

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***Análise in silico* de novos potenciais polimorfismos genéticos de risco
em Transtornos do Humor em bancos de dados de *Microarrays***

Manuela Barbosa Rodrigues de Souza
Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Recife, janeiro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***Análise in silico* de novos potenciais polimorfismos genéticos de risco
em Transtornos do Humor em bancos de dados de *Microarrays***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas. Sob a orientação do Professor Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira.

Manuela Barbosa Rodrigues de Souza
Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Recife, janeiro de 2010

Souza, Manuela Barbosa Rodrigues de

Análise in silico de novos potenciais polimorfismos genéticos de risco em transtornos do humor em bancos de dados de Microarrays / Manuela Barbosa Rodrigues de Souza. – Recife: O Autor, 2010.

71 folhas : fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Genética 2. Bioinformática 3. Distúrbios afetivos 4. Depressão mental 5. Transtorno bipolar I. Título.

572.8

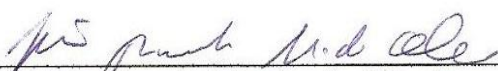
CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 051

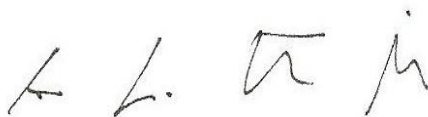
**Análise *in silico* de novos potenciais polimorfismos genéticos de risco em Transtornos do
Humor em bancos de dados de *Microarrays***

Manuela Barbosa Rodrigues de Souza

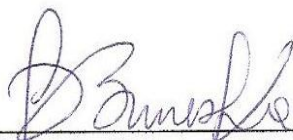
Banca Examinadora



Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira
Orientador – UFPE / Dept. Neuropsiquiatria/LIKA



Prof. Dr. Ivan Gesteira Costa filho
UFPE / Dept. CIN



Profª. Drª. Danyelly Bruneska Gondim Martins
UFPE / Dept. Bioquímica

Resumo

Os transtornos do humor compõem um grupo de doenças heterogêneas caracterizadas por alterações na esfera cognitiva das emoções, sentimentos e motivação. Dentre os transtornos do humor a Depressão Maior, a Distímia e o Transtorno Bipolar figuram como os mais prevalentes e estudados. Quanto à sua etiologia os transtornos do humor têm sido associados ao déficit de neurotransmissores como a norepinefrina, dopamina, serotonina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). As variações genéticas podem contribuir para diferenciar atividades protéicas e níveis de expressão gênica em complexos traços genéticos, como transtornos mentais. Assim, os estudos sobre polimorfismos genéticos, nas doenças psiquiátricas são de grande importância para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos e podem auxiliar no diagnóstico dos mesmos. O objetivo desse estudo é definir os principais polimorfismos envolvidos nos Transtornos do Humor, priorizando genes ligados aos sistemas GABAérgico e Glutamatérgico, através de técnicas de Bioinformática. Para obter os resultados optou-se por utilizar o software CLCbio Workbench Combined[®] versão 3.6.2., no qual estudos de *microarrays* de expressão foram usados como a única origem de genes candidatos, para revelar variações novas, a partir de sequências públicas de Expressed site tags (ESTs). A primeira etapa foi a construção do banco de dados de ESTs e recuperação dos arquivos de RNAm respectivamente a partir do Golden path of University of California Santa Cruz (UCSC) e National Center for Biotechnology Information (NCBI). Na etapa seguinte foram realizados múltiplos alinhamentos e o algoritmo usado foi o Smith-Waterman. Como resultados um total de 10402 ESTs foram alinhados, mas apenas 142 sequências de ESTs foram selecionadas depois da aplicação de parâmetros apropriados de stringência utilizados para minimizar erros de alinhamentos. A anotação revelou várias classes de variações, a maioria delas sendo deleções (158), mas também foram observadas transversões (17), transições (1), inserções (4), mutações sinônimas (33), não sinônimas (202) e Variações nas regiões 5' e 3'UTRs (55). Sabe-se que as deleções são frequentemente associadas à principais síndromes genéticas com características dismórficas. Vários estudos associam os polimorfismos genéticos de suscetibilidade transtornos de humor, exigindo o uso de técnicas em larga escala para identificar e compreender os mecanismos moleculares envolvidos neste grupo de transtornos. Estes achados levantam a possibilidade de que deleções de até 7 pares de bases estejam ligadas à fisiopatologia dos TH em genes dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico de neurotransmissor.

Palavras chave: In silico, Transtornos do Humor, Bioinformática, ESTs, Microarrays.

Abstract

Mood disorders are clinically heterogeneous and characterized by changes in emotions, feelings and motivation. Among mood disorders, major depression, dysthymia and bipolar disorder appear to be the most prevalent and studied. The etiology of mood disorders has been associated with a deficit of neurotransmitters such as norepinephrine, dopamine, serotonin, glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA). Genetic variations may help to differentiate activities and protein levels of gene expression in complex genetic traits, such as mental disorders. Thus, studies of genetic polymorphisms in psychiatric disorders are of great importance for understanding the molecular mechanisms involved and may assist in diagnosing them. The aim of this study is to define the main polymorphisms involved in mood disorders, prioritizing genes related to GABAergic and glutamatergic systems, using techniques of bioinformatics. For best results we chose to use the software CLCbio Combined Workbench® version 3.6.2. In which microarray studies of expression were used as the sole source of candidate genes, to reveal new variants, the sequences from public Expressed site tags (ESTs). The first step was the construction of the database of ESTs and recovery of files mRNA respectively from the Golden path of University of California Santa Cruz (UCSC) and National Center for Biotechnology Information, the next step were performed multiple alignments and the algorithm used was the Smith-Waterman. As a result a total of 10402 ESTs were aligned, but only 142 ESTs sequences were selected after the application of appropriate parameters of stringency used to minimize errors of alignment. The annotation revealed several classes of variations, most of them being deletions (158), but were also observed transversions (17), transitions (1), inserts (4), synonymous mutations (33), non-synonymous (202) and Variations in the 5' and 3'UTRs (55). It is known that the deletions are often associated with major genetic syndromes with dysmorphic features. Several studies have linked genetic polymorphisms in susceptibility to mood disorders, requiring the use of large-scale techniques to identify and understand the molecular mechanisms involved in this group of disorders. These findings raise the possibility that deletions of up to 7 base pairs are linked to the pathophysiology of TH genes systems neurotransmitter glutamatergic and GABAergic.

Key words: In silico, Mood disorders, Bioinformatics, ESTs, Microarrays.

Lista de Figuras

Figura 1. Atuação individual e em interação dos neurotransmissores Noradrenalina, Serotonina e Dopamina nas funções cognitivas.	1
Figura 2. Esquema mostrando as etapas metabólicas, substratos e enzimas envolvidas na reciclagem de glutamato e sua interação com o sistema GABAérgico. Adaptado de Choudary, 2005.	2
Figura 3. Representação geral dos locos cromossômicos dos genes inseridos nesse estudo.	14
Figura 4. Receptores ionotrópico de glutamato: NMDA, AMPA e Kainato. Distribuídos na membrana neuronal.	15
Figura5. Esquema de um receptor de GABA _A formando o pentâmero $\alpha_2\beta_2\gamma$.	17
Figura 6. Arquitetura de uma RNA com os três grupos de camadas.	20

Agradecimentos

A Deus por todas as bênçãos concedidas em minha vida.

A minha família, meus pais, Manoel e Lourdes, minha irmã Mariana e meu cunhado Halinson, que apesar de não estarem próximos fisicamente, estão sempre ao meu lado, acreditando e apoiando os meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, por toda confiança depositada em mim, pelo seu incentivo, apoio e paciência em contribuir com o meu crescimento não só profissional como pessoal. Especialmente por ter me oferecidos desafios acreditando que eu seria capaz de superá-los.

A minha amiga Fábila Carla Soares, por ter sido fundamental na realização desse trabalho. Confiando a mim seu projeto inicial de mestrado, que por motivos maiores ela não o realizaria, e assim me apresentando ao Prof. João Ricardo como capaz de executá-lo.

Aos companheiros e amigos de laboratório Danyllo Felipe (IC), Jose Ériton, Raquel e Roberta Lemos pelo companheirismo nos momentos de trabalho e de descontração. E em especial a Roberta, que com sua contribuição, tanto na parte técnica como com conselhos, tornou a realização do trabalho mais fácil e agradável.

Ao meu namorado, Valmir Macário filho, pelo carinho, companhia, apoio e compreensão que tem dedicado a mim na finalização do mestrado.

Aos membros da banca examinadora, por suas contribuições para o enriquecimento da pesquisa.

Ao apoio financeiro concedido pela FACEPE – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco e pela PROPESQ-UFPE.

A todos que contribuíram de alguma forma e que mesmo sem terem sido mencionados, estão presentes no meu coração.

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Introdução	1
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica.....	2
Transtornos do Humor - TH.....	6
Transtorno Depressivo Maior - TDM	7
Transtorno Distímico - TD.....	8
Transtorno Afetivo Bipolar - TAB.....	10
Fatores de risco genético associado aos TH.....	11
Busca Por Genes Associados aos TH	13
Genes dos sistemas Glutamatérgico e GABAérgico inseridos nesse estudo	13
Genes SLC1A3 e SLC1A2	14
Gene GLUL.....	14
Gene GRIA1, GRIK1, GRIK5 e GRM3	15
Genes GABRB3, GABRD e GABRA5	16
Bioinformática	19
Redes Neurais Artificiais e software PMut.....	20
Referências Bibliográficas	22
Capítulo 2 - Searching for new genetic risk factors for neuropsychiatric disorders in expression databases. <i>Journal Molecular Neurosciences</i> , 2010 Jan 19.....	7
Conclusão.....	44
Anexos	46
Resultados complementares	48
Deleções Transversões Inserções e Transições	50
Mutações sinônimas e não sinônimas	52
Mutação por mudança da matriz de leitura e códons de parada	53
Variações nas regiões UTRs	54
Análise do percentual GC	54
Predições das variações e associação com doença.....	55
SHORT COMMUNICATION - Chapter entitled: “Ethnicity, History and Mental Health in Brazil” by Oliveira JMR and Souza MBR, has been accepted for publication in the book “ethnicity: Cultural Roles, Spiritual Practices and Social Challenges”. The book is currently in the early stages of publication and is estimated to be published in 2010 1 st quarter.....	58
Ethnicity, History and Mental Health in Brazil	60
Resumo em congresso.....	67
55º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA.....	69
Searching for new genetic risk factors for neuropsychiatric disorders in expression databases ...	69
SINATER 2009.....	70
Searching for new genetic risk factors for neuropsychiatric disorders in expression databases ...	70
SINATER 2009.....	71
Population distribution of the 5-HTTLPR polymorphism compared to a World Wide Web database of subjective perception of happiness	71

Introdução

Os Transtornos do Humor (TH) caracterizam-se por alterações patológicas do humor que pode variar desde uma extrema euforia até uma grave depressão (Classificação Internacional das Doenças, 10ª Revisão - CID-10). Estes transtornos geram elevado impacto na sociedade a nível mundial, afetam a qualidade de vida dos portadores e são responsáveis por elevadas taxas de suicídio.

Em relação à sua etiologia os transtornos de humor surgem a partir da interação complexa de múltiplos genes e fatores estressores ambientais, aos quais estamos expostos diariamente e ao longo da nossa vida, e dificilmente são explicados por um único componente genético ou ambiental (KAPLAN; SADOCK, 2007).

A manifestação fenotípica da doença inclui não só mudanças do humor, como também uma gama de distúrbios do sistema cognitivo, motor, endócrino, autonomo e alterações do sono (SANACORA *et al.*, 2008). Sendo associados ao déficit de neurotransmissores como a norepinefrina, dopamina, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato (SHI *et al.*, 2008; HOLDEN, 2003; KRONFOLD; REMICK, 2000).

Por definição, neurotransmissores correspondem a substâncias contidas nos neurônios e por ele secretadas de maneira específica numa sinapse para transmitir informações ao neurônio pós-sináptico ou a um órgão efector, num processo que converte a mensagem química em um impulso elétrico.

O conhecimento da estrutura química e do modo de ação dos neurotransmissores possibilita a compreensão e o tratamento de diversas doenças (NATHANSON, 1977). A figura 1 mostra os neurotransmissores noradrenalina, serotonina e dopamina envolvidos em algumas funções cognitivas.

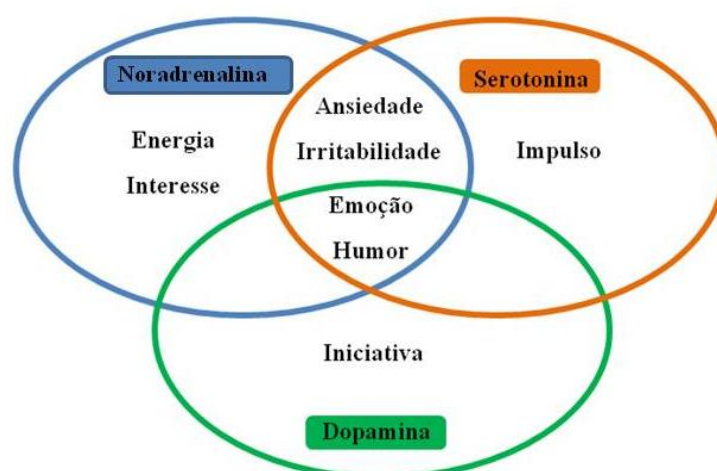


Figura 1. Envolvimento individual e em conjunto dos neurotransmissores Noradrenalina, Serotonina e Dopamina em algumas funções cognitivas.

Alteração nos sistemas de neurotransmissores é uma das hipóteses mais aceitas em relação à etiologia dos TH. O sistema monoaminérgico (serotonérgico, noradrenérgico e dopaminérgico) tem recebido maior atenção nos estudos neurobiológicos dos transtornos de humor. Com base na hipótese de disfunção dos sistemas monoaminérgicos cerebrais na doença bipolar, um dos primeiros genes candidato investigado foi à tirosina hidroxilase - TYH, uma enzima que limita o ritmo de síntese das monoaminas.

Embora a maioria dos estudos concentrem-se no sistema serotoninérgico, mostrando possível desregulação nesse sistema, e em menor medida no sistema noradrenérgico (MANN *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 1999; ORDWAY, 1997; KLIMEK *et al.*, 1997; MEANA *et al.*, 1992; ROY *et al.*, 1989; BOURNE *et al.*, 1968), também há evidências de alterações de outros sistemas de neurotransmissores, como dopaminérgico (ZALSMAN *et al.*, 2004; BERQUIST *et al.*, 2002; BOWDEN *et al.*, 1997; PARE *et al.*, 1969), glutamatérgico (SEQUEIRA *et al.*, 2009; SANACORA *et al.*, 2008; CHOUDARY *et al.*, 2005; NOWAK *et al.*, 1995; HOLEMANS *et al.*, 1993; CHEETHAM *et al.*, 1988) e GABAérgico (SEQUEIRA *et al.*, 2009; SANACORA *et al.*, 2004; BRAMBILLA *et al.*, 2003; KRISTAL *et al.*, 2002; MANJI *et al.*, 2001).

Recentemente, o papel dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico vem sendo investigado no envolvimento fisiopatologia e no tratamento dos distúrbios de humor.

Elevados níveis de glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) tem sido observado no córtex cerebral de pacientes com distúrbios do humor (SKOLNICK, 1996). As provas disponíveis sugerem que alterações em ambos os sistemas de neurotransmissores podem contribuir com a fisiopatologia dos TH (SEQUEIRA, 2009; CRYAN; KAUPMANN, 2005; MERALI *et al.* 2004; KRYSTAL *et al.* 2002).

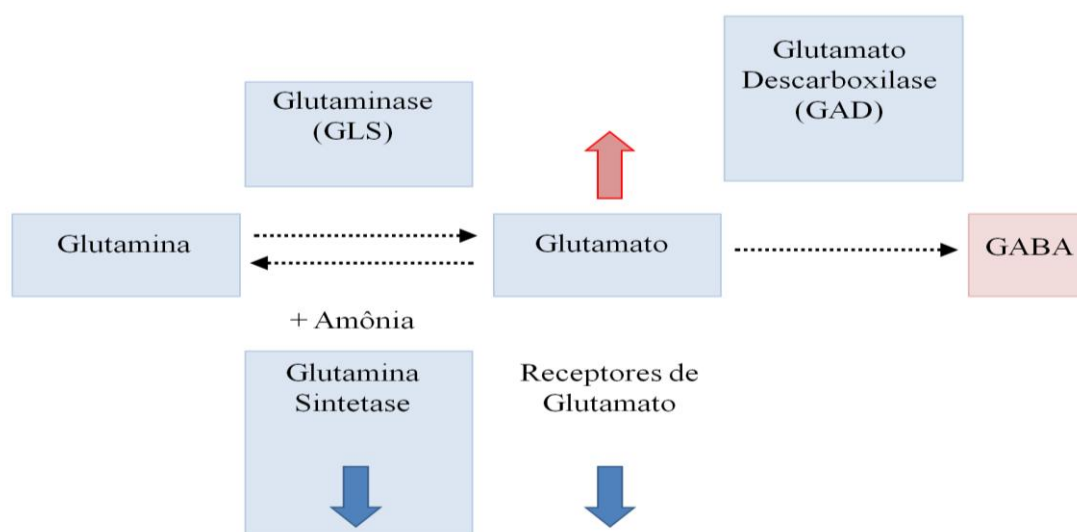


Figura 2. Esquema mostrando as etapas metabólicas, substratos e enzimas envolvidas na reciclagem de glutamato e sua interação com o sistema GABAérgico. As setas representam os níveis dos componentes envolvidos no ciclo. Adaptado Choudary, 2005.

Esta dissertação tem como principal objetivo identificar novos polimorfismos envolvidos nos Transtornos do Humor, priorizando genes ligados aos sistemas de neurotransmissor GABAérgico e Glutamatérgico, através de técnicas de Bioinformática. Utilizando ferramentas disponíveis na internet, para a identificação, classificação e validação dos polimorfismos a partir de banco de dados de etiquetas de sequências expressa (ESTs).

Capítulo 1 - **Revisão Bibliográfica**

Transtornos do Humor - TH

Os transtornos do humor (TH) compõem um grupo de doenças heterogêneas caracterizadas por alterações na esfera cognitiva das emoções, sentimentos e motivação. Sendo os mais prevalentes e estudados a Depressão Maior, a Distímia e o Transtorno Afetivo Bipolar (MORENO; MORENO, 1995).

Os principais critérios para o diagnóstico dos transtornos psiquiátricos são aqueles organizados pela OMS (Classificação Internacional das Doenças, 10ª Revisão - CID-10, 1993) e pela Associação Americana de Psiquiatria (Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 4ª Edição Revisada – DSM-IV TR, 2002).

Os TH são parcialmente divididos em Transtorno Depressivo Unipolar (UP) e Transtornos Bipolares (TB). A presença de um único episódio maníaco já é suficiente para classificar o Transtorno como Afetivo Bipolar, diferenciando-o de Depressão isoladamente. São diagnosticados a partir de sintomas e sinais característicos, que vão desde uma depressão profunda acompanhada por sintomas psicóticos, passando por estados de depressão moderada e irritabilidade, até estados eufóricos brandos ou de mania, também acompanhado por sintomas psicóticos (DSM-IV TR, 2002).

Cerca de 450 milhões de pessoas sofrem de transtornos mentais e do comportamento, o que representa cinco das dez principais causas de morbidade em todo mundo. O impacto desses distúrbios é evidenciado por representarem quatro das dez principais causas de incapacitação. Além disso, estimativas indicam que a porcentagem da morbidade mundial atribuível aos transtornos mentais aumentará para 15% até o ano de 2020, tornando-se assim a segunda das principais causas de incapacidade em todo o mundo (Organização Mundial de Saúde, 2005).

A Depressão e o Transtorno Bipolar, por exemplo, são enfermidades que afeta em torno de 17% da população, cerca de 340 milhões de pessoas em todo o mundo (SOUGEY *et al.*, 2003). A prevalência desta patologia é maior para as mulheres (5 a 20%) do que para os homens (3 a 12%) (PRYCE *et al.*, 2005).

Para Galvis (1999), esses índices estão relacionados ao aumento da expectativa de vida, elevação do estresse, às crises familiares e à falta de suporte social.

Estudos demonstram que o estresse crônico, definido como um excesso de eventos negativos por pelo menos seis meses pode gerar depressão (BLACKBURN-MUNRO; BLACKBURN-MUNRO, 2001).

Embora a maioria dos pacientes com transtorno de humor receba algum benefício com o tratamento, um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes de

transtorno de humor tem sido a compreensão limitada da sua fisiopatologia (RUSH *et al*, 2006; TRIVED *et al*, 2006).

Transtorno Depressivo Maior - TDM

O transtorno de humor depressivo maior (TDM) caracteriza-se por um ou mais episódios depressivos propriamente ditos, isto é, pelo menos duas semanas de sintomas de humor polarizado para a depressão ou perda de interesse, sem histórias de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos; acompanhados por no mínimo quatro dos seguintes sintomas adicionais (DSM-IV TR, 2002):

- Humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias.
- Diminuição do interesse ou prazer em todas ou em parte das atividades diárias.
- Perda ou ganho significativo de peso, sem estar de dieta; diminuição ou aumento do apetite.
- Insônia ou hipersonia.
- Agitação ou retardo psicomotor.
- Fadiga ou perda de energia.
- Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada.
- Capacidade de pensar e concentração diminuída.
- Indecisão.
- Pensamento de morte, ideação suicida recorrente, tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.

Ainda de acordo com o DSM-IV TR (2002), os sintomas do TDM causam sofrimento clinicamente significativo no funcionamento social ou em outras áreas na vida do indivíduo.

Segundo Moreno *et al.* (2007), a aparência do paciente deprimido é perceptível por meio da expressão facial triste, olhar melancólico ou apreensivo, testa franzida, ombros curvados e tendência ao choro. Canales (2008) cita Otto Verauguth (1911), que descreveu uma prega peculiar em forma de triângulo da pálpebra superior associada à depressão.

O TDM pode surgir de forma mais leve, ou muito grave; afetando pessoas em qualquer fase da vida, inclusive infância e adolescência e evolui de forma crônica, com taxa de recorrência mais alta nas pessoas que possuem mais de 45 anos de idade (OMS, 2005).

A diferenciação entre pacientes que têm um episódio único de TDM e pacientes com dois ou mais episódios se justifica em razão do curso incerto dos pacientes com apenas um episódio (KAPLAN; SADOCK; GREBB, 2003), uma vez que depressão maior tende à remissão e recorrência (LIMA, 1999).

No transtorno depressivo maior recorrente, o paciente tem que ter vivenciado, pelo menos, seu segundo episódio depressivo e que os diferentes episódios depressivos sejam separados por um

período mínimo de dois meses, durante o qual o paciente não teve sintomas significativos de depressão (KAPLAN; SADOCK; GREBB, 2003).

Um episódio típico não tratado tem uma duração média de seis meses. A probabilidade da ocorrência de episódios subseqüentes aumenta com o número de episódios. Após o primeiro é de 50%, após o segundo, de 70% e após o terceiro, de 90%. As chances de suicídio estão entre 10% e 15% dos casos (SOARES, 2009).

Segundo o National Comorbidity Survey (NCS) a relação mulher/homem é de 2:1, aproximadamente. O maior grupo de risco são mulheres jovens, solteiras, com filhos pequenos, e as possíveis explicações para esta predominância do sexo feminino variam desde a situação sócio-econômica até fatores hormonais (LEIBENLUFT, 1996; BURKER; REGIER, 1992).

Com relação à situação conjugal, a depressão apresenta-se mais freqüente em divorciados, do que entre solteiros e casados. Esses riscos apresentam variação de acordo com o sexo. Mulheres solteiras parecem ser menos suscetíveis à depressão do que as casadas, com os homens ocorre situação contrária. Viuvez recente e pessoas que moram sozinhas também fazem parte de grupos com maior risco à depressão (SOARES, 2009).

O TDM atinge 121 milhões de pessoas, sendo a causa de 850 mil suicídios por ano em todo o mundo e existe estimativa que esse número aumente, pois segundo a OMS em 2020 a depressão maior será a segunda causa de incapacidade no mundo, e ficando ainda as doenças isquêmicas (infartes, insuficiência coronária, acidente cerebrovascular) em primeiro lugar (OMS, 2009).

Uma pesquisa em Lundby (Suécia) mostrou uma incidência anual de depressão de 0,43% em homens e 0,76% em mulheres. Até a idade de 70 anos, a probabilidade acumulativa de um primeiro episódio de depressão foi de 27% para homens e 45% para mulheres, taxas que colocam a depressão como um dos mais importantes problemas de saúde pública (LIMA, 1999).

Existindo uma necessidade da realização de um diagnóstico precoce, que permita uma rápida intervenção terapêutica, bem como prevenção de recaídas.

Transtorno Distímico - TD

Distímia ou Transtorno Distímico (TD), é um TH de natureza depressiva crônica, não-episódica, de sintomatologia menos intensa do que nos TDM (AKISKAL, 2001; AKISKAL *et al.*, 1995; GRIFFITHS *et al.*, 2000; SERRETTI *et al.*, 1999), havendo casos onde o paciente distímico, desenvolve ainda um quadro depressivo simultaneamente, o que é denominado como depressão dupla (BELLINO, 2001).

De acordo com DSM-IV TR (2002) as características diagnósticas para o Transtorno Distímico são: humor cronicamente deprimido na maior parte do dia, na maioria dos dias por pelo menos 2 anos, em crianças e adolescente o humor pode ser irritável e a duração deve ser no mínimo

1 ano. Durante o período de humor deprimido pelo menos dois dos seguintes sintomas adicionais devem estar presentes:

- Apetite diminuído ou hiperfagia.
- Insônia ou hipersonia.
- Baixa energia ou fadiga.
- Baixa auto-estima.
- Fraca concentração ou dificuldade em tomar decisões.

Podendo existir também baixo interesse e autocrítica, onde o distímico vê a si mesmo como desinteressante ou incapaz. Durante o período de 2 anos em adultos e 1 ano em crianças e adolescentes, o intervalo livre de sintomas dificilmente dura mais que 2 meses.

Diferente do TDM, no TD apesar dos sintomas de fadiga, preocupação, alteração do sono e depressão os indivíduos conseguem atender as exigências básicas do cotidiano (CID-10).

Alguns autores caracterizam os pacientes com TD como sarcásticos, niilistas, rabugentos, exigentes e queixosos (SPANEMBERG; JURUENA, 2004).

Apesar de apresentar sintomas menos intensos que no TDM, este quadro não deve ser negligenciado por estar relacionado com intenso sofrimento pessoal, absenteísmo, incapacitação e alto custo individual, social e econômico (GOLBBERG, 1992). Klein *et al.* (2000) mostraram que ao longo do tempo indivíduos com TD experimentam um aumento cumulativo dos sintomas e mais tentativas de suicídio e internações do que pessoas com episódios depressivo maior.

TD é subdividido em precoce e tardio. Na forma precoce o início dos sintomas distímicos ocorre antes dos 21 anos de idade, esses indivíduos são mais propensos a desenvolverem TDM subseqüentes. Ocorre igualmente em ambos os sexos e frequentemente compromete o desempenho na escola e na interação social (DSM-IV TR, 2002).

A forma tardia ocorre a partir dos 21 anos (DSM-IV TR, 2002) e é mais comum em mulheres que em homens (NARDIR, 1999), sendo mais frequente em pessoas solteiras (HAYDEN; KLEIN, 2001; KLEIN *et al.*, 2000).

Estudo realizado por Bellino (2001) mostra que a forma precoce é mais prevalente que a forma tardia. Kocsis (1998) observou que embora a maioria dos casos de distímia inicie numa idade precoce, uma porcentagem significativa dos casos iniciava tardiamente, depois dos 50 anos de idade. Outros estudos, como o realizado por Devanand *et al.* (1994) descreve um início tardio acima dos 65 anos de idade.

Como todo TH, a distímia também apresenta elevada prevalência, aproximadamente 3 a 6% da população em geral (AVRICHIR; ELKIS, 2002; SERRETTI *et al.*, 1999; NARDI, 1999; AKISKAL, 1994; KELLER, 1994), sendo uma das condições mais comumente encontradas na

prática médica (SERRETTI *et al.*, 1999). Embora, tem sido sub-representada na literatura científica, com poucos dados sobre o fundo genético dos pacientes afetados (KLEIN *et al.*, 2000).

Transtorno Afetivo Bipolar - TAB

O Transtorno afetivo bipolar (TAB) é um TH cíclico, crônico e recorrente, caracterizada pela alternância dos sintomas depressivos e dos episódios ou sintomas maníacos, seguidos ou não de período de remissão dos sintomas.

Por muito tempo o TAB foi negligenciado pela saúde pública, atualmente é tratado como uma condição grave e danosa na sociedade moderna (KRELLING, 2007), sendo responsável por 5% a 15% das novas admissões psiquiátricas hospitalares mais prolongadas (MIASSO, 2006).

Segundo o DSM-IV TR (2002), o TAB pode ser classificado nos seguintes subtipos:

- Tipo I: caracterizado por um ou mais episódios maníacos com ou sem alternância de sintomas depressivos.
- Tipo II: presença (ou história) de um ou mais episódios depressivos maiores, presença (ou história) de pelo menos um episódio hipomaníaco, sem jamais existir episódio maníaco ou misto.
- Tipo SOE (sem outras especificações): compreende transtornos com características bipolares, mas que não satisfazem os critérios para qualquer TAB específico.

Na fase de mania o paciente apresenta comportamento inadequado, impulsivos, podendo trazer vários danos para si e para pessoas com as quais convive (KAPLAN *et al.*, 2003). Dentre os sinais e sintomas apresentados pelo paciente nessa fase do transtorno destacam-se: aumento da auto-estima ou grandiosidade; redução da necessidade de sono, sentindo-se descansado depois de 2 ou 3 horas de sono; fuga de idéias ou sensação de aceleração dos pensamentos; distração, sobretudo para estímulos externos irrelevantes; aumento da atividade ou agitação psicomotora; participação em atividades prazerosas, mas que apresentam algum tipo de prejuízo como fazer compras compulsivas e realizar investimentos financeiros insensatos (DSM-IV TR, 2002). Além das características trazidas no CID-10: aumento na desinibição social; comportamento precipitado, oferecendo risco ao sujeito; elevação da energia sexual ou indiscrição delas.

No que se refere à fase de depressão os sintomas são semelhantes aos do TDM, para que o diagnóstico seja efetuado são necessárias, no mínimo, duas semanas de vigência dos seguintes sintomas: humor deprimido acompanhado por incapacidade de sentir alegria, prazer ou satisfação; lentidão ou agitação psicomotora; alterações do apetite e do sono; dificuldade de concentração; e pensamentos negativos, ocorrendo ou não ideação suicida e/ou sintomas psicóticos. Mesmo nos casos mais leves há um sofrimento clinicamente significativo, com prejuízo no desempenho social ou de outras áreas importantes (DSMV-IV TR, 2002).

Enquanto alguns pacientes experimentam apenas um episódio de mania e depressão em suas vidas, mais de 95% das pessoas com TAB têm episódios recorrentes de depressão e mania ou hipomania ao longo de suas vidas (GOODWIN; JAMISON, 1990). Segundo a Associação de Psiquiatria Americana (APA - 2002), a probabilidade de ocorrência de novos episódios de depressão ou mania aumenta a cada episódio subsequente, apesar do tratamento. O que significa que as pessoas passarão mais tempo doente e menos tempo saudável à medida que o transtorno progride.

Pessoas com menos de 50 anos estão dentro de uma faixa de risco de um primeiro episódio, enquanto as que já têm o transtorno enfrentam maior risco de terem um episódio recorrente enquanto que envelhecem (KAPLAN *et al.*, 2003; STUART; LARAIA, 2001).

O TAB afeta cerca de 1,3% da população (RUSH, 2003). A prevalência ao longo da vida encontrada nos EUA para o transtorno bipolar do tipo I alcança 1%, essa mesma prevalência é encontrada na cidade de São Paulo (ANDRADE *et al.*, 2002).

Dados da OMS (2009) mostram o TAB encontra-se em sexto lugar entre as doenças de maior incapacidade mundial, respondendo por 3% de todas as doenças crônicas. Também associada a elevado índice de morbidade e mortalidade (FRANGOU *et al.* 2002).

Segundo a OMS o suicídio está entre dez principais causas de morte em todo o mundo, e uma das principais causas na faixa etária de 15 a 35 anos de idade. Cerca de 1/3 dos pacientes com TAB admitem tentativa de suicídio pelo menos uma vez durante a vida (OMS, 2009). Rihmer *et al.* (2002) mostra uma prevalência de tentativa de suicídio de 10% a 18% em indivíduos diagnosticados com TAB tipo I e uma variação de 18% a 56% em indivíduos com diagnóstico para TAB tipo II.

Fatores de risco genético associado aos TH

Em comparação a outras doenças complexas, as doenças psiquiátricas têm uma herdabilidade relativamente alta (CHAKRAVARTI; LITTLE, 2003). O envolvimento de componentes genéticos em TH é fortemente sugerido, principalmente por estudos envolvendo gêmeos (MIDDELDORP *et al.*, 2008; KENDLER *et al.*, 1993; MCGUFFIN; KATZ, 1991;), estudos com famílias (LIMA *et al.*, 2004) e estudos com adotados (LAFER; VALLADA FILHO, 1999). Além dos estudos de genética molecular, como estudos de ligação e de associação que também apontam para os TH como uma desordem de bases genéticas, envolvendo complexos mecanismos de herança (LIMA *et al.*, 2004; KELSOE *et al.*, 2001;).

Ogilvie *et al.* (1996) foram os primeiros a relatar uma associação entre um número variável de repetições em série (*variable number of tandem repeats*- VNTR) no segundo intron do gene que codifica o transportador da serotonina (5-HTT) e UP. No mesmo ano, independentemente, Collier *et*

al. (1996) não encontraram associação com UP, mas verificaram uma frequência maior de uma variante deste polimorfismo num grupo de pacientes com TAB.

Estudos de ligação realizados em pacientes com Transtorno bipolar sugeriram o envolvimento de regiões nos cromossomos X, 18, 5, 11, 4, 21 e 12 (por ordem de quantidade de estudos de ligação positivos), que, em geral, contêm genes codificadores de proteínas, ou subunidades de proteínas, relacionadas com neurotransmissores e seu funcionamento (MERIKANGAS *et al.*, 2002; SOUGEY *et al.*, 2001).

O polimorfismo do promotor da proteína transportadora da serotonina (5-HTT) tem sido um dos principais fatores de risco associados aos TH, principalmente em estudos multicêntricos e quando associados a eventos estressores (OLIVEIRA *et al.*, 2000; LESCH *et al.*, 1996). No entanto, Teste de Desequilíbrio de transmissão (TDt) não têm sido concordantes acerca do envolvimento deste polimorfismo na origem dos TH (MERIKANGAS *et al.*, 2002; SOUGEY *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1997). Mais recentemente, dois polimorfismos no gene GRIN1 e GRIN2B, que codifica a subunidade NR1 e NR2B respectivamente (subunidades de receptores ionotrópicos ativadas pelo glutamato), tem sido associado com TAB (MARTUCCI *et al.*, 2006; MUNDO, *et al.*, 2003).

Acredita-se que as variações genéticas de base única (SNPs) sejam as mais frequentes fontes de mutações que predisõem aos TH. A literatura nos revela que existem cerca de 4 milhões de SNPs já identificados no genoma humano e prevê ainda a busca de outras seqüências a serem identificadas para que se possa ter uma ampla associação com doenças do Sistema Nervoso Central (FREUDENBERG-HUA *et al.*, 2003).

Além disso, estudos de expressão constituem uma rica fonte de *Express Sequence Tags* (ESTs), sendo que cerca de 50 milhões destas seqüências estão disponíveis em bancos de dados e que podem ser utilizadas como “matéria prima” para a localização de variações no genoma (ADAMS *et al.*, 1991).

A triagem de SNPs pode ser realizada por métodos experimentais, tais como: *Microarrays* de genotipagem, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento automático, PCR em tempo real, pyrosequencing e biosensores para DNA (NISHIMURA *et al.*, 2002; PATIL., 2001; GESCHWIND *et al.*, 2000). Já os métodos de data mining e bioinformática (*In silico*), envolvendo uma grande quantidade de dados, podem indicar potenciais novos SNPs, que serão alvos de pesquisas de genotipagem (NAVRATIL *et al.*, 2008; USECHE *et al.*, 2001; PICOULT-NEWBERG *et al.*, 1999).

Recentemente, Lemos *et al.*, 2009 identificaram através de um estudo de bioinformática possíveis deleções que variaram de 1 a 10 pb nas regiões exônicas de um grupo de genes associados com doença de Alzheimer (DA) através de estudos com *microarrays* realizado por outros grupos,

fazendo estes, parte da via inflamatória e apresentando níveis de expressões alterados (COLANGELO *et al.*, 2002).

Busca Por Genes Associados aos TH

Em doenças complexas, como os TH, diversos métodos têm sido utilizados com a finalidade de identificar genes associados com os transtornos. Dentre estes métodos destacam os estudos de expressão gênica, que fazem uma análise global da expressão gênica em tecidos de indivíduos afetados e controles sadios, e ferramentas de bioinformática, que permite análise rápida e eficiente da grande quantidade de dados gerados pelos estudos de expressão.

Genes dos sistemas Glutamatérgico e GABAérgico inseridos nesse estudo

Glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) são os principais neurotransmissores excitatórios e inibitórios no sistema nervoso central sistema, respectivamente (SCHOUSBOE;WAAGEPETERSEN, 2007; DANBOLT, 2001), estudos sugerem que alterações em ambos os sistemas de neurotransmissores podem contribuir com a fisiopatologia dos TH (SANACORA *et al.*, 2008; CHOUDARY *et al.*, 2005; MERALI *et al.*, 2004; KRYSTAL *et al.*, 2002). Embora estudos levantem hipóteses do envolvimento desses neurotransmissores nos TH, os mecanismos moleculares que podem causar ou contribuir com a doença permanecem desconhecidos. Os locos cromossômico dos genes inseridos nesse estudo estão representados na figura 3.

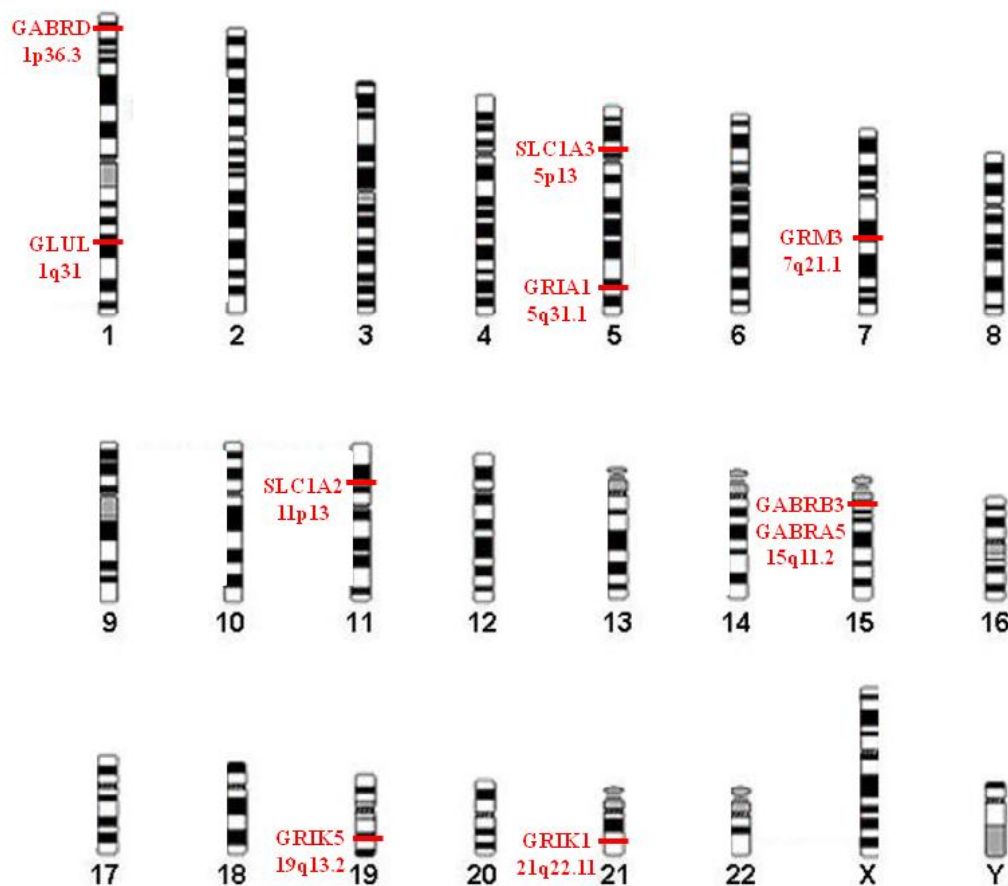


Figura 3. Representação geral dos locos cromossômicos dos genes inseridos nesse estudo, sinalizados em vermelho.

Genes SLC1A3 e SLC1A2

A captação do neurotransmissor glutamato depende de uma família de transportadores de membrana de alta afinidade (EAATs). A família EAATs é composta por cinco membros: EAAT1 (SLC1A3); EAAT2 (SLC1A2); EAAT3; EAAT4; EAAT5 (DENG *et al.*, 2004). Apresentam localização diferente a nível celular, os receptores SLC1A3 e SLC1A2 estão presentes nos astrócitos, enquanto os outros receptores dessa família são neuronais (BERRY *et al.*, 2003).

SLC1A3 está localizado na região 5p13 e SLC1A2 foi mapeado para 11p13. Mudanças nos níveis de expressão dos genes SLC1A2 e SLC1A3 em pacientes com TDM e TAB foi recentemente demonstrado (SANACORA *et al.*, 2008; CHOUDARY *et al.*, 2005), o que faz desses genes fortes candidatos a associação aos TH.

Gene GLUL

A proteína codificada pelo gene GLUL pertence à família glutamina sintetase. O ciclo glutamato-glutamina entre neurônios e astrócitos tem sido proposta como principal via de reciclagem do glutamato, que ao ser recaptado é convertido à glutamina pela ação da glutamina

sintetase, posteriormente é transportado aos neurônios e revertido a glutamato pela ação da glutaminase (DANBOLT, 2001). Localizado na região 1q31, este gene é expresso durante o início da fase fetal, desempenhando um importante papel no controle do pH do corpo através da remoção da amônia em circulação (CLANCY *et al.*,1996). Recentemente foi encontrado nível alterado na expressão de GLUL no córtex pré-frontal de suicidas portadores de TDM (SEQUEIRA *et al.*, 2009).

Gene GRIA1, GRIK1, GRIK5 e GRM3

Os receptores de glutamato medeiam maior parte da neurotransmissão excitatória no cérebro de mamíferos e são ativados em uma variedade de processos neurofisiológicos normais (SAGER *et al.*,2009) . Esses receptores são classificados em dois grupos ionotrópicos e metabotrópicos, de acordo com suas características moleculares (OZAWA *et al.*,1998).

Há três classes de receptores ionotrópico de glutamato: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) e receptores Kainato (BORTOLLO *et al.*,1999). A figura 4 ilustra a distribuição desses receptores na membrana neuronal.

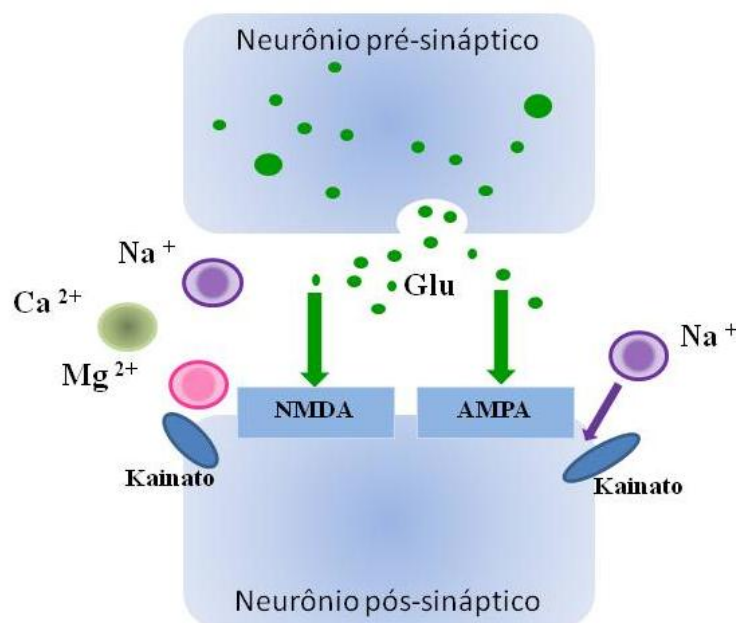


Figura 4. Receptores ionotrópico de glutamato: NMDA, AMPA e Kainato. Distribuídos na membrana neuronal.

O gene GRIA1, localizado na região 5q31.1, pertence a uma família de alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) (PEI *et al.*, 2007). Esse gene tem grande importância no controle da plasticidade sináptica (DU *et al.*, 2004), diferentes estudos mostram que uma diminuição da plasticidade sináptica pode estar associada a fisiopatologia do TAB (SHI *et al.*, 2008; CARLSON *et al.*, 2006; KEMPERMANN;KRONENBERG, 2003; DUMAN, 2002).

Receptor ionotrópico de glutamato, Kainate 1, também conhecido como GRIK1, é uma proteína que nos humanos é codificada pelo gene GRIK1 (NUTT; KANBOJ, 1994). Esse gene está localizado no cromossomo 21q22.11 (EUBANKS *et al.*, 1993). Realizando uma comparação de perfis de expressão gênica de cérebro *postmortem* de portadores de transtornos mentais, Iwamoto *et al.* 2004, mostraram uma tendência na diminuição da expressão de genes que codificam receptores, incluindo o gene GRIK1, em portadores de TAB.

O gene GRIK5, em humanos localizado na região 19q13.2, codifica o receptor ionotrópico de glutamato, Kainate 5 (SZPIRER *et al.*, 1994). Um recente estudo mostrou possível associação do gene GRIK5 a diversas desordens neuropsiquiátricas, incluindo os TH (GRATACÒS *et al.*, 2009).

Mapeado no cromossomo 7q21.1, o gene GRM3 codifica receptores de glutamato metabotrópico 3 (SCHERER *et al.*, 1996). Recentemente, Tsunoka *et al.*, 2009, encontraram uma associação entre um SNP (rs6465084) no gene GRM3 e TDM, no entanto nenhuma associação entre GRM3 e TAB.

Genes GABRB3, GABRD e GABRA5

Os receptores GABAérgicos são classificados em ionotrópicos (GABA_A) e metabotrópicos (GABA_B). Consiste em receptores transmembrana, compostos por cinco subunidades organizadas em torno de um canal iônico (Cl⁻) central, sendo esse aberto a partir de diferentes ligantes, como o neurotransmissor GABA, benzodiazepínicos, barbitúricos e esteróides anestésicos, entre outros (WEI *et al.*, 2003).

Em humanos, as subunidades dos receptores são divididas nos seguintes tipos: seis tipos de subunidades α (GABRA1, GABRA2, GABRA3, GABRA4, GABRA5 e GABRA6); três tipos de subunidades β (GABRB1, GABRB2 e GABRB3); três tipos de subunidades γ (GABRG1, GABRG2 e GABRG3); uma subunidade δ (GABRD); uma subunidade ϵ (GABRE); uma subunidade π (GABRP); e uma subunidade θ (GABRQ) (MOKRAB *et al.*, 2007).

Essas subunidades se combinam de diferentes maneiras formando os canais GABA_A. Existe um requisito mínimo de duas subunidades α e β para que seja formado um canal iônico, mas o mais comum é a união de duas subunidades α , duas β e uma γ , formando o pentâmero $\alpha_2\beta_2\gamma$ (CONNOLLY *et al.*, 1996), representado na figura 5.

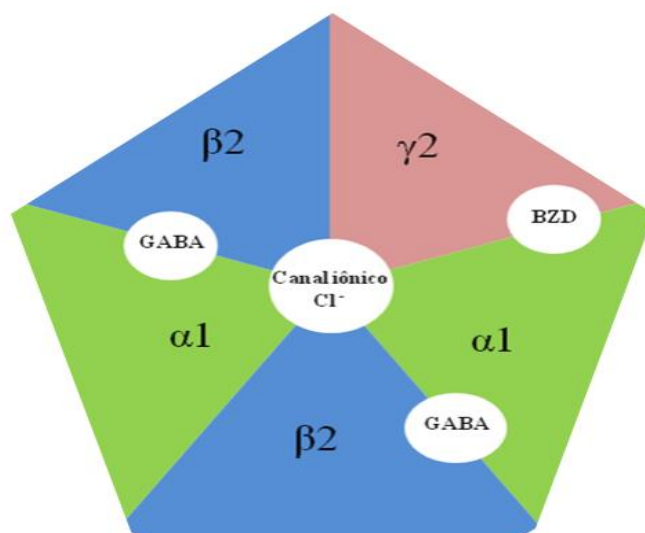


Figura5. Esquema de um receptor de GABA_A formando o pentâmero $\alpha_2\beta_2\gamma$.

O receptor do ácido gama-aminobutírico subunidade beta-3 é uma proteína codificada pelo gene GABRB3, que está localizado no cromossomo 15q11.2 (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2001), mutações nesse gene tem sido associada a patogênese de várias doenças neuropsiquiátricas como autismo, TDM, esquizofrenia e TAB (BUXBAUM *et al.*, 2002; DELONG, 2004; TORREY *et al.*, 1997).

O gene GABRD codifica o receptor GABA_A subunidade δ , encontra-se localizado na região 1p36.3 (EMBERGER *et al.*, 2000) em conjunto com o gene GABRA5, da região 15q11.2, que codifica o receptor GABA_A $\alpha 5$ tem sido associado a diversas doenças psiquiátricas, como foi observado em um recente estudo, onde variações em ambos os genes apresentam fortes evidências de risco para o TAB (CRADDOCK *et al.*, 2010).

Estudos de *Microarrays* de expressão

O sequenciamento do genoma humano foi acompanhado por avanços tecnológicos na biologia molecular. Dentre as novas tecnologias desenvolvidas destaca-se a técnica de *microarrays* de expressão.

Esta técnica permite testar simultaneamente os níveis de expressão de milhares de genes em uma única amostra, onde é possível analisar comparativamente a expressão gênica global que ocorre em diferentes tipos celulares e tecido específico, quando submetidos a uma determinada condição patológica ou experimental. São empregados na análise do conteúdo de mRNA de uma célula para revelar os padrões de expressão de RNA, ou na análise de DNA genômico, para revelar genes ausentes ou mutados.

Assim, a técnica de *microarrays* promete revolucionar a compreensão e o diagnóstico de doenças complexas por meio de um aumento substancial da capacidade analítica dos processos moleculares (DAVIS; KHOURY, 2006; SHARP *et al.*, 2006; MOCELLIN; ROSSI, 2007).

O princípio básico da tecnologia de *microarray* consiste da hibridização de RNA mensageiro, extraído de células de uma amostra de tecido de interesse, a DNA complementar (cDNA) representativo de uma numerosa classe de genes. O cDNA é imobilizado e distribuído em forma matricial sobre uma superfície apropriada. Cada gene é representado por um ou mais “spots” de cDNA na superfície da *microarray* – este esquema de endereçamento espacial é o que permite a investigação em paralelo de milhares de genes em um único experimento. O cDNA é previamente marcado com uma substância fluorescente, o que permite, após a hibridização e lavagem do excesso de material, digitalizar uma imagem da *microarray*. Os spots que se apresentam luminosos correspondem a genes que estão sendo expressos na amostra (GESCHWIND *et al.*, 2000).

Essa tecnologia usa um processo de litografia, similar ao usado na fabricação de microchips de circuitos eletrônicos, para imprimir oligonucleotídeos no substrato da *microarray*, uma base por vez; isto permite alcançar altos níveis de miniaturização e de densidade de spots (LOCKHART *et al.*, 1996).

A análise de dados de *microarrays* consiste no uso de métodos gráficos, tais como agrupamento e redução de dimensionalidade (RENCHEER, 2002), e de técnicas estatísticas, tais como testes de hipóteses (KERR; CHURCHILL, 2001) e projeto de classificadores (BRAGANETO; DOUGHERTY, 2005). Algoritmos de seleção de atributos podem encontrar automaticamente genes que melhor discriminam entre as classes presentes na amostra (KIM *et al.*, 2002); classificadores projetados usando esses genes como variáveis podem servir como ferramentas de diagnóstico/prognóstico clínico (VAN DE VIJVER *et al.*, 2001).

A eficácia de tais classificadores é avaliada através de métodos robustos de estimação de erro, que indicam o grau de discriminação atingida pelo conjunto de genes considerado (BRAGANETO; DOUGHERTY, 2004). Além disso, os genes discriminantes e classificadores assim descobertos podem levar a um entendimento básico dos mecanismos moleculares envolvidos. Desta forma, hipóteses científicas são automaticamente geradas a partir do massivo conjunto de dados de expressão gênica obtidos com as *microarrays*. É importante ressaltar que essas hipóteses devem ser validadas por meio de experimentos bioquímicos tradicionais conduzidos independentemente.

Do ponto de vista da bioinformática, os *microarrays* de DNA são fontes prolíficas de geração de dados. Um padrão chamado MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) descreve os conteúdos e o formato da informação a ser coletada em um experimento e depositada em bancos de dados (LESK, 2008).

Os principais bancos de dados públicos de *microarrays* são: o European Bioinformatics Institute-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress), o GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) e o Stanford Microarray Database-SMD (www.stanford.edu/microarray/smd).

Combinar o uso de *microarray* para evidenciar genes candidatos a serem explorados em estudo de localização de variação genética é extremamente válido. Essa metodologia já foi usada no nosso grupo para ajudar na seleção de variações inéditas de risco para DA (LEMOS, 2009).

Bioinformática

A bioinformática é uma ciência relativamente nova, emergiu em meados da década de 90 junto com o surgimento dos seqüenciadores automáticos de DNA que geraram rapidamente um grande número de seqüências a serem armazenadas e analisadas. De modo geral, a bioinformática é o desenvolvimento e a aplicação de recursos computacionais e matemática para apresentação, estocagem, organização, obtenção, análise e visualização de dados biológicos (PASTERNAK, 2007).

Uma atividade extremamente importante na Bioinformática é o alinhamento ou comparação de seqüências biológicas, onde é possível de forma rápida a agregar informações sobre uma seqüência desconhecida e compará-la com um banco de dados de seqüências conhecidas. O alinhamento de seqüências pode ser classificado em dois tipos (LESK,2008):

- Alinhamento global: encontra o melhor alinhamento de uma seqüência inteira com outra(s) seqüência(s) inteira.
- Alinhamento local: encontrar o melhor alinhamento entre algum segmento de uma seqüência com algum segmento de outra(s) seqüência(s).

O algoritmo de alinhamento global foi aplicado pela primeira vez por S. B. Needleman e C. D. Wunsch, posteriormente T. Smith e M. Waterman modificado para identificar alinhamentos locais (LESK, 2008). Atualmente os algoritmos mais utilizados para pesquisa de similaridade em banco de dados são: Smith-Waterman (LESK, 2008; SMITH; WATERMAN, 1981) e o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (LESK, 2008; TATUSOVA; MADDEN, 1999; ALTSCHUL *et al.*, 1990).

O algoritmo Smith-Waterman é o método que aperfeiçoa o alinhamento local. Levando em consideração a presença de inserções e/ou deleções e permite o alinhamento tanto de seqüências com tamanhos diferentes, quanto de seqüências com apenas alguns trechos conservados (SMITH; WATERMAN, 1981).

O algoritmo BLAST utiliza heurísticas e algoritmos de programação dinâmica. Foi desenvolvido a partir do algoritmo Smith-Waterman, com o objetivo de melhorar o tempo de execução. No entanto, não apresenta a mesma precisão que o Smith-Waterman na análise de seqüências pequenas (ALTSCHUL *et al.*, 1990), mas o seu tempo de execução é significativamente menor.

Para os estudos biológicos é fundamental que os alinhamentos indiquem uma real similaridade entre as sequências analisadas.

Na análise dos alinhamentos alguns valores são fornecidos como resultado para cada alinhamento gerado. Nessa dissertação utilizamos os valores da identidade e do *e-value* como filtros de seleção das sequências. A porcentagem de identidade quantifica o grau de similaridade entre as sequências comparadas. Enquanto o *e-value* corresponde à probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de nucleotídeos, outro alinhamento com *score* igual ou superior. Isso ocorre devido ao processo de alinhamento ser de forma aleatória, e quando o algoritmo compara fragmentos com diferentes tamanhos, sequências que não têm relação alguma podem ser alinhadas. Desta forma, o *e-value*, mais confiável tendem a zero (ALTSCHUL, 1990). No presente trabalho foram selecionadas sequências que apresentaram identidade entre 97% e 99% e *e-value* $> 10^{-20}$.

Redes Neurais Artificiais e software PMut

As redes neurais artificiais (RNAs) são modelos matemático-computacional desenvolvido para solucionar problemas através da simulação do cérebro humano. As redes neurais possuem nós ou unidades de processamento simples que calculam determinadas funções matemáticas. Essas unidades são a simulação dos neurônios, encontram-se dispostas em uma ou mais camadas e são interligadas por um grande número de conexões, nas quais recebem e enviam informações. As camadas são classificadas em três grupos: a camada de entrada, em que as unidades recebem a informação que será processada, a camada(s) intermediária(s), onde é feito processamento das informações, e a camada de saída, que conclui e apresenta o resultado final (BRAGA, *et al.*, 2000). A figura 3 apresenta uma arquitetura de uma RNA com os três grupos de camadas.

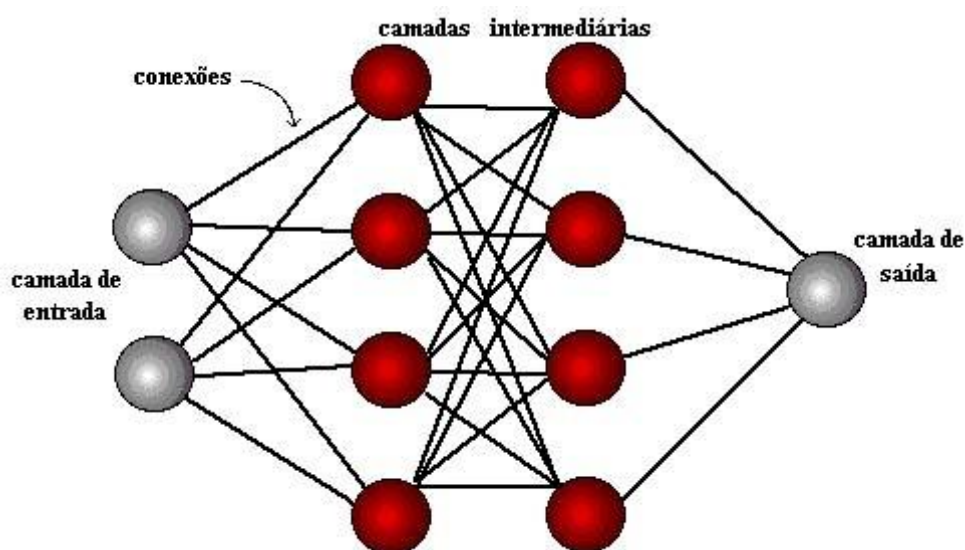


Figura 6. Arquitetura de uma RNA com os três grupos de camadas.

As RNA podem ser aplicadas para resolver uma grande quantidade de problemas. Com relação à biologia molecular, um bom exemplo de aplicação são softwares de predição de mutações associadas à doença, como o software PMut.

PMUT é um software disponível na internet (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) que visa à predição rápida e precisa da associação de um polimorfismo de aminoácido único (SAP) e um caráter patológico. Em especial para responder à seguinte pergunta: *Dada uma mutação em um local específico em uma sequência de aminoácidos, podemos dizer se ela pode ser patológica (isto é, que pode levar a doença para o portador) ou neutra (sem efeito sobre a saúde do portador).*

Este software é baseado no uso de RNA, treinada com um banco de dados de mutações neutras e mutações patológicas. A taxa de acerto é de 83,5% (FERRER-COSTA *et al.*, 2005). Sendo considerado um valor vantajoso quando comparado com os valores de outros programas que realizam a mesma função, como o SIFT (NG; HENIKOF, 2001) e POLYPHEN (SUNYAEV *et al.*, 2001) que exibem uma taxa de acerto de 70,3% e 73,5% respectivamente. Além disso, o PMut também possui um índice de confiabilidade (variando entre 0 e 9) que pode ser utilizado para manter apenas as melhores previsões (aqueles com índice de confiabilidade acima de 5) (FERRER-COSTA *et al.*, 2004).

Referências Bibliográficas

- ADAMS, M. D. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome Project. *Science*, v.252, n. 5013, p. 1651-1656, 1991.
- AKISKAL, H.S. Dysthymia and cyclothymia in psychiatric practice a century after Kraepelin. *J Affect Disord*, v. 62, p. 17-31, 2001.
- AKISKAL, H.A. et al. Dysthymia in clinical practice. *Br J Psychiatry*, v. 166, p.174-83, 1995.
- AKISKAL, H.S. Dysthymia: clinical and external validity. *Acta Psychiatr Scand*, v. 89, p. 19-23, 1994. suppl 383.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p.403-410, 1990.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Practice Guideline for the Treatment of Patients with Bipolar Disorder (Revision). *Am. J. Psychiatry*, v.159, (Suppl. 4), p. 1-50, 2002.
- ANDRADE, L. et al. - Prevalence of ICD-10 Mental Disorders in a Catchment a Area in the City of São Paulo, Brazil. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, v. 37, n. 7, p. 316-325, 2002.
- AVRICHIR, B.S.; ELKIS, H. Prevalence and underrecognition of dysthymia among psychiatric outpatients in São Paulo, Brazil. *J Affect Disord*, v. 69, p. 193-9, 2002.
- BELLINO, S. of Dysthymia and Age. *Psychiatry Reseach*, v. 130, p. 219-28, 2001.
- BERGQUIST. J. et al. Suicideattempters having immunoglobulin G with affinity for dopamine in cerebrospinal fluid. *Eur Neuropsychopharmacol* v.12, p. 153–158, 2002.
- BERRY, N.; JOBANPUTRA, V.; PAL, H. Molecular genetics of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatr Neurosci*. v.28, p. 415-429, 2003.
- BLACKBURN-MUNRO, G.; BLACKBURN-MUNRO, R.E. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? *J Neuroendocrinol* v.13, p.1009-1023, 2001.
- BORTOLOTTTO, Z.A. et al. Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* v. 402, p. 297-301, 1999.
- BOURNE, H.R. et al. Noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, and 5-hydroxyindoleacetic acid in hindbrains of suicidal patients. *Lancet* v.2, p. 805–808, 1968.
- BOWDEN, C. et al. Dopamine D1 and D2 receptor binding sites in brain samples from depressed suicides and controls. *Brain Res* v.752, p. 227–233, 1997.
- BRAGA, A.P.; CARVALHO A.C.P.L.F.; LUDERMIR T. B. Redes Neurais Artificiais: teoria e aplicações. Livros Técnicos e Científicos (LTC), 2000.
- BRAGA-NETO, U.M.; DOUGHERTY, E.R. Bolstered error estimation. *Pattern Recognition* v. 37, p.1267–1281. 2004.

BRAGA-NETO, U.M.; DOUGHERTY, E.R. Classification. In GENOMIC SIGNAL PROCESSING AND STATISTICS. EURASIP Book series on Signal Processing and Communication, Hindawi Publishing Corporation. 2005.

BRAMBILLA, P. et al. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* v.8, p. 721–737, 2003.

BURKER, J. D.; REGIER, D. A. Epidemiologia dos Transtornos Mentais. In: TALBOTT, J.; HALES, R.; YUDOFKY, S. e cols. Tratado de Psiquiatria. Porto Alegre, Artes Médicas, p.51-67, 1992.

BUXBAUM, J.D. et al. Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol Psychiatry*. v.7, n. 3, p. 311-316, 2002.

CANALES, J.Z. Fisioterapia em Transtornos Depressivos Maior: avaliação da postura e imagem corporal. 2008. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo.

CARLSON, P.J. et al. Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets. *NeuroRx* v.3, p. 22–41, 2006.

CHAKRAVARTI, A.; LITTLE, P. Nature, nurture and human disease. *Nature* v. 421, p. 412-414, 2003.

CHEETHAM, S.C. et al. BrainGABAA/benzodiazepine binding sites and glutamic acid decarboxylase activity in depressed suicide victims. *Brain Res* v. 460, p. 114–123, 1988.

CHOUDARY, P.V. et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 102, p. 15653–15658, 2005.

CID-10 - *Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento*. Organização Mundial de Saúde. 10. ed. – Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.

CLANCY, K.P. et al. Localization of the L-glutamine synthetase gene to chromosome 1q23. *Genomics*. v. 38, n.3, p. 418-420, 1996.

COLANGELO, V. et al. Gene Expression Profiling of 12633 Genes in Alzheimer Hippocampal CA1: Transcription and Neurotrophic Factor Down-Regulation and Up-Regulation of Apoptotic and Pro-Inflammatory Signaling. *Journal of Neuroscience Research*, v.70 p. 462–473. 2002.

COLLIER, D.A. et al. Susceptibility to Bipolar Affective Disorder and Unipolar Depression is Influenced by Allelic Variation of Functional Serotonin Transporter Expression. *Mol. Psychiatry* v. 1, n. 6, p. 453-460, 1996.

CONNOLLY, C.N. et al. Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem*. v.271, n. 1, p.89-96, 1996.

CRADDOCK, N. et al. Strong genetic evidence for a selective influence of GABAA receptors on a component of the bipolar disorder phenotype. *Mol Psychiatry*. v.15, n.2, p.146-153, 2010.

DANBOLT, N.C. The glutamate uptake. Prog. In Neurobiol, v.65, p. 1-105, 2001.

- DAVIS, R.L.; KHOURY, M.J. A public health approach to pharmacogenomics and gene-based diagnostic tests. *Pharmacogenomics*. v.7, n.3, p.331-337, 2006.
- DELONG, R. Autism and familial major mood disorder: are they related? *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. v. 16, n.2, p.199-213, 2004.
- DENG, X. et al. Association study of polymorphisms in the excitatory amino acid transporter 2 gene (*SLC1A2*) with schizophrenia. *BMC Psychiatry*. v.4, p. 1-6, 2004.
- DEVANAND, D.P. et al. Is dysthymia a different disorder in the elderly? *Am. J. Psychiat*, v. 151, p. 1592–1599, 1994.
- DSM-IV-TR – *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. Associação Psiquiátrica Americana. 4. Ed. rev. Porto Alegre: Artes médicas, 2002.
- DU, J. et al. Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: the role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *J Neurosci*. v. 24, p. 6578–6589, 2004.
- DUMAN, R.S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry* 17 Suppl 3: S306–S310, 2002.
- EMBERGER, W. et al. Assignment of the human GABAA receptor delta-subunit gene (*GABRD*) to chromosome band 1p36.3 distal to marker NIB1364 by radiation hybrid mapping. *Cytogenic and Genome Research* v. 89, p. 281-282, 2002
- EUBANKS, J.H. et al. The gene encoding the glutamate receptor subunit GluR5 is located on human chromosome 21q21.1-22.1 in the vicinity of the gene for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 90, n.1, p. 178–182, 1993.
- FRANGO S. et al. The Maudsley Bipolar Disorder Project: brain structural changes in bipolar 1 disorder. *Bipolar Disord*. v. 4, p. 123-124, 2002.
- FERRER-COSTA, C.; OROZCO, M.; DE LACRUZ, X. Sequence-based prediction of pathological mutations. *Proteins*. v. 57,p. 811-819, 2004.
- FERRER-COSTA, C.; OROZCO, M.; DE LACRUZ, X. Use of bioinformatics tools for the annotation of disease-associated mutations in animal models. *Proteins*. v.61, n.4, p. 878-887, 2005.
- FREUDENBERG-HUA Y. et al. Single Nucleotide Variation Analysis in 65 Candidate Genes for CNS Disorders in a Representative Sample of the European Population *Genome Research* v.13, p. 2271–2276, 2003.
- GALVIS, T. Y. Epidemiologia de los trastornos psiquiátricos: estudio nacional Colômbia. *Rev. Electrônica Psiquiatria*, v.3, n.4, 1999. Disponível em: <http://www.intersalud.es>. Acesso em 12 abr. 2008.
- GESCHWIND, D.H.; LOGINOV, M.; STERN, J.M. Identification of a locus on chromosome 14q for idiopathic basal ganglia calcification (Fahr disease). *Am J Hum Genet*, v. 65, p. 764-772, 1999.
- GOLDBERG. D.; HUXLEY, P. Common mental disorders. A bio-social model. London: Tavistock/Routledge; 1992.

- GOODWIN, F.; JAMISON, K. Maniac-depressive illness. New York: Oxford University Press, 1990.
- GRATACÒS, M. et al. Identification of new putative susceptibility genes for several psychiatric disorders by association analysis of regulatory and non-synonymous SNPs of 306 genes involved in neurotransmission and neurodevelopment. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* v.150B, n.6, p.808-816, 2009.
- GRIFFITHS, J. et al. Dysthymia: a review of pharmacological and behavioral factors. *Mol Psychiatry*, v. 5, p. 242-61, 2000.
- HAYDEN, E.P.; KLEIN, D.N. Outcome of dysthymic disorder at 5-year follow-up: the effect of familial psychopathology, early adversity, personality, comorbidity, and chronic stress. *Am J Psychiatry*, v. 158, p. 1864-70, 2001.
- HOLDEN, C. Future brightening for depression treatments. *Science*, v. 302, p. 810-813, 2003.
- HOLEMANS, S. et al. NMDA glutamatergic receptors, labelled with [3H]MK-801, in brain samples from drug-free depressed suicides. *Brain Res* v.616, p. 138–143, 1993.
- IWAMOTO, K. et al. Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol Psychiatry*. v.9 ,n.4, p.406-416, 2004.
- KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J.; GREBB, J. A. Compêndio de psiquiatria: ciências do comportamento e psiquiatria clínica. 7ª ed. Porto alegre: Artes Médicas, 2003.
- KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J. Compêndio de Psiquiatria. 9ª ed. Porto Alegre: Art médica, 2007.
- KELLER, M.B. Course, outcome and impact on the community. *Acta Psychiatr Scand*, v. 89, p. 24-34, 1994. suppl 383.
- KELSOE, J.R. et al. A genome survey indicates a possible susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 22. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA* v. 98, p. 585-590, 2001.
- KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* v. 54, p. 499–503, 2003.
- KENDLER, K.S. et al. A Pilot Swedish Twin Study of Affective Illness, Including Hospital-and-population- Ascertained subsamples. *Arch. Gen. Psychiatry* v.50, p. 699-706, 1993.
- KERR, M.K.; CHURCHILL, G.A. Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics*, v. 2, p.183-201, 2001.
- KIM, S. et al. Identification of Combination Gene Sets for Glioma Classification. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 1, p.1229-1236, 2002.
- KLEIN, D.N. et al. Five-year course and outcome of dysthymic disorder: a prospective, naturalistic follow-up study. *Am J Psychiatry*, v. 157, p.931–939, 2000.
- KLIMEK, V. et al. Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J Neurosci* v.17, p.8451–8458, 1997.

- KOCSIS, J.H. Geriatric dysthymia. *J. Clin. Psychiat*, v. 59, p. 13–15, 1998. suppl 10
- KRELLING, R. Investigação de genes candidatos para psicoses funcionais: estudo caso-controle com mães e crianças (população de alto risco). 2007. 199 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- KRONFOL, Z.; REMICK, D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, v.157, n. 5, p. 683-694, May 2000. Review.
- KRYSTAL, J.H. et al. Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood stabilizing treatments. *Mol Psychiatry* 7 Suppl 1: S71–S80, 2002.
- LAFER, B.; VALLADA FILHO, H. P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos *Rev Bras Psiquiatr*, v. 21, 1999.
- LEIBENLUFT, E. Women with bipolar illness: clinical and research. *Am J Psychiatry*, v. 153, p. 163-173, 1996.
- LEMOES, R.R. Análise *in silico* de novos potenciais polimorfismos genéticos de risco na Doença de Alzheimer em bancos de dados de *Microarrays*. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco.
- LESK, A.M. Introdução à bioinformática. In: Organização e Evolução de Genomas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 2, p.87 -132.
- LIMA, M. S. Epidemiologia e impacto social. *Rev. Bras. Psiquiatr*. v. 21, p. 01-05, 1999. suppl.1
- LIMA, I.V.M.; SOUGEY, E.B.; VALLADA FILHO, H.P. Genética dos transtornos afetivos. *Revista Psiquiatria Clínica* v.31, n.1, p. 34-39, 2004.
- LOCKHART, D.J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, v. 14, p.1675–1680, 1996.
- MCGUFFIN, P.; KATZ, R. Nature, Nurture and Depression: A Twin Study. *Psychological Med.* v.21, p. 239-45, 1991.
- MANJI, H.K.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* v.7, p. 541–547, 2001.
- MANN, J.J.; BRENT, D.A.; ARANGO, V. The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacol* v. 24, p. 467–477, 2001.
- MEANA J.J., BARTUREN F., GARCIA-SEVILLA J.A. Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biol Psychiatry* v.31, p. 471–490, 1992.
- MARTUCCI, L. et al. n-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit gene GRIN2B in schizophrenia and bipolar disorder: polymorphisms and RNA levels. *Schizophr Res* v. 84, p. 214-221, 2006.
- MERALI, Z. et al. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J. Neurosci.* v. 24, p. 1478–1485, 2004.

- MERIKANGAS, K.R. et al. Future of genetics of mood disorders research *Biol Psychiatry*, v. 52, n. 6, p. 457-77, 2002.
- MIASSO, A.I. “ENTRE A CRUZ E A ESPADA”: o significado da terapêutica medicamentosa para a pessoa com transtorno afetivo bipolar, em sua perspectiva e na de seu familiar. 2006. 261 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- MIDDELDORP, C. M. et al. I. Life events, anxious depression and personality: a prospective and genetic study. *Psychological Medicine*, v. 38, p. 1557–1565, 2008.
- MOCELLIN, S.; ROSSI, C. R. Principles of gene microarray data analysis. *Adv Exp Med Biol*. v.593, p.19-30, 2007.
- MOKRAB, Y. et al. Exploring ligand recognition and ion flow in comparative models of the human GABA type A receptor. *J Mol Graph Model*. v. 26, n.4, p. 760-774, 2007.
- MORENO D.H., DIAS R.S., MORENO R.A. *Psiquiatria básica*. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- MORENO, R.A. et al. *Psiquiatria Básica*. Porto Alegre: Artes Médicas, cap. 8. p. 136-165, 1995.
- MUNDO, E. et al. Evidence that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1) confers susceptibility to bipolar disorder. *Mol. Psychiatry*, v.8, p. 241-245, 2003.
- NARDI, A.E. Estudo epidemiológico em distímia. *J Bras Med*, v. 77, n. 1, p. 85-96, 1999.
- NATHANSON, J.A.; GREENGARD, P. *Scientific American*, 1977.
- NAVRATIL, V. et al. DigiPINS: A database for vertebrate exonic single nucleotide polymorphisms and its application to cancer association studies. *Biochimie*, v. 90, p.563-569, 2008.
- NG, P.C.; HENIKOFF, S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. v. 31, n. 13, p.3812-3814, 2003.
- NOWAK, G.; ORDWAY, G.A.; PAUL, I.A. Alterations in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex in the frontal cortex of suicide victims. *Brain Res* v.675, p. 157–164, 1995.
- NUTT, S.L.; KAMBOJ, R.K. RNA editing of human kainate receptor subunits. *Neuroreport*. v.5, n. 18, p. 2625-2629, 1994.
- OGILVIE, A.D. et al. Polymorphism in Serotonin Transporter Gene Associated with Susceptibility to Major Depression. *Lancet* v. 347, p. 731-733, 1996.
- ORDWAY, G.A. Pathophysiology of the locus coeruleus in suicide. *Ann N Y Acad Sci* v.836, p. 233–252, 1997.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), *Mental health atlas*, Genebra, 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), *Depression*, Genebra, 2009.
- Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/>
- Acesso em: 24, fev., 2009.

- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* v. 54, p. 581-618, 1998.
- PAPADIMITRIOU, G.N. et al. GABA-A receptor beta3 and alpha5 subunit gene cluster on chromosome 15q11-q13 and bipolar disorder: a genetic association study. *Am J Med Genet.* v.105, n.4, p.317-320, 2001.
- PARE, C.M.B. et al. 5-hydroxytryptamine, noradrenaline, and dopamine in brainstem, hypothalamus, and caudate nucleus of controls and patients committing suicide by coal-gas poisoning. *Lancet* v. 2, p. 133–135, 1969.
- PASTERNAK, J. J. Uma introdução à genética molecular humana: Mecanismos das doenças hereditárias. 2 ed. Guanabara koogan, 2007. cap. 8, p.149 -168.
- PEI, W. et al. Receptor occupancy and channel-opening kinetics: a study of GLUR1 L497Y AMPA receptor. *J Biol Chem.* v.282, n. 31, p. 22731-22736, 2007.
- PICOULT-NEWBERG, L. et al. Mining SNPs from EST databases. *Genome Res*, v 9, p.167-74, 1999.
- PRYCE, C.R. et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 29, p. 649-674, 2005.
- RENCHE, A.C. Methods of Multivariate Analysis. Wiley New York. 2002.
- RIHMER, Z.; BELSO, N.; KISS, K. Strategies for suicide prevention. *Curr. Opin Psychiatry* v.15, p. 83-87, 2002.
- ROY, A. et al. Suicidal behavior in depression: relationship to noradrenergic function. *Biol Psychiatry* v.25, p. 341–350, 1989.
- RUSH, A.J. et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am. J. Psychiatry*, v. 163, p.1905-1971, 2006.
- SAGER, C. et al. C-terminal domains of transmembrane alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptor regulatory proteins not only facilitate trafficking but are major modulators of AMPA receptor function. *J Biol Chem.* v.284, n. 47, p. 32413-32424, 2009.
- SANACORA, .G. et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov.* v. 7, p. 426-437. 2008
- SANACORA, G. et al. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* v.61, p. 705–713, 2004.
- SCHERER, S.W. et al. Localization of two metabotropic glutamate receptor genes, GRM3 and GRM8, to human chromosome 7q. *Genomics.* v. 31, n. 2, p. 230-233, 1996.
- SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN H.S. GABA: homeostatic and pharmacological aspects. *Prog Brain Res* v.160, p. 9-19, 2007.

- SEQUEIRA, A. et al. Global brain gene expression analysis links glutamatergic and gabaergic alterations to suicide and major depression. *PLoS One*. v. 4, p. 65-85, 2009.
- SERRETTI, A. et al. Delineating psychopathologic clusters within dysthymia: a study of 512 outpatients without major depression. *J Affect Disord*, v. 56, p. 17-25, 1999.
- SHI, J. et al. Neurotransmission and bipolar disorder: a systematic family-based association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. v.147B, n.7, p.1270-1277, 2008.
- SHARP, F. R. et al. The future of genomic profiling of neurological diseases using blood. *Arch Neurol*. v.63, n.11, p. 1529-1536, 2006.
- SMITH, T. F.; WATERMAN, M. S. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, v. 147, p. 195-197, 1981.
- SOARES, F.C.S. Influência dos eventos de vida estressantes em grupos com predisposição genética para Transtornos de Humor. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Neuropsiquiatria e Ciências do comportamento) – Universidade Federal de Pernambuco.
- SOUGEY, E.B.; PETRIBU K.C.L. Depressão. In: Everton Botelho. (Org.). *Condutas em Clínica Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro, v. 1, p. 16-32, 2003.
- SPANEMBERG, L.; JURUENA, M.F. Distímia: características históricas e nosológicas e sua relação com transtorno depressivo maior. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul*, Porto Alegre, v. 26, n. 3, p. 300-11, 2004.
- STUART, G. W.; LARAIA, M. T. *Enfermagem psiquiátrica: princípios e prática*. Tradução Dayse Batista. 6ª ed. Porto alegre: Artes Médicas, 2001. 958p.
- SUNYAEV, S. et al. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* v.10, p. 591-597, 2001.
- SZPIRER, C. et al. The genes encoding the glutamate receptor subunits KA1 and KA2 (GRIK4 and GRIK5) are located on separate chromosomes in human, mouse, and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.91, n.25, p.11849-11853, 1994.
- TATUSOVA, A.; MADDEN, T. L. Blast 2 sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *Microbiology Letters*, v. 174, p.247-250, 1999.
- TORREY, E.F. et al. Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. *Schizophr Res*. v.28, n.1, p.1-38, 1997.
- TRIVEDI, M.H. et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am. J. Psychiatry*, v.163, p. 28-40, 2006.
- TSUNOKA, T. et al. Association analysis of Group II metabotropic glutamate receptor genes (GRM2 and GRM3) with mood disorders and fluvoxamine response in a Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. v. 33, n.5, p. 875-879. 2009.
- USECHE, F.J. et al. High-Throughput Identification, Database Storage and Analysis of SNPs in EST Sequences. *Genome Informatics*, v. 12, p. 194–203, 2001.

VAN DE VIJVER, M.J. et al. Amyloid metabolism and secretases in Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, v. 1, p. 422-427, 2001.

WEI, W. et al. Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci*. v.23, n. 33, p. 10650-10661, 2003.

ZALSMAN, G. et al. DRD4 receptor gene exon III polymorphism in inpatient suicidal adolescents. *J Neural Transm* v.111, p. 1593–1603, 2004.

ZHU, M.Y. et al. Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry* v.46, p. 1275–1286, 1999.

Capítulo 2 - Searching for new genetic risk factors for neuropsychiatric disorders in expression databases. *Journal Molecular Neurosciences*, 2010 Jan 19.

Searching for New Genetic Risk Factors for Neuropsychiatric Disorders in Expression Databases

Manuela Barbosa Rodrigues de Souza & Roberta Rodrigues de Lemos &
José Eriton Gomes da Cunha & José Luiz de Lima Filho &
João Ricardo Mendes de Oliveira

Received: 1 September 2009 / Accepted: 8 December 2009
Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Genetic variations might contribute to differences in protein activities and gene expression levels observed in complex genetic traits, like neuropsychiatric disease. This finding motivated the development of original approaches using expression studies to guide the finding of new genetic variations. We extended this approach to new genes selected from microarrays studies of brain samples of patients with Alzheimer's disease, major depressive disorder, bipolar affective disorder, and sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. The CLCbio Workbench Combined® version 3.6.2 was initially used to build expression sites tags (ESTs) and mRNA files retrieved, respectively, from the Goldenpath (UCSC) and NCBI databases and latter to perform multiple batches of Smith–Waterman alignments. The total of 438 ESTs sequences were selected after proper stringent parameters were applied to the first set of mismatches. The annotation revealed various classes of variations, most of them deletions ranging from 1 to 10 pb. These deletions were present in coding regions, 5' and 3' UTR regions. Deletions are often associated to major

Manuela Barbosa Rodrigues de Souza and Roberta Rodrigues de Lemos contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12031-009-9321-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. B. R. de Souza · R. R. de Lemos · J. E. G. da Cunha ·
J. L. de Lima Filho · J. R. M. de Oliveira
Keizo Asami Laboratory (LIKA), Federal
University of Pernambuco, Recife, PE,
Brazil

J. R. M. de Oliveira (*) Department of
Neuropsychiatry, Federal University of
Pernambuco (UFPE), 50670901 Recife,
PE, Brazil e-mail: joao.ricardo@ufpe.br

genetic syndromes with dysmorphic features; however, recent studies show that common microdeletions might be highly associated with common neuropsychiatric disorders.

Keywords: Genetic variations, Bioinformatics, Expression databases, Neuropsychiatric disorders, Neurogenetics

Introduction

A myriad of Bioinformatics tools and Genomic databases, currently curated by public and private institutions, are in constant development to process the rampant amount of data generated by major sequencing consortia (Stein 2008). However, proteomic platforms are in a much faster track of advancement, especially after the widespread usage of microarray technologies, which allowed the simultaneous analysis of expression patterns, in a single experiment (Miller et al. 2008).

Genetic variations might contribute to differences in protein activities and gene expression levels observed in complex genetic traits, like neuropsychiatric disorders. This finding motivated the development of original approaches in using expression studies to guide the finding of new polymorphic regions, which might include single nucleotide polymorphisms (SNPs), deletions and insertions of a few base pairs, microdeletions, or even major chromosomal changes (Coppola et al. 2008; Lemos et al. 2009). Previous reports studied expression sites tags (ESTs) sequences through the simultaneous overlapping and comparison of numerous batches of alignments in order to identify genetic variations such as SNPs (Useche et al. 2001; Forment et al. 2008). However, our group recently screened ESTs databases and predicted the existence of deletions ranging from 1 to 10 bp in genes from the

Published online: 19 January 2010

 Humana Press

inflammatory pathway in Alzheimer disease (AD) that showed expression levels altered in microarray studies with the Cornu Ammonia 1 (CA1) subregion of the hippocampus (Lemos et al. 2009; Colangelo et al. 2002). Extending this method to the study of AD and additional neuropsychiatric diseases in expression databases might uncover original genetic variations as potential new risk factors for these diseases, some of them among the most prevalent medical conditions.

Materials and Methods

In this analysis, we extended this approach to new genes selected from microarrays studies of specific brain samples of patients with AD (CA1 and Inferior parietal lobe), major depressive disorder (anterior cingulate cortex), bipolar affective disorder (left dorsolateral prefrontal cortex), and sporadic Creutzfeldt–Jakob disease (CJD; prefrontal cortex). Figure 1 summarizes the genes selected (GRIA1 and isoform 1, GRIK1, SLC1A2, SLC1A3, GABRD, TNFAIP2, CTSC, CXCR4 isoform B, ECE2 isoform A/C, and TAGLN3), displaying also which ones were up- or down-regulated in different groups of patients (Colangelo et al. 2002; Choudary et al. 2005; Xiang et al. 2005; Weeraratna et al. 2007). The methodology was according to Lemos et al. (2009), and the software CLCbio Workbench Combined® version 3.6.2. was used during all the following steps, initially to build spliced ESTs and mRNA files retrieved respectively from the Goldenpath (www.genome.ucsc.edu) and NCBI

(www.ncbi.nlm.nih.gov) databases and latter to perform multiples batches of Smith–Waterman BLASTn alignments (Fig. 1).

An initial number of 8,156 ESTs related to the genes previously selected were screened to decrease the chances of handling sequencing artifact, excluding alignments with 100% identity and e value index under 10^{-20} . A final list of 438 ESTs was analyzed, and after a proper annotation, we searched the NCBI SNPs database for any of the variations detected during this study.

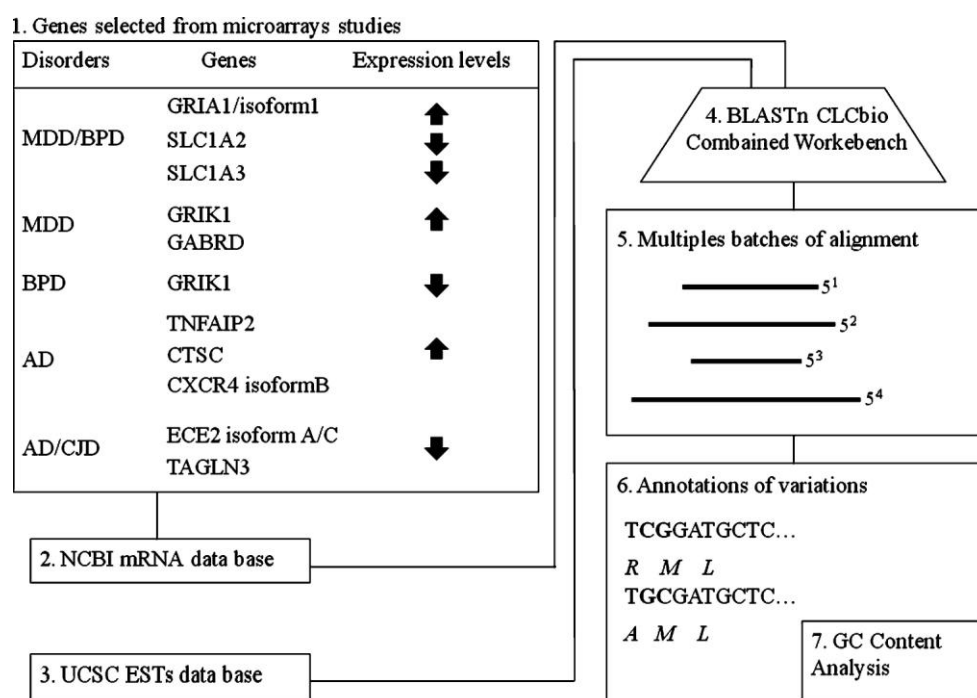
The “GC content,” a tool of UCSC genome browser platform, was used to identify and avoid regions more likely to generate sequencing artifacts.

The whole process was accelerated by using an additional piece of hardware, named CUBE® version 1.06, designed to speed sequence alignment and subsequent data mining, through a Field Programmable Gate Array (FPGA) technology which runs Smith–Waterman up to 125 times faster than a 3-GHz desktop computer.

Results

Annotation originated from our analysis revealed various classes of variations, most of them deletions [333]. Among this specific group, some were frameshift deletions [137] and the virtual translation of a few others [7] were predicted to induce no change other than an amino acid removal, with no subsequent repercussions at the protein sequence (Electronic supplementary material).

Figure 1 Sequential steps of the proposed Bioinformatics pipeline for screening candidate variations from ESTs databases. The arrows indicate genes down- or up-regulated selected from microarray studies



In addition, the analysis identified possible transitions [251], synonymous SNPs [3], non-synonymous SNPs [255], and variations in UTRs [32].

Additionally, we noticed clusters of mismatches in different ESTs libraries in certain exons of the genes TNFAIP2, CTSC, ECE2 isoform C, and TAGLN3 (Fig. 2). This finding makes them actual promising candidates to be explored afterward as candidate risk factors.

The process of virtual validation and a search at the NCBI SNP database confirmed a previous deposited variation (rs217086) at the exon 5 of the CTSC gene, showing once again that this method is a feasible approach to detect genuine genetic variations that were previously confirmed in actual DNA samples (Fig. 2).

A virtual translation detected a greater number of non-synonymous variations, and some of them caused by micro-deletions predicted to change the coding frame or to generate stop codon and truncated protein in some cases (Table 1). The annotation revealed deletions ranging from 1 to 10 bp, predicted in coding regions, 5' and 3' UTR regions (Electronic supplementary material). Curiously, this pattern of variations was similar to our previous study in candidate genes for AD (Lemos et al. 2009).

The distribution of "GC content" in percent at the regions analyzed ranged between 50% and 70%, and this additional evaluation was a standard procedure during this study to select only variations in areas of low GC content, since these regions present lower chances of providing sequencing artifacts, which might be misinterpreted as true variations.

Discussion

The genes analyzed in this study were previously investigated with different approaches and have been involved with the glutamatergic system in mood disorders, inflammation, and immunological signaling or amyloid clearance in AD and cytoskeleton-associated protein in CJD (Colangelo et al. 2002; Choudary et al. 2005; Xiang et al. 2005; Weeraratna et al. 2007).

Genes associated with inflammatory pathway showed significant up-regulation expression in subjects with AD, indicating that this panel might be an indicative of disease progression (Blalock et al. 2004).

Studies have linked some neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia, mood disorders, AD, amyotrophic

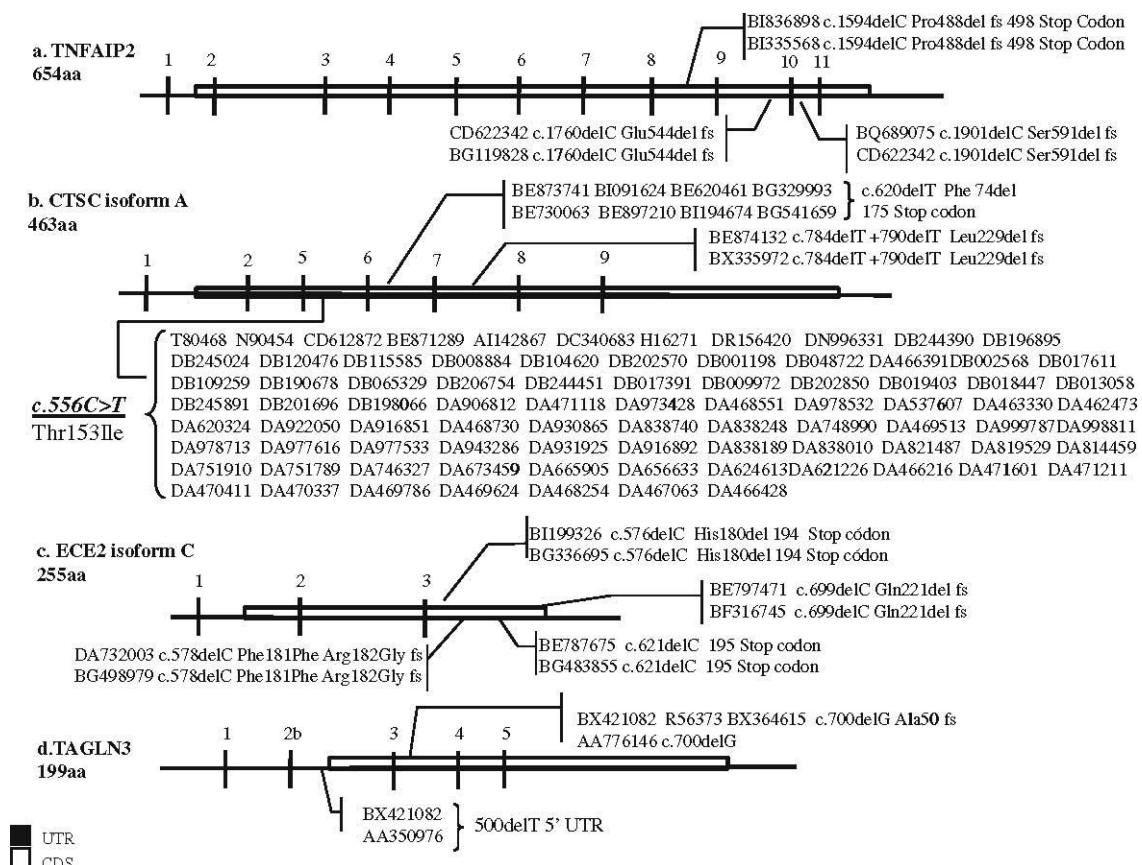


Figure 2 Identification of ESTs codes and positions in UTR and CDS regions; 250 ESTs sequences overlapped to the underlined variation (rs217086) identified at the CTSC gene during the process of virtual validation and are fully displayed at the Electronic supplementary material

Table 1 Predicted deletions causing premature protein truncation

ESTs code	Gene position	Mutation	Protein size
AA844606	TNFAIP2/exon 4	c.1134delG Frameshift Incorporating Arg335del	338aa
BG831039	TNFAIP2/exon 7	c.1468delC Stop Introduction in position 446aa	446aa
AA464440	TNFAIP2/exon 9	c.1695delC Frameshift Incorporating His522del	525aa
BI828133	CTSC/exon 6	c.658delC Frameshift Incorporating Ala187del	200aa
BI520194	CTSC/exon 6	c.654_655delAC Frameshift Incorporating Thr186del	192aa
BE789469	CTSC/exon 6	c.661delC Frameshift Incorporating Thr188del	200aa
BG430120	CTSC/exon 6	c.[661delC + 690delC] Frameshift Incorporating Thr188del	201aa
BG433205	CTSC/exon 6	c.617delC Frameshift Incorporating Phe174del	175aa
BE870710	CTSC/exon 6	c.617delC Frameshift Incorporating Phe174del	175aa
BG432521	CTSC/exon 6	c.617delC Frameshift Incorporating Phe174del	175aa
BQ224700	CTSC/exon 6	c.[658delC + 677_683delTGGAC] Frameshift Incorporating Ala187del	201aa
BF130367	CTSC/exon 6	c.651delT Frameshift Incorporating Thr185del	200aa
CD612875	CTSC/exon 8	c.926delA Frameshift Incorporating Asn276del	283aa
BE785436	CTSC/exon 8	c.882delU Frameshift Incorporating Phe261del	266aa
BE874132	CTSC/exon 8	c.882delU Frameshift Incorporating Phe261del	266aa
AL569316	CTSC/exon 8	c.901delA Frameshift Incorporating Arg270del	237aa
AL542222	CTSC/exon 8	c.931delC Frameshift Incorporating Pro281del	283aa
BX399933	CTSC/exon 8	c.931delC Frameshift Incorporating Pro281del	283aa
BG542865	CTSC/exon 8	c.931delC Frameshift Incorporating Pro281del	283aa
BX357941	CTSC/exon 8	c.[924_925delCA + 931_932delCA] Frameshift Incorporating Asn276del	283aa
BE542347	CTSC/exon 8	c.925_931delAACAATT Frameshift Incorporating Asn276del	283aa
DB488609	TAGLN3/exon 3	c.[800delC + 873delC] Frameshift Incorporating Ser81del	82aa
AV725786	SLC1A3/exon 4	c.883delG Stop Introduction in position136aa	136aa

lateral sclerosis, and Parkinson's disease, with peripheral and central changes in expression and sensitivity of glutamatergic receptors to glutamate (Ferrarese et al. 2001). A decrease in SLC1A4 and SLC1A6 expression may diminish the capacity of the synapse to clear glutamate, resulting in increased levels of glutamate and its metabolites in the synapse (McCullumsmith and Meador-Woodruff 2002). These genes are members of the glutamate transport molecular family, and recent studies suggest that abnormal activity of the glutamatergic system helps to prevent neural plasticity of the synapse, which is observed in patients with severe mood disorders (Sanacora et al. 2008). Recent studies show that Prion Protein (PrP) plays a major role in CJD, and it is associated to various cytoskeleton proteins such as laminin, α -tubulin (Aguzzi et al. 2008). Human neuronal protein 25 (hNP25, codified by TAGLN3) presents numerous motifs previously associated with cytoskeleton, and a previous microarrays study in CJD brain samples show a significant down-regulation, reinforcing the connection between CJD and cytoskeleton maintenance (Aguzzi et al. 2008). Most of the potential new variations annotated were deletions, which is often associated to major genetic

syndromes with dysmorphic features; however, various recent studies show that common microdeletions might be highly associated with common neuropsychiatric disorders such as schizophrenia, autism, and mental retardation (Walsh et al. 2008; Yu et al. 2002).

Interestingly, the mutation c.795delC in OGG1 gene was recently detected in AD patients, changing the coding frame and adding 59 amino acid residues downstream after termination codon, causing reduced enzymatic activity (Mao et al. 2007).

Single nucleotide polymorphisms in Prion gene (PRNP) and various other genes are consistently associated with major susceptibility to prion disease, like CJD (Mead et al. 2009). However, Kerber et al. (2008) studied the possible impact of deletions in cattle PRNP gene, showing that the 12 bp indel allele conferred a substantial factor of risk for scrapie. Neuropsychiatric disorders are highly prevalent, and the current cyberinfrastructure available in biotechnology platforms is allowing integrative approaches to better understand the interaction between a massive number of genetic, epigenetic, and environmental factors that might modulate predisposition, trigger the first symptoms, and affect the clinical outcome or even treatment response (Stein 2008; Miller et al. 2008).

At the present moment, our group is screening DNA samples to validate these predicted variations, and the confirmation of our findings will support the current concept that microdeletions and other rare variations, different than SNPs, might be important culprits as genetic risk factor for common neurological and behavioral conditions, as well as for other complex traits (Stefansson et al. 2008; Walsh et al. 2008; Conrad et al. 2009).

Acknowledgments We are greatly indebted to Henrique Castelletti and Aaron Rowe for technical support and manuscript review. This study received financial support from the following Brazilian funding agencies and academic bureaus: LIKA-JIKA, PROPESQ-UFPE, CAPES, CNPq, and FACEPE.

References

- Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008) The Prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31:439–477
- Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW (2004) Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci* 101:2173–2178
- Choudary PV, Molnar M, Evans SJ et al (2005) Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15653–15658
- Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ (2002) Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res* 70:462–473
- Conrad DF, Pinto D, Redon R et al (2009) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* doi:10.1038/nature08516. 14 August 2009
- Coppola G, Karydas A, Rademakers R et al (2008) Gene expression study on peripheral blood identifies progranulin mutations. *Ann Neurol* 64:92–96
- Ferrarese C, Tremolizzo L, Rigoldi M et al (2001) Decreased platelet glutamate uptake and genetic risk factors in patients with Parkinson's disease. *Neurol Sci* 22:65–66
- Forment J, Gilbert F, Robles A, Conejero V, Nuez F, Blanca JM (2008) EST2uni: an open, parallel tool for automated EST analysis and database creation, with a data mining web interface and microarray expression data integration. *BMC Bioinformatics* 9:5–15
- Kerber AR, Hepp D, Passos DT, de Azevedo Weimer T (2008) Polymorphisms of two indels at the PRNP gene in three beef cattle herds. *Biochem Genet* 46:1–7
- Lemos RR, Castelletti CH, Lima Filho JL, Marques ET, Oliveira JR (2009) In silico identification of new genetic variations as potential risk factors for Alzheimer's Disease in a Microarray oriented simulation. *J Mol Neurosci* 39:242–247
- Mao G, Pan X, Zhu BB et al (2007) Identification and characterization of OGG1 mutation in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35:2759–2766
- McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH (2002) Striatal excitatory amino acid transporter transcript expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 26:368–375
- Mead S, Poulter M, Uphill J et al (2009) Genetic risk factors for variant Creutzfeldt–Jakob disease: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 8:57–66
- Miller JA, Oldham MC, Geschwind DH (2008) A systems level analysis of transcriptional changes in Alzheimer's disease and normal aging. *J Neurosci* 28:1410–1420
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature* 7:426–437
- Stefansson D, Rujescu D, Cichon S et al (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455:232–236
- Stein LD (2008) Towards a cyberinfrastructure for the biological sciences: progress, visions and challenges. *Nat Rev Genet* 9:678–688
- Useche FJ, Gao G, Harafey M, Rafalski A (2001) High-throughput identification, database storage and analysis of SNPs in ESTs sequences. *Genome Informatics* 12:194–203
- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE et al (2008) Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 320:539–543
- Weeraratna AT, Kalehua A, DeLeon I et al (2007) Alterations in immunological and neurological gene expression patterns in Alzheimer's disease tissues. *Exp Cell Res* 3:450–461
- Xiang W, Windl O, Westner IM et al (2005) Cerebral gene expression profiles in sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *Ann Neurol* 58:242–257
- Yu CE, Dawson G, Munson J et al (2002) Presence of large deletions in kindreds with autism. *Am J Hum Genet* 71:100–115

Electronic Supplementary Material

Table 1. Additional Polymorphisms in TNFAIP2, CXCR4 and ECE2 isoform A/C.

Location	Predicted nucleotide variation in coding and non coding sequences	Predicted protein variation in coding sequences. fs: frameshift	ESTs code
Exon 1/TNFAIP2	77delG + 124_125delAG (5'UTR)		W33183
Exon 2/ TNFAIP2	c.[851delC + 870delG] c.[919_921delCCG + 925delC]	Ala241del fs Ala263del + Gly265del fs	CD622344 AA854458
Exon 3/ TNFAIP2	c.1050delC c.1064delG c.1072_1074delGAC	Leu307del fs Arg311 del fs Arg314del	AA772252 AW628453 BI914269
Exon 4/ TNFAIP2	c.1134delG c.[1179_1180delCA+1200delC]	Arg335del fs and Stop Introduction in position 338aa Gln350del fs	AA844606 AA772250
Exon 5/ TNFAIP2	c.1250delC	Lys374del fs	AA772252
Exon 7/ TNFAIP2	c.1449delT c.1468delC c.1517delT	Trp440del fs Stop Introduction in position 446aa Phe462del fs	BG119828 BG831039 BI836898
Exon 8/ TNFAIP2	c.1594delC	Pro488del fs and Stop Introduction in position 498aa	BI836898 BI335568
Exon 9/ TNFAIP2	c.1664delC c.1695delC c.1743delC c.1760delC	Cys512del fs His522del fs and Stop Introduction in position 525aa Leu538del fs Glu544del fs	BG685187 AA464440 BF094358 CD622342 BG119828
Exon 10/ TNFAIP2	c.1763_1766delGCAG c.1790deldelC c.1858delC c.1901delC	Glu544del fs Leu553del fs Pro576del fs Ser591del fs	BF869291 BE272545 AA464440 BQ689075 CD622342
Exon 11/ TNFAIP2	c.1902_1903delCA 2550delG (3'UTR) 2698_2702delGCCCC (3'UTR) 2854delA (3'UTR) 2898delC (3'UTR)	Ser591del fs	BM048080 AI923266 AI923340 AI923367 AI923255
Exon 2b/CXCR4	c.[237_239delATC + 629_630delTG] c.656_660delCCGCT c.[802_803delAG + 854_857delGCCT] c.[853_855delTGC + 871_873delTCA] c.[856delC +860_865delCTACAT +866T>C] c.885_889delTTCAT c.901_902delTC c.975delC c.[989delC + 1016delC] c.1142delT	Ile48del + Ser178 Arg fs Arg188del fs and Stop Introduction in position 200aa Lys236del fs Leu253del + Ile259del Leu253del fs Phe264del fs Ile269del fs and Stop Introduction in position 274aa His294del fs and Stop Introduction in position 296aa Pro299Pro fs and Stop Introduction in position 308aa His350del fs	BI819797 CD987769 BI754094 CD389217 BQ718617 BI762229 BX418530 BX353253 BX421511 BI821693 AL520954
Exon 1/ ECE isoform A	c.101_102delCG c.140delC	Glu22del fs Asp35del fs and Stop Introduction in position 52aa	BG483855 DA732003 AL520953
Exon 2/ECE isoform A	c.[247delC +470_478del GACCGTGTC] c.354_357delCAGC c.452_457delTGGGGA	Leu117del fs Gln106del fs Gly Glu 139_140del and Stop Introduction in position 141aa	BF035953 AW341249 BF511209 AA44831
Exon 15/ECE isoform A	c.1851delG c.1845delC	Ala605del fs Arg603del fs Gln661del fs	
Exon 17/ECE isoform A	c.2019delCAGC		
Exon 22/ECE isoform A	[3073delT + 3099delG +3130delG+3140delC] (3'UTR)		H46357
Exon 3/ECE isoform C	c.576delC c.578delC	His180del and Stop Introduction in position 194aa Phe181Phe + Arg182Gly fs	BI199326 BG336695 DA732003

c.618delT	Ser194Pro and Stop Introduction in position 195aa	BG498979
c.621delC	Stop codon 195aa	BU568980
c.[621delC+623delG]	Stop codon 195aa	BE787675
c.[699delC+717delC+739delC+746delC+780delG+784_785delTC]	Gln221del fs	BG483855
c.[699delC+723delC+746delC+754delT]	Gln221del fs	BE797471
c.706delC	Ala223del	BF316745
c.738_743delCTCCCA	Pro Pro 234_235 del	BE263969
c.[804delC] + 837delC+851delC+869_870delTC	Ile253del fs	CR997279
956_958delTGA (3'UTR)		BI196548
		BG219927

Table 2. Additional Polymorphisms in CTSC gene.

Location	Predicted nucleotide variation in coding and non coding sequences	Predicted protein variation in coding sequences. fs: frameshift	ESTs code
Exon 5/CTSC	c.556C>T	Thr153Ile	T80468 N90454 CD612872 BE871289 AI142867 DC340683 H16271 DR156420 DN996331 DB244390 DB196895 DB245024 DB120476 DB115585 DB008884 DB104620 DB202570 DB001198 DB048722 DB002568 DB017611 DB109259 DB190678 DB065329 DB206754 DB244451 DB017391 DB009972 DB202850 DB019403 DB018447 DB013058 DB245891 DB201696 DB198066 DA906812 DA471118 DA973428 DA468551 DA978532 DA537607 DA463330 DA462473 DA620324 DA922050 DA916851 DA468730 DA930865 DA838740 DA838248 DA748990 DA469513 DA999787 DA998811 DA978713 DA977616 DA977533 DA943286 DA931925 DA916892 DA838189 DA838010 DA821487 DA819529 DA814459 DA751910 DA751789 DA746327 DA673459 DA665905 DA656633 DA624613 DA621226 DA471601 DA471211 DA470411 DA470337 DA469786 DA469624 DA468254 DA467063 DA466428 DA466391 DA466216 DA465558 DA464833 DA464707 DA464419 DA464285 DA462483 DA890118 DA466406 DA540885 DA945416 DA419139 DA383406 DA375157 DA345330 DA257284 DA643670 DA463325 DA467685 DA465205 DA465176 DA023129 DA955322 DA670477 DA657277 DA471323 DA636805 DA467508 DA750293 DA045651 DA627074 DA675144 DA465342 DA371797 DA543402 DA670505 DA675438 DA987214 DA076122 DA676299 DA670776 DA677744 DA482421 DA677131 DA046452 DA420673 DA586230 DA383772 DA671705 DA614852 DA537912 DA605616 DA728677 CX752525 CX787231 CX753331 CX761106 CX870574 CX786353 CV575704 CV802049 CN368908 CN368904 CN368912 CN368906

Exon 6/CTSC	c.617delC	Phe174del and Stop Introduction in position 175aa	CN368898 CD696955 CD242989 CB215643 CA394380 CA390747 BY800064 BX474280 BX474267 BX487108 BX473331 BX397609 BX380095 BX357522 BX438246 BX358736 BX334698 BX437244 BX338304 BX335972 BX338737 BX357941 BX399933 BX459226 BX358146 BX417634 BX379033 BX358211 BX448761 BX445346 BX377161 BX339088 BX446455 BX403603 BX378079 BX396132 BX335482 BX399951 BX439376 BX356554 BX329214 BX397572 BX378510 BX339569 BX335492 BU933915 BU175771 BU174610 BU933867 BQ880504 BQ877745 BQ431011 BQ439369 BQ889118 BQ066878 BQ213395 BP873242 BP300593 BP225102 BP325669 BM763514 BM762969 BM836855 BM991175 BM908005 BM790860 BM546911 BI859911 BI520194 BI753521 BI828133 BI837849 BG432521 BG329993 BG570012 BG251396 BG433205 BG430120 BG677535 BG675247 BG284981 BG542865 BF182750 BF350728 BF034499 BE397079 BE903556 BE397640 BE870710 BE897210 BE397177 BE789469 BE785703 BE728886 BE730063 BE873741 AU280323 AU310891 AU124669 AU135019 AU125946
	c.620delT	Phe174del and Stop Introduction in position 175aa	BG432521 BG433205 BE870710 BE873741 BI091624 BE620461 BG329993 BE730063 BE897210 BG541659 BI194674 BE903556
	c.634delA	Asn179del fs	BF130637
	c.651delT	Thr185del fs and Stop Introduction in position 200aa	BI520194
	c.654_655delAC	Thr186del fs and Stop Introduction in position 192aa	BI828133
	c.658delC	Ala187del fs and Stop Introduction in position 200aa	BQ224700
	c.658delC +677_683delTGGAC	Ala187del fs and Stop Introduction in position 201aa	BE789469
	c.661delC	Thr188del fs and Stop Introduction in position 200aa	BG430120 BM908005
	c.661delC + c.690delC	Thr188del fs and Stop Introduction in position 201aa	BF034499 BG251396 BI859911 BE785703
	c.713_717delTGGTG	Ser205del fs	BI091624
	c.720delC	His208del fs	BG284981
	c.722_724delCAG	Ser209del	BX378078
	c.784delT +833delT	Leu229del fs	BE876057 BE874132
	c.763delC	Ala222del fs	BX338304
	c.780_781delAT + 823delG	Ile228del fs	BQ877745
	c.784delT +790delT	Leu229del fs	BX335972
	c.804delG	Asp236del fs	BG179480 BF130637 BE788584 BE730063 AU124334 DN999234
	c.812_816delAAATG	Arg238del fs	BE785436 BE874132
	c.814delA	Asn239del fs	AL569316 H04403
Exon 7/CTSC	c.833delT	Phe245del fs	
	c.882delT	Phe261del fs and Stop Introduction in position 266aa	
	c.901delA	Arg270del fs and Stop Introduction in position 237aa	
Exon 8/CTSC	c.906_908delCGA	Ala269del + Arg279Gly	

c.924delC +931delC+938_939delAG	Asn276del fs	BX338737
c.924delC +931delC+943delC	Asn276del fs	AL551578
c.924_925delCA+ 931_932delCA	Asn276del fs and Stop Introduction in position 283aa	BX357941
c.925_931delAACAATT	Asn276del fs and Stop Introduction in position 283aa	BE542347
c.926delA	Asn276del fs and Stop Introduction in position 283aa	CD612875
c.931delC	Pro281del and Stop Introduction in position 283aa	AL542222 BX3999933 BG542865
c.944delT	Gln286del fs	BX417634
c.953delT	Val290del fs	AL517809

Table 3. Additional Polymorphisms in GRIA1, GRIK1, SLC1A2, SLC1A3, GABRD and TAGLN3.

Location	Predicted nucleotide variation in coding and non coding sequences	Predicted protein variation in coding sequences. fs: frameshift	ESTs code
Exon 10/GRIA1	c.1681delG	Glu441del fs	BG911907
Exon 17/GRIA1	[5250_5256delTCTCCAG] (3'UTR)		H18463
Exon 4/ GRIK1	c.1095del A	Asp410del fs	DN992663
Exon 10/ GRIK1	c.1752delG	Met429del fs	W26913
Exon 11/ GRIK1	c.1971delC+1976delA	Lys503del fs	W26913
Exon 16/ GRIK1	c.2936delA	Asn82del fs	AI659715
Exon2/SLC1A2	c.649delC+650delG	His19del fs	BI919209
Exon4/SLC1A2	c.1068delA	Asn159del fs	BP199676
Exon7/SLC1A2	c.[1612delC+1634_1639delTTTGCT] c.[1529_1533delCTGGG]	Arg351del fs Leu323del fs	BI824607 BQ337869
Exon9/SLC1A2	c.1995delT	Val478del fs	BX411366
Exon4/SLC1A3	c.[890delG+891delC] c.877delG c.883delG	Gly139del fs Ala134del fs Stop Introduction in position 136aa	BF574754 DA226490 AV725786
Exon 6/SLC1A3	c.1286delT c.1321delG	Phe270del fs Val281del fs	W22929 CV345024
Exon7/SLC1A3	c.[1423delA+1424delT] c.1508delA	Met316del fs Asn344del fs	BG178299 BP311834
Exon8/SLC1A3	c.1658delG	Asn394del fs	AL533760
Exon9/SLC1A3	c.[1875delG+1876delC]	Leu467del fs	DA341859
Exon1/GABRD	95delC(5'UTR)		BI824761
Exon2/GABRD	c.165delG c.213delC	Glu37delfs Arg53delfs	DA071101 W81526
Exon6/GABRD	c.771delG c.760delA c.695delA c.744delC	Met226delfs Thr222delfs Gln200delfs Thr217delfs	BI757337 BM545512 BG037021 AV122311
Exon7/GABRD	c.885delC c.817_819delTTC c.829delA	Met264delfs Phe241delfs Arg245delfs	BI829118 H41122 BI758571
Exon8/GABRD	c.1089delC	Ala331delfs	H41122
Exon9/GABRD	c.1293delG	Glu600delfs	BI822807
Exon 2b/TAGLN3	499delC (5'UTR) 498delG (5'UTR) c.700delG c.700delG c.586delC		BX421082 AA350976 R56373 BX364615 AA776146
Exon 3/TAGLN3	c.813delT c.770delG c.818delA c.871delA c.800delC	Arg12del fs Phe87delfs Gly73del fs Gln89delfs Thr107del fs Ser81del fs and stop introduction in position 82 aa	BX455724 BF952083 W48780 BG912462 DB488609
	c.813delT c.790delA c.873delC c.780delC	Phe87del fs Ile80del fs Thr108 delfs Ile177 fs	BF952075 AW149738 BM857707 D56133
Exon 4/TAGLN3	c.978delC	Cys143del fs	BM671589

Exon 5/TAGLN3	c.995delC	Pro148del fs	BE798688
	c.980delG	Cys143del fs	W28770
	c.947delT	Leu132del fs	AW954599
	c.937delC	Leu129del fs	BI752669
	c.1050delG	Gln166del fs	BX364614
	c.1091delG	Ser180del fs	BF967886
	1197delC (3'UTR)		BM547950
	c.1087delG	Gly179delfs	DB558560
	1197delC (3'UTR)		CK004771
	1170delC (3'UTR)		BI913088
	c.1112delC	Ala187del fs	BF346837
	c.1051delC	Leu167 delfs	BI548764
	c.1100delG	Gly183del fs	BI752669
	c.1102delG	Ala184 delfs	AW900296
	c.1061delG	Gly170del fs	BI824281
	1218delA (3'UTR)		BX421082
	c.1097delA	Lys182del fs	CK003985
	c.1076delG	Gly175 delfs	BI034607
	c.1076delG	Gly175del fs	BF963590
	c.1061delG	Gly170del fs	BE884352
	c.1039delT	Ser163del fs	BE699646

Conclusão

Após utilizar uma sequência de etapas associadas a diferentes ferramentas de bioinformáticas, foi possível verificar que o estudo de sequências de ESTs para se identificar novas variações candidatas é uma abordagem promissora e acessível.

Isto fica mais evidente se consideramos que a infra-estrutura necessária principal foi o uso de um computador ligado à internet e a associação de um *software* que é temporariamente disponível gratuitamente, o que faz da metodologia relevante devido ao seu baixo custo.

Foram encontradas variações previamente descritas, além de prováveis polimorfismos candidatos inéditos, para a manifestação dos TH. Destacando novos candidatos que serão posteriormente investigados em amostras de DNA.

Estes achados levantam a possibilidade de que deleções de até 7 pares de bases estejam relacionadas à fisiopatologia dos TH, eventualmente em genes dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico de neurotransmissor.

A técnica de screening *in silico* de SNPs a partir de ESTs vem se tornando uma metodologia rápida e de baixo custo (PICOULT-NEWBERG *et al.*, 1999; USECHE *et al.*, 2001; NAVRATIL *et al.*, 2008). Esse tipo de abordagem envolve uma grande quantidade de dados e pode indicar potenciais novos SNPs, que serão alvos de pesquisas de genotipagem experimental na população.

Os genes analisados GRIK5, GRM3, GABRA5, GABRB3 e GLUL, foram provenientes de um estudo de *microarray* de expressão de Choudary *et al.* (2005) e estão associados ao sistema glutamatérgico e GABAérgico. Onde amostras do tecido da região córtex cingulado anterior (AnCg; área 24) e córtex prefrontal dorsolateral esquerdo (DLPFC; áreas 9 e 46), foram avaliadas em controles e pacientes com TH, , conforme descrito na metodologia.

O córtex cingulado anterior e córtex prefrontal dorsolateral esquerdo são regiões envolvidas no desempenho de tarefas cognitivas.

Alterações neuroanatômicas no TAB geralmente são bem localizadas em certas regiões do cérebro, envolvendo o córtex pré-frontal (CPF) e o córtex cingulado anterior (CCA). Por exemplo, redução volumétrica de substância cinzenta no CPF dorsal (CPFD) e no CPF ventral (CPFV) (FRANGO *et al.*, 2002; LYOO *et al.*, 2004).

O número total de ESTs alinhados com os 5 genes foi de 6438 (Tabela 1), sendo que apenas 122 seqüências foram selecionadas a partir do uso de dois filtros: *e-value* >10⁻²⁰ e identidade entre 97% e 99%.

Algumas das seqüências alinhadas com os genes são ESTs próprios do gene, revelando assim 100% de identidade. Estas seqüências foram descartadas da análise, por não ser alvo da pesquisa de polimorfismos.

Através da análise *in silico* foram identificadas Deleções e Transições em regiões codificantes e nas regiões 5' ou 3' UTR (Tabela 5).

Tabela 1. Resumo da análise *in silico* dos genes: GRIK5, GRM3, GABRA5, GABRB3 e GLUL.

ESTs alinhados	6438
ESTs selecionadas através dos dois filtros	122
Deleções	112
Transversões	17
Transição	1
Inserções	4
Sinônimos	33
Não Sinônimos	172
SNPs em UTRs	46

Deleções Transversões Inserções e Tansições

As deleções foram à maior classe de variação encontrada na análise dos genes. Envolveram de 1 até 7pb e a maioria delas quando presentes na região codificadora provocam mudança da matriz de leitura e alguns códons de parada (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

As transversões detectadas pelo CLCbio, mostraram ser um dado já previamente descrito e anotado no dbSNP, demonstrando que a metodologia proposta por este trabalho, chegou a um dado experimentalmente já comprovado previamente em amostras de DNA genômico.

Sendo observado agrupamento de trocas nos exons 2 e 4 do gene GABRA5 (Figura 1). O processo de validação virtual com busca no banco de dados de SNP do NCBI confirmou as trocas encontradas nos dois exons, mostrando mais uma vez que esse método é uma abordagem viável para detectar variações genéticas anteriormente encontradas em amostras de DNA. Essas regiões serão alvo de novas variações candidatas a serem testadas no futuro.

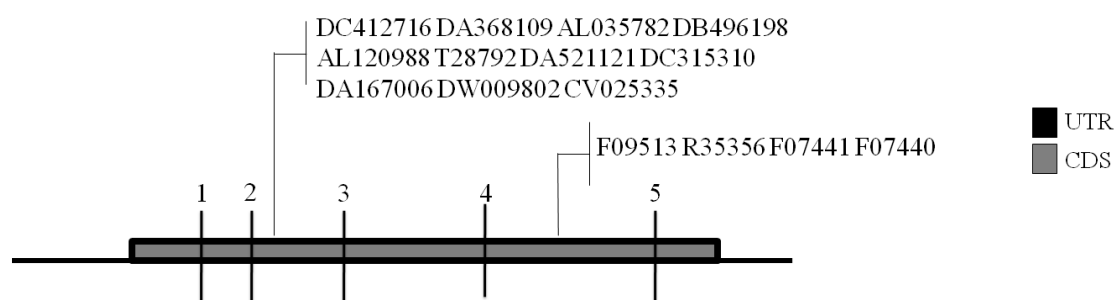


Figura 1. Identificação dos códigos de ESTs e das posições na região CDs representa as variações previamente identificadas no gene GABRA5, durante o processo de validação virtual.

As inserções detectadas nesta análise foram todas na região 3'UTR do gene GLUL, exon9 (Tabela 2).

Trasição foi a menor classe de variação encontrada, apenas no exon 8 do gene GLUL foi verificado este tipo de mutação (Tabela 2).

Tabela 2. Polimorfismo no gene GLUL. Único gene a apresentar inserções e transição.

Localização	Variações previstas de nucleotídeos em seqüências codificantes e não codificantes	Variações previstas de aminoácidos	Código do ESTs
Exon8/GLUL	c.1125delT	Ile 205 Met fs	BG328783
	c.1125delT	Ile 205 Met fs	BF343863
	c.1125delT	Ile 205 Met fs	BF311167
	c.1125delT	Ile 205 Met fs	BE737399
	c.1135delG	Glu210 delfs	BQ339490
	c.1127_1129delGAC	Gly206delfs	AV758685
	c.1171delC	Arg222delfs	AV758682
	c.1203delT	Phe 231 Leu fs	BG286627
	c.1218delC	Phe298delfs	BX395398
	c.1259delG	Gly 251delfs	AL548328
	c.1279delA	Thr258delfs	AL570809
	c.1268_1212delCAAC	Thr254del+Asn255delfs	AL553426
	c.1264delC	His253del fs	BI869492
	c.1275delC+1276delA	Phe 256Leu fs	BU526529
	c.1283Troca A p/ G	Lys 259Arg fs	BM473826
	c.1287delC	Met261delfs	BQ723521
	c.1287delC	Met261delfs	BX358227
	c.1287delC	Met261delfs	AL539984
	c.1476delA	Arg354delfs	BX411411
Exon9/GLUL			

2089delG(3'UTR)	AL576337
2956delA(3'UTR)	CF455674
2136delG(3'UTR)	AL574476
2239delG (3'UTR)	BM476840
2593delT(3'UTR)	BU164034
2267delA+2268delC(3'UTR)	BQ670907
2041delT(3'UTR)	BU165515
2458Tdel+2459A+	CD370427
2460_2461 ins A(3'UTR)	BU685135
	CB306072
	CD364667
1959delT(3'UTR)	BG403248
3804delA(3'UTR)	BG290718
2037_2040delGTGG (3'UTR)	CD517441
2328delT(3'UTR)	BI827221
2365del A+2366delT(3'UTR)	CF457060
2891delT(3'UTR)	BG567715
2898delT(3'UTR)	BU181118
1372delG(3'UTR)	AL550535
2480delT(3'UTR)	AW074130
2499delG(3'UTR)	CK725154
2499delG(3'UTR)	CA748517
3108delG+3109delT(3'UTR)	BQ717088
1901delC(3'UTR)	BF339029
2104delG(3'UTR)	BE782083
2191delG(3'UTR)	BQ879479

Mutações sinônimas e não sinônimas

Após a tradução das seqüências alinhadas foi verificado um maior número de mutações não sinônimas em relação às mutações sinônimas (Tabela 1).

As mutações sinônimas consistem em mutações que não causam mudança de nenhum aminoácido específico a partir de uma deleção ou substituição de um nucleotídeo por outro.

Equanto as mutações não-sinônimas são tipos de mutações pontuais onde um único nucleotídeo é mutado provocando uma mudança de aminoácido. Isto por sua vez pode fazer com que a proteína resultante se torne não-funcional. Esse tipo de mutação é responsáveis por diversas doenças, tais como: anemia falciforme e esclerose lateral (Boillée, 2006).

As mutações sinônimas encontradas foram resultantes de algumas transversões nos genes GRIK5 e GABRA5. Como resultado inédito as mutações sinônimas no gene GABRA5, Exon5 (c.2304T>C) e no gene GRIK5, Exon15 (c.1994G>T) ainda não encontram-se descritas. Enquanto as variações no Exon2 (c.945T>C) e Exon4 (c.1314T>C) do gene GABRA5 identificadas nesta análise, já haviam sido descritas (rs140682) e (rs140685), respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Polimorfismo nos genes GRIK5 e GABRA5.

Localização	Variações	Variações preditas de aminoácidos	Código do ESTs
Exon4/GRIK5	c.475_480delCTTGGC		BF305115
Exon5/GRIK5	c.603_605delAGT	Val190del	BF305115
Exon7/GRIK5	c.834delC	Phe 267del	BF305115
Exon8/GRIK5	c.1006delA	Ser326delfs	CD300587
Exon9/GRIK5	c.1186delG+1187delG	Gly286delfs	H06567

Exon10/GRIK5	c.1268_1271delCACT	Thr3314delfs	H06567
Exon11/GRIK5	c.1365delC+1366delG		AL048958
Exon13/GRIK5	c.1629delG		AL048958
Exon14/GRIK5	c.1777delG	Ala486del fs	AA977136
Exon15/GRIK5	c.1944G > T		BM551231
	c.1957delG	Ala549del fs	T64839
	c.1957delG	Ala549del+Phe550delfs	R60372
Exon16/GRIK5	c.2168_2172delGCGTC	Arg620del+Val621delfs	R59240
Exon19/GRIK5	c.2646delG	Ser693delfs	BI964037
	3274_3279delGAGGAC(3'UTR)		AA971174
Exon 1/GABRA5	c.881delC	Pro180defs	AL035782
	c.868delC	177fs	BE778898
Exon 2/GABRA5	c.945 T > C	Sinonima	DC412716
			DA368109
			AL035782
			DB496198
			AL120988
			T28792
			DA521121
			DC315310
			DA167006
			DW009802
			CV025335
Exon 3/GABRA5	c.1178del T	Gly del Stp	R35346
Exon 4/GABRA5	c.1302delC	Gly del fs . Stp	AL120988
	c.1313 T > C	Sinonima	F09513
			R35346
			F07441
			F07440
Exon 5/GABRA5	c.2304 T > C	Sinonima	DB533989
	2083delT (3'UTR)		AI807046
	2260delT (3'UTR)		DB575690
	2260delT (3'UTR)		DB577496
	2260delT (3'UTR)		DB548674
	2260delT (3'UTR)		BU738949
	2260delT (3'UTR)		DB553043
	2291delG (3'UTR)		DB537480

Mutação por mudança da matriz de leitura e códons de parada

Mutações não sinônimas presentes na região codificadora provocaram mudança no quadro de leitura, ocasionando em Mutação por mudança da matriz de leitura e códons de parada.

Mutações por mudança da matriz de leitura alteram o modo de leitura devido à inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos. Este tipo de mutação pode gerar códons de parada, que são paradas na tradução da sequência de nucleotídeos, pela introdução do códon de terminação, gerando formas truncadas da proteína, muitas vezes gerando uma proteína não-funcional. Erros na sequência de aminoácido, *in vivo*, são frequentemente degenerados.

No presente estudo, apenas 5 entre as mutações encontradas ocasionaram códons de parada, levando assim a uma proteína truncada prematura (Tabela 4).

Tabela 4. Deleções preditas que causam proteínas truncadas prematuras.

Código ESTs	Posição do gene	Varição	Tamanho da proteína
BI599936	GRM3/Exon2	c.1222delT Ile 41del Incorporação de mudança da matriz de leitura	41aa
BF952992	GRM3/Exon5	c.3513delC Cys795del	795aa

BF952996		Incorporação de mudança da matriz de leitura	
R35346	GABRA5/Exon3	c.1178delT	278aa
		Trp279 del Incorporação de mudança da matriz de leitura	
AL120988	GABRA5/Exon4	1302delC	323aa
		Trp321delIncorporação de mudança da matriz de leitura	

Variações nas regiões UTRs

A maioria dos genes apresentaram variações nas regiões 5' e 3'UTR. Além das inserções encontradas na região 3'UTR do gene GLUL (Tabela 2). Também foram detectadas deleções nas regiões 5' e 3'UTR nos seguintes exon 19 gene GRIK5 (Tabela 1), exon 6 gene GRM3 (Tabela 5) e exon 9 gene GLUL (Tabela 2).

O gene GABRA5, apresentou no exon 5, tanto transversão quanto deleções na região 3'UTR (Tabela 3).

Tabela 5. Polimorfismo nos genes GABRB3 e GRM3.

Localização	Variações	Variações preditas de aminoácidos	Código do ESTs
Exon5/GABRB3	c.339delT+340delA	Asp94 Val fs	DN992028
	c.412delG	Gln115 His fs	F05759
Exon7/GABRB3	c.631delT	Tyr 194 del fs	BE780160
Exon8/GABRB3	c.860del A+861delT	Asn 269 delfs	CD652458
Exon9/GABRB3	c.955delA	Ile 300 delfs	CD643162
	c.955delA	Ile 300 delfs	DR001491
Exon2/GRM3	c.1202_1208delAATAGAA	Ile35_Glu36delfs	BG706422
	c.1222delT	Ile 41del fs e introdução de códon de parada na posição 41aa	BI599936
Exon3/GRM3	c.1830delG	Ala235delfs	CD609638
	c.2078delC	Ser238delfs	CD609637
	c.2131delA	Lys423delfs	BX410048
	c.2126delC	Tyr334delfs	CD609639
Exon4/GRM3	c.2955_2959delTTGTT	Leu610_Phe611delfs	BI753076
	c.3017_3021delCATCT	Ile631delfs	BF952990
	c.3117delG	Val665delfs	AL540214
	c.2477delT	450Phe troca Leufs	CD609641
Exon5/GRM3	c.3513delC	Cys795del fs e introdução de códon de parada na posição 795aa	BF952992
	c.3513delC	Cys795del fs e introdução de códon de parada na posição 795aa	BF952996
	c.3565delA	Lys813delfs	BF952998
	c.3526delT	Leu800delfs	BQ339573
Exon6/GRM3	c.3688delC	Pro854del fs	AA670430

Análise do percentual GC

Todas as variações encontradas estão em regiões com conteúdo de GC abaixo de 50%, assim, as deleções identificadas estão em áreas de baixa concentração GC, em relação a todas as outras áreas do gene, essa indicação diminui a possibilidade de essas deleções serem apenas artefatos do sequenciamento (Figuras 2). A figura a seguir mostra como exemplo a análise do percentual de CG para o gene GRIK5.



Figura 2. Análise do conteúdo GC dos exons 13, 14, 17, 18 e 19 do gene GRIK5.

Predições das variações e associação com doença

Os polimorfismos de aminoácidos encontrado no exon 5 do gene GABRB3 (Tabela 5) e no exon 8 do gene GLUL (Tabela 2), foram submetidas a análise no site PMut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>). Segundo resultados do site as variações de aminoácidos analisadas não apresentam associação com a fisiopatologia dos TH, sendo assim consideradas variações neutras (Figura 3).

Results for PMut analysis of pmut1257277336911

Detailed Results for pmut1257277336911

wt	mt	Position	NN output	Reliability	Prediction	3Dstructure*
D	V	94	0.3941	2	NEUTRAL	

Results for PMut analysis of pmut1257309991268

Detailed Results for pmut1257309991268

wt	mt	Position	NN output	Reliability	Prediction	3Dstructure*
F	L	238	0.3918	2	NEUTRAL	

Results for PMut analysis of pmut1257310107067

Detailed Results for pmut1257310107067

wt	mt	Position	NN output	Reliability	Prediction	3Dstructure*
I	M	206	0.2351	5	NEUTRAL	

Results for PMut analysis of pmut1257310261967

Detailed Results for pmut1257310261967

wt	mt	Position	NN output	Reliability	Prediction	3Dstructure*
F	L	256	0.3862	2	NEUTRAL	

Results for PMut analysis of pmut1257310312220

Detailed Results for pmut1257310312220

wt	mt	Position	NN output	Reliability	Prediction	3Dstructure*
K	R	259	0.1108	7	NEUTRAL	

© 2004. Molecular Modelling & Bioinformatics Unit. Parc Científic de Barcelona

Figura 3. Resultado da análise realizada no programa PMut.

SHORT COMMUNICATION - Chapter entitled: “Ethnicity, History and Mental Health in Brazil” by Oliveira JMR and Souza MBR, has been accepted for publication in the book “ethnicity: Cultural Roles, Spiritual Practices and Social Challenges”. The book is currently in the early stages of publication and is estimated to be published in 2010 1st quarter.

Ethnicity, History and Mental Health in Brazil

Authors: Oliveira JRM^{1,2}, Souza MBR¹

1- Keizo Asami Laboratory (LIKA) – Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

2- Neuropsychiatry Department - Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

Address: Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brazil

João.ricardo@ufpe.br

Abstract

There is little data concerning medical reports about the first Brazilian habitants, after the first Portuguese expeditions at the XVI Century. However, some historical records mention a variable expression of behavioral disturbances amongst some descendents from European Caucasians, Native Indians from the Brazilian coast and Africans brought to work as slaves. The mixing of these three groups during decades of miscegenation generated a wide spectrum of cultural, behavioral and genetic variants and to study this issue is crucial to understand how their biological and cultural idiosyncrasies might have influenced the present Brazilian neuroepidemiology. On the other hand, the current ethnical profile in Brazil presents an unusual and unique distribution across the country, with highly mixed groups living at the coast, contrasting with a scattered distribution of high inbreeding clusters found at the country side, where almost 30% of the population lives. The natural consequence is the often manifestation of recessive disorders in rural areas, several of them with major neuropsychiatric symptoms and other with important psychological consequences due to general life quality impairment. There are, in part, geographic reasons for this pattern, in cases of families living in isolated regions, but there are also intriguing cultural aspects. Some poor families own significant, but barren and desolated pieces of land, and some of them are recognized as wealthy, compared to their neighbors. Actually they avoid to “mix” themselves with other kindred, avoiding splitting their property with subjects other than their own siblings. Additional studies are crucial for the full understanding of the connection between the past Psychopathology of the first “Brazilians” and the nowadays neuropsychiatric profile at the general population.

Key words: Ethnicity, History, Mental Health, Brazil, Inbreeding.

There is little data concerning medical records about the first components of the Brazilian habitants after the first Portuguese expeditions at the XVI Century.

However, some historical proceedings mention a variable expression of behavioral disturbances amongst some descendents from European Caucasians, Native Indians from the Brazilian coast and Africans brought to work here as slaves.

The mixing of these three ethnicities groups during decades of miscegenation generated a wide spectrum of cultural, behavioral and genetic variants, forming the first “Brazilians”. In order to start a discussion about this issue is crucial understand how their biological and cultural idiosyncrasies might have influenced the present Brazilian neuroepidemiology.

To analyze these manifestations is crucial for understanding the Psychopathology of the first subjects and populations with mental disorders that were originated by various ethnical groups and that latter started one of the largest populations at the American Continent.

The work of three major Brazilian Historians and Anthropologists interested in this period was analyzed in search of reports of behavioral changes compatible to the nowadays notions of Psychiatric symptoms (Freyre, 2003; Mello, 1996; Ribeiro, 1995).

The first Portuguese administrators sent to explore the Brazilian resources started slaving Native Indians in order to make them help exploiting, initially wood and latter minerals. However, the tribes were rebellious towards slaving and it was common the episodes of some subjects whom intentionally starved to death, laying down in hammocks indefinitely, resembling contemporary depressive patients in asylums, before the advent of antidepressant medication. (Ribeiro, 1995).

The Negroids brought from The East cost of Africa fitted better the intentions of the Portuguese Crown. However, a feeling of homesickness was common (called *Banzo*), inducing episodes compatible with major depression, mainly characterized by apathy, lethargy and indifference. Some of these subjects would be taken as rebels and punished to death while others would kill themselves by eating earth (suffocation), hanging or poisoning. Others would develop addictions to alcohol and *Cannabis sativa* (Freyre, 2003).

The most precise records about this issue are from European Caucasians, especially New-Christians (crypto-Jews) who migrated to Brazil after the Inquisition and Dispersion of Sephardic Jews during the first half of the XVI century. The study of a famous kindred, derived from Branca Dias and Diogo Fernandes, owners of a sugar-cane plantation in Pernambuco, Northeast region, shows the presence of some siblings displaying behavioral disturbances similar to what we would label today as mental retardation or maybe negative symptoms of schizophrenia. (Mello, 1996)

Curiously, we note a variety of expression of behavioral disturbances between the three Ethnical groups reported and we wonder if their cultural idiosyncrasies might influence the way these three different populations might face systematic violence, aggressiveness, emigration, prejudice and hostility.

Obviously that Mental Disorder was already a reality to these groups of Humans and here we intend to report the Colonization process, and various stressful aspects involved with it, as an important trigger to behavioral changes at the dawn of the XVI Century in Colonial Brazil in three different ethnical groups.

However, the current ethnical profile in Brazil presents an unusual and distinctive distribution across the country, with different ethnical groups living on the coast, in contrast with a unique cluster of high inbreeding groups in the rural areas, where almost 30% of the Brazilian

population live. This specific group works mainly in agriculture and crafts, often in small towns or farms, in conditions of limited access to health care, transportation and family planning, often with large offspring, often with consanguineous marriages (www.ibge.gov.br).

The natural consequence is the common occurrence of recessive disorders, several with major neuropsychiatric symptoms and others with important psychological consequences such as: Pendred syndrome, Berardinelli-Seip lipodystrophies, Waardenburg syndrome, Tay-Sachs disease, juvenile parkinsonism, Knobloch syndrome, primary microcephaly, Ellis Van Creveld disease, familial dwarfism, Gaucher's disease, limb girdle muscular dystrophies and recently a new form of spastic paraplegia with neuropathy and optic atrophy. It was from some of these families that the responsible genes were first identified. (Bond J et al, 2005; Chien et al, 2006; Fu et al, 2004; Macedo-Souza et al, 2005; Nigro et al, 1994; Passos-Bueno et al, 1996; Rozemberg et al, 2004; 2006; Rui-Perez et al 2003; Salvatori et al, 1999; Sertié et al, 2000).

Other families with autosomal recessive conditions have been reported with Pycnodysostosis and Neuronal ceroid lipofuscinoses, but they lacked a further molecular investigation (Fonteles et al, 2007; Gama et al, 2007).

During the last two decades, the first molecular studies localized candidate regions and genes for various recessive syndromes in families from the Brazilian Northeast but this information was not provided in most of the articles and a nosological geography of these families is import to correlate the kindred's origin and the local inbreeding rate.

Fifty years ago, Newton Freire Maia established a milestone at the study of inbreeding across the Brazilian territory and the northeast region presented the highest rates known so far, especially at the countryside (Freire-Maia, 1957).

The low demographic density and the high inbreeding rates found at the Brazilian Northeast resemble the situation of others genetics isolates.

Various humans groups became isolated, for different reasons. Sometimes because of cultural isolation, geographical isolation or founder effect but often due to a combination of different reasons. The studies of population isolates were crucial for the identification of various genes and loci responsible for genetic disorders, especially the ones with autosomal recessive pattern of inheritance. The best examples are the Old Order Amish, Finnish, Sardinian, Hutterians and Jewish communities, with all of them presenting high inbreeding rates. The study of genetic isolates are scarce in South America and the best know example is the Paisa community from Colombia, mostly at the state of Antioquia (Arcos-Burgos and Muenke, 2002).

There are, in part, geographic reasons for families living in isolated regions, but there are also intriguing cultural aspects. In our case, some poor families own significant, but barren and desolated pieces of land, and others are recognized as being wealthy, compared to their neighbors.

In practice they do not want to “mix” themselves with other families to avoid splitting their property with people other than their own siblings.

Additional studies are crucial for the full understanding of the connection between the past Psychopathology of the first “Brazilians” and the nowadays neuropsychiatric profile at the general population.

References

- Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, Hampshire DJ, Morrison EE, Leal GF, Silva EO, Costa SM, Baralle D, Raponi M, Karbani G, Rashid Y, Jafri H, Bennett C, Corry P, Walsh CA, Woods CG. 2005. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet* 37(4):353-5.
- Chien HF, Rohé CF, Costa MD, Breedveld GJ, Oostra BA, Barbosa ER, Bonifati V. 2006. Early-onset Parkinson's disease caused by a novel parkin mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil. *Neurogenetics*;7(1):13-9.
- Fu M, Kazlauskaitė R, Baracho Mde F, Santos MG, Brandão-Neto J, Villares S, Celi FS, Wajchenberg BL, Shuldiner AR. 2004. Mutations in Gng3lg and AGPAT2 in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy and Brunzell syndrome: phenotype variability suggests important modifier effects. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6):2916-22.
- Jorge AA, Menezes Filho HC, Lins TS, Guedes DR, Damiani D, Setian N, Arnhold IJ, Mendonça BB. 2005. [Founder effect of E180splice mutation in growth hormone receptor gene (GHR) identified in Brazilian patients with GH insensitivity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 49(3):384-9.
- Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, Amorim SC, Starling A, Nishimura A, Lezirovitz K, Lino AM, Zatz M. 2005. Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. *Ann Neurol.* 57(5):730-7.
- Nigro V, de Sá Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M. 1996. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet.* 14(2):195-8.
- Passos-Bueno MR, Moreira ES, Marie SK, Bashir R, Vasquez L, Love DR, Vainzof M, Iughetti P, Oliveira JR, Bakker E, Strachan T, Bushby K, Zatz M. 1996. Main clinical features of the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J Med Genet.* 33(2):97-102.
- Rozenberg R, Martins AM, Micheletti C, Mustacchi Z, Pereira LV. 2004. Tay-Sachs disease in Brazilian patients: prevalence of the IVS7+1g>c mutation. *J Inherit Metab Dis.* 27(1):109-10.
- Rozenberg R, Kok F, Burin MG, Sá Miranda MC, Vasques C, Henriques-Souza AM, Giugliani R, Vainzof M, Pereira LV. 2006. Diagnosis and molecular characterization of non-classic forms of Tay-Sachs disease in Brazil. *J Child Neurol.* 21(6):540-4.
- Ruiz-Perez VL, Tompson SW, Blair HJ, Espinoza-Valdez C, Lapunzina P, Silva EO, Hamel B, Gibbs JL, Young ID, Wright MJ, Goodship JA. 2003. Mutations in two nonhomologous genes in a head-to-head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome. *Am J Hum Genet.* 72(3):728-32.
- Salvatori R, Hayashida CY, Aguiar-Oliveira MH, Phillips JA 3rd, Souza AH, Gondo RG, Toledo SP, Conceição MM, Prince M, Maheshwari HG, Baumann G, Levine MA. 1999. Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(3):917-23.
- SERTIÉ AL, SOSSI V, CAMARGO AA, ZATZ M, BRAHE C, PASSOS-BUENO MR. 2000. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Hum Mol Genet.* 9 (13):2051-8.

- Baldwin CT, Hoth CF, Amos JA, da-Silva EO, Milunsky A. 1992. An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* 355(6361):637-8.
- Ribeiro, Darcy - O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil (*The Brazilian People: The Formation and Meaning of Brazil*). Editora: Cia das Letras, 2ª Edição 1995.
- Freyre, Gilberto - Casa-Grande e Senzala (*The Masters and the Slaves*). Editora: Global, 51ª Edição 2006.
- Mello, José Antônio Gonsalves - Gente da Nação: Cristãos-Novos e Judeus em Pernambuco. Editora: Massangana, 2ª edição, 1996.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 2009.
- Gama RL, Nakayama M, Távora DG, de Lara Alvim TC, Nogueira CD, Portugal D. 2007. [Neuronal ceroid lipofuscinosis: clinical and neuroradiological findings] *Arq Neuropsiquiatr*. ;65(2A):320-6.
- Fonteles CS, Chaves CM Jr, Da Silveira A, Soares EC, Couto JL, de Azevedo M de F. 2007. Cephalometric characteristics and dentofacial abnormalities of pycnodysostosis: report of four cases from Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 104(4):83-90.
- Arcos-Burgos M, Muenke M. 2002. Genetics of population isolates. *Clin Genet*. ;61(4):233-47.
- Baldwin CT, Hoth CF, Amos JA, da-Silva EO, Milunsky A. 1992. An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* 355(6361):637-8.
- Freire-Maia N. Inbreeding in Brazil. *Am J Hum Genet*. 1957; 9(4):284-9

Resumo em congresso

Searching for new genetic risk factors for neuropsychiatric disorders in expression databases

Oliveira, JRM1,2; Lemos, RR1; Souza, MBR1; Castelletti, CH1; Gomes da Cunha, JE1; Marques, ET3,4; Lima Filho, JL1

1-Keizo Asami Laboratory (LIKA) – Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

2-Neuropsychiatry Department - Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

3-Virology and Experimental Therapy Laboratory, Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Brazil

4-The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, USA

joao.ricardo@ufpe.br

Keywords: genetic variations, Bioinformatics, expression databases, neuropsychiatric disorders; neurogenetics

Genetic variations might contribute to differences in protein activities and gene expression levels observed in complex genetic traits, like neuropsychiatric disease. This finding motivated the development of original approaches using expression studies to guide the finding of new genetic variations, which might include SNPs, deletions and insertions of a few base pairs, microdeletions or even major chromosomal changes. In this analysis we extended this approach to new genes selected from microarrays studies of brain samples of patients with Alzheimer disease-AD (CA1 and Inferior parietal lobe), major depressive disorder-MDD (anterior cingulate cortex), bipolar affective disorder-BPD (left dorsolateral prefrontal cortex) and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease-CJD (prefrontal cortex). The CLCbio Workbench Combined® version 3.6.2. was initially used to build ESTs and mRNA files retrieved respectively from the Goldenpath (UCSC) and NCBI databases and latter to perform multiple batches of Smith-Waterman alignments. The total of 542 ESTs sequences were selected after proper stringent parameters were applied to the first set of mismatches. The annotation revealed various classes of variations, most of them deletions (569), but also transitions (253), transversions (52), synonymous (51), non synonymous (502) and SNPs in UTRs (57). Deletions ranging from 1 to 10 pb were the most common finding and were present in coding regions 5' and 3'UTR regions. Deletions are often associated to major genetic syndromes with dysmorphic features, however, various recent studies show that common micro-deletions might be highly associated with common neuropsychiatric disorders such as schizophrenia, autism, mental retardation or even in various ethnicities, detected in whole genome sequencing experiments.

Funding: FACEPE, CNPq, CAPES, Propesq-UFPE.

Searching for new genetic risk factors for neuropsychiatric disorders in expression databases

Souza, M.B.R.¹; Lemos, R.R.¹; Gomes da Cunha, J. E¹; Lima Filho, J. L. ¹; Oliveira, J.R.M.^{1,2}

¹Keizo Asami Laboratory (LIKA) - Federal University of Pernambuco, Recife-PE.

²Neuropsychiatry Department - Federal University of Pernambuco, Recife-PE

Genetic variations might contribute to differences in protein activities and gene expression levels observed in complex genetic traits, like neuropsychiatric disease. This finding motivated the development of original approaches using expression studies to guide the finding of new genetic variations. **Objective:** Set new genetic risk factors for neuropsychiatric disorders. **Methods:** We extended this approach to new genes selected from microarrays studies of brain samples of patients with Alzheimer's Disease, major depressive disorder, bipolar affective disorder and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. The CLCbio Workbench Combined® version 3.6.2. was initially used to build ESTs and mRNA files retrieved respectively from the Goldenpath (UCSC) and NCBI databases and latter to perform multiple batches of Smith-Waterman alignments. **Results:** The total of 426 ESTs sequences were selected after proper stringent parameters were applied to the first set of mismatches. The annotation revealed various classes of variations, most of them deletions ranging from 1 to 10 pb. These deletions were present in coding regions, 5' and 3'UTR regions. **Conclusion:** Deletions are often associated to major genetic syndromes with dysmorphic features, however, recent studies show that common micro-deletions might be highly associated with common neuropsychiatric disorders or even in various ethnicities detected in whole genome sequencing experiments.

Keywords: genetic variations, Bioinformatics, expression databases, neuropsychiatric disorders, deletions.

Funding: This study received financial support from the following Brazilian funding agencies and academic bureaus: PROPESQ-UFPE, CAPES, CNPq and FACEPE.

Population distribution of the 5-HTTLPR polymorphism compared to a World Wide Web database of subjective perception of happiness

Queiroz, R.C.¹; Souza, M.B.R.¹; Oliveira, J.R.M.^{1,2}

¹Keizo Asami Laboratory (LIKA) - Federal University of Pernambuco, Recife-PE.

²Neuropsychiatry Department - Federal University of Pernambuco, Recife-PE.

Introduction: The 5-HTTLPR polymorphism has been widely associated with several mood disorders, such as major depression, dysthymia and bipolar disorder. However, there is current debate about the involvement of this polymorphism and the subjective perception of happiness in different populations world wide. **Objective:** To understand the cultural differences between some populations that might be more optimistic than others, despite living under more stressful social and economic conditions, like in Brazil. **Methods:** To compare the frequency of the short and Long alleles of the 5-HTTLPR polymorphism in control populations from different countries available in studies retrieved from PUBMED, SCOPUS and ISI Web of Knowledge databases, conducting a meta-analysis searching for the terms “polymorphism 5-HTTLPR”, “polymorphism 5-HTTLPR in population”, “polymorphism 5-HTTLPR in race”, “mood disorders”, “serotonin transporter gene” and “5-HTTLPR and name of the country following the site <http://www.infoplease.com/countries.html>”. These data was gathered and compared with the information available at the “world Database of happiness (<http://www.worlddatabaseofhappiness.eur.nl>)”, in order to try to identify a correlation between the happiness scores and the allelic frequencies variations across different nations. We also examined the bibliographies of all of the considered publications so as to identify other studies. **Inclusion Criteria:** Published and unpublished studies were included if they were: randomized controlled trials (RCTs) of mood disease (major depression and bipolar disorders); written in English; and conducted among persons documented diagnostic criteria for mood disease. **Results:** Conflicting results were found sometimes supporting the association of higher frequencies of the L allele, associated with good mood and high scores of happiness perception, but not always. **Conclusion:** Conflicting social factors might be confounding these analyses and should be further explored along the extension of this study.

Keywords: 5-HTTLPR, happiness, mood, meta-analysis, database.

This study received financial support from PROPESQ-UFPE.

