se crucial caracterizar esse grupo. Dentre as patologias, a depressão é um transtorno que provoca grande impacto socioeconômico, levando à incapacidade e sofrimento. Sua

causa é multifatorial: a predisposição genética somado à diversas influências ambientais são uma prerrogativa para o seu desenvolvimento. Uma vez que a via serotoninérgica é central na etiopatologia da doença, fatores genéticos ligados a esse sistema são fundamentais para seu correto funcionamento. Escolhemos, então, a Tph2 por ser uma enzima limitante na síntese da serotonina, intrinsicamente envolvida com o transtorno de humor. Estabelecemos nosso estudo de associação do gene *TPH2* e depressão de início tardio na tentativa de elucidar a participação de polimorfismos no desenvolvimento de eventos depressivos em uma amostra de pacientes idosos brasileiros.

II. OBJETIVOS

II.I OBJETIVO GERAL:

Avaliar a associação entre o gene *TPH2* e a depressão de início tardio em uma amostra da população idosa do município de Belo Horizonte.

II.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a distribuição de oito polimorfismos do gene *TPH2* em uma amostra de idosos do Centro de Referência do Idoso.
- Analisar a correlação entre genótipos, alelos e haplótipos do gene *TPH2* em idosos com depressão de início tardio.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.I Pacientes

Cento e sessenta e três indivíduos foram incluídos, sendo 84 pacientes com diagnóstico de depressão de início tardio (69 mulheres e 15 homens, com idade média de 79,2) e 79 indivíduos pertencentes ao grupo controle (55 mulheres e 24 homens, com idade média de 75,4). Todos os pacientes foram recrutados no Centro de Referência do Idoso de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. O grupo controle foi selecionado a partir de uma população brasileira com mais de 65 anos, sem história pessoal ou familiar – parentes de primeiro grau – de doenças neuropsiquiátricas. Todos os participantes assinaram o consentimento informado para participação neste estudo. A pesquisa foi aprovada pelo comite de ética da Universidade Federal de Minas Gerais. O diagnóstico de depressão foi feito com base nos critérios do DSM-IV, utilizando uma entrevista estruturada, MINI-PLUS e da Escala de Depressão Geriátrica (GDS) (Almeida & Almeida, 1998). Pacientes com diagnóstico de demência foram excluídos da amostra. Todos foram submetidos ao Mini Mental de Folstein (1975), adaptado por Brucki e colaboradores, 2003. Além disso, registros médicos de todos os pacientes com depressão foram revisados.

Os indivíduos pertencentes ao grupo controle foram cuidadosamente selecionados no mesmo centro de referência ou a partir do programa supervisionado de atividade física para idosos saudáveis na escola de educação física da Universidade Federal de Minas Gerais. Através de entrevistas, aqueles que não tinham história pessoal ou familiar (parentes de primeiro grau) de depressão, demência, transtorno do pânico, autismo, transtorno obsessivo-compulsivo, esquizofrenia e alcoolismo foram incluídos.

Foi aplicado também no grupo controle os mesmos testes dos pacientes diagnosticados com depressão de início tardio.

III.II Polimorfismos estudados

Os polimorfismos foram escolhidos através do Projeto Internacional HapMap (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/) e sondas de genotipagem adquiridas pela empresa de biotecnologia Applied Biosystems (anexo VII.III). Os marcadores utilizados são denominados TagSNPs porque são polimorfismos representativos de uma região do gene. Estudos de associação de genes com doenças vem sendo desenvolvidos com o objetivo de conseguir uma boa abrangência do gene. Um dos métodos utilizados é o baseado em haplótipo, o qual são selecionados polimorfismos representativos de um ou mais haplótipos.

III.III Genotipagem

O DNA genômico foi isolado de sangue total utilizando o método salino de Nürnberger Lahiri (1991). Foram selecionados oito tagSNPs que foram genotipados utilizando o kit TaqMan ® SNP Genotyping Ensaios (Applied Biosystems, E.U.A.). As sondas utilizadas correspondem aos seguintes SNPs: *rs4448731* (intergênica), *rs4565946* (intron 2), *rs11179000* (intron 4), *rs7955501* (intron 5), *rs10506645* (intron 7), *rs4760820* (intron 8), *rs1487275* (intron 8) e *rs10879357* (intron 8). Todos os polimorfismos foram escolhidos utilizando a base de dados Hapmap (www.hapmap.org) e 10% da totalidade das amostras foram genotipadas novamente para o controle de qualidade.

Genotipagem foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real - discriminação alélica (Strategene Mx3005 - MxPro QPCR-Software, 2007). O Protocolo de PCR seguiu as instruções de utilização da genotipagem TaqMan ® Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condição da PCR foi: 1 ciclo (10 min a 95 °C) e 50 ciclos (95 °C a 15 s, 60 °C 1 min). Protocolo: 3,5µl do Mix, 0,1µl de sonda, de 3,4µl de água deionizada e 1,0µl uma concentração de DNA 50ng/µl para um volume total de 8µl.

A análise dos dados foi feita conforme a disposição dada pelo equipamento que separa em grupos conforme a leitura da fluorescência. O resultado da discriminação alélica é representado por três grupos: um para homozigoto marcado com a fluorescência FAM, outro homozigoto marcado com a fluorescência HEX e um para o heterozigoto que possuirá as duas fluorescências. Os alelos marcados com a fluorescência variam conforme a sonda. O eixo y representa a fluorescência FAM e o eixo x representa a fluorescência Hex (Fig 5).

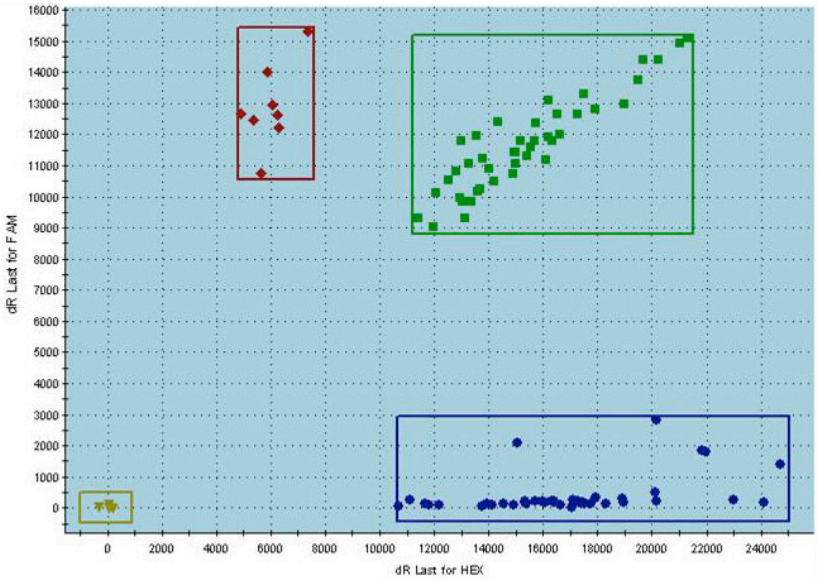


Figura 5. Exemplo de Gráfico do Real Time PCR – discriminação alélica

III.IV Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados após genotipagem para alelos isolados, genotípica, haplotípica e de 1000 permutações foram realizadas com o programa Unphased 3.0.13 (Dudbridge F., 2008). O programa Haploview 4.1 (www.broad.mit.edu/mpg/haploview/) foi utilizado para avaliar a abrangência do gene e sua representatividade através do desequilíbrio de ligação e o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O nível de significância considerado foi $p<0,05$.

IV. RESULTADOS

Foram genotipados 163 indivíduos, com oito tagSNPs do gene *TPH2*, sendo 84 pacientes com depressão de início tardio e 79 idosos do grupo controle. Todos os tagSNPs apresentaram uma alelo de menor frequência maior que 10% (Tabela.1), que indica uma boa penetrância dos alelos na população. Todos os marcadores estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do marcador *rs4448731,* o que pode ser explicado devido à estratificação das amostras, segregação para o fator doença ou por características etnicas. O erro de genotipagem foi investigado com repetição de 10% de todas as amostras para todas as sondas.

Tabela 1. Descrição das oito sondas do gene *TPH2* nas amostras de caso-controle de depressão de início tardio.

				MAF*	
tagSNP	Polimorfismo	Alelo Ancestral	Posição	Caso (*n*=84)	Controle (*n*=79)
rs4448731	C/T	T	Intergênico	0.464	0.434
rs4565946	C/T	C	Intron 2	0.435	0.449
rs11179000	A/T	A	Intron 4	0.244	0.39
rs7955501	A/T	T	Intron 5	0.321	0.405
rs10506645	C/T	T	Intron 7	0.167	0.205
rs4760820	C/G	C	Intron 8	0.295	0.36
rs1487275	A/C	A	Intron 8	0.274	0.253
rs10879357	A/G	G	Intron 8	0.355	0.34

*Alelo de Menor Frequência

Na análise alélica, o SNP *rs11179000* mostrou associação do alelo A ancestral com depressão de início tardio (Tabela 2). Para os outros marcadores nenhuma associação alélica foi encontrada.

Tabela 2- Distribuição alélica dos SNPs do gene *TPH2* – Unphased 3.0.13 (Dudbridge F, 2008).

tagSNP	Alelo	Caso (freq.)	Controle (freq.)	OR (95%CI)	X^2	Valor de *p*
rs4448731	T	90(0,54)	89(0,56)	1(ref.)		
	C	78(0,46)	68(0,44)	1,1	0,29	0,58
rs4565946	T	73(0,44)	71(0,45)	1(ref.)		
	C	95(0,56)	87(0,55)	1,1	0,07	0,78
rs11179000	T	41(0,25)	61(0,40)	1(ref.)		
	A	127(0,75)	96(0,60)	1,9	7,8	**0,005***
rs7955501	T	54(0,32)	64(0,40)	1(ref.)		
	A	114(0,68)	94(0,60)	1,4	2,4	0,11
rs10506645	T	28(0,17)	32(0,21)	1(ref.)		
	C	140(0,83)	125(0,79)	1,3	0,79	0,37
rs4760820	G	49(0,30)	56(0,36)	1(ref.)		
	C	118(0,70)	101(0,64)	1,3	1,5	0,21
rs1487275	C	46(0,28)	40(0,26)	1(ref.)		
	A	122(0,72)	118(0,74)	0,8	0,17	0,67
rs10879357	G	108(0,65)	104(0,66)	1(ref.)		
	A	59(0,35)	53(0,34)	1,1	0,08	0,76

*Valor significativo p<0,05

Identificamos associação entre os marcadores *rs4565946* e *rs11179000* e a depressão de início tardio. Para o polimorfismo *rs4565946* houve um valor estatístico significativo para os indivíduos heterozigotos (C/T) para fator de

proteção por ser mais observado em controles. Para o polimorfismo *rs11179000* houve o risco aumentado para o desenvolvimento de depressão de início tardio para o indivíduo homozigoto (A/A) (Tabela 3). Com os demais marcadores não foram observados nenhuma associação na análise genotípica

Tabela 3- Distribuição genotípica dos tagSNPs do gene *TPH2* nos casos e nos controles – Unphased 3.0.13 (Dudbridge F, 2008).

tagSNP Genótipo	Pacientes (freq.) n=84	Controles (freq.) n=79	OR (95%IC)	valor de p (valor ajustado)
rs4448731				
C/C	30(0,36)	26(0,33)	1(ref.)	0,7
C/T	30(0,36)	37(0,47)	0,6 (0,3-1,4)	0,13
T/T	24(0,28)	15(0,20)	1,3 (0,5-3,0)	0,19
rs4565946				
T/T	20 (0,24)	12 (0,15)	1(ref.)	0,16
C/T	33 (0,39)	47 (0,60)	0,42 (0,18-0,97)	**0,009*(0,02)**
C/C	31 (0,37)	20 (0,25)	0,93 (0,37-2,31)	0,11
rs11179000				
T/T	6 (0,07)	13 (0,16)	1(ref.)	0,06
A/T	29 (0,35)	35 (0,46)	1,75 (0,58-5,27)	0,17
A/A	49 (0,58)	30 (0,38)	3,5 (1,08-10,3)	**0,01*(0,03)**
rs7955501				
A/A	7(0,09)	13(0,16)	1(ref.)	0,11
A/T	40(0,48)	38(0,48)	1,9 (0,7-5,4)	0,95
T/T	37(0,44)	28(0,36)	2,4(0,8-6,9)	0,26
rs10506645				
C/C	2(0,02)	4(0,05)	1(ref.)	0,35
C/T	24(0,29)	24(0,30)	2 (0,3-11,9)	0,75
T/T	58(0,69)	50(0,65)	2,3(0,40-13,21)	0,5
rs4760820				
C/C	7(0,08)	11(0,14)	1(ref.)	0,21
C/G	35(0,42)	33(0,42)	1,7(0,5-4,9)	0,94
G/G	41(0,50)	33(0,44)	2,0(0,7-5,7)	0,36
rs1487275				
C/C	6(0,07)	2(0,03)	1(ref.)	0,17
A/C	34(0,41)	36(0,45)	0,31(0,05-1,6)	0,51
A/A	44(0,52)	41(0,52)	0,35(0,06-1,8)	0,95
rs10879357				
G/G	33(0,39)	32(0,41)	1(ref.)	0,87

A/G	41(0,50)	39(0,51)	1,0(0,5-1,9)	0,93
A/A	9(0,11)	7(0,08)	1,2(0,41-3,7)	0,69

*Valor significativo p<0,05 (permutação 1000x)

A análise haplotípica feita utilizando-se o programa Haploview 4.1 não mostrou bloco haplotípico entre as amostras (Fig. 6)

Esta figura indica a associação entre dois marcadores, cada losando representa o grau de recombinação entre apenas dois tagSNPs. As cores aumentam de intensidade conforme a diminuição de recombinação entre os marcadores, o vermelho vivo indica assim, uma baixa recombinação alélica entre os dois marcadores que o representam.

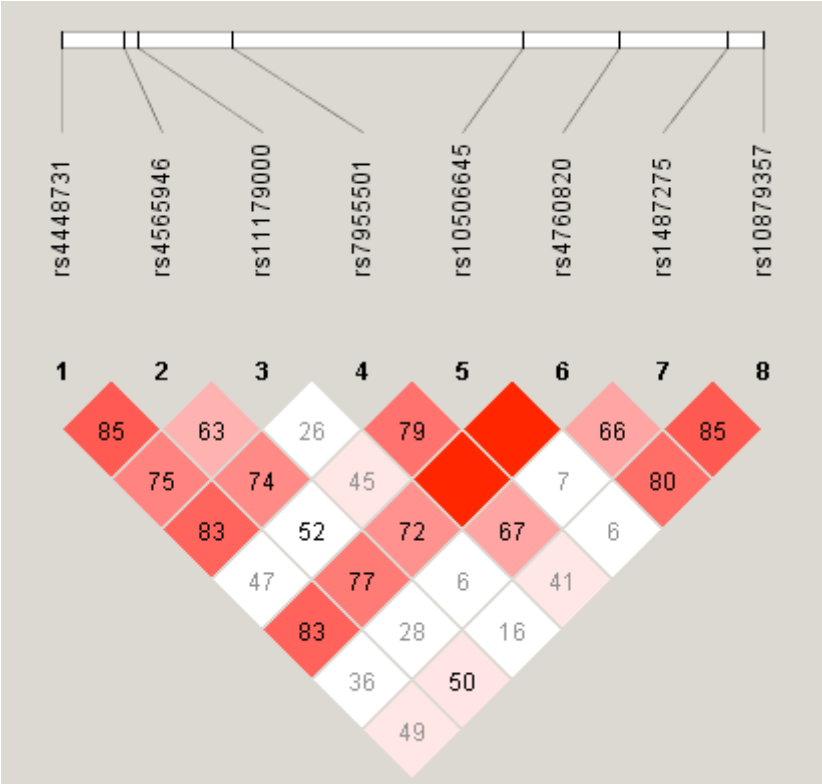


Figura 6. Desequilíbrio de ligação dos tagSNP do gene *TPH2* utilizados na pesquisa – Haploview 4.1

A análise obtida pelo Haploview 4.1 apresentou os polimorfismos em baixo desequilíbrio de ligação portanto sem apresentar bloco haplotípico entre os marcadores 2 e 3 que apresentaram valor significativo estatístico (D': 0,635; r^2: 0,143). Este programa apresenta como cofatores estatísticos o D` e o r^2 , que representam a recombinação em função do número amostral e da distância entre os marcadores.

O estudo de desequilíbrio de ligação (LD) é usado para identificar regiões do genoma que contêm genes que predispõem doenças (Horikawa, 2000). O programa de análise Haploview 4.1 indica através de cores a relação entre os polimorfismos selecionados dentro da população estudada.

Apesar do Haploview 4.1 não apresentar bloco haplotípico, o que significa que os marcadores não estão em desequilíbrio de ligação, quando fazemos permutação em uma janela de até quatro marcadores, pelo Unphased, obtivemos os seguintes resultados (Tabela 4).

A análise haplotípica feita utilizando-se o programa Unphased (Dudbridge F, 2008) mostrou que o haplótipo A-A dos tagSNP (*rs11179000* e *rs7955501*) foi mais frequente nos casos que nos controles (P = 0.02, $P_{ajustado}$ = 0.03). Os haplótipos T-T (*rs4448731* e *rs4565946*), T-T (*rs11179000* e *rs7955501*), T-T-T (*rs4565946*, *rs11179000* e *rs7955501*), C-T-T (*rs4565946*, *rs11179000* e *rs7955501*), T-T-T-T (*rs4448731*, *rs4565946*, *rs11179000* e *rs7955501*) e T-C-T-T (*rs4448731*, *rs4565946*, *rs11179000* e *rs7955501*) foram significativamente mais frequentes em controles quando comparados aos casos (Tabela 4). Para outros haplótipos não obtivemos valores relevantes

após permutação. Confirmando assim o alelo A como fator de risco para desenvolver depressão de início tardio.

Tabela 4- Os haplótipos dos *rs4448731*, *rs4565946*, *rs11179000* e *rs7955501* nas amostras de depressão de início tardio – Unphased 3.0.13 (Dudbridge F., 2008)

Haplótipo	Frequência nos Casos n=84	Frequência nos Controles n=79	X^2 (df)	p*
Dois tagSNP Haplótipos (rs4448731, rs4565946)				
TT	0,006	0,07	11(3)	0,01
Dois tagSNP Haplótipos (rs11179000, rs7955501)				
TT	0,1	0,22	9,5(3)	0,03
AA	0,53	0,49	9,5(3)	0,03
Três tagSNP Heplótipos (rs4565946, rs11179000, rs7955501)				
T T T	0	0,05	18,6 (7)	0,009
C T T	0,09	0,16	18,6 (7)	0,009
Quatro tagSNP haplótipos (rs4448731, rs4565946, rs11179000, rs7955501)				
T T T T	0	0,03	24,6(13)	0,02
T C T T	0,09	0,17	24,6(13)	0,02

*p<0,05; (df) grau de liberdade.

V. DISCUSSÃO

No nosso estudo de associação, usamos a estratégia combinada de analisar polimorfismos de um gene possivelmente associados com a doença a partir de hipóteses neurobiológicas da depressão. Neste estudo, oito tagSNPs do gene *TPH2* foram investigados em amostras de controles comparadas com pacientes com depressão de início tardio.

Já estão bem estabelecidos na literatura os efeitos da disfunção serotoninérgica no transtorno de humor, por isso a importância em estudar genes relacionados ao sistema serotoninérgico. Variantes no gene *TPH2* vem sendo estudados por diversos pesquisadores, porém os achados ainda são conflitantes.

A descoberta da isoforma *TPH2* é recente e o número de estudos em pacientes idosos ainda é restrito. Além disso, outros fatores como o número reduzido de amostras e a diferença da distribuição de gênero entre os casos e controles podem tornar os resultados conflitantes. Na literatura, constam estudos feitos com alguns polimorfismos utilizados nesta pesquisa, associados à depressão maior, transtorno bipolar (Campos e cols., 2009), suicídio (Lopez de Lara e cols., 2007) e autismo (Ramoz e cols., 2006).

Nossos achados sugerem que dois polimorfismos do gene *TPH2* estão associados com a depressão de início tardio. Apesar destes tagSNP representarem uma região e serem intrônicos estes polimorfismos podem repesentar uma região do gene que pode abrangir algum polimorfismo funcional.

O estudo de genes candidatos, assim como o de polimorfismos candidatos, é um dos tipos de estudo de associação, que pode ser feito baseado em caso-controles (Teare e Barrett, 2005). Nosso estudo de caso-controle, tendo como problemas a estratificação da população e o pareamento adequado de casos e controles (Evangelou, 2006). Neste estudo a população controle apresenta uma distribuição diferente entre mulheres e homens. Isso pode ser explicado pela maior frequência de mulheres que buscam cuidados médicos, principalmente atendimento de saúde mental (Drapeau e cols., 2009; Schomerus e cols., 2009), somado ao fato que, mundialmente, entre a população acometida por depressão estima-se uma proporção de 5 mulheres acometidas para cada 2 homens, sugerindo uma influência de gênero na depressão (Wong e Licinio, 2001). Além disso, a proporção de mulheres é maior tanto na população geral quanto na de idosos, o que ajuda a sustentar a diferença de gênero da nossa amostra (IBGE-Pnad, 2008). Assim, são poucos os estudos existentes com depressão de início tardio uma vez que as amostras são de difícil obtenção e caracterização. Nossos dados, entretanto, são sugestivos e devem ser confirmados em outras populações e amostras.

Observamos que os homozigotos (C/C e T/T) para o SNP *rs4565946* não estão associados com depressão de início tardio, mas o heterozigoto (C/T) (p=0.009) para este SNP teve uma associação com a doença (Tabela 3). Isto poderia ser um exemplo de fenômeno molecular de heterozigose, definido como uma situação em que o indivíduo, heterozigoto para o polimorfismo, apresenta uma diminuição ou aumento do fenótipo em relação ao grupo homozigótico (Comings e MacMurray, 2000). Embora a heterozigose tenha sido demontrada principalmente em polimorfismos funcionais, não se pode

descartar que a associação encontrada neste estudo não inclua um polimorfismo funcional representado pelo tagSNP em questão.

A presença de dois marcadores com valor de *p* significativo nos fez analisar a interação com o desequilíbrio de ligação (*rs4565946* e *rs11179000*) que resultou em uma representação de 63% de desequilíbrio de ligação, o que significa uma alta taxa de recombinação entre os marcadores (Fig. 6).

Nossos achados necessitam de replicação em outras populações, pois este é o primeiro estudo a avaliar oito polimorfismos intrônicos no gene da *TPH2* e a susceptibilidade a depressão de início tardio.

Algumas limitações devem ser levadas em consideração como: a diferença entre número de casos e o número de controles devido à grande dificuldade de obtenção de controles idosos que peenchessem os requisitos de não terem história na família de alcoolismo nem apresentarem nenhuma doença mental em parentes de primeiro grau. Outra dificuldade foi a obtenção de indivíduos do sexo masculino, sugerindo que as mulheres podem procurar mais atendimento médico do que os homens (Schomerus e cols., 2009). Selecionamos nossas amostras em função da idade não levando em consideração outros dados demográficos como etnia e nível sócio-econômico.

Polimorfismos do gene da enzima *TPH2* parecem estar relacionados com depressão de início tardio. Estudos de genômica funcional e amostras maiores e definidas demograficamente podem trazer novas e interessantes perspectivas para o entendimento dos transtornos do humor na senescência.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akiskal, H.S. (2000). Mood disorders: introduction and overview. In Comprehensive Textbook of Psychiatry, B.J. Sadock and V.A. Sadock, eds. (New York: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 1284–1298.

Alexopoulos GS (2005) Depression in the elderly. Lancet 365: 1961-1970.

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.

American Psychiatric association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (American Psychiatric association, Washington, DC, 1994).

Anttila, S., Viikki, M., Huuhka, K., Huuhka, M., Huhtala, H., Rontu, R., Lehtimäki, T., Leinonen, E. (2009) TPH2 polymorphisms may modify clinical picture in treatment-resistant depression *Neuroscience Letters* 464 (1), pp. 43-46

Blazer DG, Hybels CF (2005) Origins of depression in later life. Psychol Med 35: 1241-1252

Blazer DG, Hybels CF, Pieper CF. (2001) The association of depression and mortality in elderly persons: a case for multiple, independent pathways.J Gerontol A Biol Sci Med Sci. Aug;56(8):M505-9.

Blazer, D. G., Kessler, R. C., McGonagle, K. A. & Swartz,M. S. (1994) The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity

Blier, P., Ward, N.M., (2003). Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression? Biol. Psychiatry 53 (3), 193– 203.

Brodaty H, Luscombe G, Parker G, Wilhelm K, Hickie I, Austin MP, Mitchell P. (2001) Early and late onset depression in old age: different aetiologies, same phenomenology. J Affect Disord. Oct;66(2-3):225-36.

Campos SB, Miranda DM, Souza BR, Pereira PA, Neves FS, Bicalho MA, Melillo PH, Tramontina J, Kapczinski F, Romano-Silva MA, Correa H. Association of polymorphisms of the tryptophan hydroxylase 2 gene with risk for bipolar disorder or suicidal behavior. J Psychiatr Res. 2009 Sep 30. [Epub ahead of print]

Castrén, E., (2005) Is mood chemistry? Nature Reviews Neuroscience 6, 241-246

Cichon S; Winge I; Mattheisen M; Georgi A; Karpushova A; Freudenberg J; Bogaert AVD; Nothen MM.(2008) -Brain-specific tryptophan hydroxylase 2 (TPH2): a functional Pro206Ser substitution and variation in the 5'-region are associated with bipolar affective disorder. Human molecular Genetics,vol.17:87-97

Claes, S., (2009). Glucocorticoid Receptor Polymorphisms in Major Depression Ann. N.Y. Acad. Sci. 1179: 216–228

Comings, D.E., MacMurray, J.P., (2000) Molecular heterosis: A review, Molecular Genetcs Metabolism 71 19 –31.

Cote, F., Thevenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M.A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., et al. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the impor tance of peripheral serotonin in cardiac function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 13525–13530.

de Lara, C.L., Brezo, J., Rouleau, G., Lesage, A., Dumont, M., Alda, M., Benkelfat, C., Turecki, G. (2007) Effect of Tryptophan Hydroxylase-2 Gene Variants on Suicide Risk in Major Depression *Biological Psychiatry* 62 (1), pp. 72-80

Devanand DP, Kim MK, Paykina N, Sackeim HA. (2002) Adverse life events in elderly patients with major depression or dysthymic disorder and in healthy-control subjects. Am J Geriatr Psychiatry. May-Jun;10(3):265-74.

Drapeau, A., Boyer, R., Lesage, A., (2009) The In*fl*uence of Social Anchorage on the Gender Difference in the Use of Mental Health Services The Journal of Behavioral Health Services & Research 36:3 July

Drevets WC: (2001) Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. Curr Opin Neurobiol; 11:240–249

DSM-IV – Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais- 4ª edição (1995). Porto Alegre : ARTMED,

Dudbridge F (2008) Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Human Heredity* 66:87-98

Lopez de Lara C, Brezo J, Rouleau G, Lesage A, Dumont M, Alda M, Benkelfat C, Turecki G. Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on suicide risk in major depression. Biol Psychiatry. 2007 Jul 1;62(1):72-80. Epub 2007 Jan 9

Evangelou E, Trikalinos TA, Salanti G, Ioannidis JP. (2006) Family-based versus unrelated case-control designs for genetic associations. PLoS Genet. 2006 Aug;2(8):e123. Epub Jun 26.

Fava, M., and Kendler, K.S. (2000). Major depressive disorder. Neuron *28*, 335–341.

Gaspar P, Cases O, Maroteaux L (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. Nat Rev Neurosci 4: 1002-1012.

Gillespie, C. F. & Nemeroff, C. B. (2005). Hypercortisolemia and depression. *Psychosom. Med.* 67 (Suppl.), S26–S28

Hamet P, Tremblay J. (2005) Genetics and genomics of depression. Metabolism. May;54(5 Suppl 1):10-5.

Hannon J, Hoyer D. (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. Behav Brain Res. Dec 16;195(1):198-213. Epub 2008 Mar 25.

Hensler, J.G., (2003). Regulations of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. Life Sci. 72, 1665– 1682.

Herbert, J. Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR.(2006) Do corticosteroids damage the brain? J.Neuroendocrinol. 18, 393–411

Hickie I, Simons L, Naismith S, Simons J, McCallum J, Pearson K. (2003) Vascular risk to late-life depression: evidence from a longitudinal community study. Aust N Z J Psychiatry. Feb;37(1):62-5.

Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y,

Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. (2000) Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. Nat Genet. Oct;26(2):163-75.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol Biochem Behav. Apr;71(4):533-54.

Kalia, M. (2005) Neurobiological basis of depression: an update. .Metabolism. May;54(5 Suppl 1):24-7.

Kessler RC, Berglund P, Demler O, et al. (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*;289:3095-105.

Kessler, R.C., Angermeyer, M., Anthony, J.C., DE Graaf, R., Demyttenaere, K.,Gasquet, I., DE Girolamo, G., Gluzman, S., Gureje, O., Haro, J.M., Kawakami, N., Karam, A., Levinson, D., Medina Mora, M.E., Oakley Browne, M.A., Posada-Villa, J., Stein, D.J., Adley Tsang, C.H., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., Lee, S., Heeringa, S., Pennell, B.E., Berglund, P., Gruber, M.J., Petukhova, M., Chatterji, S., Ustün, T.B., (2007). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the WHO World Mental Health Surveys.World Psychiatry 6, 168–176

Kloiber, S., Kohli, M.A., Brueckl, T., Ripke, S., Ising, M., Uhr, M., Menke, A., Lucae, S. (2009) Variations in tryptophan hydroxylase 2 linked to decreased serotonergic activity are associated with elevated risk for metabolic syndrome in depression Molecular Psychiatry.

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.

Lahiri, Debomoy K. and John I.Nurnberger,Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 19, Submitted June 11.

Lucki I. The spectrum of behaviours influenced by serotonin. Biol. Psychiatry (1998) 44:151–162.

Murray, C.J.L., Lopez, A.D., (1996). The Global Burden of Disease. Harvard Univ. Press, Cambridge, p. 21.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. (2002) Neurobiology of depression. Neuron. Mar 28;34(1):13-25.

Oliveira A P., Gomes D.L., Oliveira R.F.. (2006) Prevalência de depressão em idosos que freqüentam centros de convivência Rev Saúde Pública;40(4):XX-XX

Organização Mundial da Saúde. (1993) Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10. Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas;.

Organização Mundial de Saúde (2001) The World Health Report - Mental Health: New understanding, WHO, Geneve.

Patel, P.D., Pontrello, C., and Burke, S. (2004). Robust and specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. Biol. Psychiatry *55*, 428–433.

Popova, N. K. (2006), “From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system,” *BioEssays*, 28, No. 5, 494–503.

Ramoz N, Cai G, Reichert JG, Corwin TE, Kryzak LA, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, Buxbaum JD. Family-based association study of TPH1 and TPH2 polymorphisms in autism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Dec 5;141B(8):861-7.

Scheuch K, Lautenschlager M, Grohmann M, Stahlberg S, Kirchheiner J, Zill P, Heinz A, Walther DJ, Priller J. (2007) Characterization of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonergic raphe neurons. Biol Psychiatry. Dec 1;62(11):1288-94. Epub 2007 Jun 13.

Schomerus, G., Matschinger, H., Angermeyer, MC., (2009) The stigma of psychiatric treatment and help-seeking intentions for depression Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 259:298–306

Schweitzer I, Tuckwell V, O'Brien J, Ames D. (2002) Is late onset depression a prodrome to dementia? Int J Geriatr Psychiatry. Nov;17(11):997-1005

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.

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

Tamai, S. Epidemiologia do Envelhecimento no Brasil.Em: Forlenza, O. V, Almeida, O. P. (1999). Depressão e Demência no Idoso, 2ª edição. (p. 11-24). São Paulo: Lemos Editorial.

Twarog, B. M., Page, I. H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* 175:157-61

Walther, DJ; Peter, JU; Bashammakh, S; Hortnagl, Heide; Voits, Mechthild; Fink, H; Bader, Michael (2003) -Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. Brevia Neuroscience, vol 299:76

Wong, Ma-Li and Licino, Julio (2001) Research and Treatment Approaches to Depression. Nature. Rev. vol2, 343-351.

Wurtman, R.J. Genes, stress, and depression. Metabolism. (2005) May;54(5 Suppl 1):16-9.

Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Tryptophan hidroxylase-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 (2005) Loss-of-function mutant in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. Neuron 45: 11-16.

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.

VII. ANEXOS

VII.I Anexo 1. Questionário

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

Baseado no DSM-IV, são descritos os critérios de diagnósticos de episódios depressivos

Critérios para Episódio Depressivo Maior
A. Cinco (ou mais) dos seguintes sintomas estiveram presentes durante o mesmo período de 2 semanas e representam uma alteração a partir do funcionamento anterior; pelo menos um dos sintomas é (1) humor deprimido ou (2) perda do interesse ou prazer. Nota: Não incluir sintomas nitidamente devidos a uma condição médica geral ou alucinações ou delírios incongruentes com o humor.
(1) humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias, indicado por relato subjetivo (por ex., sente-se triste ou vazio) ou observação feita por outros (por ex., chora muito). Nota: Em crianças e adolescentes, pode ser humor irritável
(2) interesse ou prazer acentuadamente diminuídos por todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias (indicado por relato subjetivo ou observação feita por outros)
(3) perda ou ganho significativo de peso sem estar em dieta (por ex., mais de 5% do peso corporal em 1 mês), ou diminuição ou aumento do apetite quase todos os dias. Nota: Em crianças, considerar falha em apresentar os ganhos de peso esperados
(4) insônia ou hipersonia quase todos os dias
(5) agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias (observáveis por outros, não meramente sensações subjetivas de inquietação ou de estar mais lento)
(6) fadiga ou perda de energia quase todos os dias
(7) sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou

inadequada (que pode ser delirante), quase todos os dias (não meramente auto-recriminação ou culpa por estar doente)
(8) capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão, 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
B. Os sintomas não satisfazem os critérios para um Episódio Misto
C. Os sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.
D. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (por ex., droga de abuso ou medicamento) ou de uma condição médica geral (por ex., hipotiroidismo).
E. Os sintomas não são melhor explicados por Luto, ou seja, após a perda de um ente querido, os sintomas persistem por mais de 2 meses ou são caracterizados por acentuado prejuízo funcional, preocupação mórbida com desvalia, ideação suicida, sintomas psicóticos ou retardo psicomotor.

Escala Geriátrica de Depressão (GDS15 e GDS5)
(Para cada questão, escolha a opção que mais se assemelha ao que você está sentindo nas últimas semanas)
Validação: Almeida O.P. Arq Neuropsiquiat,v.57,p.421426,
1999.

Você está basicamente satisfeito com sua vida?..... Sim NÃO
Você se aborrece com freqüência?..... SIM Não
Você se sente um inútil nas atuais circunstâncias?..... SIM Não
Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas?..... SIM Não
Você sente que sua situação não tem saída?.....SIM Não
Você tem medo que algum mal vá lhe acontecer? ..... .SIM Não
Você acha que sua situação é sem esperanças?.....SIM Não
Você acha maravilhoso estar vivo?..... Sim NÃO
Você sente que sua vida está vazia?..... SIM Não
Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você?.....SIM Não
Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria?..... SIM Não
Você deixou muitos de seus interesses e atividades? ..... SIM Não
Você se sente de bom humor a maior parte do tempo?..... Sim NÃO
Você se sente cheio de energia?..... Sim NÃO
Você se sente feliz a maior parte do tempo?..... Sim NÃO

PONTUAÇÃO:

VII.II Anexo 2. Protocolo de Extração Salina:

Extração de Sangue

São necessários para este protocolo:

- TKM1 (10 mM Tris-HCL pH 7.6, 10 mM KCL, 10 mM MgCl2, 2 mM EDTA)
- Triton X-100
- TKM2 (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl2, 0.4M NaCl, 2 mM EDTA)
- 10% SDS
- NaCl Saturado (6M)
- Etanol Absoluto
- Etanol 70%
- TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

Protocolo:

1- Coloque o sangue em um tubo Falcon de 50 mL (máximo de 22,5 mL de sangue)

Obs: Homogeinizar o sangue antes de passar para o tubo de Falcon

2- Adicione 1 volume de TKM1 (volume final máximo no Falcon é de 45 mL)

3- Adicione Triton-100 para lisar as células. Agite bem

Volume de Triton:

>20 mL de sangue = 0.5 mL de Triton

20 mL de sangue = 0.4 mL de Triton

<15 mL de sangue = 0.3 mL de Triton

4- Centrifugue a 2600 RPM por 15 minutos

5- Lentamente despreze o sobrenadante em descarte com hipoclorito e salve o pellet.

Lave o pellet adicionando o mesmo volume de TKM1 do passo 2. Agite bem

6- Centrifugue a 1600 RPM por 10 minutos

7- Despreze o sobrenadante e muito cuidado pois o pellet dessa vez está muito friável

8- Ressuspenda o pellet em TKM2 (mL)

Volume de TKM2 :

≥ 20 mL de sangue = 4 mL de TKM2

15 mL de sangue = 2.4 mL de TKM2

≤10 mL de sangue = 1.6 mL de TKM2

9- Adicione SDS 10% e agite bem

≥20 mL de sangue = 250 µL

15 mL de sangue = 150 µL

≤10 mL de sangue = 100 µL

10- Incube a 55°C no banho-maria por 10-20 minutos

11- Adicione NaCl saturado

Volume de NaCl:

≥ 20 mL de sangue = 1,5 mL de NaCl saturado

≤15 mL de sangue = 0,9 mL de NaCl saturado

Obs: Misture muito bem a solução de NaCl saturado pipetando próximo ao nível sal-água

12- Centrifugue a 15500 RPM, por 15 minutos

13- Despeje o sobrenadante em um tubo Falcon de 50 mL com etanol absoluto

(quantidade de etanol suficiente para preencher o fundo cônico do tubo – cerca de 4 mL)

14- Rode a pipeta de vidro até começar a formar um grumo na pipeta

Obs: Se possível usar pipeta de vidro com ponta em gancho para melhor "pescar" o DNA

15- Retire o a pipeta com o DNA e mergulhe em um Falcon de 15 mL com Etanol 70% (quantidade de etanol suficiente para preencher o fundo cônico do tubo – cerca de 1,5 mL) por aproximadamente 10 minutos

16- Remova a pipeta com o DNA e deixe secar por 10 minutos

17- Em um criotubo, ressuspenda o DNA em 500 µL de TE por 3 minutos

18- Incube no banho-maria por 2 dias a 55°C

19- Armazene a 4°C

Soluções:

- TKM1 (2L)

  20mL de Tris-HCl (1M, pH7.6)

  20mL de KCl (1M)

  20mL de $MgCl_2$ (1M)

  16mL de EDTA (0.5M, pH8.0)

  Acrescentar água deionizada até completar 2L de solução

- TKM2

  5mL de Tris-HCl (1M, pH7.6)

  5mL de KCl (1M)

  5mL de $MgCl_2$ (1M)

  4mL de EDTA (0.5M, pH8.0)

  40mL de NaCl (5M)

  Acrescentar água deionizada até completar 500mL de solução

- 10% SDS

10g de pó de SDS em 100mL de água deionizada

- NaCl Saturado (6M)

  35g de NaCl em 100mL de água deionizada

- TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)

  Para 100mL de solução, adicionar em um balão de 100 mL:

  - 1 mL de Tris-HCl 1M
  - 0,2 mL de EDTA 0,5M

  Ajustar para pH 8.0 e completar até 100 mL com água deionizada

VII.III Anexo 3. Informações sobre as Sondas:

ID Applied	RS	Local no cromossomo (NCBI)	Frequência NCBI - National Center for Biotechnology Information (HapMap)	Sequência da Probe [VIC/FAM]	Alelo Ancestral
C__31110841_10	4448731	70615373 Intergênico	CEPH(CEU)-0.21(T/T);0,43(C/T);0,35(C/C) Yoruba (YRI)-0.01(C/C);0.31(C/T);0.69(T/T)	TTTTCCAGTCCCTGGCAGCCACTAA[C/T]CTACTTTCTGTGTGTGTCTCTCTCT	T
C__26385313_10	4565946	70623036 Intron 2	CEPH(CEU)-0.24(C/C);0,47(C/T);0,28(T/T) Yoruba (YRI)-0,86(C/C);0,13(C/T);0,01(T/T)	ACTCTGCCATCAGCTAGTCACGGGG[C/T]CTTAGCTAAGCCATTTAACCCATCT	C
C__31110852_10	11179000	70624895 Intron 4	CEPH(CEU)-0.63(A/A);0.27(A/T);0.09(T/T) Yoruba (YRI)-0.27(A/A);0.55(A/T);0.16(T/T)	TCCAAATGATAAAGCTTCCCTGTAC[A/T]CGTGTTGACTGGAAGCGGGTTAGAA	A
C__44867511_10	7955501	70636293 Intron 5	CEPH(CEU)-0.46(A/A);0.36(A/T);0.16(T/T) Yoruba (YRI)-0.21(A/A);0.56(A/T);0.21(T/T)	GCCTTTTATAACCTAGCATTGGAAG[A/T]GACACACCATCACTCTTGCTGTATC	T
C__30277975_20	10506645	70671767 Intron 7	CEPH(CEU)-0.58(C/C);0.38(C/T);0.03(T/T) Yoruba (YRI)-0.36(C/C);0.51(C/T);0.11(T/T)	AGGGTCCACTCCCGGCTTAGAACTA[C/T]TGGACTTGTAACTGAATCAAATGCA	T
C___8376112_10	4760820	70683263 Intron 8	CEPH(CEU)-0.26(C/C);0.46(C/G);0.26(G/G) Yoruba (YRI)-0.91(C/C);0.06(G/C);0.01(G/G)	ACCACTTTAGTATCTCTACAGAAAG[C/G]TTGAAATAAGCCTCAGGCTTATTTA	C
C___8872268_10	1487275	70696559 Intron 8	CEPH(CEU)-0.08(C/C);0.31(C/A);0.60(A/A) Yoruba (YRI)-0.08(C/C); 0.36(C/A);0.55(A/A)	GAGTATCTTATAAGTGAAGTACACC[A/C]AATTTAGCCTATAACTTTTTGTTAT	A
C__31110979_10	10879357	70700830 Intron 8	CEPH(CEU)-0.16(A/A);0.45(A/G);0.38(G/G) Yoruba (YRI)-0.18(A/A);0.42(A/G);0.39(G/G)	ATTACAGGTGTGAGTCACCACGCCC[A/G]GTCTAGGGCTGTAATTTTAGCCTCT	G

VII.IV Anexo 4. Artigo

1634

Words

Association between Tryptophan Hydroxylase II gene and late onset depression

[a]Patricia de Araújo Pereira Bsc, [a]Marco Aurélio Romano-Silva MD PhD,[a, b]Maria Aparecida Camargos Bicalho MD MSc, [a]Luiz Armando De Marco MD PhD, [a]Humberto Correa MD PhD, [a]Simone Becho de Campos MSc, [a, b]Edgar Nunes de Moraes MD PhD, [a]Karen Cecilia de Lima Torres PhD, [a]Bruno Rezende de Souza PhD, [a]Debora Marques de Miranda MD PhD

[a]Laboratório de Neurociência, INCT de Medicina Molecular Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Mental, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte-MG, 30130-100, Brazil

[b]Centro de Referência do Idoso, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55 314099650

E-mail address: patriciabiomol@yahoo.com.br.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, FAPEMIG and FINEP. INCT de Medicina Molecular. MAR-S was recipient of a J.S. Guggenheim Fellowship during the development of this study.

Key Words: Tryptophan hydroxylase-2; SNP; late onset depression

Abstract

Background Major depression is one of the most common psychiatric disorders among the elderly and has impact on suicide rates and poor prognosis of comorbidities. Seems to be a interesting candidate gene for the tryptophan hydroxylase type II gene (*TPH2*) have been associated with many psychiatric disorders in special with major. Tph2 is a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of serotonin. Polymorphisms in *TPH2* might result in changes of brain serotonin synthesis.

Methods We genotyped 84 patients with diagnosis of late-onset depression and 79 individuals belonging to the control group for eight tag-SNPs in the *TPH2* gene to investigate an association between gene *TPH2* and late-onset depression.

Results Our findings suggested that the *TPH2* gene is associated with late onset depression.

Limitation The number of patients who participated was relatively small. Our study have interesting data however replication studies are necessary.

Conclusion Our results support the hypothesis that the *TPH2* gene is associated with late onset depression.

1. Introduction

Assessment and diagnosis of mental disorders in the elderly are especially difficult due to several distinctive characteristics of older adults, such as different clinical presentation from that of other adults, making detection of treatable illness more difficult.

Depression in the elderly is not necessarily associated with the same risk factors as in younger adults, especially when the first episode occurs at an advanced age. It is necessary to identify temporal relationships, correlates, and causal patterns to develop clinically useful profiles for high-risk patients and to inform prevention and intervention studies and health care policy. Studies of socioeconomic status and nonmodifiable factors (eg: age, sex, and race) that contribute to risk are useful in identifying at-risk populations (Charney et al., 2003).

One to four percent of the general elderly population is diagnosed with major depression at some point in their lifetime. The ratio of 5:2 women to men is the same observed in younger adults (Wong and Licinio, 2001). When depression occurs in late life, it may be a relapse of an earlier depression. If it is a first time occurrence, it may be triggered by another illness, hospitalization, or placement in a nursing home. Unlike the onset of depression in non-elderly populations, depression in the elderly is thought to be a psychological disorder triggered by specific stressors, such as medical illness, economic impoverishment, disability, isolation, relocation, caregiving, and bereavement. Late life depression (LLD) often arises in the context of other clinical disorders, especially neurological (Krishman et al., 1995).

Biological and molecular genetic studies of LLD are limited therefore this is clearly an understudied area, particularly in view of the significant costs to the individual, families and the health care system. Some findings of note in genetics of

antidepressant treatment response in the elderly have been reported by Murphy et al. (2001, 2003), Pollock et al. (2000), Adeoye et al. (2003). When compared with elderly individuals with early-onset major depression, individuals with late-onset major depression have a less frequent family history of mood disorders, a higher prevalence of dementia, a larger impairment in neuropsychological tests, a higher rate of dementia development on follow-up, more neurosensory hearing impairment, a greater enlargement in lateral brain ventricles, and more white-matter hyperintensities (reviewed by Alexopoulos, 2005).

The DSM-IV defines late onset depression as a disorder starting after the age of 65 years when neurodegenerative processes may generate a psychobiological vulnerability for the development of the depression (Ernst and Angst, 1995). It generally last long, are more frequently under recognized and under treated, with high rates of suicide as compared with depression in younger people. Furthermore, elderly depression frequently coexists with other medical illness and disabilities usually, usually negatively impacting them (Smith et al, 2009; Teper and O'Brien, 2008).

It is known that the serotonergic pathway has an important role on the modulation of mood, sleep, appetite and cognition (Lucki, 1998) being involved with a variety of neuropsychiatric disorders, including major depression (Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2005), and suicidal behavior (Correa et al, 2002, Campi-Azevedo, 2003, Neves 2008). Tryptophan hydroxylase 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, *TPH2* (chromosome 12q15) have been proposed as a candidate gene for association studies of many behavioral phenomena including mood disorders, suicide, personality traits and substance abuse (Walther and Bader, 2003).

Furthermore, some functional mutations in this gene carrying a reduction in serotonin synthesis was described (Zhang et. al. 2004, 2005) opening the possibility that mutations in the *TPH2* that promote changes in the serotoninergic homeostasis could generate susceptibility to some neuropsychiatric disorders.

In this study, we tested the hypothesis that variations of the *TPH2* gene could be associated with late onset depression in a sample of Brazilian population.

2. Methods

2.1 Subjects

In the present study, 84 patients with diagnosis of late-onset depression (69 women and 15 men, mean age of 79.2) were enrolled. The diagnosis of depression was made based on DSM-IV criteria, using a structured interview, MINI-PLUS, the Geriatric Depression Scale (Almeida & Almeida, 1998) and a review of medical records. All patients were further submitted to the Mini Mental of Folstein (1975), adapted by Brucki et al. (2003) and patients diagnosed with dementia were excluded. All patients were recruited in the Reference Center for Aging of Minas Gerais, Belo Horizonte, UFMG, Brazil.

Subjects belonging to the control group (n = 79; 55 women and 24 men, mean age of 75.4) were carefully selected at the program of supervised physical activity for healthy seniors at the UFMG school of physical education. Those who had no personal or family history (relatives of first degree) of depression and dementia were included. The control group was also submitted to the Mini Plus, GDS and DSM-IV evaluation. All subjects gave informed consent for participation in this study that was approved by UFMG ethics committee.

2.2 Genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood using the high salt method of Lahiri and Nurnberger (1991). We selected eight tagSNPs which were genotyped using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA). The probes used correspond to the following SNPs: *rs4448731* (intergenic), *rs4565946* (intron 2), *rs11179000* (intron 4), *rs7955501* (intron 5), *rs10506645* (intron 7), *rs4760820* (intron 8), *rs1487275* (intron 8) and *rs10879357* (intron 8). All polymorphisms were chosen using the Hapmap database (www.hapmap.org). Retypes of 10% of the whole sample were performed for quality control.

Genotypings were performed by PCR-Realtime using the allelic discrimination mode (Strategene Mx3005 – MxPro QPCR- Software, 2007). PCR protocols followed the instructions for use of the TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR conditions were: 1 cycle (10 min at 95°C) and 50 cycles (95 °C at 15 s, 60 °C 1 min). Protocol: 3.5µl of Mix, 0.1µl of probe, 3.4 µl of deionized water and a 1.0µl DNA concentration 50ng/µl to a total volume of 8µl.

2.3 Analysis

Statistical analyses were performed using the Unphased software package version 3.0.13 (www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/) with permutation correction. The results were considered significant when $p < 0.05$. Pairwise linkage disequilibrium was established using Haploview 4.1 (www.broad.mit.edu/mpg/haploview/) (Barrett et al. 2005). Estimates of deviation from HWE were also calculated with Haploview 4.1.

3. Results

All eight tagSNPs showed allele frequencies higher then 10%. Our sample was in Hardy-Weinberg equilibrium, except for marker *rs4448731*.

We identified an association between the SNPs *rs4565946* and *rs11179000* and late-onset depression. The *rs4565946* showed a higher frequency of the heterozygotic C/T genotype in controls than in patients. For the tagSNP *rs11179000,* shown us a risk to development of late-life depression for homozygous (A/A) (Table 1). For other markers no association was detected at genotypic analyses. Allelic analysis of tagSNP *rs11179000* showed an association of allele A with depression (p-value > 0.005). For the other markers no association was found.

Haplotypic analyses showed no haplotype bloc (Haploview 4.1).

4. Discussion

In this study, eight SNPs of *TPH2* gene were investigated in a sample of 163 individuals older than 65 years (84 with late onset depression and 79 health controls). Our findings suggested that the *TPH2* gene may be associated with late onset depression. In our study the *rs4448731*, as mentioned, was not in HW equilibrium (p=0.04). We retyped at least 10% of the samples for quality control and no genotyping errors were detected.

Interestingly, we observed that the homozygous genotype of SNP *rs4565946* were not associated with late-onset depression, but the heterozygous (C/T) (p=0.009) for this SNP were (Table 1). It could be an example of the phenomenon of molecular heterosis, defined as the situation in which subjects heterozygous for polymorphisms display a lesser or greater effect on the trait than both homozygotic group. One explanation for this phenomenon is that this might be a result of interactions with

another genetic or nongenetic risk factor that causes a hidden stratification of the study population (Comings and MacMurray 2000).

The presence of two positive markers prompted us to examine their interaction, leading to identification of two loci (*rs4565946* and *rs11179000*) associated with 63% increase in risk (fig.1).

In conclusion, our study provides evidence that polymorphisms in *TPH2* gene contribute to late-onset depression. Clearly, further large-scale genetic studies are needed to confirm these observations since our sample could be considered small. Furthermore, functional studies will clarify the role of other variants and of haplotypes in the susceptibility to mood disorders.

References

Almeida, O.P., Almeida, A.A., 1998. Confiabilidade da versão brasileira da escala de depressão geriátrica (GDS) versão reduzida. Arq Bras Neuro-psiq. 57, 421-426.

Campi-Azevedo AC, Boson W, De Marco L, Romano-Silva MA, Correa H. Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with suicidal behavior. Mol Psychiatry. 2003 Nov;8(11):899-900. No abstract available.

Comings DE, MacMurray JP. Molecular heterosis: a review. Mol Genet Metab. 2000 Sep-Oct;71(1-2):19-31. Review.

Correa H, De Marco L, Boson W, Viana MM, Lima VF, Campi-Azevedo AC, Noronha JC, Guatimosim C, Romano-Silva MA. Analysis of T102C 5HT2A polymorphism in Brazilian psychiatric inpatients: relationship with suicidal behavior. Cell Mol Neurobiol. 2002 Dec;22(5-6):813-7.

Ernst, C., Angst, J., 1995. Depression in old age. Is there a real decrease in prevalence? A review. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 245, 272–287.

Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R., 1975. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res. 12, 189-98.

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.

Lahiri, D.K., Nurnberger, J.I. Jr., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res. 19, 5444.

Lucki, I., 1998. The spectrum of behaviours influenced by serotonin. Biol Psychiatry 44, 151–162.

Neves FS, Silveira G, Romano-Silva MA, Malloy-Diniz L, Ferreira AA, De Marco L, Correa H. Is the 5-HTTLPR polymorphism associated with bipolar disorder or with suicidal behavior of bipolar disorder patients? Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008 Jan 5;147B(1):114-6.

Smith PJ, Blumenthal JA, Babyak MA, Doraiswamy PM, Hinderliter A, Hoffman BM, Waugh R, Sherwood A. 2009. Intima-media thickness and age of first depressive episode. Biol Psychol 80: 361–364.

Teper E, O'Brien JT. 2008. Vascular factors and depression. Int J Geriatric Psychiatry 23: 993–1000.

Walther, D. J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H., Bader, M., 2003. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. Brevia Neuroscience. 299, 76.

Wong, Ma-Li and Licino, Julio (2001) Research and Treatment Approaches to Depression. Nature. Rev. vol2, 343-351.

Zhang, X., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2004. Tryptophan hidroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science. 305, 217.

Zhang, X., Gainetdinov, R.R., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Burch, L.H., Williams, R.B., Schwartz, D.A., Krishnan, K.R.R., Caron, M.G., 2005. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. Neuron. 45,11-16.

Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H.J., Bondy, B., Ackenheil, M., 2004b. Regional mRNA expression of a second tryptophan hydroxylase isoform in postmortem tissue samples of two human brains. European Neuropsychopharmacology. 14, 282-284.

Table 1- Genotype distribution of associated TPH2 SNPs *rs4565946* and *rs11179000*

SNP Genotype	Patient (freq.) n=84	Control (freq.) n=79	OR (95%IC)	p value (adjustade)
rs4448731				
C/C	30(0,36)	26(0,33)	1(ref.)	0,7
C/T	30(0,36)	37(0,47)	0,6 (0,3-1,4)	0,13
T/T	24(0,28)	15(0,20)	1,3 (0,5-3,0)	0,19
rs4565946				
T/T	20 (0,24)	12 (0,15)	1(ref.)	0,16
C/C	31 (0,37)	20 (0,25)	0,93 (0,37-2,31)	0,11
C/T	33 (0,39)	47 (0,60)	0,42 (0,18-0,97)	**0,009*(0,02)**
rs11179000				
T/T	6 (0,07)	13 (0,16)	1(ref.)	0,06
A/A	49 (0,58)	30 (0,38)	3,5 (1,08-10,3)	**0,01*(0,03)**
A/T	29 (0,35)	35 (0,46)	1,75 (0,58-5,27)	0,17
rs7955501				
A/A	7(0,09)	13(0,16)	1(ref.)	0,11
A/T	40(0,48)	38(0,48)	1,9 (0,7-5,4)	0,95
T/T	37(0,44)	28(0,36)	2,4(0,8-6,9)	0,26
rs10506645				
C/C	2(0,02)	4(0,05)	1(ref.)	0,35
C/T	24(0,29)	24(0,30)	2 (0,3-11,9)	0,75
T/T	58(0,69)	50(0,65)	2,3(0,40-13,21)	0,5
rs4760820				
C/C	7(0,08)	11(0,14)	1(ref.)	0,21
C/G	35(0,42)	33(0,42)	1,7(0,5-4,9)	0,94
G/G	41(0,50)	33(0,44)	2,0(0,7-5,7)	0,36
rs1487275				
C/C	6(0,07)	2(0,03)	1(ref.)	0,17
A/C	34(0,41)	36(0,45)	0,31(0,05-1,6)	0,51
A/A	44(0,52)	41(0,52)	0,35(0,06-1,8)	0,95
rs10879357				
G/G	33(0,39)	32(0,41)	1(ref.)	0,87
A/A	9(0,11)	7(0,08)	1,2(0,41-3,7)	0,69
A/G	41(0,50)	39(0,51)	1,0(0,5-1,9)	0,93

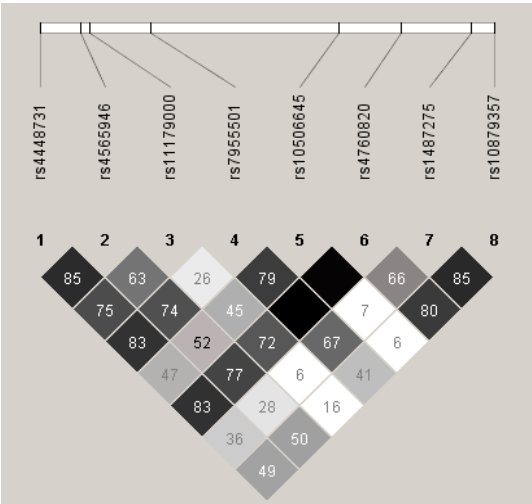
* p<0,05 (permutation 1000x)

Table 2- Allelic distribution of tagSNPs gene *TPH₂* – Unphased 3.0.13 (Dudbridge F, 2008).

tagSNP	Allele	Case (freq.)	Control (freq.)	OR (95%IC)	X^2	*P Value*
rs4448731	T	90(0,54)	89(0,56)	1(ref.)		
	C	78(0,46)	68(0,44)	1,1	0,29	0,58
rs4565946	T	73(0,44)	71(0,45)	1(ref.)		
	C	95(0,56)	87(0,55)	1,1	0,07	0,78
rs11179000	T	41(0,25)	61(0,40)	1(ref.)		
	A	127(0,75)	96(0,60)	1,9	7,8	**0,005***
rs7955501	T	54(0,32)	64(0,40)	1(ref.)		
	A	114(0,68)	94(0,60)	1,4	2,4	0,11
rs10506645	T	28(0,17)	32(0,21)	1(ref.)		
	C	140(0,83)	125(0,79)	1,3	0,79	0,37
rs4760820	G	49(0,30)	56(0,36)	1(ref.)		
	C	118(0,70)	101(0,64)	1,3	1,5	0,21
rs1487275	C	46(0,28)	40(0,26)	1(ref.)		
	A	122(0,72)	118(0,74)	0,8	0,17	0,67
rs10879357	G	108(0,65)	104(0,66)	1(ref.)		
	A	59(0,35)	53(0,34)	1,1	0,08	0,76

* p<0,05

Figure 1 – Linkage Disequilibrium between tagSNPs – Haploview 4.1



Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo