



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ansiedade, Depressão e *Stress*: estudo dos polimorfismos funcionais 5-HTTLPR e rs25531 do gene SLC6A4, numa amostra de jovens adultos de nacionalidade portuguesa

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Evolução e Biologia Humanas, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Jorge Gama Mota (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Manuela Pratas Alvarez (Universidade de Coimbra).

Patrícia Pinto Pereira

2015

Agradecimentos

Aos meus orientadores Professor Doutor Paulo Gama e Professora Doutora Manuela Alvarez pela orientação e incentivo. À minha orientadora, um especial e sincero agradecimento pela constante motivação, atenção e incansável disponibilidade ‘fora de horas’.

Ao Doutor Licínio Manco pela orientação no trabalho de laboratório e preciosas sugestões.

À psicóloga Sónia Cherpe pelas sugestões, encorajamento e boa disposição.

A todos os estudantes que voluntariamente participaram neste trabalho.

À Mariana por ser quem é, pelas pausas que partilhámos, pela força que me deu e por trazer sempre tanta cor até aos momentos mais negros.

À Valérie pelas partilhas no nosso ‘escritório’ e por me ter feito sentir sempre tão bem acompanhada em tempos de desespero.

À Patrícia que mesmo longe e sem saber me guiou em tantas etapas e tarefas.

Ao Gonçalo pela enorme paciência e cumplicidade e por estar sempre presente de uma forma tão especial.

À minha irmã por ser a minha *pessoa*.

Aos meus pais por *tudo*.

Índice

1. Introdução	1
1.1 <i>Depressão</i>	3
1.1.2 Sintomas e Epidemiologia	4
1.2 Mecanismos Neurobiológicos da Depressão	5
1.2.1 Hipótese Monoamínica	5
1.2.2 Transportador de serotonina SLC6A4	7
1.2.2.1 Polimorfismo funcional 5-HTTLPR	7
1.2.2.2 rs25531	9
1.3 Estudo da depressão e dos estados depressivos	10
1.3.1 Perspetiva evolutiva dos estados depressivos	10
1.3.1.1 Teoria ecológica da conservação de recursos	10
1.3.1.2 Teoria da competição social	11
1.3.1.3 Teoria do afeto	12
1.3.1.4 Teoria do risco social	12
1.3.1.5 Neurobiologia, Evolução e Cognição	13
i) Experiências sociais negativas e sistema serotoninérgico	13
ii) Hipersensibilidade ao risco social	14
iii) Sistemas de tomada de decisão e córtex pré-frontal	14
1.3.2 Perspetiva Evolutiva da Depressão major	14
1.3.2.1 Modelo de desregulação	14
1.3.2.2 Hipótese da navegação social	15
1.3.2.3 Modelo de Nettle – diferenças individuais e neuroticismo	15
1.3.3 Design experimental de interação Gene x Ambiente	16
1.4 Objetivos	18
2. Material e Métodos	21
2.1 Caracterização da amostra	23
2.2 Métodos laboratoriais	23
2.2.1 Extração de DNA	23
2.2.2 Genotipagem	24
2.2.2.1 Definição dos grupos de genótipos para análise estatística	25
2.3 Métodos analíticos	26
2.3.1 Teste do Equilíbrio Hardy-Weinberg	26
2.3.2 Cálculo da distância genética entre populações	27
2.3.3 Modelos Lineares Generalizados	28
2.3.4 Instrumentos de medida	29
2.3.4.1 CERQ – Cognitive Emotion Regulation Questionnaire	30
2.3.4.2 EADS-21 – Escalas de Ansiedade Depressão e Stress	31
2.3.4.3 CTQ – Childhood Trauma Questionnaire	31
2.3.4.4 MHC – Mental Health Continuum – Short Form	32
2.3.5 Introdução ao modelo G x A	34

2.3.5.1 Modelo EADS-21, maus tratos, bem-estar, <i>depressão dos pais</i> e genótipo 5-HTTLPRrs/25531	34
2.3.5.2 Modelo EADS-21, estratégias <i>coping</i> cognitivas, <i>depressão da mãe</i> e genótipo 5-HTTLPRrs/25531	36
3. Resultados	40
3.1 Descrição das frequências alélicas e genótípicas no locus SLC6A4 definidas pelos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 numa amostra de jovens adultos de nacionalidade Portuguesa	42
3.1.1 Alelos L e S	42
3.1.2 Alelos <i>a</i> e <i>g</i>	43
3.1.3 Haplótipo 5-HTTLPR/rs25531	44
3.1.4 Equilíbrio Hardy-Weinberg	46
3.2 Comparação das frequências alélicas registadas na população portuguesa com as que foram observadas noutras populações dos continentes Europeu, Asiático e Africano ...	46
3.3 Os polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 do gene SLC6A4 e o risco individual para níveis elevados de ansiedade, depressão e <i>stress</i> em ambientes psicossociais particulares	
3.3.1 Modelo EADS-21, maus tratos (CTQ), bem-estar (MHC), <i>depressão dos pais</i> e genótipo 5-HTTLPRrs/25531	50
3.3.1.1 Genótipo 5-HTTLPR/25531	52
3.3.1.2 Género	53
3.3.1.3 <i>Depressão do pai</i> e <i>depressão da mãe</i>	54
3.3.1.4 Bem-estar emocional, psicológico e social (MHC)	55
3.3.1.5 Maus tratos na infância (CTQ)	56
3.3.1.6 <i>Depressão do pai</i> , <i>depressão da mãe</i> e maus tratos	57
3.3.1.7 <i>Depressão do pai</i> , <i>depressão da mãe</i> e bem-estar	58
3.3.1.8 <i>Depressão do pai</i> , <i>depressão da mãe</i> e genótipo 5-HTTLPR/rs25531	60
3.3.2 Modelo EADS-21, estratégias <i>coping</i> cognitivas, <i>depressão da mãe</i> e genótipo 5-HTTLPRrs/25531	63
3.3.2.1 Estratégias <i>coping</i> cognitivas	65
3.3.2.3 <i>Depressão da mãe</i> e estratégias <i>coping</i> negativas	66
4. Discussão e Considerações finais	69
4.1 Frequências dos alelos L, S, <i>a</i> e <i>g</i> na população portuguesa	71
4.2 Modelos de interação estatística G x A	73
4.2.1 Interação entre o genótipo 5-HTTLPR/rs25531 e fatores indutores de <i>stress</i>	73
4.2.2 Interação entre o genótipo 5-HTTLPR/rs25531 e perfil cognitivo	76
4.3 Considerações finais	77
5. Referências bibliográficas	81

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática da síntese, armazenamento, libertação, recaptção e degradação da serotonina no neurónio pré-sináptico. A serotonina é sintetizada pela triptofano-hidroxilase e armazenada em vesículas. Depois de libertada na fenda sináptica, (1) liga-se aos recetores de serotonina no neurónio pós-sináptico; (2) Liga-se aos recetores de serotonina no neurónio pré-sináptico; e (3) é recaptada pelo transportador de serotonina – SLC6A4 para ser reciclada ou degradada. (Adaptado de Rot *et al.*, 2009).
.....6

Figura 2 – Representação esquemática do gene transportador de serotonina SLC6A4, localizado no cromossoma 17q11.1-17q12, com 14 exões. O polimorfismo 5-HTTLPR está localizado na região promotora do gene tem duas variantes alélicas S, com 375 pb e L com 419 pb. A atividade basal destas duas variantes é diferentes, sendo que o alelo longo é mais eficaz na transcrição. (Adaptado de Canli e Lesch, 2007).8

Figura 3 – Representação esquemática do conjunto de fatores que podem influenciar o fenótipo medido pelas escalas de Ansiedade, Depressão e Stress: i) genótipo 5-HTTLPR/rs25531 - L1L1, L1S1 e S1S1 (diferentes grupos consoante a funcionalidade); ii) bem-estar emocional, psicológico e social e iii) ambiente familiar que engloba a presença ou não de perturbações psicológicas do pai e da mãe e maus tratos infantis. As letras A, B e C estão representadas nos fatores testados em interação: Depressão do pai* Depressão da mãe (A), Depressão do pai* Depressão da mãe* Maus tratos na infância (B) e Depressão do pai* Depressão da mãe* Bem-estar emocional, psicológico e social..... 35

Figura 4 – Representação esquemática do conjunto de fatores que podem influenciar o fenótipo medido pelas Escalas de Depressão, Ansiedade e Stress: i) genótipo 5-HTTLPR/rs25531 - L1L1, L1S1 e S1S1 (diferentes grupos consoante a funcionalidade); ii) estratégias *coping* cognitivas positivas e negativas e iii) ambiente familiar que engloba a presença ou não de perturbações psicológicas da mãe. As letras A, B e C estão representadas nos fatores testados em interação: Genótipo* Estratégia positivas (A),

Genótipo * estratégias negativas (B), Depressão da mãe* Estratégias positivas (C) e Depressão da mãe* Estratégias negativas. 38

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando os 3 diferentes genótipos (LL; SS; e LS) relativos ao polimorfismo 5-HTTLPR localizado na região promotora do gene transportador de serotonina SLC6A4. L corresponde ao alelo longo com 419 pb; e S corresponde ao alelo curto com 375 pb. A seta representada do lado direito da figura indica o sentido da corrente elétrica na eletroforese.43

Figura 6 – Eletroforese em gel horizontal de poliacrilamida (6%) mostrando 6 dos 8 haplótipos obtidos pela digestão da enzima MspI relativos aos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 do gene transportador de serotonina SLC6A4. (1) LaSa; (2) LaLa; (3) SaSa; (4) LaLg; (5) LgSa; (6) LgLg. A banda não numerada é uma amostra não digerida. Do lado esquerdo da figura, MPM representa o marcador de peso molecular usado na eletroforese. A seta do lado direito da figura indica o sentido da corrente elétrica na eletroforese.44

Figura 7 – Representação gráfica multidimensional da proximidade (distância e semelhança / dissemelhança) entre 11 populações (designadas pelo nome do país a que pertencem) de três continentes diferentes com base nas frequências alélicas do polimorfismo 5-HTTLPR e nos valores de distância genética correspondentes estimados pela estatística F_{ST} . O eixo vertical representa os valores de distância genética e o eixo horizontal representa os valores de diferença genética.49

Figura 8 – Média da pontuação total obtida na EADS-21 por grupo de genótipo 5-HTTLPR/rs25531: L1L1; L1S1; e S1S1. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos). Os valores médios para cada grupo: L1L1 $15,73 \pm 14,02$; L1S1 $13,91 \pm 12,02$; S1S1 $13,89 \pm 11,09$. As barras representam o intervalo de confiança de 95%.53

Figura 9 – Distribuição das frequências da pontuação total obtida na EADS-21 por sexo feminino (F) e masculino (M). O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos) e o eixo horizontal representa a frequência de indivíduos que obteve um determinado valor de pontuação total (uma lado para cada sexo). Os

valores médios para cada grupo: sexo feminino $15,31 \pm 12,67$ e sexo masculino $12,37 \pm 11,16$54

Figura 10 – Distribuição da pontuação total obtida na EADS-21 e no MHC para a amostra total (n=162). O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos) para a escala de ansiedade, depressão e *stress*. O eixo horizontal representa o nº de pontos obtidos (máximo 70 pontos; mínimo 0 pontos) para a escala de bem-estar. Cada uma das circunferências no gráfico representa um indivíduo que obteve um determinado valor de pontuação total em ambas as escalas. A reta de regressão representada traduz a equação matemática que melhor se ajusta à distribuição das variáveis $y=0,48x+33,69$ 56

Figura 11 – Média da pontuação total obtida no CTQ por grupos definidos pela depressão dos pais: Pais deprimidos, pais não deprimidos e não sabe. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 112 pontos; mínimo 0 pontos). Os valores médios para cada grupo: pais deprimidos $49,46 \pm 9,39$; pais não deprimidos $45,91 \pm 10,62$ e não sabe $47,46 \pm 8,08$. As barras representam o intervalo de confiança de 95%.57

Figura 12 – Média da pontuação total obtida no MHC por grupos definidos pela depressão dos pais: Pais deprimidos, pais não deprimidos e não sabe. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 70 pontos; mínimo 0 pontos). Os valores médios para cada grupo: pais deprimidos $42 \pm 12,48$; pais não deprimidos $41,75 \pm 13,17$ e não sabe $38,38 \pm 10,75$. As barras representam o intervalo de confiança de 95%. ... 59

Figura 13 – Mediana da pontuação total obtida na EADS-21 por grupo de genótipo 5-HTTLPR/rs25531: L1L1; L1S1; e S1S1. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos). As linhas pretas nas barras do gráfico representam a mediana, as caixas quartis, as linhas limites de confiança de 5% e 95% e os pontos ‘outliers’. 61

Figura 14 – Distribuição de indivíduos deprimidos (n=22) e não deprimidos (n=98) da amostra (n=162) por grupos de depressão dos pais. 46% Dos deprimidos têm pais deprimidos, enquanto 54% não tem pais deprimidos. No grupo de não deprimidos, apenas 27% tem pais deprimidos e 74% não tem pais deprimidos.62

Figura 15 – Distribuição da pontuação total obtida na EADS-21 e nos índices CERQ – Estratégias positivas e Estratégias negativas para a amostra total (n=123). O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos) para a escala de ansiedade, depressão e *stress*. O eixo horizontal representa o valor do índice (máximo 5; mínimo 1) para as estratégias *coping* positivas e negativas (esquerda e direita). Cada uma das circunferências no gráfico representa um indivíduo que obteve um determinado valor de pontuação total em ambos os índices. As retas de regressão no gráfico representam a equação matemática que melhor se ajusta à relação entre as duas variáveis: $y=3,41x+21,48$ para a relação EADS-21 estratégias positivas e $y=9,44x+0,25$ para a relação EADS-21 estratégias negativas.66

Figura 16 - Filogenia construída com base em marcadores polimórficos espalhados pelo genoma humano. A expansão geográfica para fora de África foi acompanhada por perda de diversidade genética, representada pela diminuição de intensidade da cor. As linhas horizontais cheias representam o fluxo de genes entre populações ancestrais (14 no continente Africano) e as interrompidas representam fluxo de genes recente entre as populações da Ásia e da Austrália (adaptado de Campbel e Tishkoff, 2010).72

Índice de tabelas

Tabela 1 – Alguns estudos com observação de diferentes variantes alélicas da região promotora do gene SLC6A4: 5-HTTLPR.	9
Tabela 2 – Protocolo utilizado para realização da técnica PCR.	24
Tabela 3 – Fragmentos obtidos após digestão dos produtos da reação de PCR com a enzima MspI.	25
Tabela 4 – Critérios de divisão dos grupos de genótipos para análise estatística.	26
Tabela 5 – Regras qualitativas sugeridas por Sewall Wright (1951) para interpretação dos valores de F_{ST} (adaptado de Jobling <i>et al.</i> , 2014).	27
Tabela 6 – Resumo da classificação das variáveis contínuas e categóricas incluídas no modelo de análise estatística MLG.	28
Tabela 7 – Sumário descritivo os instrumentos de medida utilizados.	29
Tabela 8 – Frequências genotípicas do polimorfismo 5-HTTLPR.	42
Tabela 9 – Frequências genotípicas do SNP rs25531.	43
Tabela 10 – Frequências dos haplótipos 5-HTTLPR/rs25531.	45
Tabela 11 – Frequência de genótipos 5-HTTLPR/rs25531 por grupos funcionais para de acordo com Hu <i>et al.</i> , 2005.	45
Tabela 12a – Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR.	46
Tabela 12b – Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs25531.	46
Tabela 13 – Frequências alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR de outras populações caucasianas.	47
Tabela 14 – Frequências alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR de populações dos continentes Asiático e Africano.	47
Tabela 15 – Valores de distância genética estimados pela estatística F_{ST} em 11 populações de três continentes: Europa, Ásia e África. A população portuguesa apresenta valores baixos (a preto) de diferenciação genética relativamente às populações da Rússia, Áustria, Espanha, Alemanha, Croácia e Itália ($F_{ST} < 0,05$), valores elevados (a vermelho) de diferenciação genética relativamente à Coreia e ao Japão ($0,15 < F_{ST} < 0,25$) e valores	

moderados (a castanho) de diferenciação genética relativamente às populações de África e da China.	48
Tabela 16 – Frequências absolutas da população analisada para o fenótipo por sexo e grupo de genótipo.	50
Tabela 17 – Frequências absolutas e relativas das variáveis <i>depressão do pai</i> e <i>depressão da mãe</i> para a população estudada.	50
Tabela 18 – Valores do teste de Qui-quadrado de Wald e respetivos valores de significância p para os fatores e interações entre fatores testados no modelo (variáveis) e graus de liberdade (gl). EADS-21 é a variável dependente e medida fenotípica de ansiedade, depressão e <i>stress</i>	51
Tabela 19 – Estimativas do modelo. Médias estimadas para os fatores genótipo, sexo, depressão do pai e depressão da mãe, valores de B para as co-variáveis: índice de bem-estar MHC e índice de maus tratos CTQ e respetivos erros padrão. As co-variáveis que aparecem no modelo são fixas nos seguintes valores: MHC = 41,0247 e CTQ = 47,4691. EADS-21 é a variável dependente e medida fenotípica de ansiedade, depressão e <i>stress</i>	51
Tabela 20 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos definidos pela <i>depressão dos pais</i> e respetivas médias do índice fenotípico EADS-21.	55
Tabela 21 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos definidos pela <i>depressão dos pais</i> e respetivas médias do índice de maus tratos (CTQ) e médias do índice fenotípico EADS-21.	58
Tabela 22 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos de <i>depressão dos pais</i> e respetivas médias de pontuação total obtida do índice de bem-estar (MHC) e no índice fenotípico EADS-21.	60
Tabela 23 – Frequência de genótipos 5-HTTLPR/rs25531 no grupo de indivíduos em que pelo menos um dos pais tem ou teve depressão e na amostra total.	60
Tabela 24 – Frequência de indivíduos deprimidos na amostra total e na subamostra em que pelo menos um dos pais teve ou tem depressão.	61
Tabela 25 – Frequências absolutas da população analisada para o fenótipo por sexo e grupo de genótipo.	63

Tabela 26 – Frequências absolutas e relativas das variáveis <i>depressão do pai</i> e <i>depressão da mãe</i> para a população estudada.	63
Tabela 27 – Valores do teste de Qui-quadrado de Wald e respectivos valores de significância p para os fatores e interações entre fatores testados no modelo (variáveis) e graus de liberdade (gl). EADS-21 é a variável dependente e a medida fenotípica de ansiedade, depressão e <i>stress</i>	64
Tabela 28 – Estimativas do modelo. Médias estimadas para os fatores sexo, depressão do pai e depressão da mãe, valores de B para as co-variáveis estratégias CERQ + e CERQ – e respectivos erros padrão. As co-variáveis que aparecem no modelo são fixas nos seguintes valores: CERQ + = 2,1711 e CERQ - = 1,8699	64
Tabela 29 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos definidos pela <i>depressão da mãe</i> e respectivas médias do índice de estratégias coping negativas (CERQ -), e médias do índice fenotípico EADS-21 para os mesmos grupos.	67
Tabela 30 – Tabela de classificação geral das variáveis incluídas nos modelos de avaliação G x A em moderadores positivos e negativos da escala EADS-21 de ansiedade, depressão e <i>stress</i>	78

Resumo

Os polimorfismos funcionais 5-HTTLPR e rs25531, localizados na região promotora do gene transportador de serotonina SLC6A4, deram origem a variantes alélicas, S e g, responsáveis pela diminuição dos níveis de expressão do gene. Devido à sua influência na redução da velocidade de adaptação dos neurónios serotoninérgicos em resposta a estímulos ambientais geradores de *stress*, foi colocada a hipótese de que estas variantes genéticas poderiam contribuir para o aumento do risco individual para a depressão major em ambientes psicossociais adversos. Esta hipótese foi testada em numerosos estudos efetuados em populações da Europa e da Ásia, porém, nem todos provaram a existência de uma relação estatística significativa entre os polimorfismos S e g e os distúrbios depressivos. Os objetivos principais do presente estudo foram descrever a diversidade genética nos locais de segregação 5-HTTLPR e rs25531 para a população portuguesa e verificar se existe interacção estatística entre o genótipo e o fenótipo que sugira uma interacção biológica entre o ambiente fisiológico interno, determinado pela expressão do gene SLC6A4, e os estímulos externos geradores de *stress*. Para cumprir este objectivo foram genotipados 320 jovens adultos de nacionalidade portuguesa, com idades compreendidas entre os 18 e os 31 anos, provenientes de várias regiões do país. Através de inquéritos de autoavaliação foi avaliado o ambiente psicossocial dos indivíduos incluindo a presença de perturbações psicológicas dos pais, maus tratos na infância, bem-estar geral e o nível de ansiedade, depressão e *stress*. A ocorrência de interacção estatística entre o genótipo e os factores geradores de *stress* foi testada através da análise de Modelos Lineares Generalizados (MLG), implementada no programa informático IBM SPSS. Por ser a primeira vez que a frequência dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 foi descrita na população Portuguesa procedeu-se à sua comparação com a de outras populações através da estatística F_{ST} . Esta revelou grande semelhança com as populações Europeias previamente estudadas. Os resultados mostraram interacções muito significativas entre alguns factores ambientais e o locus estudado e confirmam a utilidade do *design* experimental G x A na interpretação de perfis de vulnerabilidade a perturbações psicológicas.

Abstract

Functional polymorphisms 5-HTTLPR and rs25531, which are located in the promoter region of the serotonin transporter gene SLC6A4, gave rise to allelic variants, S and g, which slows down the synthesis of the serotonin transporter. Given that acute stressors increase serotonin release, it was hypothesised that these polymorphisms could increase the risk of major depression disorder because they reduce serotonin neurons's speed in adapting to changes in their stimulation. This hypothesis was tested in several studies conducted in European and Asian populations. However, some of them failed to demonstrate a relationship between both S and g polymorphisms, and depression. The main goal of this study was to describe the genetic diversity of 5-HTTLPR and rs25531 segregation sites for the Portuguese population, and check if there is a statistical interaction between the genotype and the phenotype. To fulfil this objective 320 young adults of Portuguese nationality, aged between 18 and 31 years, were genotyped for both 5-HTTLPR and rs25531 polymorphisms. Through self-assessment surveys their psychosocial environment was measured, including the parents' psychological disturbances, levels of abuse in childhood, general well-being, and overall levels of anxiety, depression and stress. The occurrence of a statistical interaction between the genotype and stress inducing factors was tested by way of Generalized Linear Models (GLM), implemented in IBM SPSS software. The relatedness between populations, Portuguese, European and non-European, was measured using pairwise F_{ST} statistics. The evolutionary distance between them match with similarity with European populations previously studied. The results showed highly significant interactions between environmental factors and the loci studied and confirm the usefulness of experimental design G x E in the interpretation of psychological disturbance vulnerability profiles.

1.Introdução

1.1 Depressão

A *depressão* é uma das perturbações mentais mais comuns, antigas e bem reconhecidas (Jabbi et al., 2008). Segundo Sullivan et al. (2000) prevê-se que até 2020 esta perturbação seja uma das principais causas de incapacidade e inaptidão em todo o mundo (Sullivan et al., 2000). No entanto, o termo *depressão* tem sido usado para designar um espectro de estados, condições e patologias muito abrangente (Del Porto, 1999). Enquanto estado afetivo, surge frequentemente associado a perdas pessoais, desmoralização e frustração a vários níveis, e dissipa-se quando a causa externa desaparece (Nesse, 2011). Em termos patológicos, a depressão é o prolongar deste estado ou condição que toma por vezes proporções anormais, perturbando o normal funcionamento do indivíduo a nível psicológico, cognitivo e motor (Belmaker e Agam, 2008). Pode dividir-se em três categorias de acordo com a sintomatologia, intensidade e durabilidade: depressão major ou distúrbio unipolar; depressão maníaca ou distúrbio bipolar e distímia. Genericamente, a depressão major pode ser reativa, em resposta a um acontecimento externo, ou endógena. É geralmente mais intensa e de menor durabilidade. A distímia, pelo contrário, é mais comum, menos severa e prolonga-se durante mais tempo. Estas duas perturbações estão relacionadas com um espectro emocional negativo e assemelham-se na sintomatologia. O transtorno bipolar, por sua vez, tem uma forte componente hereditária e é caracterizado por estados emocionais negativos, alternados com grande excitabilidade, agitação e elevada autoestima, típicos de episódios maníacos (Cartwright, 2008).

Segundo a mais recente versão do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV (DSM-IV)*, para que seja diagnosticado algum tipo de depressão, o indivíduo tem de apresentar pelo menos cinco sintomas de uma lista de nove: – 1) estado deprimido; 2) anodinia; 3) sensação de inutilidade e auto-culpa; 4) dificuldades de concentração; 5) fadiga ou perda de energia; 6) distúrbio de sono; 7) problemas psicomotores; 8) perda ou ganho de pessoa; e 9) ideias recorrentes de morte ou suicídio. Um destes sintomas deverá ser, obrigatoriamente, estar frequentemente deprimido (1) ou anódino (2) durante, pelo menos, duas semanas e a situação deve ter a duração mínima de duas semanas.

1.1.2 Sintomas e Epidemiologia

A sintomatologia da depressão pode ser de natureza psicológica, cognitiva, fisiológica e motora (Harmer *et al.*, 2009; Jabbi *et al.*, 2008). De um modo geral, os sentimentos de tristeza e desvalorização pessoal, perda de energia, insônia, dificuldades de concentração e pensamentos de morte ou suicídio são os sintomas mais frequentemente associados à depressão (Weissman *et al.*, 2004). Para além dos sintomas mais comuns, a depressão pode também manifestar-se por apatia, irritabilidade, fadiga extrema, perda de apetite, retardamento psicomotor e por vezes, pensamentos de morte ou suicídio (Del Porto, 1999). Contudo, estes sintomas parecem variar com o sexo e a idade e com a etnia (Gonda, *et al.*, 2005). Para as mulheres, a primeira manifestação de depressão surge normalmente durante a adolescência, enquanto para os homens, o começo da depressão ocorre no final da segunda década de vida (Weissman *et al.*, 2004). Para além disto, o rácio de depressão para as mulheres é cerca de três vezes superior ao dos homens (Kessler *et al.*, 1993). É possível que as flutuações hormonais femininas que têm início durante a adolescência contribuam para a incidência diferencial do distúrbio depressivo (Eley *et al.*, 2004). Depois do primeiro episódio depressivo ter lugar em crianças e adolescentes, o risco de reincidência parece ser aumentado principalmente por fatores de natureza genética. Quando o começo da depressão é precoce, é provável que tenha uma forte componente hereditária, que se sabe hoje ser cerca de 37 % para este distúrbio (Lesch *et al.*, 1994; Jabbi *et al.*, 2008). Já em pacientes mais velhos, a depressão está muitas vezes associada a outras patologias, tais como problemas cardiovasculares e disfunções endoteliais (Belmaker & Agam, 2008; Del Porto, 1999). Por outro lado, as pessoas deprimidas têm risco aumentado de desenvolver outras perturbações como distúrbios de pânico e obsessivo-compulsivos e apresentam-se mais vulneráveis a abusos de álcool e outras substâncias aditivas (Weissman *et al.*, 2004). No que diz respeito à distribuição geográfica da depressão maior, os países em desenvolvimento, com exceção do este e sudeste asiático, apresentam níveis mais elevados de prevalência deste distúrbio, quando comparados com os países desenvolvidos (Ferrari *et al.*, 2013).

1.2 Mecanismos Neurobiológicos da Depressão

Através da neuroimagem, já se conseguiu perceber que são várias as regiões cerebrais envolvidas no desenvolvimento e sintomatologia da depressão. Por esta razão, as hipóteses explicativas para este distúrbio envolvem diferentes sistemas, regiões e substâncias cerebrais (Price *et al.*, 2012). O conhecimento do funcionamento das regiões envolvidas em condições normais permite associá-las a diferentes aspetos da depressão, tais como a cognição, memória emocional e sintomatologia. Porém, o facto de estas estruturas operarem em simultâneo em sistemas paralelos que interagem entre si, torna difícil formular uma hipótese única para explicar todos os mecanismos da depressão (Nestler *et al.* 2002). A grande maioria dos estudos clássicos dos processos neurobiológicos inerentes à depressão foca-se nos sistemas de neurotransmissores monoamínicos, nomeadamente o sistema serotoninérgico. Esta linha de investigação tem como princípio base o facto de grande parte dos pacientes deprimidos apresentar níveis reduzidos deste neurotransmissor (Rot *et al.*, 2009).

1.2.1 Hipótese Monoamínica

No neurónio pré-sináptico, a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HTT) é sintetizada pela enzima triptofano-hidroxilase e armazenada em vesículas antes de ser libertada. Após estimulação suficiente, a serotonina é libertada na fenda pré sináptica, onde atua de três formas distintas: (1) liga-se aos seus recetores no neurónio pós sináptico, promovendo a transdução de sinal semelhante à que estimulou em primeiro lugar o neurónio pré-sináptico; (2) liga-se aos seus recetores no neurónio pré-sináptico, promovendo um sistema de feedback positivo que regula a plasticidade do neurónio; e (3) é eliminada da fenda sináptica, regressando ao neurónio pré-sináptico através do transportador de serotonina – SLC6A4. Desta forma, o neurotransmissor é reciclado para ser usado posteriormente ou degradado pela enzima monoamina-oxidase (MAO) para excreção (Figura 1).

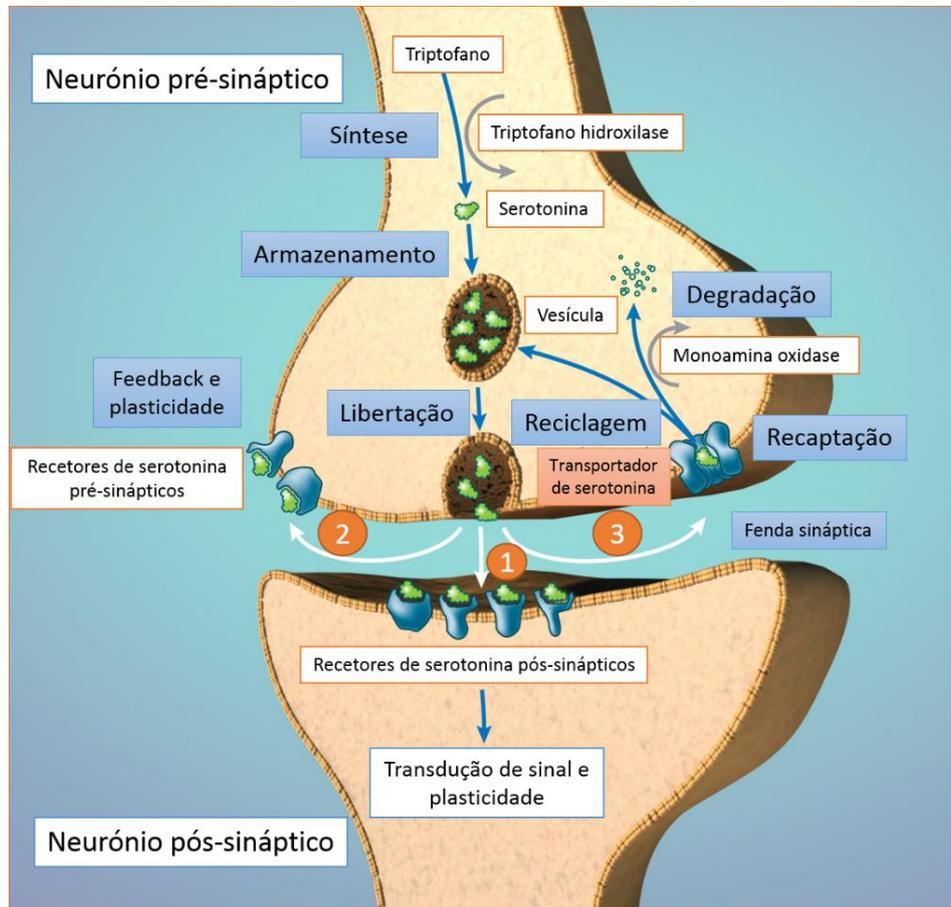


Figura 1 – Representação esquemática da síntese, armazenamento, liberação, recaptção e degradação da serotonina no neurónio pré-sináptico. A serotonina é sintetizada pela triptofano-hidroxilase e armazenada em vesículas. Depois de libertada na fenda sináptica, (1) liga-se aos recetores de serotonina no neurónio pós-sináptico; (2) Liga-se aos recetores de serotonina no neurónio pré-sináptico; e (3) é recaptada pelo transportador de serotonina – SLC6A4 para ser reciclada ou degradada. (Adaptado de Rot *et al.*, 2009)

Para testar esta hipótese, pacientes com diagnóstico prévio de depressão ingeriram uma mistura de substâncias pobre em triptofano, essencial à síntese de serotonina. Gradualmente, os níveis de serotonina diminuíram, provocando breves recaídas sintomatológicas quer nos pacientes medicados com antidepressivos que alteram os níveis de serotonina, quer nos pacientes não medicados em remissão. Isto sugere que a diminuição dos níveis de serotonina pode conduzir à depressão. Contudo, quando este tipo de experiências foi feito em sujeitos sem historial familiar de distúrbios depressivos, não foram registadas as mesmas alterações sintomáticas (Ruhé *et al.*, 2007). Isto leva a crer que, para além da alteração dos níveis de serotonina em si, outros fatores contribuíram para a sensibilidade de cada individuo a estas variações, e consequentemente para a suscetibilidade para a depressão.

Por estar ativamente envolvido no sistema serotoninérgico e ser um dos principais responsáveis pela manutenção dos níveis deste neurotransmissor, o transportador de serotonina - SLC6A4 - apresenta-se como um dos melhores candidatos a gene envolvido em distúrbios de ansiedade e depressão (Lesch *et al.*, 1994).

1.2.2 Transportador se serotonina SLC6A4

Localizado no cromossoma 17q11.1-17q12 (Ramamoorthy *et al.*, 1993), o SLC6A4 tem aproximadamente 31 kb e é composto por 14 exões e 13 intrões. O primeiro intrão encontra-se antes do codão de iniciação ATG e mais 12 intrões estão alternados na região codificante do gene (Lesch *et al.*, 1994). Este gene codifica um transportador de serotonina de alta afinidade dependente de sódio e cloro, que se localiza na membrana pré-sináptica dos neurónios (Ramamoorthy *et al.* 1993) e parece ser o alvo primário da ação de uma importante classe de antidepressivos terapêuticos – inibidores seletivos da recaptção de serotonina (Ogilvie *et al.*, 1996).

1.2.2.1 Polimorfismo funcional 5-HTTLPR

Depois de estudar e mapear a região promotora do gene em 1995, Heils *et al.* (1996), reportaram um polimorfismo comum na região promotora, localizado antes do local de iniciação da transcrição – 5-HTTLPR. Este polimorfismo consiste numa inserção ou deleção de 43-pb envolvendo 14 (14R) a 16 (16R) elementos repetitivos, referidos como variantes *Short* (S, com 375 pb) e *Long* (L com 419 pb) de onde vem os números 375 e 419? (Gelernter *et al.*, 1997) Estas duas variantes do polimorfismo ocorrem em todas as populações representantes das grandes regiões geográficas do mundo, levando a crer que o polimorfismo não é recente na história do homem moderno (Gelernter *et al.*, 1999). A principal diferença entre as duas variantes S e L é em termos de eficiência transcricional; a variante longa é aproximadamente três vezes mais eficaz que a variante curta (Lesch *et al.*, (1996). Por este motivo, a recaptção de serotonina em células homozigóticas para o alelo L é mais eficaz do que em células que contenham uma ou duas cópias do alelo S. O estudo de Lesch *et al.* (1996) concluiu que os indivíduos L/S e S/S apresentavam, tendencialmente, maiores níveis de neurose

(associados a ansiedade e depressão), que indivíduos L/L, reforçando a ideia de que o polimorfismo 5-HTTLPR poderá estar associado a estes distúrbios.

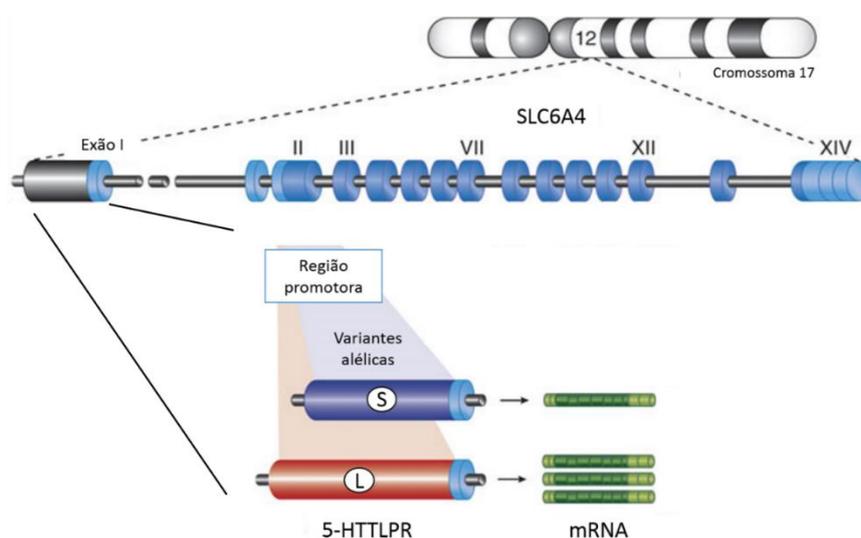


Figura 2 – Representação esquemática do gene transportador de serotonina SLC6A4, localizado no cromossoma 17q11.1-17q12, com 14 exões. O polimorfismo 5-HTTLPR está localizado na região promotora do gene tem duas variantes alélicas S, com 375 pb e L com 419 pb. A atividade basal destas duas variantes é diferentes, sendo que o alelo longo é mais eficaz na transcrição. (Adaptado de Canli e Lesch, 2007)

Mais tarde, numa investigação que visava estudar as frequências alélicas S e L em vários grupos com origens geográficas distintas, Gelernter *et al.* (1997), relataram, pela primeira vez, a observação de dois novos alelos na região promotora do gene em indivíduos Africo-Americanos e Japoneses. De acordo com a nomenclatura originalmente atribuída por Heils *et al.* (1996), estes alelos foram designados de *Very Long* (VL, com 460 pb) e *Extra Long* (XL, com 500 pb). Depois disto, vários trabalhos fizeram observações semelhantes, aumentando o leque de variações alélicas na região promotora do gene (Tabela 1). A grande maioria das observações de variantes com tamanhos superiores ao alelo L foi feita em heterozigóticos (Haberstick *et al.*, 2015) de populações de origem asiática e africana e ainda não foram reportadas em nenhuma população caucasiana (Goldman *et al.* 2010).

Tabela 1 – Alguns estudos com observação de diferentes variantes alélicas da região promotora do gene SLC6A4: 5-HTTLPR.

		Autores do estudo	
Variante S	STP14	14R	Nakamura <i>et al.</i> , 2000; Kunugi <i>et al.</i> , 1997; Gelernter <i>et al.</i> , 1999; Michaelovsky <i>et al.</i> , 1999; Goldman <i>et al.</i> 2010
		15R	Nakamura <i>et al.</i> , 2000;
Variante L	STP16	16R	Nakamura <i>et al.</i> , 2000; Kunugi <i>et al.</i> , 1997; Gelernter <i>et al.</i> , 1999; Michaelovsky <i>et al.</i> , 1999; Goldman <i>et al.</i> 2010
		17R	Haberstick <i>et al.</i> , 2015
		18R	Guhathakurta <i>et al.</i> , 2006; Michaelovsky <i>et al.</i> , 1999; Goldman <i>et al.</i> 2010
Variantes VL e XL	STP19	19R	Nakamura <i>et al.</i> , 2000; Kunugi <i>et al.</i> , 1997; Goldman <i>et al.</i> 2010
	STP20	20R	Nakamura <i>et al.</i> , 2000; Kunugi <i>et al.</i> , 1997; Guhathakurta <i>et al.</i> , 2006; Goldman <i>et al.</i> 2010
		22R	Nakamura <i>et al.</i> , 2000; Gelernter <i>et al.</i> , 1999; Goldman <i>et al.</i> 2010

A variante S do polimorfismo 5-HTTLPR abranda a síntese do transportador de serotonina, o que se pensa estar associado à redução da velocidade à qual os neurónios se adaptam a estímulos (Lesch *et al.* 1996). Se um determinado fator de *stress* aumenta a libertação de serotonina, então este polimorfismo deve influenciar a sensibilidade e resposta de um individuo ao stress, propulsor comum da depressão. O que acontece é que nem o património genético, nem a exposição a estímulos stressantes, por si só, são bons indicadores de risco. Em vez disso, estes dois fatores interagem entre si para interferir na forma como se pode prever a vulnerabilidade de um determinado individuo de desenvolver distúrbios psicológicos (Rot *et al.*, 2009).

1.2.2.2 rs25531

Hu *et al.*, (2005) mostraram que a substituição de um único nucleótido *a> g* (SNP25531) na variante L do polimorfismo 5-HTTLPR (La ou Lg) também podia levar a alterações ao nível da transcrição do gene SLC6A4. Localizado imediatamente fora do segmento 5-HTTLPR, o alelo *g* atenua a eficiência transcricional do alelo L, fazendo com que em associação, o haplótipo se comporte de forma semelhante à variante S (Bonvicini *et al.*, 2010). Apesar da substituição do nucleótido também ser encontrada associada à variante curta do 5-HTTLPR (Sa ou Sg), não são visíveis alterações ao nível da eficácia transcricional neste caso (Wendland *et al.*, 2006). Assim, em quatro possíveis haplótipos pela combinação destes dois polimorfismos apenas um se destaca com eficácia transcricional elevada – La. Os restantes, Lg, Sa e Sg apresentam níveis de

transcrição diminuídos e semelhantes entre si e são responsáveis pela redução da expressão do gene SLC6A4 (Bonvicini *et al.*, 2010).

1.3 Estudo da depressão e dos estados depressivo

O estudo teórico e empírico da depressão tem sido dominado pela investigação da sintomatologia e do tratamento dos estados depressivos. Apesar da importância inquestionável da pesquisa das causas próximas do fenómeno depressivo, nos últimos anos, têm aumentado significativamente, na literatura as explicações de natureza evolutiva, ou causas últimas da depressão. Abordar a depressão sob o ponto de vista evolutivo, permite compreender porque é que as pessoas deprimem.

1.3.1 Perspetiva evolutiva dos estados depressivos

Em primeiro lugar, será mais adequado sob o ponto de vista evolutivo utilizar os termos – estados depressivos – para referir todo um espectro de estados ou condições que podem variar entre o ‘claramente normal’ e o ‘possivelmente patológico’, uma vez que o termo *depressão* está muitas vezes associado a *patologia* (Nesse, 2006). Segundo esta abordagem, níveis moderados de perturbação psicológica podem ser adaptativos e ter benefícios reprodutivos. Se assim for, é provável que no ambiente ancestral humano fossem recorrentes as situações que envolvem um dos preditores indissociáveis da depressão, a perda. Nestas situações, algumas características dos estados depressivos devem ter conferido vantagens que permitiram lidar de forma mais eficaz com as pressões seletivas que atuavam neste contexto (Nesse, 1991). Serão apresentadas algumas teorias e modelos evolutivos que explicam a depressão e os estados depressivos sob o ponto de vista evolutivo que podem complementar-se e não são mutuamente exclusivas.

1.3.1.1 Teoria ecológica da conservação de recursos

Do ponto de vista ecológico, os estados depressivos são instigados por situações em que não há controlo razoável sobre o resultado de um investimento; ou é provável que haja fracasso, ou a recompensa é insuficiente (Nesse, 2000). Cada indivíduo deverá decidir quando e como investir da melhor maneira os recursos disponíveis no momento

certo e proporções adequadas. Deixar ou trocar um companheiro; alterar o curso da carreira; arriscar investir num negócio; são normalmente decisões difíceis de tomar, uma vez que envolvem mudança e requerem abdicar de alguns investimentos para dar lugar a novas experiências, possibilidades e incertezas. Tendo em conta o peso e a importância destas decisões, um mecanismo como os estados depressivos, que faça com que um indivíduo se mantenha na mesma posição quando o risco associado à mudança é demasiado elevado, é uma estratégia que pode ser útil (Nesse, 1991). Como resposta adaptativa, a depressão surgiria para reduzir ou inibir qualquer tipo de investimento nestas situações onde há pouco ou nenhum ganho. Mas da mesma forma que os estados depressivos podem ser um incentivo à libertação de objetivos inatingíveis, também podem resultar de demasiado tempo e recursos investidos nestes mesmos objetivos (Klinger, 1993 in Allen & Badcock, 2006). De facto, as pessoas deprimidas tendem a investir em demasia num número limitado de objetivos e quando falham, parecem ficar mais propensos a colapsar (Champion & Power, 1995).

1.3.1.2 Teoria da competição social

O acesso que um indivíduo tem a importantes recursos reprodutivos depende grandemente da sua posição e estatuto dentro de uma rede ou grupo social. E uma forma de disputar lugares nestes rankings é através de conflitos mediados pela competição entre indivíduos. Baseado nestes comportamentos ritualísticos de luta, Price (1998) formulou uma hipótese explicativa para os estados depressivos. Durante um encontro entre adversários, os indivíduos vão à partida exibir comportamentos distintos de acordo com a posição ou estatuto inicial de cada um. O mais forte adota uma estratégia de escalada para aumentar as chances de ganhar, enquanto o mais fraco adota a estratégia contrária característica de subordinação e comportamento submisso. Assim, os estados depressivos surgiriam como mecanismos involuntários que evoluíram como estratégias de subordinação (Price *et al.*, 1994). Contudo, se na maioria das espécies os comportamentos agonísticos de luta e intimidação são estratégias eficazes, o mesmo não acontece sempre com os humanos. Na nossa espécie, a aquisição de recursos depende da atratividade, valor social e prestígio. Dependendo da sua posição e estatuto, o indivíduo pode licitar mais ou menos atenção e recompensas sociais sob a forma de aprovação, aceitação, respeito, e admiração. E é quando há privação destas recompensas

quando se pensa serem merecidas, que são ativados sistemas de reposta defensivos de perda de confiança e autoestima (Allen & Badcock, 2006).

1.3.1.3 Teoria do afeto

Segundo Buss (1991), a fixação e retenção de companheiro e a capacidade de construir e manter alianças recíprocas estão entre as principais pressões sociais seletivas na história evolutiva humana. Desta forma, os laços afetivos entre pais e filhos, parceiros sexuais e membros de um grupo social, são extremamente importantes na medida em que asseguram a sobrevivência e reprodução dos indivíduos. Quando estes laços se perdem ou estão ameaçados, pode ter início a depressão como forma de inibir a exploração e formação de laços que possam ser pouco seguros e eficazes. Ao mesmo tempo, *estar deprimido* motiva o sofrimento para evitar deteriorar outros laços preexistentes e estimula a reconstrução do laço perdido quando possível (Ingram, 2003). Também poderá servir como pedido de ajuda aos entes próximos para que reforcem o provimento de recursos necessários para a recuperação dos deprimidos. Muitas vezes, a tristeza associada ao estado depressivo é acompanhada de sinais e expressões faciais evidentes, como as lágrimas. Isto faria mais sentido, se a manifestação destes sinais se desse normalmente em público. Mas geralmente os episódios depressivos ocorrem com frequência em isolamento e são mais intensos quando o indivíduo se encontra sozinho (Nesse, 1991).

1.3.1.4 Teoria do risco social

A hipótese do risco social assenta no pressuposto de que todas as relações pessoais podem ser compreendidas em termos de duas dimensões: 1) poder e individualismo; e 2) comunhão e coletivismo (Judd *et al.*, 2005). Quando enfraquecidas, a primeira dimensão apresenta riscos de derrota, frustração, humilhação, armadilha, e a segunda dimensão apresenta riscos de rejeição e ostracização. Apoiados neste pressuposto, Allen e Badcock (2003) sugerem que a depressão pode ter sido concebida como uma resposta psicobiológica defensiva quando há um risco aumentado num destes dois domínios de uma relação. As situações de *stress* interpessoal estão entre as causas mais prováveis e comuns para os estados depressivos. Neste tipo de situações, há por vezes uma desregulação dos sistemas que coordenam as emoções e estados de espírito positivos, os quais estão altamente embebidos no comportamento e cognição sociais.

Estes processos sociais são muito importantes na etiologia e manutenção da depressão, uma vez que moldam e regulam em parte as emoções e postura de confiança dos indivíduos perante o mundo. Assim, em contextos de interação em que há claramente risco de exclusão de um grupo social, vital para lidar com desafios adaptativos e reprodutivos, desenvolveram-se os estados deprimidos para facilitar uma abordagem de ‘aversão ao risco’. Uma vez ativado este mecanismo, a estratégia normal de ‘procura de oportunidades de investimento social’, é trocada pela estratégia ‘aversão ao risco’, ou estados deprimidos. A percepção social é alterada e o indivíduo torna-se hipersensível a indicadores de risco social, modificando a comunicação e os comportamentos de aquisição de recursos (Kendler *et al.*, 2003). Por este motivo, é extremamente útil saber detetar quando há risco elevado de exclusão de uma ou várias redes sociais, uma vez que é nestes grupos que estão concentrados alguns recursos essenciais. Para além de frustração e perda, qualquer experiência social relevante que implique negociar estatuto e recursos, pode ativar os mecanismos da depressão (Allen & Badcock, 2003). Ecologicamente, isto implica que aqueles que foram sendo capazes de preservar melhor o seu valor e participação sociais e diminuir o risco de futuras perdas nestes contextos foram favorecidos por seleção natural. Segundo esta hipótese, o distúrbio depressivo não representa verdadeiramente uma adaptação, mas antes uma consequência despropositada dos mecanismos psicobiológicos quando estes atuam fora do espectro adaptativo normal.

1.3.1.5 Neurobiologia, Evolução e Cognição

Existem algumas evidências neurobiológicas que parecem complementar e integrar-se nestas teorias evolutivas da depressão.

i) Experiências sociais negativas e sistema serotoninérgico

Os recetores de serotonina mediam respostas cognitivas e fazem parte de sistemas de resiliência que restabelecem os comportamentos normais face a adversidades e acontecimentos stressantes (Deakin, 1996). Quando se encontram em situações extremas deste tipo, as dificuldades psicossociais interferem com este sistema, quebrando-o e provocando baixa autoestima e dando início a episódios depressivos.

ii) Hipersensibilidade ao risco social e amígdala

A amígdala também está envolvida na percepção social e sabe-se que está hiperativa durante os estados deprimidos (Cahill *et al.*, 1996). Quando esta região está lesionada, a capacidade de discernimento de características faciais relevantes fica enfraquecida, debilitando uma das competências essenciais na percepção do perigo social (Adolphs *et al.*, 1998).

iii) Sistemas de tomada de decisão e córtex pré-frontal

Em situações em que é necessário tomar decisões sob pressão e arriscar, é criada uma expectativa sobre essa tomada de decisão. O valor global dessa expectativa baseia-se na estimativa da probabilidade de obter recompensas e no valor subjetivo dessas recompensas (Kahneman & Tversky, 1979 *in* Allen & Badcock, 2006). O sistema que avalia estas expectativas é coordenado por vários processos psicológicos, altamente sensíveis ao estado de espírito e às emoções do indivíduo (Loewenstein *et al.*, 2001). No caso particular dos estados depressivos, as emoções negativas e o estado de espírito debilitado do indivíduo farão com que haja menor propensão para adotar comportamentos e fazer escolhas que envolvam riscos. Uma vez que a computação e avaliação destas expectativas de recompensa envolve pensamento a longo prazo, uma das capacidades mais importantes envolvidas neste processo é a memória. A região cerebral responsável por este mecanismo é o córtex pré-frontal esquerdo, que em pessoas deprimidas está menos ativo (Davidson & Irwin, 1999). O efeito que a depressão tem é editar emocionalmente a motivação do indivíduo, inibindo o valor positivo e potenciando o valor negativo destas expectativas futuras (Allen & Badcock, 2006). Também o sistema serotoninérgico pode modular os sistemas de tomada de decisão, atuando sobre a capacidade de empreendimento e compromisso dos indivíduos. A serotonina modera o impacto emocional de estímulos imediatos e estimula o compromisso motivado de objetivos a longo prazo e estímulos distantes (Katz, 1999).

1.3.2 Perspetiva evolutiva da Depressão major

1.3.2.1 Modelo de desregulação

Quando há exposição a elevados níveis de *stress*, são ativadas defesas psicobiológicas com o intuito de repor as funções normais de funcionamento do organismo. Contudo, quando o padrão de exposição é crónico, estas defesas tornam-se

pouco eficazes e falham. O indivíduo entra num estado desregulado em que há exacerbação de sintomas desadequados ao contexto e é induzido à condição de deprimido (Gilbert, 2001). Este modelo explica que o aumento da prevalência da depressão major pode ser explicado pelas diferenças e incompatibilidades entre o nosso ambiente ancestral e moderno (Allen & Badcock, 2003).

1.3.2.2 Hipótese da navegação social

A hipótese de navegação social apoia-se no facto de a depressão major ser uma condição com elevado grau de prevalência na população humana. Este modelo também é adaptativo na medida em que retrata a depressão clínica como um sinalizador honesto e não intencional para extorquir recursos de grupos ou redes sociais. Ao mostrar-se deprimido, o indivíduo ‘emite um pedido de ajuda’, recebendo diversas formas de investimento futuras por parte dos parceiros. (Watson & Andrews, 2002).

1.3.2.3 Modelo de Nettle - diferenças individuais e neuroticismo

Nettle (2004) defende que algumas evidências etiológicas da depressão clínica impedem que seja razoável explicar esta condição em termos de adaptação evolutiva. Se se tratasse efetivamente de uma adaptação, a capacidade para adquirir depressão major deveria ser igual em todos os humanos e a variabilidade dessa capacidade explicada pela hereditariedade deveria ser próxima de zero. A depressão clínica não está presente na maioria das pessoas e existem diferenças nos traços de personalidade individuais que modificam a suscetibilidade à depressão. A depressão clínica crónica pode desenvolver-se mesmo na ausência de fatores ambientais sociais de risco e para além disto, o fator preditor de maior peso, é a presença de um episódio depressivo prévio (Kendler *et al.*, 1993). Segundo Nettle (2004), a variação individual na labilidade das emoções negativas, pode estar refletida no ‘neuroticismo’, ligado à vulnerabilidade e impulsividade. Esta característica pessoal é caracterizada por um continuum de distribuição normal, com extremos patológicos e variação hereditária considerável. Ao mesmo tempo neuroticismo exagerado pode estar associado a diminuição da saúde e falhas nas relações interpessoais, níveis razoáveis deste traço de personalidade podem trazer alguns benefícios reprodutores. Um sistema de reatividade moderada de emoções negativas pode fazer com que o indivíduo seja mais persistente e lutador na

concretização de objetivos pessoais, aumentando a aptidão. Desta forma, a característica – neuroticismo – pode ter sido selecionada por motivar comportamentos de requisto e persistência em contextos interpessoais, até ao ponto que as consequências negativas que daqui advêm ultrapassam os benefícios do ótimo ecológico.

1.3.3 *Design* experimental de interação Gene x Ambiente

A maioria dos estudos de associação genética a distúrbios psicológicos foca-se em polimorfismos funcionais, tais como o 5-HTTLPR, e de que forma interagem com determinados ambientes psicossociais para influenciar o risco e vulnerabilidade a estes distúrbios. Caspi e colaboradores (2003), foram os primeiros autores a publicar um trabalho onde estudaram a vulnerabilidade a distúrbios depressivos, seguindo um modelo experimental de Interação Gene x Ambiente (G x A), relacionando o polimorfismo 5-HTTLPR com fatores de *stress* ambientais. Concluíram que em vez de uma associação direta entre os genes e a depressão (Bellivier *et al.* 1998), a variante S do polimorfismo interage com a exposição a fatores de *stress* ambientais de forma a aumentar a vulnerabilidade dos indivíduos ao distúrbio. O mesmo não se verificou com os portadores de dois alelos L, em cuja associação do genótipo a fatores do ambiente psicossocial parece não atuar da mesma forma. Este tipo de investigação G x A tem sido replicado por vários autores com algumas variações na metodologia e nos parâmetros estudados. E apesar da sua importância e de continuar a ser apontado como um dos melhores candidatos a marcador genético de distúrbios psicológicos, o estudo do polimorfismo 5-HTTLPR criou discórdia e acumulou uma boa quantidade de resultados contraditórios. Apesar de tudo, a grande maioria dos trabalhos continua a encontrar uma forte associação entre a variante S do polimorfismo e fatores ambientais no aumento da vulnerabilidade à depressão e outros distúrbios. Porque este polimorfismo é sensível a influências externas, podem ser medidos e avaliados diferentes parâmetros que caracterizem o meio ambiente que rodeia os indivíduos, tais como o ambiente familiar, historial familiar de distúrbios psicológicos, experiências negativas e acontecimentos de vida stressantes.

Carskadon *et al.*, 2012, por exemplo, estudaram os padrões de sono e verificaram que indivíduos homozigóticos para o alelo S relatavam com mais frequência que se sentiam facilmente irritados e de humor deprimido, se o tempo de sono fosse

reduzido, quando comparados com outros indivíduos. Uma vez que se sabe existir alguma relação entre os distúrbios do sono e a depressão, este fator ambiental poderá interagir com a vulnerabilidade genética dos indivíduos SS para aumentar a tendência para estados depressivos. Como explicação, os autores sugerem que é possível que o encurtamento dos padrões de sono normais possa reduzir os recursos cognitivos requeridos para a abstração de estímulos emocionais negativos.

A importância do tipo de métodos cognitivos a que os indivíduos recorrem para lidar com eventos de vida negativos e stressantes está intimamente ligada à vulnerabilidade a distúrbios psicológicos. A forma como se dá a regulação e adaptação das emoções a este tipo de situações determina, em parte, o tipo de sentimentos, pensamentos e emoções que permanecem após um acontecimento menos bom. Em termos gerais, a probabilidade de um indivíduo apresentar sintomas associados à depressão e ansiedade é tanto maior quanto mais frequentemente o indivíduo optar por estratégias cognitivas ‘menos adaptativas’ ou negativas (Garnefski *et al.*, 2001). Por este tipo de estratégias entendem-se aquelas que fazem com que o indivíduo se foque excessivamente na parte negativa do acontecimento e na forma como se culpabiliza pelo que aconteceu, como a ruminação, auto-culpabilização e catastrofização (Gernefski e Kraaij, 2006). Relacionando este parâmetro com o polimorfismo 5-HTTLPR, Alexander *et al.*, 2009, relataram que indivíduos homozigóticos para o alelo S, quando expostos a elevados níveis de *stress*, apresentavam menor habilidade para lidar com este tipo de acontecimentos, optando por utilizar estratégias cognitivas menos eficientes.

Também o historial de maus tratos na infância e adolescência pode ser levado em conta como fator ambiental de *stress* na medida em que o meio ambiente em que o indivíduo cresce e se desenvolve molda significativamente o seu comportamento enquanto adulto. Entre adolescentes com distúrbios psicológicos é comum a prevalência de níveis elevados de abusos e negligência enquanto crianças (Bernstein *et al.*, 2003). Por exemplo, em crianças abusadas sexualmente, a sintomatologia desenvolvida pós-abuso está intimamente ligada à depressão e ansiedade – há aumento de comportamentos de isolamento e retração, agressividade, neuroticismo, afastamento, auto-injúria e baixa autoestima (Kendall-Tackett, 1993). Num estudo que relacionava o genótipo 5-HTTLPR com o fator de *stress* ambiental ‘maus tratos na infância’, os investigadores Stein *et al.* (2008) relataram que indivíduos homozigóticos para o alelo S que tinham níveis mais elevados de maus tratos infantis, eram o grupo de maior risco

para o desenvolvimento de distúrbios psicológicos. Os autores mediram traços como a ‘sensibilidade à ansiedade’, que também é comum em pessoas deprimidas. Já uma conclusão semelhante tinha sido publicada por Caspi *et al.* (2003), que associaram positivamente o genótipo homozigótico para o alelo S com elevado risco de depressão, quando o fator ‘maus tratos infantis’ estava presente.

Apesar de existir uma grande variedade de acontecimentos que podem ser estudados como fatores de *stress* ambientais, o ambiente familiar, índices de abuso e negligência na infância e o bem estar-social estão entre os mais consensuais nos fatores de risco externos à depressão e ansiedade (Jabbi *et al.*, 2008). Como tal, estes foram os fatores eleitos para ser sujeitos a medições através de questionários de autorrelato com questões sociodemográficas, onde se incluem perguntas sobre as perturbações psicológicas dos pais, de bem-estar emocional, psicológico e social, de abusos e negligência física, psicológica e emocional e sobre estratégias de regulação emocional adotadas face a um acontecimento de vida negativo.

1.4 Objetivos

Os objetivos principais da presente dissertação foram:

- i) Descrever as frequências alélicas e genotípicas no locus SLC6A4 definidas pelos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 numa amostra de jovens adultos de nacionalidade Portuguesa;
- ii) Comparar as frequências alélicas registadas na população portuguesa com as que foram observadas noutras populações dos continentes Europeu, Asiático e Africano;
- iii) Averiguar se nesta amostra, os polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 do gene SLC6A4 estão associados ao risco individual para a apresentar elevados níveis de ansiedade, depressão e *stress* em certos ambientes psicossociais.

Para cumprir com estes objetivos foi feita a genotipagem numa amostra de 320 jovens adultos de nacionalidade portuguesa, com idades compreendidas entre os 18 e os 31 anos, provenientes de várias regiões do país. Em 206 indivíduos desta amostra, foi avaliado o ambiente psicossocial através de inquéritos de autoavaliação, previamente publicados e validados que permitiram conhecer aos níveis de maus tratos na infância, a

presença ou não de perturbações psicológicas dos pais, o bem-estar geral e o nível de ansiedade depressão e *stress*. Com os dados obtidos, foi testada a existência de interação estatística entre o genótipo e as medidas de avaliação psicossocial através da análise de Modelos Lineares Generalizados (MLG), implementada no programa informático IBM SPSS. Por ser a primeira vez que são estudadas as frequências dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 numa amostra de população portuguesa, foi utilizada a estatística F_{ST} para comparar as frequências obtidas com as de outras populações.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da amostra

O grupo amostral foi composto por 206 jovens adultos de ambos os sexos (154 mulheres e 78 homens), não aparentados, com idades compreendidas entre os 18 e os 31 anos (média = 22,1) pertencentes, na sua maioria, à população estudantil da Universidade de Coimbra. A sua participação consistiu: i) na cedência de uma amostra biológica de células do epitélio bucal para determinação do genótipo; ii) no preenchimento de um conjunto de questionários de resposta fechada para avaliação do ambiente psicossocial – CERQ, MHC, CTQ e EADS-21 (introduzidos no ponto 2.3.4 da secção Material e Métodos); iii) e no preenchimento de um formulário sociodemográfico do qual faziam parte questões sobre o percurso académico do indivíduo, formação e profissão dos pais, tamanho do agregado familiar e historial clínico de doenças físicas e mentais dos pais e do próprio (Apêndice 1).

Foram recolhidas amostras biológicas num grupo adicional de 114 indivíduos que, por não terem completado o preenchimento dos questionários de autoavaliação, foram excluídos da análise de interação estatística entre o genótipo e os fatores ambientais facilitadores da depressão. Ainda assim, a informação relativa ao seu genótipo foi utilizada para descrever a diversidade genética da população no locus SLC6A4.

Mediante o devido consentimento informado, todos os participantes foram instruídos sobre os propósitos e objetivos da investigação.

2.2 Métodos laboratoriais

2.2.1 Extração de DNA

As células da mucosa bucal foram recolhidas com escovas esterilizadas (*sterile swabs*, Sarstedt, Germany) por fricção no epitélio bucal de cada indivíduo. O esfregaço foi devidamente identificado e armazenado a -10°C. A extração do ADN genómico foi efetuada com o kit de extração FavorPrepTM Genomic DNA Mini Kit FABGK (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) que utiliza a enzima proteinase K para digerir as membranas plasmáticas, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Apêndice 2).

2.2.2 Genotipagem

A genotipagem dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Bonvicini *et al.* (2010) e consistiu na realização de uma reação de amplificação da região alvo por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), seguida por uma digestão com a enzima de restrição MspI.

Na PCR foram utilizados os *primers* descritos por Gelernter *et al.* (1997) - direto **JP** (5' - ATG CCA GCA CCT AAC CCC TAA TGT - 3') e reverso **GR** (5' - GG ACC GCA AGG TGG GCG GGA - 3') - específicos para o segmento de interesse em questão, permitindo a sua amplificação num termociclador TProfessional (Biometra, Germany) com o programa seguinte: a) 95° C - 10 minutos; b) 35 ciclos de 95° C - 30 segundos, 60° C - 45 segundos, 72° C - 45 segundos e c) Extensão final a 72° C - 10 minutos. Cada reação de amplificação foi realizada num volume total de 25 µl por amostra, preparado de acordo com o protocolo descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolo utilizado para realização da técnica PCR.

<i>Solução</i>	<i>Volume/tubo</i>
H₂O	16,5 µl
Tampão Taq Buffer	2,5 µl
MgCl₂	3 µl
dNTPs	0,5 µl
Primer JP	0,5 µl
Primer GR	0,5 µl
Taq Polymerase	0,1 µl
DNA genómico	1,5 µl

A amplificação resultou em dois fragmentos amplificados, um com 419 pb relativo ao alelo longo (L) e outro com 375 pb relativo ao alelo curto (S).

Numa primeira fase, foram apenas distinguidos os genótipos LL, LS e SS através de uma eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídeo (concentração final 0,5 µg/ml), em tampão TBE 0,5x e visualizado à luz ultravioleta (Apêndice 3)

Na segunda fase, os mesmos produtos PCR foram digeridos com a enzima de restrição MspI para identificação do genótipo do polimorfismo rs25531 *a/g* sendo identificada, simultaneamente, a fase haplotípica 5HTTLPR/rs25531 para cada indivíduo de acordo com Bonvicini *et al.* (2010). A digestão foi feita a 37°C durante a noite (cerca de 16 horas) e os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel horizontal de poliacrilamida a 6% em tampões 0,375 M Tris/HCl pH 8,8 (tampão do gel) e 0,125 M Tris/Glicina pH 8,8 (tampão das pontes), em placa de arrefecimento, com uma voltagem de 100 V durante cerca de 3 horas. A coloração das bandas de DNA foi efetuada recorrendo a nitrato de prata (Apêndice 4).

A digestão enzimática conduziu à formação de 4 fragmentos com diferentes tamanhos (Tabela 3).

Tabela 3 – Fragmentos obtidos após digestão dos produtos da reação de PCR com a enzima MspI.

La	325 + 62 + 33	pb
Lg	174 + 150 + 62 + 33	pb
Sa	281 + 62 + 33	pb
Sg	150 + 131 + 62 + 33	pb

2.2.2.1 Definição dos grupos de genótipos para análise estatística

A divisão da amostra em três grupos de genótipos 5-HTTLPR com as variantes alélicas *a* e *g* do SNP rs25531 foi feita de acordo com o estudo de Hu e colaboradores (2005), que concluíram que apenas o haplótipo La se comporta como alelo longo de eficácia transcricional elevada, sendo que as restantes variantes haplotípicas – Lg; Sa; e Sg – se comportam como alelos curtos de eficácia transcricional reduzida (Tabela 4).

- i. **S1S1** – Todos os que têm somente alelos com eficácia transcricional reduzida. Inclui indivíduos cujo genoma tem alelos S (Sa e Sg) ou alelos Lg, combinados da seguinte forma: **SaSa**; **SaSg**; **LgLg**; e **LgSa**.
- ii. **L1S1** – Todos os que apresentam alelos com eficácia transcricional reduzida e alelos com eficácia transcricional elevada. Inclui indivíduos cujo genoma tem alelos S (Sa e Sg) e alelos L (La e Lg), combinados da seguinte forma: **LaSa**; **LaLg**; e **LaSg**.

- iii. **L1L1** - Todos os que têm somente alelos com eficácia transcricional elevada. Inclui apenas indivíduos homozigóticos **LaLa**.

Tabela 4 – Critérios de divisão dos grupos de genótipos para análise estatística.

Grupo	5-HTTLPR/rs25531	Eficácia Transcricional
L1L1	LaLa	LL
	LaLg	LS
L1S1	LaSg	LS
	LaSa	LS
	SaSa	SS
S1S1	SaSg	SS
	LgLg	SS
	LgSa	SS
	LgSg	SS

Todos os procedimentos laboratoriais descritos neste trabalho decorreram no laboratório de genética do Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS) da Universidade de Coimbra.

2.3 Métodos analíticos

Os dados relativos ao genótipo e ao ambiente psicossocial, estimados a partir das respostas aos questionários CERQ, MHC-SF, CTQ e EADS-21, foram introduzidos numa base do programa informático IBM SPSS 23 (Chicago, IL) onde foram realizados os cálculos das frequências alélicas e genótípicas observadas na amostra e testadas as hipóteses sobre as possíveis interações estatísticas entre o genótipo e os indicadores de adversidade do ambiente psicossocial.

2.3.1 Teste do Equilíbrio Hardy-Weinberg

Para verificar se as frequências dos genótipos se encontravam no equilíbrio de Hardy-Weinberg recorreu-se ao Teste do Qui-Quadrado implementado no programa de análise estatística Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) disponível *online* no endereço <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>. Considerou-se uma probabilidade de erro de tipo I (α) de 0,05.

2.3.2 Cálculo da distância genética entre populações

A distribuição das frequências genótípicas observada na amostra de sujeitos com nacionalidade Portuguesa foi comparada com a de outras 10 populações da Europa, África e Ásia Oriental previamente publicadas. Esta comparação foi efetuada com recurso ao cálculo da distância genética através da estatística F_{ST} implementada no programa Arlequim (Excoffier *et al.*, 2005). Esta estatística comparou as populações duas a duas através da fórmula matemática:

$$F_{ST} = \frac{(Vp)}{p(1-p)}$$

Onde p e Vp correspondem, respetivamente, à média e à variância das frequências génicas entre as duas populações.

Foram utilizadas as regras qualitativas de Wright (1951) para interpretar os valores de F_{ST} (Tabela 5).

Tabela 5 – Regras qualitativas sugeridas por Sewall Wright (1951) para interpretação dos valores de F_{ST} (adaptado de Jobling *et al.*, 2014).

Valor de F_{ST}	Nível de diferenciação
Menor do que 0,05	Pequeno
Entre 0,05 e 0,15	Moderado
Entre 0,15 e 0,25	Elevado
Maior do que 0,25	Muito Elevado

As semelhanças/dissemelhanças entre as 11 populações foram analisadas com a técnica de Escalonamento Multidimensional Replicado (EMR), com o auxílio do programa informático IBM SPSS 23. Esta técnica exploratória multivariada permitiu representar de forma parcimoniosa, num sistema multidimensional reduzido, as semelhanças entre as populações e o seu posicionamento num mapa perceptual.

2.3.3 Modelos Lineares Generalizados

Para verificar a existência de eventuais interações estatísticas entre o genótipo e os indicadores de adversidade do ambiente psicossocial foi utilizada a análise Modelos

Lineares Generalizados (MLG) implementado no programa informático IBM SPSS 23. Os MLG têm como objetivo testar um modelo em que um conjunto de variáveis independentes e de fatores surge como preditor de uma variável dependente, que pode assumir vários tipos de distribuição. Em relação à forma como explicam o comportamento da variável dependente, os fatores envolvidos no modelo podem ser testados individualmente ou através de interações. (Tabela 6). A variável dependente em estudo assume uma distribuição de probabilidade do tipo *Poisson* e a função de ligação é do tipo *Log*. A significância do modelo foi avaliada com a estatística do teste de qui-quadrado de Wald.

Tabela 6 – Resumo da classificação das variáveis contínuas e categóricas incluídas no modelo de análise estatística MLG.

	Tipo de indicador	Descrição	Classificação da variável no MLG	
EADS-21	Fenotípico	Gradiente de níveis de ansiedade, depressão e <i>stress</i>	Dependente	Contínua
MHC	Preditor ambiental	Índice de bem-estar emocional, psicológico e social	Co-variável	Contínua
CTQ	Preditor ambiental	Índice de abusos e negligência na infância	Co-variável	Contínua
CERQ +	Cognitivo	Indicador de estratégias <i>coping</i> positivas	Co-variável	Contínua
CERQ -	Cognitivo	Indicador de estratégias <i>coping</i> negativas	Co-variável	Contínua
Depressão dos pais	Biológico e ambiental	A depressão dos pais funciona como marcador genético familiar e traduz-se em alterações no meio de crescimento do indivíduo	Fator	Categórico
Genótipo	Preditor biológico	Indica a funcionalidade do transportador de serotonina	Fator	Categórico
Sexo	Biológico	-	Fator	Categórico

2.3.4 Instrumentos de medida

Os instrumentos aqui utilizados permitiram estudar em que medida determinadas características individuais e ambientais atuam como fatores de vulnerabilidade ou traços

que tornem os indivíduos mais suscetíveis a apresentar sintomas de distúrbios emocionais como a depressão e ansiedade. Através do autorrelato de memórias, emoções, pensamentos e comportamentos num determinado contexto, foi permitido avaliar a relação entre a forma como um estímulo externo é processado e alguns marcadores biológicos como o genótipo e o sexo. Seguindo a lógica do modelo G x A, é permitido perceber de que forma todo este conjunto de fatores atua para moldar aquilo a que chamaremos de perfil fenotípico, medido através de níveis de ansiedade, depressão e *stress*. Na tabela que se segue, encontra-se quais os instrumentos de medida usados, os principais parâmetros medidos por cada um, e os autores originalmente responsáveis pela construção dos mesmos.

Tabela 7 – Sumário descritivo os instrumentos de medida utilizados.

Instrumento	Parâmetros medidos	Autores
CERQ <i>Cognitive Emotional Regulation Questionnaire</i>	Tipo de estratégias de regulação emocional	Garnefski & Kraaij, 2001
EADS-21 <i>Escalas de Ansiedade, Depressão e Stress</i>	Níveis de ansiedade, depressão e <i>stress</i>	Pais-Ribeiro <i>et al.</i> , 2004
CTQ <i>Childhood Trauma Questionnaire</i>	Níveis de abuso e negligência psicológica e física	Bernstein <i>et al.</i> , 2003
MHC-SF <i>Mental Health Continuum - Short Form</i>	Índices de bem-estar emocional, psicológico e social	Keyes <i>et al.</i> , 2008.

2.3.4.1 CERQ - *Cognitive Emotion Regulation Questionnaire*

Tradução e adaptação: Cherpe, S; Matos, A. P.; Serra, A. R. 2009.

Este questionário é utilizado como instrumento de medida de diferentes tipos de estratégias *coping* cognitivas comumente adotadas pelos indivíduos depois de experiências de vida negativas e situações desagradáveis que caracterizam o perfil cognitivo dos indivíduos. É composto por 36 itens em que a resposta pode variar numa escala entre 1 - '(quase) Nunca' e 5 - '(quase) Sempre' (Garnefski *et al.*, 2001). Estes 36 itens subdividem-se em 9 subescalas distintas de 4 itens cada:

- a) *Autocrítica* - Refere-se a pensamentos de auto culpabilização pela experiência vivida. A grande maioria dos estudos relaciona positivamente este parâmetro com a depressão;
- b) *Aceitação* – Refere-se a pensamentos de aceitação e resignação em relação ao que aconteceu. Este parâmetro está de alguma forma negativamente relacionado com os níveis de ansiedade e positivamente relacionado com a autoestima e otimismo.
- c) *Ruminação* – Refere-se ao foco dado aos pensamentos e sentimentos associados à situação negativa vivida. A ruminação tende a estar associada a níveis elevados de depressão.
- d) *Reorganização positiva* – Refere-se a pensamentos positivos e agradáveis ao invés da reflexão no evento em si. O foco em pensamentos positivos pode ser considerado uma forma de libertação mental e de afastamento da experiência negativa. Apesar de útil *a priori*, pode a longo prazo ser uma estratégia *coping* impeditiva.
- e) *Replaneamento* – Refere-se a pensamentos sobre como lidar com a situação negativa e o que fazer depois disso. Está negativamente associado aos níveis de ansiedade e positivamente relacionado com a autoestima e o otimismo.
- f) *Reavaliação positiva* – Refere-se a pensamentos que atribuem um significado positivo à experiência em termos de crescimento pessoal. Está positivamente relacionado com a autoestima e otimismo e negativamente relacionado com os níveis de ansiedade.
- g) *Respetivar* – Refere-se aos pensamentos de atenuar a gravidade da situação, comparando-a com outros acontecimentos relativamente mais desagradáveis.

- h) *Catastrofização* – Refere-se a pensamentos recorrentes que enfatizam a parte negativa do evento ocorrido. Este parâmetro parece estar relacionado com inaptidão e sofrimento emocional.
- i) *Culpa no outro* – Refere-se a pensamentos de responsabilização de outros pela situação vivida. Culpar outrem pelo que acontece está associado a estados emocionais mais suscetíveis.

2.3.4.2 EADS-21 – Escalas de Ansiedade Depressão e Stress

Pais-Ribeiro, J. L.; Honrado, A.; Leal, I. 2004.

Este questionário foi desenvolvido com o objetivo de gerar parâmetros de medida de perturbações afetivas no geral. É composto por 21 itens que representam sintomas emocionais negativos e pode dividir-se em 3 subescalas: *Depressão*, *Ansiedade* e *Stress*. As respostas podem variar numa escala de 0 a 3, consoante a frequência com que o indivíduo experimentou o que é descrito em cada tópico, durante a semana anterior à data de resposta do questionário. Os 21 itens dividem-se em três escalas distintas:

- a) *Depressão*. Inclui parâmetros de disforia; desânimo; desvalorização da vida; auto depreciação; falta de interesse e envolvimento; anodinia; e inércia.
- b) *Ansiedade*. Inclui parâmetros de excitação do sistema autónomo; efeitos dos músculos esqueléticos; ansiedade situacional; e experiências subjetivas de ansiedade.
- c) *Stress*. Inclui parâmetros de dificuldade em relaxar; excitação nervosa; facilidade em ficar agitado/ chateado; irritabilidade/ reação exagerada; e impaciência.

2.3.4.3 CTQ *Childhood Trauma Questionnaire*

Tradução e adaptação: Cherpe, S.; Matos, A. P.; Pereira A. R. 2010.

Este instrumento de medida tem como principal objetivo apurar em retrospectiva se o indivíduo poderá ter sofrido maus-tratos durante a infância e adolescência, remetendo para memórias pessoais. A resposta pode variar numa escala de 0 – ‘Nunca verdadeiro’ a 4 – ‘Muito frequentemente verdadeiro’ e divide-se em 5 categorias:

- a) *Abuso emocional* – Se houve algum tipo de agressão verbal ao bem-estar ou qualquer tipo de situação humilhante para a criança por parte de um adulto ou idoso.
- b) *Abuso físico* – Se houve algum tipo de agressão corporal por parte do um adulto ou idoso que possa ter resultado em algum tipo de lesão ou tenha pelo menos representado risco de lesão.
- c) *Abuso sexual* – Se houve algum tipo de contacto ou conduta de cariz sexual entre um adulto ou idoso e uma criança com menos de 18 anos de idade.
- d) *Negligência física* - Quando de alguma forma a segurança da criança foi posta em causa através de comportamentos de desleixo, má supervisão e falta de cuidados parentais em prover as necessidades físicas básicas, como comida, abrigo, roupa, segurança e cuidados de saúde.
- e) *Negligência emocional* – Quando de alguma forma os tutores da criança fracassaram em atender às necessidades básicas psicológicas e emocionais, como amor, pertença, sustentação e apoio.

2.3.4.4 MHC - *Mental Health Coninuum-Short Form*

Tradução e adaptação: Cunha, M., Cherpe, S.; Keyes, C. L. M. 2014.

Este instrumento de medida tem como principal objetivo avaliar o bem-estar mental e psicológico dos indivíduos. É composto por 14 itens em que a resposta pode variar de 0 – ‘Nunca’ a 5 – ‘Todos os dias’, de acordo com a forma como o individuo se tem sentido no mês anterior à data de resposta. Está dividido em três partes distintas:

- a) *Bem-estar emocional*- Avalia a satisfação com a vida no geral, a felicidade e o entusiasmo pessoais. Representa em parte, a preocupação individual em maximizar a quantidade e duração dos pensamentos positivos e agradáveis em relação aos negativos e desagradáveis. Tendo em conta que a felicidade se baseia em reflexos espontâneos sobre uma experiência momentânea, esta subescala de bem-estar emocional pode ser uma medida de avaliação a longo-prazo.
- b) *Bem-estar psicológico* -Representa uma escala da autoestima global, avaliando parâmetros como a tendência para envolvimento em pensamentos complexos; expressão de opinião; reflexão sobre metas e desafios; e autonomia. Esta

subescala estima o quão o indivíduo se esforça por estar em pleno com os seus talentos; relações com os outros; e objetivos de vida.

- c) *Bem-estar social*- Avalia a integração e participação do indivíduo na sociedade sob várias formas, como o envolvimento político; participação em grupos ativistas; trabalho de voluntariado como forma de contribuição social; e compromissos cívicos. Reflete as preocupações com o desenvolvimento de habilidades e capacidades pessoais que permitam ao indivíduo tornar-se um melhor cidadão.

2.3.5 Introdução ao modelo G x A

A escala de Ansiedade, Depressão e Stress (EADS-21) foi usada como variável dependente e computada sob a forma de um valor único de pontuação total (soma de todos os pontos obtidos em cada um dos 21 itens) para cada indivíduo (máximo 63 pontos, mínimo 0 pontos) A escala assume que as perturbações psicológicas e emocionais não se reduzem a categorias, mas adequam-se mais a dimensões. Por este motivo, as diferenças entre os indivíduos serão essencialmente no grau e intensidade com que experimentam algum sintoma emocional negativo. Apesar de ter sido desenvolvida com o objetivo de separar categoricamente os constructos ansiedade, depressão e *stress*, a escala será usada neste modelo como um indicador geral de variações emocionais negativas. Não faz parte dos objetivos deste trabalho avaliar nenhum tipo de distúrbio em particular, nem tão pouco fazer um diagnóstico clínico da população em estudo. Ainda que possa haver alguma distinção entre estas três síndromes, ansiedade, depressão e *stress* estão em continuidade, na medida em que se apresentam semelhantes e interligadas na sintomatologia. Para além disto, apenas metade das pessoas com um distúrbio particular apresentam sintomas exclusivos e específicos desse distúrbio (Lovibond & Lovibond 1995). Deste modo, a escala representa neste contexto, um gradiente de fenótipos possíveis, em que pontuações mais elevadas estão associadas a níveis maiores de perturbação psicológica. Este gradiente fenotípico varia com alterações intrínsecas e extrínsecas ao indivíduo, tais como o genótipo e fatores ambientais externos. É a interligação diferencial de todos estes fatores que combinados entre si resultam em diversos perfis fenotípicos de maior ou menor suscetibilidade a perturbações psicológicas.

2.3.5.1 Modelo EADS-21, maus tratos, bem-estar, depressão dos pais e genótipo 5-HTTLPRrs/25531

Neste modelo teórico, o sexo (feminino e masculino) e o genótipo dos indivíduos, aqui dividido em três grupos funcionais de acordo com a eficácia transcricional do gene SLC6A4, foram utilizados como marcadores biológicos. No primeiro grupo foram incluídos os indivíduos que apresentam o genótipo de maior eficácia transcricional - L1L1. No segundo grupo, aqueles que apresentam genótipos intermédios, em que apenas um dos alelos apresenta eficácia transcricional elevada –

L1S1. E no terceiro grupo foram incluídos os indivíduos cujo genótipo apresenta eficácia transcricional reduzida – S1S1. Os fatores ambientais externos incluídos na análise foram divididos em duas categorias: os que se relacionam com o meio em que o indivíduo cresceu e se desenvolveu (índice de maus tratos na infância - CTQ) e os que traduzem o bem-estar pessoal na relação com os outros e a sociedade (índice de bem-estar – MHC-SF). O índice de maus tratos foi computado sob a forma de um valor único de pontuação total (soma de todos os pontos obtidos em cada um dos 28 itens; máximo 112 pontos e mínimo 0 pontos) após serem aplicadas as devidas inversões para os itens que confirmam a validade da escala. O índice de bem-estar foi computado sob a forma de um valor única de pontuação total (soma de todos os ponto obtidos em cada uma dos 14 itens; máximo 70 pontos e mínimo 0 pontos). Na figura que se segue, estão representados esquematicamente os fatores preditores que foram incluídos na análise e que se prevê que possam alterar a medida fenotípica em estudo.

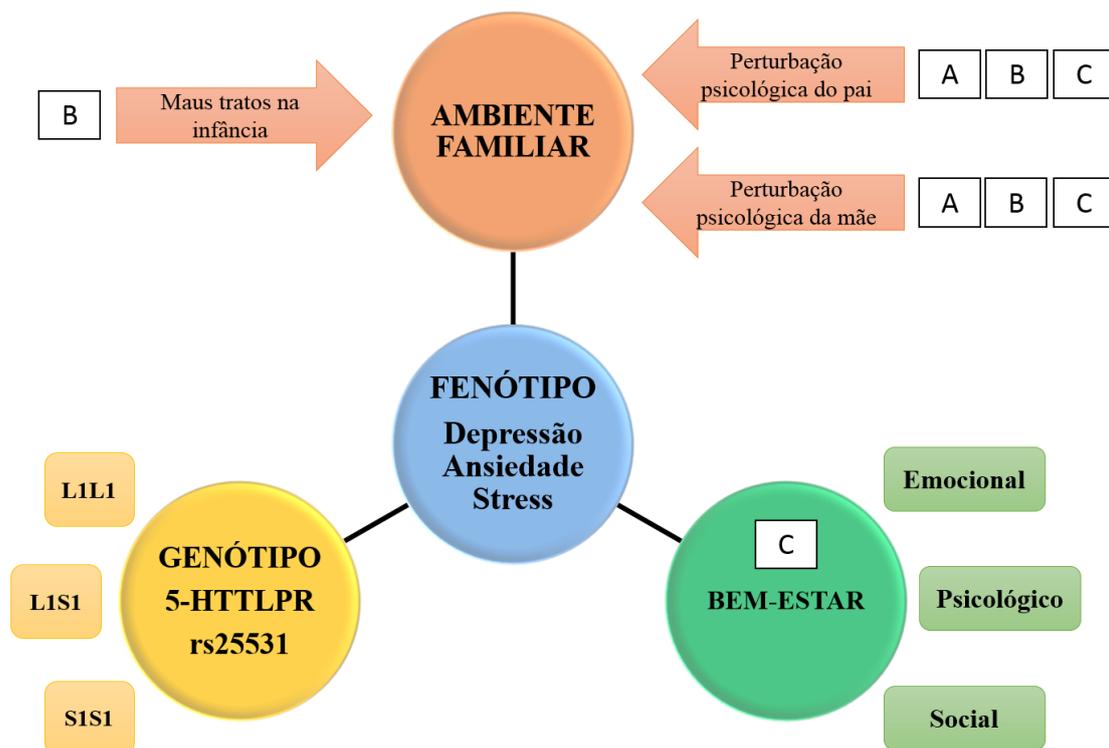


Figura 3 – Representação esquemática do conjunto de fatores que podem influenciar o fenótipo medido pelas escalas de Ansiedade, Depressão e Stress: i) genótipo 5-HTTLPR/rs25531 - L1L1, L1S1 e S1S1 (diferentes grupos consoante a funcionalidade); ii) bem-estar emocional, psicológico e social e iii) ambiente familiar que engloba a presença ou não de perturbações psicológicas do pai e da mãe e maus tratos infantis. As letras A, B e C estão representadas nos fatores testados em interação: Depressão do pai* Depressão da mãe (A), Depressão do pai* Depressão da mãe* Maus tratos na infância (B) e Depressão do pai* Depressão da mãe* Bem-estar emocional, psicológico e social.

2.3.5.2 Modelo EADS-21, estratégias coping cognitivas, depressão da mãe e genótipo 5-HTTLPRs/25531

Outro dos aspetos importantes sobre a forma como nos apresentamos mais ou menos suscetíveis a determinadas perturbações psicológicas, é o modo como regulamos as emoções na adaptação a situações e eventos de vida negativos. Apesar da dificuldade em aceder rigorosamente a todos os mecanismos envolvidos neste sistema, existem alguns fatores que podem ser avaliados, que medem a autorregulação consciente das componentes cognitivas de todos este processo emocional. Desta forma, o instrumento – CERQ – mede estratégias *coping* cognitivas, que traduzem os esforços individuais para lidar e controlar com desafios e situações de ameaça, quando estas excedem as exigências normais de recursos do indivíduo (Garnefski *et al.*, 2001). A classificação do tipo de estratégias *coping* não é dicotómica nem tão pouco linear. Contudo, em termos gerais, podemos agrupa-las em dois grandes grupos: estratégias positivas e estratégias negativas. Globalmente, as estratégias *coping* negativas – *autocrítica*, *ruminação* e *catastrofização* - estão mais comumente associadas a inaptidão e sofrimento emocional e são características de indivíduos tendencialmente ansiosos e deprimidos. Ao contrário, as estratégias *coping* positivas – *aceitação*, *reorganização positiva*, *replaneamento*, *reavaliação positiva*, *pôr noutra perspetiva* e *culpa no outro* - relacionam-se positivamente com o bem-estar emocional, otimismo e autoestima (Garnefski & Kraaij, 2006).

No modelo de interação G x A pode prever-se que indivíduos cujo genótipo está associado a maior vulnerabilidade a distúrbios psicopatológicos, adotem sistemática e frequentemente estratégias *coping* negativas para lidar com acontecimentos de vida stressantes, quando comparados com outros indivíduos. Deste modo, é expectável que as estratégias *coping* tenham influência sobre a resposta às escalas EADS-21 e que interajam com outros fatores de forma a modular o fenótipo dos indivíduos.

Estas medidas correspondem a dois índices diferentes (positivas e negativas), em que valores mais elevados representam os indivíduos que recorrem mais frequentemente a cada um dos dois tipos de estratégias. Os índices CERQ positivos e negativos correspondem à média da soma dos itens de cada uma das categorias: autocrítica, ruminação e catastrofização para as medidas negativas e aceitação, reorganização positiva, replaneamento, reavaliação positiva, respeter e culpa no outro para as medidas positivas.

Como no modelo anterior, o sexo (feminino e masculino) e o genótipo dos indivíduos, aqui dividido em três grupos funcionais de acordo com a eficácia transcricional do gene SLC6A4, foram utilizados como marcadores biológicos. No primeiro grupo foram incluídos os indivíduos que apresentam o genótipo de maior eficácia transcricional - L1L1. No segundo grupo, aqueles que apresentam genótipos intermédios, em que apenas um dos alelos apresenta eficácia transcricional elevada – L1S1. E no terceiro grupo foram incluídos os indivíduos cujo genótipo apresenta eficácia transcricional reduzida – S1S1. Neste segundo modelo, a variável *depressão da mãe* foi eleita para representar o ambiente familiar. Apesar de ambos os pais contribuírem para as condições e qualidade do meio onde os indivíduos se desenvolvem, existem na literatura algumas evidências de que a depressão da mãe tem um peso aumentado como fator de vulnerabilidade para a depressão dos filhos (Goodman & Gotlib, 1999; Elgar *et al.*, 2004). Mesmo durante a gravidez, quando a mãe apresenta sintomas depressivos, podem dar-se alterações epigenéticas no filho que alteraram mais tarde, em criança, a reatividade ao *stress* (Oberlander *et al.*, 2008).

Na figura que se segue, estão representados esquematicamente os fatores preditores que foram incluídos na análise deste segundo modelo que se prevê que possam alterar a medida fenotípica em estudo.

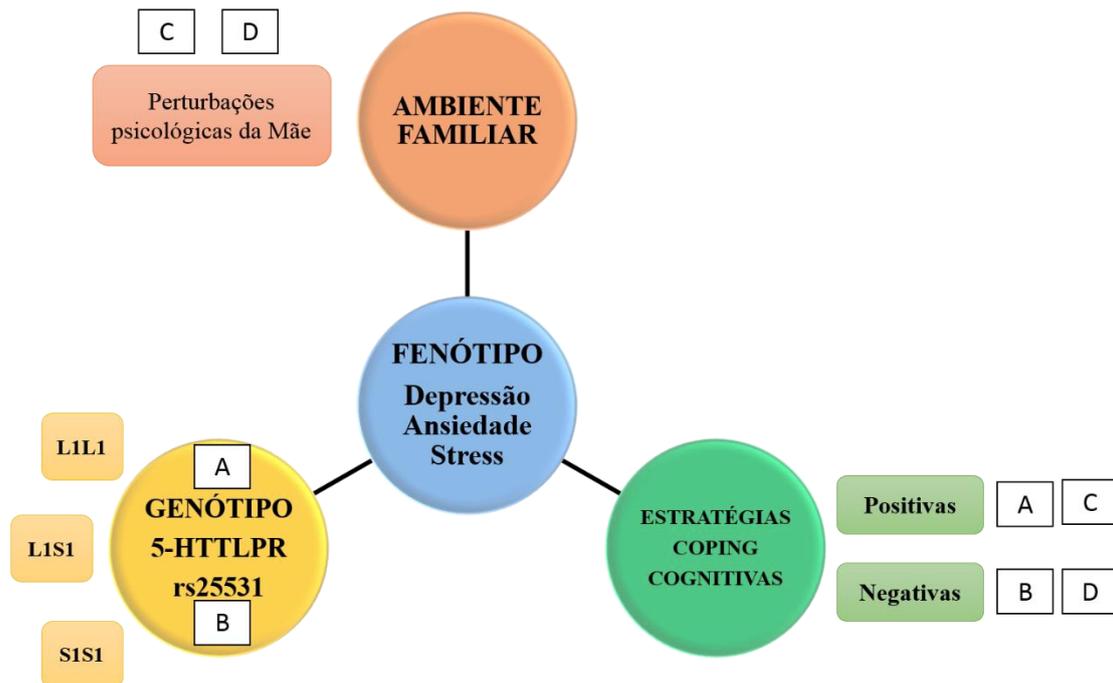


Figura 4 – Representação esquemática do conjunto de fatores que podem influenciar o fenótipo medido pelas Escalas de Depressão, Ansiedade e Stress: i) genótipo 5-HTTLPR/rs25531 - L1L1, L1S1 e S1S1 (diferentes grupos consoante a funcionalidade); ii) estratégias *coping* cognitivas positivas e negativas e iii) ambiente familiar que engloba a presença ou não de perturbações psicológicas da mãe. As letras A, B e C estão representadas nos fatores testados em interação: Genótipo* Estratégia positivas (A), Genótipo * estratégias negativas (B), Depressão da mãe* Estratégias positivas (C) e Depressão da mãe* Estratégias negativas.

3. Resultados

3.1 Descrição das frequências alélicas e genóticas no locus SLC6A4 definidas pelos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 numa amostra de jovens adultos de nacionalidade Portuguesa

3.1.1 Alelos L e S

Para obter a frequência de genótipos 5-HTTLPR, foram usadas amostras de 320 indivíduos (Tabela 8). A figura x mostra uma imagem do gel de agarose onde se podem distinguir os 3 genótipos observados na amostra estudada.

Tabela 8 – Frequências genóticas do polimorfismo 5-HTTLPR.

5-HTTLPR	Frequência	%
LL	101	31,6
LS	149	46,6
SS	70	21,9
Total	320	100

As frequências de genótipos 5-HTTLPR obtidas para a população portuguesa em estudo são semelhantes às obtidas para outros estudos de populações caucasianas, com a frequência de homozigóticos L a variar entre 26 e 35 %; homozigóticos S entre 18 e 26%; e heterozigóticos entre 48 a 53% (Haberstick *et al.*, 2015).

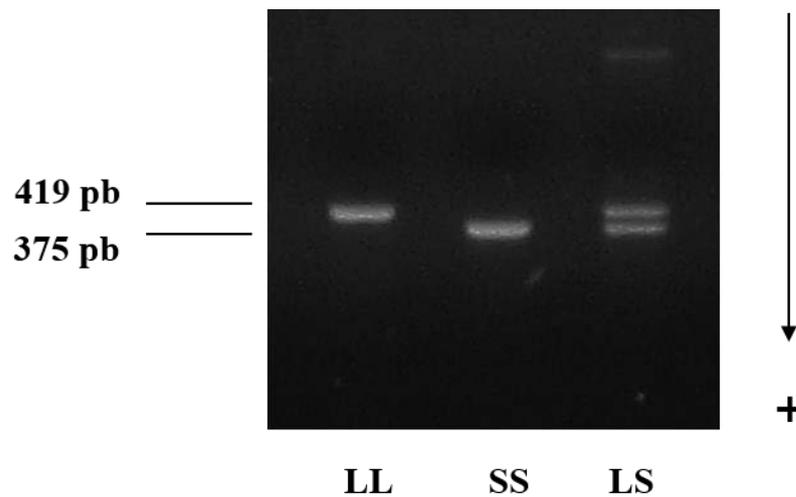


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando os 3 diferentes genótipos (LL; SS; e LS) relativos ao polimorfismo 5-HTTLPR localizado na região promotora do gene transportador de serotonina SLC6A4. L corresponde ao alelo longo com 419 pb; e S corresponde ao alelo curto com 375 pb. A seta representada do lado direito da figura indica o sentido da corrente elétrica na eletroforese.

3.1.2 Alelos *a* e *g*

A genotipagem no local de segregação rs25531 foi efetuada apenas no grupo de 206 indivíduos da amostra total que forneceram informação sobre o fenótipo. Os produtos PCR foram digeridos com a enzima de restrição MspI para identificação dos fragmentos *a/g* do genótipo do polimorfismo rs25531. Foram obtidas as frequências para estes dois alelos, que se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 – Frequências genotípicas do SNP rs25531.

Alelos <i>a</i> e <i>g</i>	Frequência	%
<i>aa</i>	185	89,5
<i>ag/ga</i>	20	9,7
<i>gg</i>	1	0,5
Total	206	100

De acordo com Haberstick *et al.* (2015) a variante *g* do SNP rs25531 é observado com muito menor frequência do que a variante *a*, sendo menos comum em caucasianos, hispânicos e nativo-americanos, que em asiáticos e africanos.

3.1.3 Haplótipo 5-HTTLPR/rs25531

A digestão resulta num haplótipo para cada indivíduo em que são representados simultaneamente os alelos do polimorfismo 5HTTLPR e do rs25531 (Figura 6).

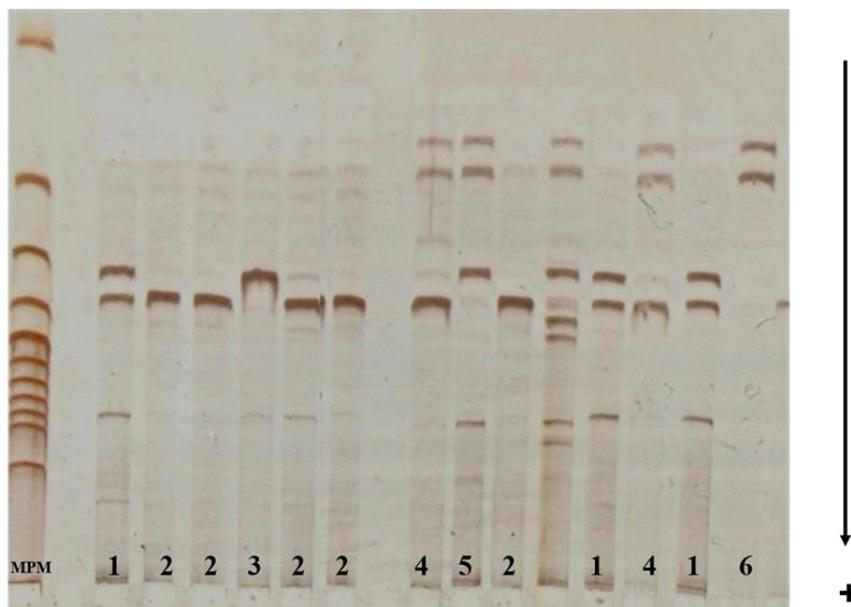


Figura 6 – Eletroforese em gel horizontal de poliacrilamida (6%) mostrando 6 dos 8 haplótipos obtidos pela digestão da enzima MspI relativos aos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 do gene transportador de serotonina SLC6A4. (1) LaSa; (2) LaLa; (3) SaSa; (4) LaLg; (5) LgSa; (6) LgLg. A banda não numerada é uma amostra não digerida. Do lado esquerdo da figura, MPM representa o marcador de peso molecular usado na eletroforese. A seta do lado direito da figura indica o sentido da corrente elétrica na eletroforese.

Foram obtidas as frequências para 8 haplótipos diferentes, que se encontram na Tabela 10.

Tabela 10 – Frequências dos haplótipos 5-HTTLPR/rs25531.

Haplótipo	Frequência	%
LaLa	51	24,8
LaSa	83	40,3
LaLg	9	4,4
LaSg	1	0,5
SaSa	50	24,3
SaSg	1	0,5
LgLg	1	0,5
LgSa	10	4,9
Total	206	100

Pelos critérios de divisão da amostra em grupos de genótipos funcionais com as variantes alélicas S e L do 5-HTTLPR e *a* e *g* do SNP rs25531 foram calculadas as frequências de L1L1 (indivíduos LaLa), L1S1 (indivíduos LaSa, LaLg e LaSg) e S1S1 (indivíduos SaSa, SaSg, LgLg e LgSa). No que respeita à funcionalidade genotípica, o grupo L1L1 é o que tem eficácia transcricional mais elevada, seguido do grupo L1S1, de eficácia transcricional intermédia e S1S1, de eficácia transcricional mais reduzida. As frequências destes grupos encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Frequência de genótipos 5-HTTLPR/rs25531 por grupos funcionais para de acordo com Hu *et al.*, 2005.

Genótipo 5-HTTLPR/rs25531	Frequência	%
L1L1	51	25
L1S1	93	45
S1S1	62	20

Para a população portuguesa, foram obtidos apenas 8 haplótipos, dos 10 haplótipos possíveis pela combinação dos dois polimorfismos do locus em estudo, não tendo sido observados os haplótipos SgSg e LgSg. A observação do alelo *g* é pouco frequente e torna-se ainda menos comum, quando associado à variante S do 5-HTTLPR

(Wendland *et al.*, 2006). Pela tabela, podemos constatar que a combinação dos alelos *g* e *S* foi observada apenas duas vezes, numa amostra de 206 indivíduos.

3.1.4 Equilíbrio Hardy-Weinberg

As frequências dos genótipos definidos pelos dois locais de segregação, 5-HTTLPR e rs25531 (Tabelas 12a e 12b), encontram-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), sugerindo que os sujeitos que constituem a amostra pertencem à mesma população mendeliana.

Tabela 12a – Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR.

	LL	LS	SS	
Observados	101	149	70	
Esperados	96,25	158,5	65,25	$p = 0,2837$
Frequências alélicas	L	351 (54,84%)		
	S	289 (45,16%)		

Tabela 12b – Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs25531.

	aa	ag/ga	gg	
Observados	185	20	1	
Esperados	184,58	20,83	0,59	$p = 0,5695$
Frequências alélicas	a	390 (94,66%)		
	g	22 (5,34%)		

3.2. Comparação das frequências alélicas registadas na população portuguesa com as que foram observadas noutras populações dos continentes Europeu, Asiático e Africano

Devido ao número ainda reduzido de estudos populacionais que incluam as variantes *s* e *g* do SNP rs25531, não se procedeu à comparação entre populações ao nível das frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo. As frequências dos alelos *L* e *S* observadas na amostra da população portuguesa são semelhantes às de outras populações estudadas previamente por vários autores (Tabela 13). Porém, diferem claramente das observadas em populações da Ásia Oriental, nomeadamente, China, Coreia e Japão (Tabela 14).

Tabela 13 – Frequências alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR de outras populações caucasianas.

Autores	Origem geográfica	N	% Alelo S	% Alelo L
Bellivieret et al., 1998	França	99	41	59
Brummett et al., 2008	Carolina do Norte, EUA	203	46	54
Caspi et al., 2003	Nova Zelândia	1037	43	57
Gelernter et al., 1997	Connecticut, EUA	104	40	60
Gutiérrez et al., 1998^a	Espanha ¹	83	57	43
Hu et al., 2006	Finlândia	771	40	60
Jacobs et al., 2006	Bélgica	356	45	55
Lang et al., 2004^a	Alemanha ¹	228	60	40
Nakamura et al., 2000	Europa central (CEPH*)	76	45	55
Nonnis et al., 2008^a	Itália ¹	150	43	57
Noskova et al., 2008	Croácia ¹	665	62	38
Szekely et al., 2004^a	Hungria	151	58	42
Willeit et al., 2003^a	Áustria ¹	146	57	42
Noskova et al., 2008	Rússia ¹	498	44	56

*CEPH – *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*. É um centro internacional de investigação (Paris, França), onde foi criado o primeiro mapa genético humano com DNA de famílias europeias de referência.

¹ Subpopulações incluídas na análise de distância genética pela estatística F_{ST} .

^a in Noskova et al., 2008.

Tabela 14 – Frequências alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR de populações dos continentes Asiático e Africano.

Autores	Origem geográfica	N	% Alelo S	% Alelo L
Li et al., 2007^a	China ¹	103	72	28
Kim et al., 2000^a	Coreia ¹	252	75	25
Katsuragi et al., 1999^a	Japão ¹	101	81	19
Haberstick et al., 2015	África ¹	621	26	74

¹ Subpopulações incluídas na análise de distância genética pela estatística F_{ST} .

^a in Noskova et al., 2008.

Os valores de distância genética estimados pela estatística F_{ST} entre as populações comparadas variaram entre 0 e 0,42484. O nível médio de diferenciação genética na população total, estimada com base em análises *genomewide*, é cerca de 0,05, considerado baixo de acordo com a interpretação sugerida por Wright (1951). No caso da região genómica estudada (Tabela 15), foram encontrados valores muito semelhantes entre as populações da Europa. Porém, a amostra Africana apresenta um nível elevado de diferenciação relativamente aos grupos populacionais Europeus, e

muito elevado relativamente aos grupos populacionais da China, Coreia e Japão. O mesmo se verificou entre os grupos populacionais Europeus e Asiáticos (Figura 7).

Tabela 15 – Valores de distância genética estimados pela estatística F_{ST} em 11 populações de três continentes: Europa, Ásia e África. A população portuguesa apresenta valores baixos (a preto) de diferenciação genética relativamente às populações da Rússia, Áustria, Espanha, Alemanha, Croácia e Itália ($F_{ST} < 0,05$), valores elevados (a vermelho) de diferenciação genética relativamente à Coreia e ao Japão ($0,15 < F_{ST} < 0,25$) e valores moderados (a castanho) de diferenciação genética relativamente às populações de África e da China.

	Portugal	Croácia	Rússia	Alemanha	Áustria	Espanha	Itália	China	Coreia	Japão	África
Portugal	0.00000										
Croácia	0.00930	0.00000									
Rússia	-0.00113	0.00714	0.00000								
Alemanha	0.00282	-0.00035	0.00154	0.00000							
Áustria	-0.00138	0.00268	-0.00178	-0.00157	0.00000						
Espanha	-0.00265	0.00132	-0.00306	-0.00291	-0.00475	0.00000					
Itália	0.02680	0.07083	0.03138	0.05357	0.03807	0.03704	0.00000				
China	0.12813	0.19608	0.13474	0.17535	0.15300	0.15581	0.04033	0.00000			
Coreia	0.16401	0.23171	0.16897	0.21603	0.19444	0.19913	0.06543	-0.00116	0.00000		
Japão	0.21627	0.28597	0.22064	0.27242	0.25303	0.26444	0.11187	0.01655	0.00616	0.00000	
África	0.06779	0.02507	0.06055	0.03757	0.05287	0.05234	0.17685	0.33132	0.36539	0.42484	0.00000

Distância genética

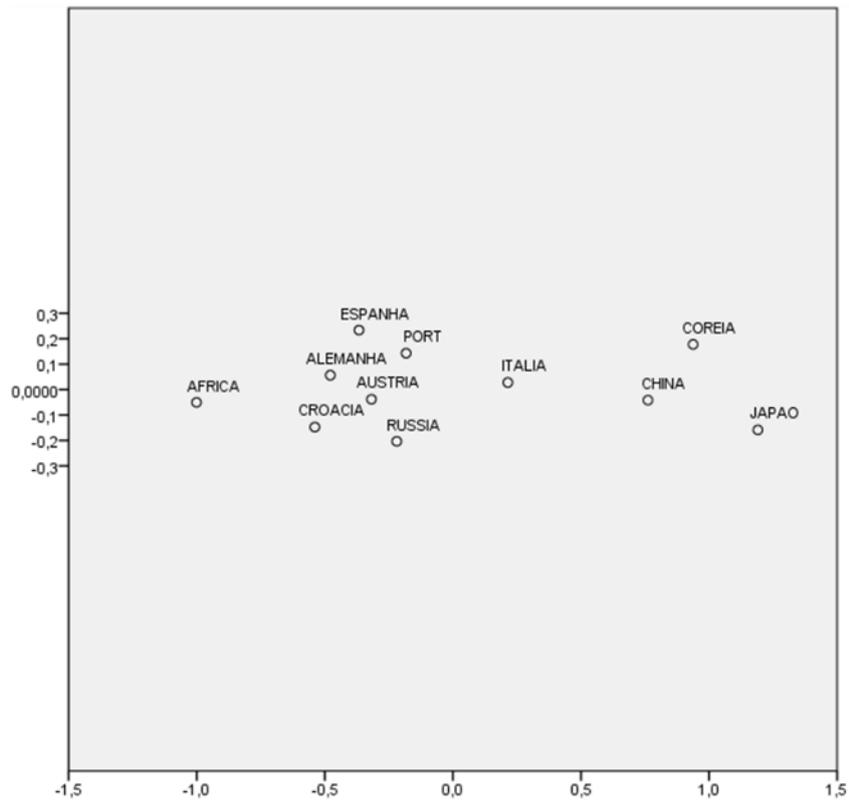


Figura 7 – Representação gráfica multidimensional da proximidade (distância e semelhança / dissemelhança) entre 11 populações (designadas pelo nome do país a que pertencem) de três continentes diferentes com base nas frequências alélicas do polimorfismo 5-HTTLPR e nos valores de distância genética correspondentes estimados pela estatística F_{ST} . O eixo vertical representa os valores de distância genética e o eixo horizontal representa os valores de diferença genética.

3.3 Os polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 do gene SLC6A4 e o risco individual para níveis elevados de ansiedade, depressão e *stress* em ambientes psicossociais particulares

3.3.1 Modelo EADS-21, maus tratos (CTQ), bem-estar (MHC), *depressão dos pais* e genótipo 5-HTTLPRrs/25531

Para a análise do fenótipo foi usada uma população de 162 indivíduos da amostra total, 110 do sexo feminino e 52 do sexo masculino, distribuídos pelos três grupos de genótipos L1L1, L1S1 e S1S1 (Tabela 16).

Tabela 16 – Frequências absolutas da população analisada para o fenótipo por sexo e grupo de genótipo.

Sexo	Genótipo 5-HTTLPR/rs25531			Total
	L1L1	L1S1	S1S1	
Feminino	26	50	34	110
Masculino	15	24	13	52
Total	41	74	47	162

Como já referido acima, a *depressão dos pais* está dividida em *depressão do pai* e *depressão da mãe*, e as frequências para estas duas variáveis são apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 – Frequências absolutas e relativas das variáveis *depressão do pai* e *depressão da mãe* para a população estudada.

	Depressão do pai	Depressão da mãe
Sim	18 (11%)	44 (27%)
Não	103 (64%)	84 (52%)
Não sabe	41 (25%)	34 (21%)
Total	162 (100%)	162 (100%)

Os indicadores CTQ e MHC – índice de maus tratos e índice de bem-estar - foram testados com e sem interação com outros fatores – genótipo, sexo, *depressão do pai*, *depressão da mãe*. Como hipótese de estudo, foi suposto que todas as variáveis testadas, quer individualmente, quer em interação, podem alterar significativamente a

distribuição dos níveis de ansiedade, depressão e *stress*. Os valores de significância *p* para o teste MLG desta hipótese bem como as médias dos fatores estimadas pelo modelo encontram-se nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 – Valores do teste de Qui-quadrado de Wald e respectivos valores de significância *p* para os fatores e interações entre fatores testados no modelo (variáveis) e graus de liberdade (gl). EADS-21 é a variável dependente e medida fenotípica de ansiedade, depressão e *stress*.

Variáveis	Tipo III		
	Qui-quadrado de Wald	gl	<i>p</i>
Genótipo 5-HTTLPR/rs25531	8,124	2	0,017
Sexo	3,129	1	0,077
Depressão do pai	22,504	2	<0,001
Depressão da mãe	21,110	2	<0,001
Índice de bem-estar MHC	80,459	1	<0,001
Índice de maus tratos CTQ	6,392	1	0,011
Depressão do pai* depressão da mãe	37,473	3	<0,001
Depressão do pai* depressão da mãe* índice de maus tratos	32,574	7	<0,001
Depressão do pai* depressão da mãe* índice de bem-estar	49,690	7	<0,001
Genótipo 5-HTTLPR/rs25531* depressão do pai* depressão da mãe	50,759	13	<0,001

Tabela 19 – Estimativas do modelo. Médias estimadas para os fatores genótipo, sexo, depressão do pai e depressão da mãe, valores de B para as co-variáveis: índice de bem-estar MHC e índice de maus tratos CTQ e respectivos erros padrão. As co-variáveis que aparecem no modelo são fixas nos seguintes valores: MHC = 41,0247 e CTQ = 47,4691. EADS-21 é a variável dependente e medida fenotípica de ansiedade, depressão e *stress*.

Fatores	Média	Erro Padrão
Genótipo 5-HTTLPR/rs25531	L1L1	11,13
	L1S1	11,83
	S1S1	11,12
Sexo	Feminino	11,92
	Masculino	10,85
Depressão do pai	Sim	6,95
	Não	12,72
	Não sabe	14,9
Depressão da mãe	Sim	12,7
	Não	14,15
	Não sabe	8,07
Co-variáveis	B	Erro padrão
Índice de bem-estar MHC	-0,011	0,0052
Índice de maus tratos CTQ	-0,008	0,0073

Para os fatores testados individualmente – genótipo ($p=0,017$), depressão do pai ($p <0,001$), depressão da mãe ($p <0,001$), índice de bem-estar ($p <0,001$) e índice de maus tratos ($p=0,011$) – os valores de p são muito significativos, indicando que as variáveis alteram o índice fenotípico EADS-21. Para o fator sexo, testado individualmente, o valor de p não é significativo ($p=0,077$), indicando que a variável não altera o índice fenotípico EADS-21.

Para as interações testadas – *depressão do pai* depressão da mãe* ($p <0,001$), *depressão do pai* depressão da mãe* índice de maus tratos* ($p <0,001$), *depressão do pai* depressão da mãe* índice de bem-estar* ($p <0,001$) e *depressão do pai* depressão da mãe* genótipo* ($p <0,001$) – os valores de p são igualmente significativos, indicando que os fatores interagem entre si de forma a alterar o índice fenotípico EADS-21.

Deste modelo, podemos prever que, com exceção do fator sexo, todas as variáveis se relacionam com o índice fenotípico medido EADS-21. O genótipo 5-HTTLPR/rs25531, os fatores ambientais de *stress* familiar – *depressão do pai*, *depressão da mãe*, *maus tratos* – e o índice de bem estar-geral testados, influenciaram os níveis de ansiedade, depressão e *stress* medidos nos indivíduos. Na prática, isto significa cada um destes fatores tem um efeito modelador de fenótipo quando as restantes variáveis são ajustadas. De forma expectável, também as interações testadas entre fatores se revelaram significativas.

3.3.1.1 Genótipo 5-HTTLPR/25531

A amostra estudada apresenta, em média, valores baixos de EADS-21 ($14,36 \pm 12,25$) uma vez que a pontuação do índice varia entre 0 e 63. Por isso é caracterizada por níveis baixos de ansiedade, depressão e *stress*. O grupo genotípico L1L1 ($15,73 \pm 14,02$) apresenta uma média superior às dos restantes grupos L1S1 ($13,91 \pm 12,02$) e S1S1 ($13,89 \pm 11,09$), que, por sua vez, apresentam médias muito semelhantes entre si. Apesar de pouco evidente, há um decréscimo na média de L1L1 para S1S1, sendo que o grupo L1S1 se encontra entre os dois. Assim, o grupo genotípico L1L1 foi aquele que relatou níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress* quando comparado com os restantes grupos genotípicos L1S1 e S1S1. Nesta amostra, o fator genótipo alterou significativamente o índice EADS-21 ($p=0,017$). A figura mostra de que forma se

distribuem as médias do índice EADS-21 pelos três grupos de genótipos L1L1, L1S1 e S1S1.

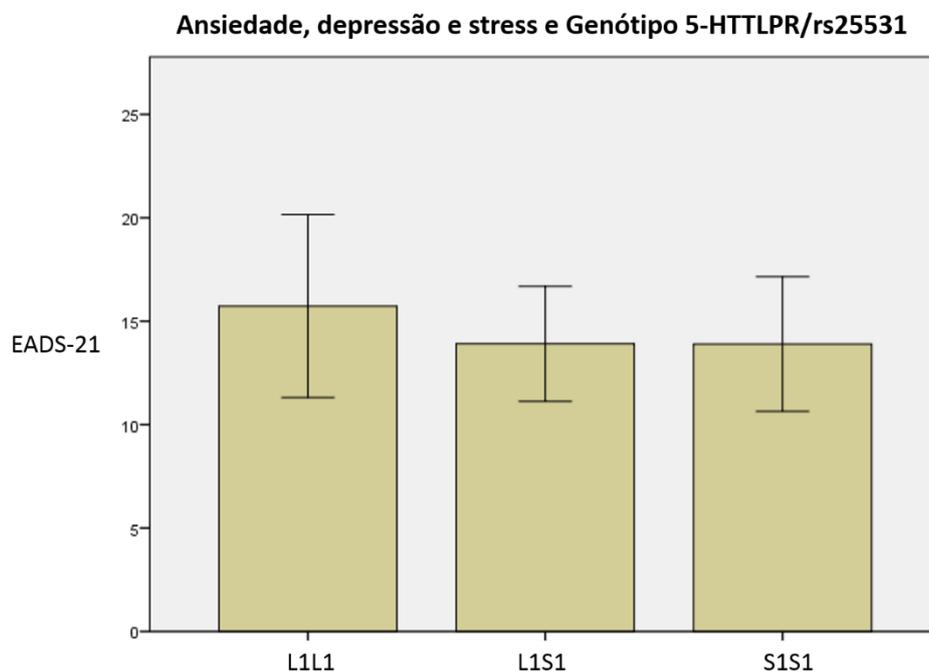


Figura 8 – Média da pontuação total obtida na EADS-21 por grupo de genótipo 5-HTTLPR/rs25531: L1L1; L1S1; e S1S1. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos). Os valores médios para cada grupo: L1L1 15,73 ± 14,02; L1S1 13,91 ± 12,02; S1S1 13,89 ± 11,09. As barras representam o intervalo de confiança de 95%.

3.3.1.2 Género

Ambos os sexos apresentam frequências mais elevadas para os valores mais baixos de EADS-21, sugerindo que a maioria dos sujeitos de ambos os sexos apresentou níveis baixos de ansiedade, depressão e *stress*. Na amostra, o fator sexo não alterou o índice EADS-21 ($p=0,077$). Contudo, o valor de significância está próximo do limite de rejeição ($p=0,05$). Valores de EADS-21 superiores a 40 foram apenas obtidos mulheres, indicando que é neste sexo que encontramos os indivíduos com níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress*. A figura 9 ilustra de que forma o índice EADS-21 se distribui nos indivíduos dos sexos feminino e masculino na amostra estudada.

Ansiedade, depressão, stress e género

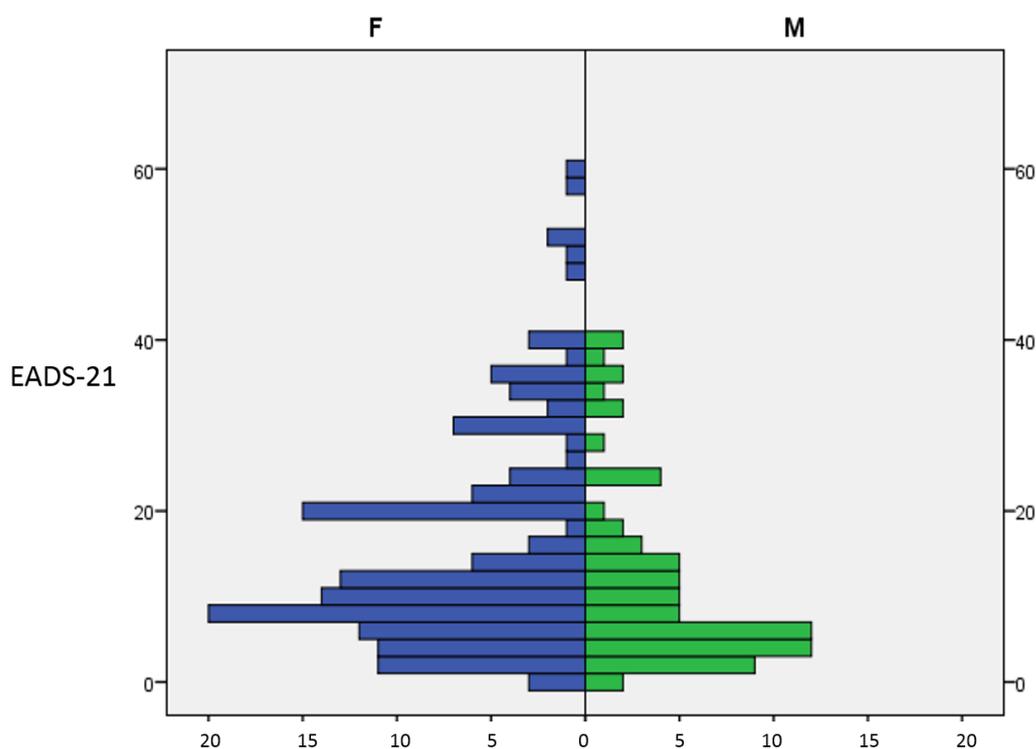


Figura 9 – Distribuição das frequências da pontuação total obtida na EADS-21 por sexo feminino (F) e masculino (M). O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos) e o eixo horizontal representa a frequência de indivíduos que obteve um determinado valor de pontuação total (uma lado para cada sexo). Os valores médios para cada grupo: sexo feminino 15,31 ± 12,67 e sexo masculino 12,37 ± 11,16.

3.3.1.3 Depressão do pai e depressão da mãe

A *depressão do pai* e a *depressão da mãe* mostraram efeitos significativos na escala EADS-21, quer como fatores individuais ($p < 0,001$ para ambos), quer em interação entre si ($p < 0,001$) e com os outros fatores ambientais testados. As duas variáveis foram emparelhadas, originando três grupos distintos consoante a presença ou não de pelo menos, um dos pais deprimido. No grupo com *pais deprimidos*, estão os indivíduos cujo pai, a mãe ou ambos tiveram ou têm depressão. No grupo com *pais não deprimidos* estão os indivíduos cujos pais não tiveram nem têm depressão e no grupo *não sabe* estão os indivíduos que não sabem se o pai, a mãe ou ambos tiveram ou têm depressão. As médias do índice EADS-21 variam entre grupos de acordo com o esperado; o grupo de indivíduos com *pais deprimidos* apresenta níveis de ansiedade, depressão e *stress* mais elevados do que o grupo com *pais não deprimidos* (Tabela 20).

Tabela 20 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos definidos pela *depressão dos pais* e respetivas médias do índice fenotípico EADS-21.

	N	EADS-21*
Pais deprimidos	54	15,46 ± 12,35
Pais não deprimidos	69	12,77 ± 12,81
Não sabe	39	15,67 ± 11,03
Total	162	-

* EADS-21: máximo 63 pontos, mínimo 0 pontos

3.3.1.4 Bem-estar emocional, psicológico e social (MHC)

A amostra estudada apresenta, em média, valores moderados de MHC (41,02 ± 12,41) uma vez que a pontuação varia entre 0 e 70. Na amostra estudada o índice de bem-estar influenciou, significativamente, o índice EADS-21 ($p < 0,001$). Por este motivo é caracterizada por valores razoáveis de bem-estar emocional, psicológico e social. A distribuição dos valores dos índices EADS-21 e MHC apresentam uma relação negativa. Os valores mais baixos do índice de EADS-21 estão associados a valores mais elevados do índice MHC, indicando que os indivíduos que relatam níveis mais baixos de ansiedade, depressão e *stress* são caracterizados por níveis mais elevados de bem-estar. A figura 10 ilustra de que forma os índices EADS-21 e MHC se distribuem na amostra estudada.

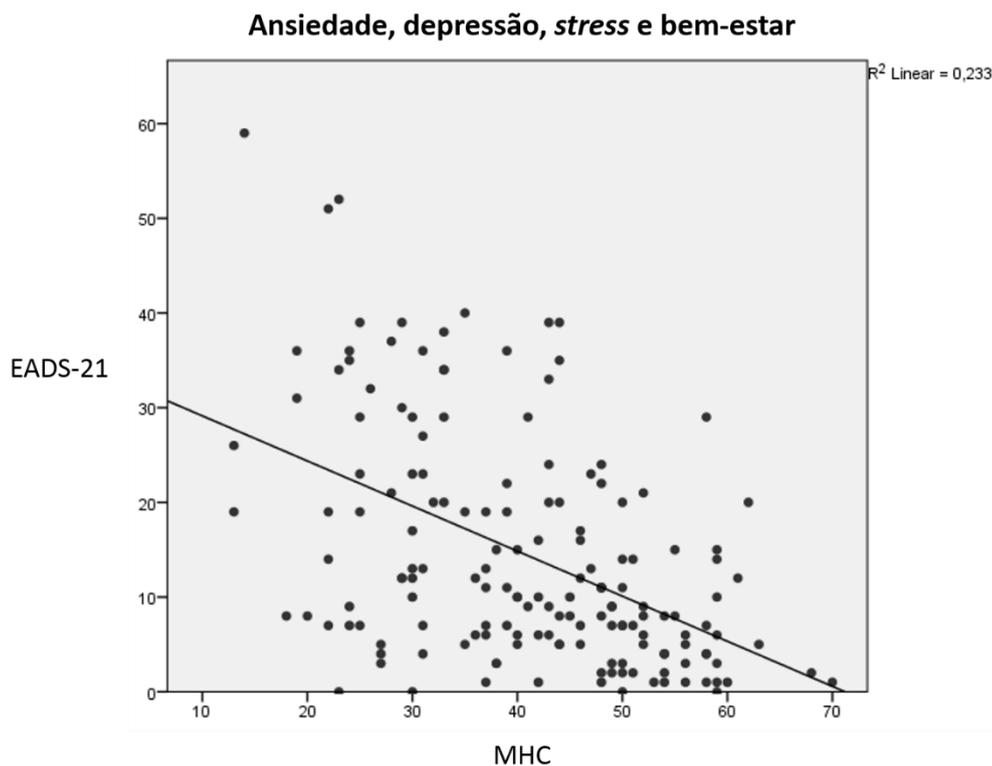


Figura 10 – Distribuição da pontuação total obtida na EADS-21 e no MHC para a amostra total (n=162). O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos) para a escala de ansiedade, depressão e *stress*. O eixo horizontal representa o nº de pontos obtidos (máximo 70 pontos; mínimo 0 pontos) para a escala de bem-estar. Cada uma das circunferências no gráfico representa um indivíduo que obteve um determinado valor de pontuação total em ambas as escalas. A reta de regressão representada traduz a equação matemática que melhor se ajusta à distribuição das variáveis $y=0,48x+33,69$.

3.3.1.5 Maus tratos na infância (CTQ)

A amostra apresenta níveis médios de maus tratos moderadamente baixos ($47,47 \pm 9,72$) uma vez que a pontuação varia entre 0 e 112. A forma como a medida de maus tratos influenciou o índice EADS-21 não é graficamente clara e a distribuição dos valores de combinação dos dois índices pela amostra não mostra qualquer tipo de relação. Não obstante, segundo o modelo, os níveis de maus tratos influenciaram os níveis de ansiedade, depressão e *stress* dos indivíduos de forma significativa ($p = 0,011$).

3.3.1.6 Depressão do pai, depressão da mãe e maus tratos

Para tentar perceber como é que os fatores – índice de maus tratos, *depressão do pai* e *depressão da mãe* - interagiram de forma a alterar o índice EADS-21 ($p < 0,001$), as variáveis *depressão do pai* e *depressão da mãe* foram utilizadas novamente emparelhadas. A figura 11 ilustra de que forma os índices CTQ se distribuem nos grupos definidos pela variável emparelhada *depressão dos pais*.

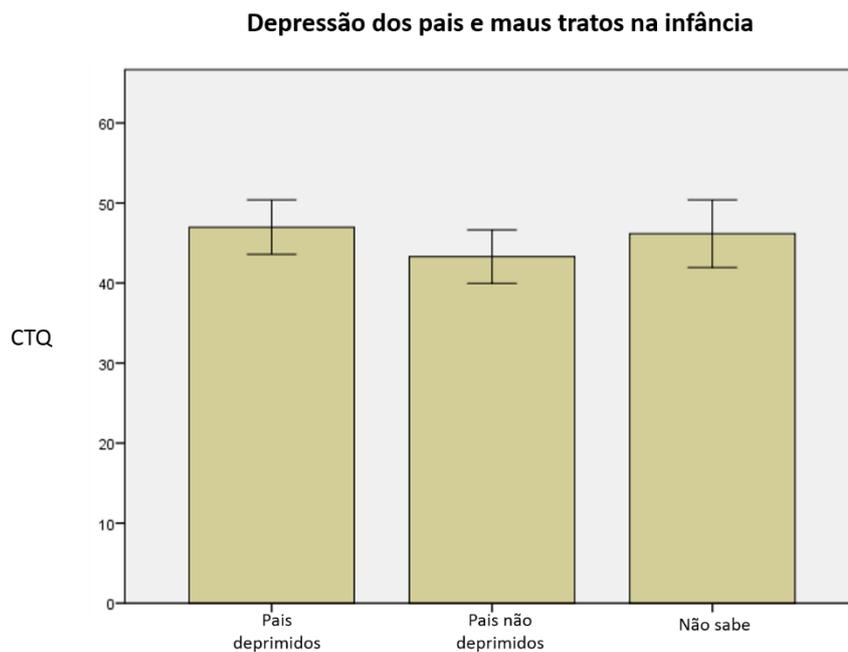


Figura 11 – Média da pontuação total obtida no CTQ por grupos definidos pela *depressão dos pais*: Pais deprimidos, pais não deprimidos e não sabe. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 112 pontos; mínimo 0 pontos). Os valores médios para cada grupo: *pais deprimidos* $49,46 \pm 9,39$; *pais não deprimidos* $45,91 \pm 10,62$ e *não sabe* $47,46 \pm 8,08$. As barras representam o intervalo de confiança de 95%.

Quanto à distribuição da variável – maus tratos na infância – pelos três grupos definidos pela *depressão dos pais*, as diferenças entre as médias são muito pouco evidentes. Contudo, no grupo com *pais deprimidos* os níveis de maus tratos são superiores ($49,46 \pm 9,39$) à média da amostra total ($47,47 \pm 9,72$) que, por sua vez, é superior aos níveis de maus tratos do grupo de *pais não deprimidos* ($45,91 \pm 10,62$) (Tabela 21).

Tabela 21 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos definidos pela *depressão dos pais* e respectivas médias do índice de maus tratos (CTQ) e médias do índice fenotípico EADS-21.

	N	CTQ*	EADS-21*
Pais deprimidos	54	49,46 ± 9,39	15,46 ± 12,35
Pais não deprimidos	69	45,91 ± 10,62	12,77 ± 12,81
Não sabe	39	47,46 ± 8,08	15,67 ± 11,03
Total	162	-	-

*CTQ: máximo 112 pontos, mínimo 0 pontos. EADS-21: máximo 63 pontos, mínimo 0 pontos

Da mesma forma que o grupo de indivíduos com os *pais deprimidos* apresenta um índice médio de maus tratos superior ao do grupo de *pais não deprimidos*, relatou níveis médios de EADS-21 superiores ao deste grupo. Os resultados são indicadores de que quando são levados em conta os dois fatores – *depressão dos pais* e maus tratos – a interação atua de tal forma que o grupo em que o fator de *stress* familiar está ausente, apresenta níveis mais baixos de maus tratos e significativamente mais baixos de ansiedade, depressão e *stress*.

3.3.1.7 Depressão do pai, depressão da mãe e bem-estar

Para tentar perceber como é que os fatores – índice de bem-estar; *depressão do pai*; e *depressão da mãe* – interagiram de forma a alterar o índice EADS-21 ($p=0,000$), as variáveis *depressão do pai*, *depressão da mãe* foram novamente colocadas de forma emparelhada, originando três grupos distintos consoante a presença ou não de pelo menos um dos pais deprimido. A figura ilustra de que forma o índice MHC se distribui nos grupos definidos pela variável emparelhada *depressão dos pais*.

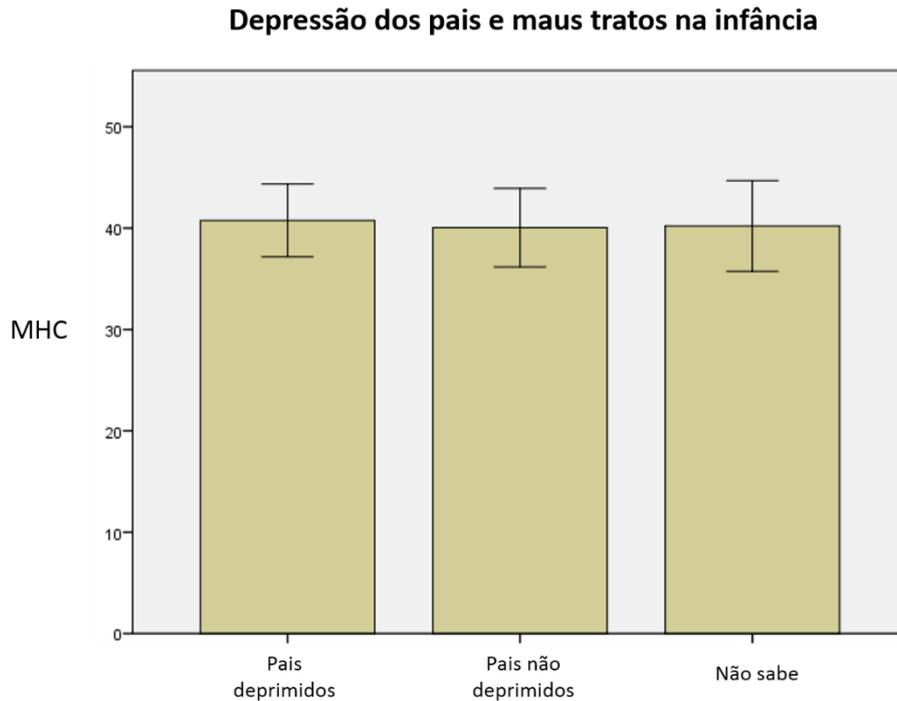


Figura 12 – Média da pontuação total obtida no MHC por grupos definidos pela *depressão dos pais*: *pais deprimidos*, *pais não deprimidos* e *não sabe*. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 70 pontos; mínimo 0 pontos). Os valores médios para cada grupo: *pais deprimidos* $42 \pm 12,48$; *pais não deprimidos* $41,75 \pm 13,17$ e *não sabe* $38,38 \pm 10,75$. As barras representam o intervalo de confiança de 95%.

Quanto à distribuição da variável – bem-estar – pelos grupos definidos pela *depressão dos pais*, as diferenças entre as médias são pouco evidentes. Ao contrário do que era esperado, no grupo com *pais deprimidos* a média é superior à do grupo de *pais não deprimidos* e superior à média da amostra total ($41,02 \pm 12,41$). Ainda assim, neste grupo, a média do índice EADS-21 é mais elevada do que no grupo de *pais não deprimidos*, que apresenta níveis de bem-estar mais baixos (Tabela 22). Uma das explicações possíveis para estes valores poderá ser o facto de a amostra se ter caracterizado, de forma geral, por níveis baixos de ansiedade, depressão e *stress* e níveis mais elevados de bem-estar. No caso desta amostra em particular, os níveis gerais de bem-estar são moderados e as pequenas diferenças entre indivíduos poderão não ser suficientes para justificar as diferenças no índice EADS-21.

Tabela 22 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos de *depressão dos pais* e respectivas médias de pontuação total obtida do índice de bem-estar (MHC) e no índice fenotípico EADS-21.

	N	MHC*	EADS-21*
Pais deprimidos	54	42 ± 12,48	15,46 ± 12,35
Pais não deprimidos	69	41,75 ± 13,17	12,77 ± 12,81
Não sabe	39	38,38 ± 10,75	15,67 ± 11,03
Total	162	-	-

*MHC: máximo 70 pontos, mínimo 0 pontos. EADS-21: máximo 63 pontos, mínimo 0 pontos.

3.3.1.8 *Depressão do pai, depressão da mãe e genótipo 5-HTTLPR/rs25531*

Para frisar a importância da *depressão dos pais* como possível duplo marcador biológico e ambiental, foi testada a interação entre *depressão do pai*, *depressão da mãe* e genótipo 5-HTTLPR/rs25531, resultando da análise um valor de *p* muito significativo ($p=0,000$). Confirmou-se, assim, a existência de uma interação significativa entre estes três fatores que atua de forma a alterar o índice EADS-21. Foram selecionados apenas os indivíduos do grupo em que, pelo menos, um dos pais teve ou tem depressão ($n=54$) e calculadas as frequências dos três grupos de genótipos L1L1, L1S1 e S1S1 para estes indivíduos (Tabela 23).

Tabela 23 – Frequência de genótipos 5-HTTLPR/rs25531 no grupo de indivíduos em que pelo menos um dos pais tem ou teve depressão e na amostra total.

Genótipo	Frequência no grupo	Frequência na amostra total
L1L1	12 (22%)	51 (25%)
L1S1	26 (48%)	93 (45%)
S1S1	16 (30%)	62 (30%)
Total	54 (100%)	206 (100%)

As frequências dos diferentes grupos genotípicos são muito semelhantes entre a amostra e o grupo selecionado, mostrando que para a variável *depressão dos pais*, a distribuição dos grupos genotípicos L1L1, L1S1 e S1S1 é idêntica à da amostra total e nenhum deles se encontra representado de forma diferencial (Tabela 23). A figura 13 ilustra de que forma se distribuem as medianas do índice EADS-21 nos três grupos de genótipo para os indivíduos do grupo em que pelo menos um dos pais, teve ou tem depressão.

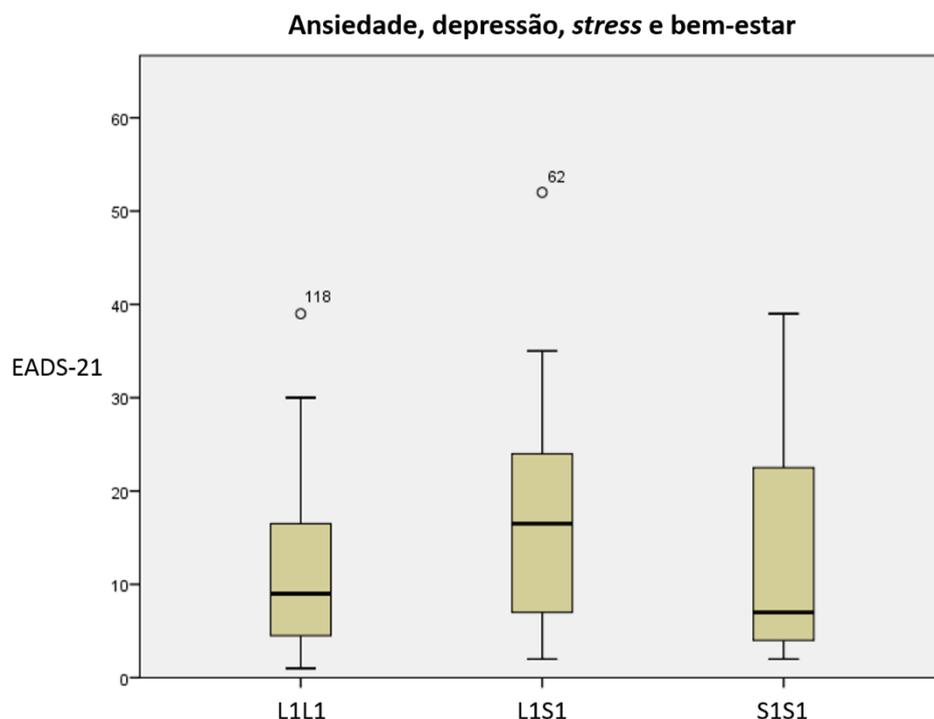


Figura 13 – Mediana da pontuação total obtida na EADS-21 por grupo de genótipo 5-HTTLPR/rs25531, L1L1, L1S1, e S1S1. O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos). As linhas pretas nas barras do gráfico representam a mediana, as caixas quartis, as linhas limites de confiança de 5% e 95% e os pontos ‘outliers’.

Acerca da perturbação psicológica dos indivíduos, também eles foram separados por grupos pela variável *depressão* em três grupos distintos, consoante o indivíduo teve ou tem depressão, não teve nem tem depressão e não sabe. Mais de metade dos indivíduos afirmou não ter tido nem ter depressão (Tabela 24).

Tabela 24 – Frequência de indivíduos deprimidos na amostra total.

	Frequência	%
Deprimido	22	14%
Não deprimido	98	61%
Não sabe	42	26%
Total	162	100%

A percentagem de indivíduos que afirma que teve ou tem uma depressão representa menos de um quarto da amostra, dado que se trata de uma população

saudável. Contudo, é importante notar, que quase metade dos indivíduos (10 indivíduos em 22) que afirma que teve ou tem depressão pertence a famílias onde também os pais estiveram ou estão deprimidos (Figura 14).

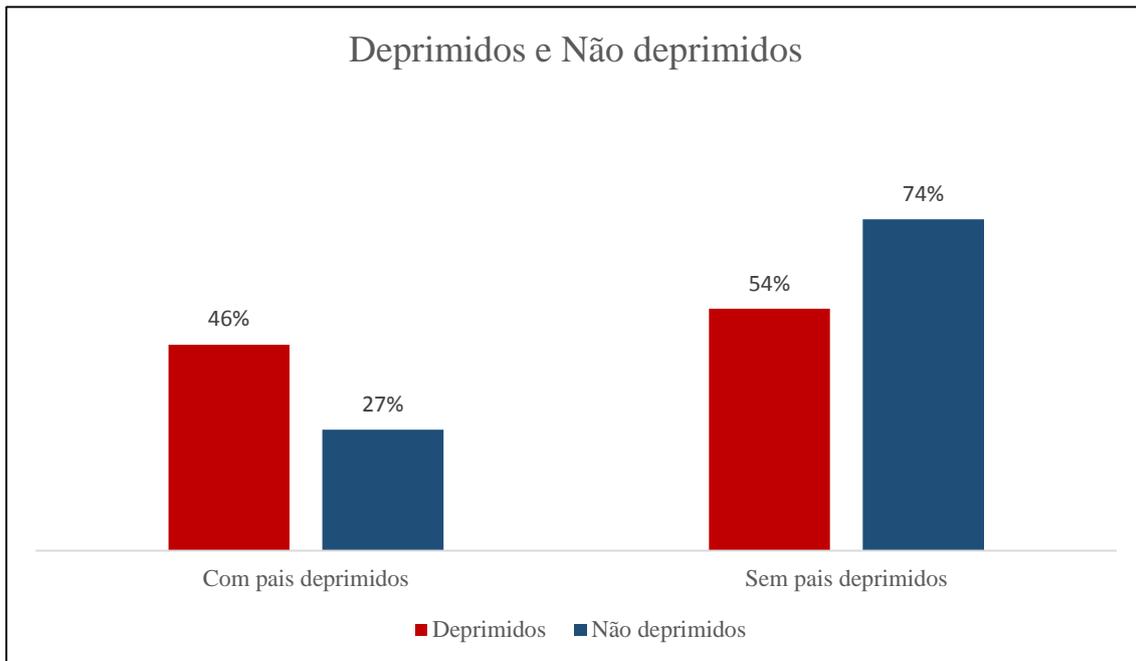


Figura 14 – Distribuição de indivíduos deprimidos (n=22) e não deprimidos (n=98) da amostra (n=162) por grupos de *depressão dos pais*. 46% Dos deprimidos têm pais deprimidos, enquanto 54% não tem pais deprimidos. No grupo de não deprimidos, apenas 27% tem pais deprimidos e 74% não tem pais deprimidos.

3.3.2 Modelo EADS-21, estratégias *coping* cognitivas, depressão da mãe e genótipo 5-HTTLPRrs/25531

Para a análise do fenótipo no neste modelo foi utilizada uma população de 123 indivíduos da amostra total: 89 do sexo feminino e 34 do sexo masculino, distribuídos pelos três grupos de genótipos L1L1 L1S1 e S1S1 (Tabela 23).

Tabela 25 – Frequências absolutas da população analisada para o fenótipo por sexo e grupo de genótipo.

Genótipo 5-HTTLPR/rs25531				
Sexo	L1L1	L1S1	S1S1	Total
Feminino	22	38	29	89
Masculino	8	18	8	34
Total	30	56	37	123

Como já referido, a *depressão dos pais* está dividida em *depressão do pai* e *depressão da mãe*, e as frequências para estas duas variáveis são apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26 – Frequências absolutas e relativas das variáveis *depressão do pai* e *depressão da mãe* para a população estudada.

	Depressão do pai	Depressão da mãe
Sim	13 (11%)	36 (29%)
Não	81 (66%)	67 (55%)
Não sabe	29 (23%)	20 (16%)
Total	123 (100%)	123 (100%)

Os indicadores CERQ – estratégias *coping* positivas e estratégias *coping* negativas - foram testados com e sem interação com outros fatores – genótipo e *depressão da mãe*. As variáveis – genótipo, sexo, *depressão do pai* - foram mantidos como variáveis categóricas no modelo, sem terem sido testadas individualmente. Como hipótese de estudo, foi suposto que as variáveis testadas, que individualmente, quer em interação, podem alterar significativamente a distribuição dos níveis de ansiedade, depressão e *stress*. Os valores de significância *p* para o teste MLG desta hipótese bem como as médias dos fatores estimadas pelo modelo encontram-se nas Tabela 27 e 28.

Tabela 27 – Valores do teste de Qui-quadrado de Wald e respectivos valores de significância p para os fatores e interações entre fatores testados no modelo (variáveis) e graus de liberdade (gl). EADS-21 é a variável dependente e a medida fenotípica de ansiedade, depressão e *stress*.

Variáveis	Tipo III		
	Qui-quadrado de Wald	gl	p
Estratégias de coping cognitivas positivas CERQ +	65,189	1	0,000
Estratégias de coping cognitivas negativas CERQ -	204,201	1	0,000
Genótipo 5-HTTLPR/rs25531* estratégias positivas CERQ +	4,871	2	0,088
Genótipo 5-HTTLPR/rs25531* estratégias negativas CERQ -	2,593	2	0,273
Depressão da mãe* estratégias positivas CERQ +	4,954	2	0,084
Depressão da mãe* estratégias negativas CERQ -	6,149	2	0,046
Depressão da mãe	1,387	2	0,500

Tabela 28 – Estimativas do modelo. Médias estimadas para os fatores sexo, depressão do pai e depressão da mãe, valores de B para as co-variáveis estratégias CERQ + e CERQ - e respectivos erros padrão. As co-variáveis que aparecem no modelo são fixas nos seguintes valores: CERQ + = 2,1711 e CERQ - = 1,8699.

Fatores		Média	Erro Padrão
Sexo	Feminino	14,02	0,423
	Masculino	14,02	0,423
Depressão do pai	Sim	14,02	0,423
	Não	14,02	0,423
	Não sabe	14,02	0,423
Depressão da mãe	Sim	16,49	0,738
	Não	14,11	0,5
	Não sabe	11,84	0,843
Co-variáveis		B	Erro padrão
Estratégias positivas CERQ +		-0,707	0,1529
Estratégias negativas CERQ -		0,804	0,1258

Para os fatores testados individualmente – estratégias coping positivas ($p < 0,001$) e estratégias coping negativas ($p < 0,001$) – os valores de p são muito significativos, indicando que as variáveis alteram o índice fenotípico EADS-21. Para o fator depressão da mãe testada individualmente, o valor de p não é significativo ($p = 0,5$), indicando que a variável não altera o índice fenotípico EADS-21.

Com exceção da interação significativa – *depressão da mãe** estratégias coping negativas ($p = 0,046$) – as restantes interações - genótipo* estratégias coping positivas ($p = 0,088$), genótipo* estratégias coping negativas ($p = 0,273$) e *depressão da mãe**

estratégias positivas ($p=0,084$) – não apresentam valores de p significativos, indicando que os fatores não interagem entre si de forma a alterar o índice EADS-21.

Deste modelo, podemos prever que apenas as variáveis estratégias *coping* negativas e estratégias *coping* positivas se relacionam individualmente com o índice fenotípico medido EADS-21. Em relação às interações, apenas a *depressão da mãe* e as estratégias negativas do indivíduo interagem de forma a influenciar os níveis de ansiedade, depressão e *stress* medidos nos indivíduos. Na prática, isto significa que ambos os tipos de estratégias cognitivas e a interação das estratégias negativas com a *depressão da mãe* têm um efeito modelador de fenótipo quando as restantes variáveis são ajustadas.

3.3.2.1 Estratégias *coping* cognitivas

A amostra estudada apresenta, em média, valores moderados de estratégias positivas ($2,28 \pm 0,66$) e mais baixos de estratégias negativas ($1,97 \pm 0,68$). Por isso é caracterizada por recorrer mais frequentemente a estratégias *coping* positivas do que negativas. A distribuição dos valores dos índices EADS-21 e CERQ+ apresentam uma relação negativa, isto é, quanto mais elevado o índice de estratégias positivas, menor o índice EADS-21. A tendência para recorrer a estratégias *coping* cognitivas positivas está associada a níveis mais baixos de ansiedade, depressão e *stress*. A distribuição dos valores dos índices EADS-21 e CERQ- apresenta uma relação positiva, isto é, quanto mais elevado o índice de estratégias negativas, maior o índice EADS-21. A tendência de recorrer a estratégias *coping* cognitivas negativas é a de estar associada a níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress*. Na amostra estudada os índices de ambas as estratégias influenciaram significativamente o índice EADS-21. A figura 14 ilustra de que forma os índices EADS-21 e CERQ se distribuem pela amostra estudada.

Ansiedade, depressão, *stress* e estratégias *coping* cognitivas

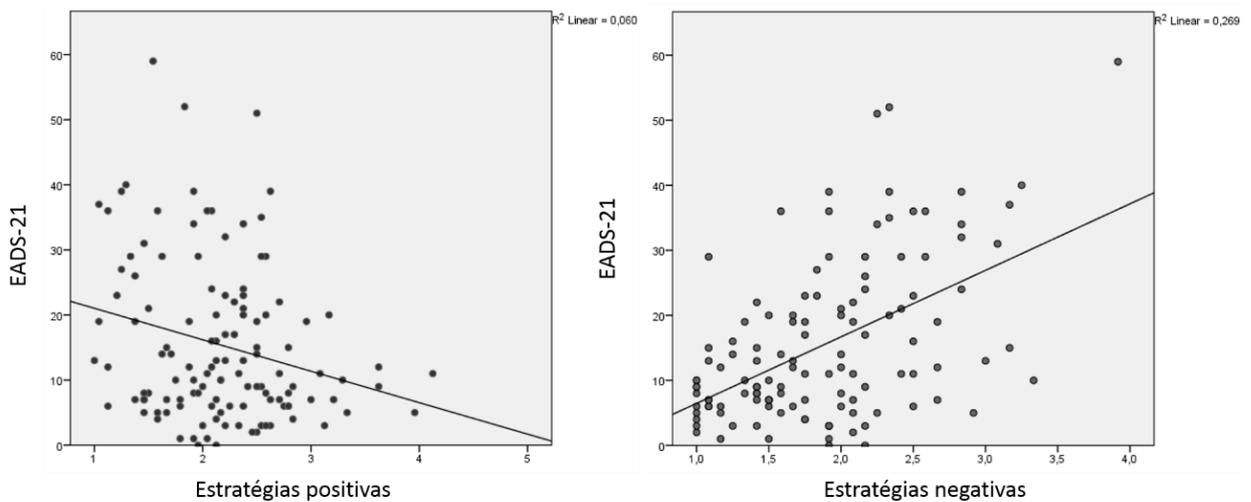


Figura 15 – Distribuição da pontuação total obtida na EADS-21 e nos índices CERQ – Estratégias positivas e Estratégias negativas para a amostra total (n=123). O eixo vertical representa o nº de pontos obtido (máximo 63 pontos; mínimo 0 pontos) para a escala de ansiedade, depressão e *stress*. O eixo horizontal representa o valor do índice (máximo 5; mínimo 1) para as estratégias *coping* positivas e negativas (esquerda e direita). Cada uma das circunferências no gráfico representa um indivíduo que obteve um determinado valor de pontuação total em ambos os índices. As retas de regressão no gráfico representam a equação matemática que melhor se ajusta à relação entre as duas variáveis: $y=3,41x+21,48$ para a relação EADS-21 estratégias positivas e $y=9,44x+0,25$ para a relação EADS-21 estratégias negativas.

3.3.2.3 Depressão da mãe e estratégias *coping* negativas

Apesar de o fator *depressão da mãe* não se ter apresentado como modelador significativo do índice EADS-21 ($p=0,5$), quando colocado em interação com as estratégias *coping* negativas, o resultado é significativo ($p=0,046$), sugerindo que os dois fatores interagiram de forma a alterar o índice EADS-21. A tabela 29 mostra como estão agrupadas as médias obtidas no índice de estratégias negativas com as médias do índice fenotípico EADS-21 por grupos definidos pela *depressão da mãe*.

Tabela 29 – Tabela de frequências de indivíduos por grupos definidos pela *depressão da mãe* e respectivas médias do índice de estratégias coping negativas (CERQ -), e médias do índice fenotípico EADS-21 para os mesmos grupos.

	N		CERQ - *	EADS-21*
Mãe deprimida	44	27%	1,71 ± 0,54	15,5 ± 11
Mãe não deprimida	84	52%	1,96 ± 0,64	15,82 ± 13,12
Não sabe	33	21%	1,84 ± 0,64	13,6 ± 11,63
Total	162	100%		-

*CERQ -: máximo 5, mínimo 1. EADS-21: máximo 63 pontos, mínimo 0 pontos.

Para as estratégias cognitivas negativas, o grupo com o índice mais elevado é aquele em que as mães não tiveram nem têm depressão. Ao contrário do que seria esperado, o grupo de indivíduos cuja mãe teve ou tem depressão, é aquele que recorre menos vezes a estratégias negativas. Pelo contrário, nas famílias em que a mãe não teve nem tem depressão, estão os indivíduos que recorrem com maior frequência a estratégias negativas. Relacionando as médias dos índices estratégicos com o índice fenotípico EADS-21, os dois grupos – *mãe deprimida* e *mãe não deprimida* – apresentam níveis muito semelhantes de ansiedade, depressão e *stress*. Teoricamente, seria de esperar que no grupo onde está presente o fator – *depressão da mãe* – se encontrassem indivíduos com valores médios do índice EADS-21 mais elevado, por este ser um fator de *stress* familiar.

4. Discussão e Considerações finais

4.1 Frequências dos alelos L, S, a e g na população portuguesa

Pela primeira vez, o estudo dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 foi feito num grupo populacional de nacionalidade portuguesa. Dado que o polimorfismo 5-HTTLPR foi estudado, previamente, noutras populações, Europeias e não-Europeias, foi possível comparar as frequências alélicas entre elas através da estatística F_{ST} . Esta medida de distância genética revelou uma grande proximidade entre as populações da Europa ($F_{ST} < 0,05$), nomeadamente, Espanha, Áustria, Alemanha e Itália (Gutierrez *et al.*, 1998; Willeit *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2004; Nonnis *et al.*, 2008 in Noskova *et al.*, 2008). Porém, quando a nossa amostra foi comparada com as de populações de outros continentes, o valor numérico de F_{ST} aumentou consideravelmente, colocando em evidência a dissemelhança entre amostras populacionais de continentes diferentes ($F_{ST} > 0,25$). Nas populações do Leste Asiático, o alelo S é muito mais frequente do que nas restantes populações da Europa e de África (Li *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2000; Katsuragi *et al.*, 1999 in Noskova *et al.*, 2008). Este padrão de diferenciação não difere muito do encontrado em outras regiões genómicas, consideradas isoladamente, ou agrupadas, e sugere um modo de distribuição da diversidade genética nas populações de acordo com um modelo de dispersão neutral ou quase-neutral. Neste cenário, os humanos foram divididos em três categorias principais: Africanos, Asiáticos Orientais e Europeus. A divergência dos não-Africanos, estimada em cerca de 55 mil anos, terá ocorrido por migrações sucessivas em numerosos pequenos paços permitindo que cada deslocação no espaço fosse acompanhada por uma amostragem da população ancestral e a concomitante perda de diversidade genética (Campbel & Tishkoff, 2010) (Figura 15). Para além do efeito causado pelo padrão de migração, responsável pelo povoamento da região, deve também ser considerado o impacto de determinadas práticas sociais no *gene pool* da população da Ásia Oriental, nomeadamente: i) as expansões da população associadas à difusão da agricultura e, mais recentemente, da cultura Han, e ii) a seleção social (Stoneking e Delfin, 2010). Através da combinação dos efeitos da deriva genética e do crescimento demográfico, o alelo S, se estivesse presente no grupo de pioneiros da expansão espacial, poderá ter surfado nesta onda de expansão beneficiando de um aumento significativo da sua frequência na população. A seleção social, por sua vez, poderá ter gerado diferenças na aptidão reprodutiva dos homens conduzindo ao aumento da fertilidade de determinadas linhagens masculinas, transmitida socialmente de geração em geração. Esta prática poderá ter contribuído para a redução do tamanho efetivo da população e, conseqüentemente, da sua diversidade

genética. Através deste mecanismo, a frequência do alelo S poderá ter aumentado na população se ele estivesse presente nas linhagens com fertilidade mais elevada.

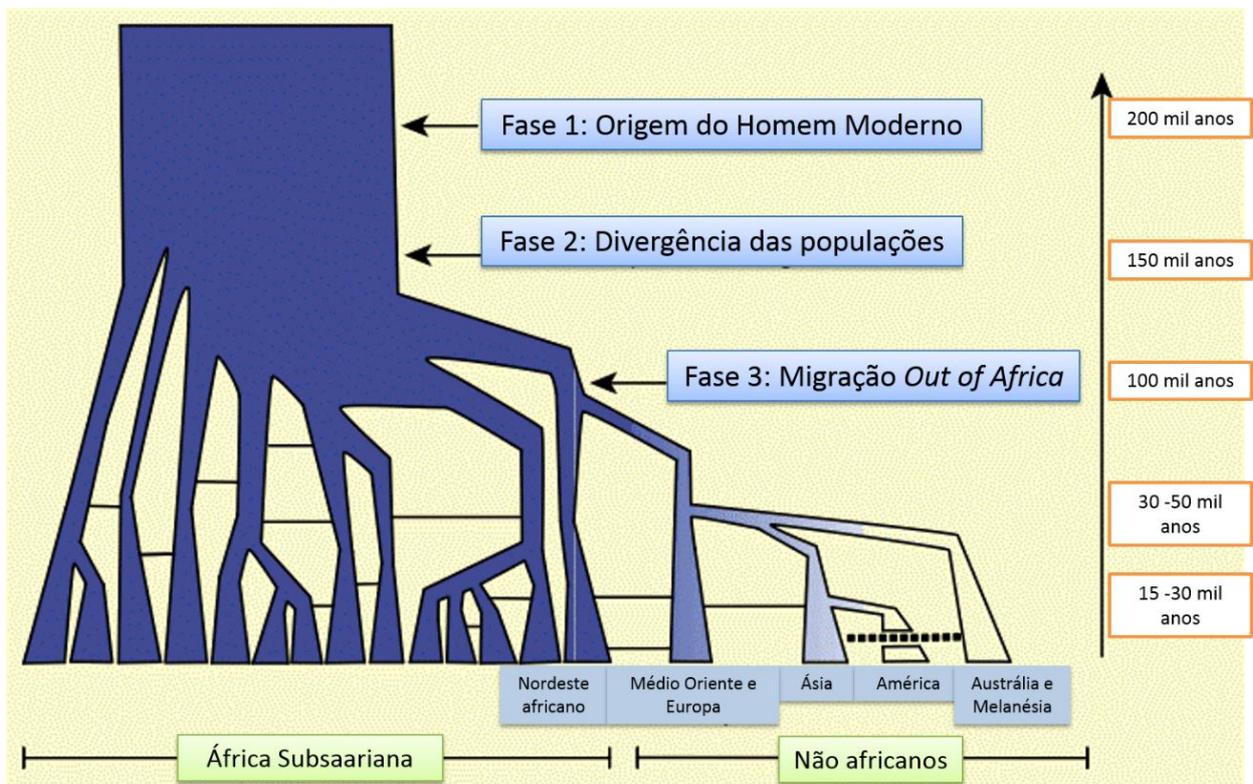


Figura 16 - Filogenia construída com base em marcadores polimórficos espalhados pelo genoma humano. A expansão geográfica para fora de África foi acompanhada por perda de diversidade genética, representada pela diminuição de intensidade da cor. As linhas horizontais cheias representam o fluxo de genes entre populações ancestrais (14 no continente Africano) e as interrompidas representam fluxo de genes recente entre as populações da Ásia e da Austrália (adaptado de Campbel e Tishkoff, 2010).

O alelo *g*, associado ao polimorfismo rs25531, foi observado num número reduzido de indivíduos (5,4%), à semelhança do que foi descrito por Wendland *et al.* (2006). Os haplótipos em que estão associados as variantes *g* e *S* são ainda menos comuns. Na amostra estudada somente dois sujeitos apresentaram as duas variantes em simultâneo.

4.2 Modelos de interação estatística G x A

4.2.1 Interação entre o genótipo 5-HTTLPR/rs25531 e fatores indutores de *stress*

No que diz respeito ao modelo G x A, este *design* foi utilizado para que se pudessem testar fatores de diversas naturezas e inferir de que forma influenciaram o perfil fenotípico dos indivíduos. No primeiro modelo, em que se testaram os marcadores biológicos e ambientais – genótipo 5-HTTLPR/rs25531, sexo, depressão do pai, depressão da mãe, índice de bem-estar e índice de maus tratos – com exceção do sexo, todos os fatores alteraram significativamente os níveis de ansiedade, depressão e *stress* dos indivíduos medido pelo índice EADS-21. Os resultados mostraram que o fenótipo em questão não é independente destas variáveis e que o efeito particular de cada uma delas é significativo para valores ajustados das restantes.

O genótipo 5-HTTLPR/rs25531 revelou ter um efeito significativo no índice EADS-21 ($p=0,017$). A amostra caracterizou-se por níveis muito baixos de ansiedade, depressão e *stress* que poderão, à partida, ser justificados por se tratar de uma população saudável não diagnosticada para nenhuma perturbação psicológica. Quando os níveis de ansiedade, depressão e *stress* foram comparados entre grupos genotípicos, o genótipo L1L1 foi o que apresentou valores médios mais elevados. Por outro lado, o grupo genotípico S1S1 caracterizou-se por níveis mais baixos de EADS-21 e muito semelhantes ao grupo de heterozigóticos L1S1. Ao contrário do que seria, à partida, esperado (Bellivier *et al.*, 1998), os níveis de ansiedade, depressão e *stress* foram mais elevados nos indivíduos com pelo menos uma cópia da variante curta. Contudo, a grande maioria dos estudos que reporta este tipo de resultados tem como *design* experimental a interação G x A, semelhante ao adotado neste estudo (Caspi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009; Bonvicini *et al.*, 2010; Hammen *et al.*, 2010). Na ausência de interação com outros fatores e para valores ajustados das restantes variáveis incluídas no modelo, nesta amostra em particular, o grupo L1L1 apresentou fenótipos com níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress*.

O sexo dos indivíduos não revelou ter efeito modelador dos níveis de ansiedade, depressão e *stress*. Contudo, estudos efetuados noutras populações mostraram que as mulheres apresentam o dobro da prevalência de depressão quando comparadas com os homens (Kessler *et al.*, 1993). Tendo em conta as alterações hormonais femininas que

têm início na adolescência e dado que o risco para o primeiro episódio depressivo é mais precoce nas mulheres, é possível que haja uma explicação biológica para a distribuição desigual desta perturbação nos dois sexos (Eley *et al.*, 2004). De forma não direta, o sistema hormonal feminino atua na suscetibilidade para a depressão aumentando a reatividade ao *stress*. Para além disto, as diferenças de estatuto e poder social e o facto de serem mais vezes vítimas de vários tipos de abusos (nomeadamente sexual), também pode contribuir para a vulnerabilidade aumentada das mulheres para a depressão. Também se sabe que a região cerebral envolvida na reatividade ao *stress* (hipotálamo – HPA *axis*) pode sofrer desregulação após um trauma (Hoeksma, 2001). Estando socialmente mais predispostas a traumas e biologicamente mais sensibilizadas, as mulheres são naturalmente mais vulneráveis à depressão. Nesta amostra, os indivíduos do sexo feminino obtiveram, em média, índices mais elevados de ansiedade, depressão e *stress* ($15,31 \pm 12,67$) do que os indivíduos do sexo masculino ($12,37 \pm 11,16$), porém, insuficientes para rejeitar a hipótese nula. O valor de *p* de teste Qui quadrado de Wald foi próximo do limite de rejeição ($p=0,077$).

O índice EADS-21 foi influenciado por todos os fatores ambientais indutores de *stress* no modelo. A depressão do pai, a depressão da mãe, o índice de bem-estar e o índice de maus tratos revelaram ter influência nos níveis de ansiedade, depressão e *stress* medidos nos indivíduos. A presença de perturbação psicológica do pai e da mãe, como fatores indutores de *stress*, atuaram de forma a aumentar o índice EADS-21 ($p < 0,001$ para ambos). No grupo de indivíduos com pais deprimidos, os valores dos índices EADS-21 foram, em média, mais elevados ($15,46 \pm 12,35$) do que no grupo em que os pais não apresentavam perturbação psicológica ($12,77 \pm 18,81$).

No que respeita ao índice MHC, a amostra caracterizou-se por níveis moderados de bem-estar ($41,02 \pm 12,41$) e os resultados mostraram que a relação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) que existe entre os dois índices MHC e EADS-21 é do tipo negativo. A tendência exibida pela amostra é de apresentar níveis mais baixos de ansiedade, depressão e *stress* conjugados com níveis mais elevados de bem-estar. É importante referir que esta escala foi aqui usada como um indicador do bem-estar geral do indivíduo, mas contém três subescalas distintas: bem-estar emocional, psicológico e social. O bem-estar social (uma de três componentes do índice MHC) tem mais peso como preditor no modelo, uma vez que avalia melhor a interligação do indivíduo com o seu meio ambiente. No entanto, como avaliador global do bem-estar mental, era de

esperar que a relação entre os dois índices MHC e EADS-21 fosse do tipo negativa, como se verificou na amostra estudada. Os autores Keys *et al.* (2008) referem que pontuações mais elevadas nesta escala estão associadas a indivíduos socialmente mais funcionais, cognitivamente mais positivos e menos sintomáticos para a depressão e ansiedade.

O índice de maus tratos na infância revelou ter um efeito estatístico significativo no índice fenotípico medido nos indivíduos ($p=0,011$), que de uma forma geral apresentam valores baixos ($47,47 \pm 9,72$). Este fator ambiental de *stress* está fortemente ligado à depressão em crianças e adolescentes de ambos os sexos e é muito importante como fator de vulnerabilidade a perturbações psicológicas no adulto (Aslund *et al.*, 2009). Crianças que tenham sofrido abusos tendem a desenvolver sintomas de ansiedade e depressão e fazem-no muito mais frequentemente que crianças que nunca sofreram maus tratos (Kendall-Tackett *et al.*, 1993). Quando está presente o fator de *stress* de perturbação psicológica dos pais, o grupo de indivíduos com índices médios mais elevados de maus tratos apresentaram também níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress*. Os dois fatores interagem entre si de tal forma ($p < 0,001$) que é mais provável que, no grupo com os pais deprimidos, os indivíduos relatarem níveis mais elevados de maus tratos e consequentemente de ansiedade, depressão e *stress*.

O fator depressão dos pais influenciou a distribuição da variável dependente. A sua presença parece alterar o efeito modulador de fenótipo que os genes teriam para valores ajustados das restantes variáveis incluídas no modelo. Isto é, apesar de os indivíduos do grupo S1S1 apresentarem níveis mais baixos de ansiedade, depressão e *stress*, na presença de perturbação psicológica dos pais, esta tendência é invertida. Nesta situação, os indivíduos homozigóticos L1L1, passam a ser o grupo com menores níveis de ansiedade, depressão e *stress*, quando comparados com os outros dois grupos. Esta observação está de acordo com a hipótese inicial segundo a qual, nos indivíduos portadores do alelo S, as alterações no sistema serotoninérgico associadas à depressão podem ser potenciadas por acontecimentos de vida stressantes (Alexander *et al.*, 2009). Há autores que mencionam que a exposição diferencial a este tipo de acontecimentos pode ser influenciado pela genética do indivíduo, fazendo com que se trate de um fator de risco biológico em vez de ambiental (Caspi *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2010).

Quando se comparam os valores da mediana da variável dependente nos três genótipos, na presença do fator de *stress* familiar, o grupo com valores numéricos mais

elevados de ansiedade, depressão e stress foi o L1S1. Jabbi *et al.* (2007) obtiveram resultados semelhantes e sugeriram que a relação entre o polimorfismo 5-HTTLPR e os fatores ambientais indutores de *stress* era tal que os indivíduos heterozigóticos tendem a mostrar respostas endócrinas exageradas quando comparados com indivíduos homozigóticos L e S. Esta hipótese poderá explicar, pelo menos, parcialmente, os resultados observados na amostra estudada.

Os resultados observados neste modelo analítico sugerem que o *stress* interage com o genótipo dos indivíduos de modo a influenciar o seu risco para desenvolver sintomas depressivos. Os portadores de pelo menos uma cópia do alelo de menor eficácia transcricional foram os que apresentaram risco mais elevado.

4.2.2 Interação entre o genótipo 5-HTTLPR/rs25531 e perfil cognitivo

No segundo modelo de interação G x A, em que foram incluídos os índices de estratégias cognitivas positivas e negativas, os resultados mostraram que o perfil de resposta cognitiva do indivíduos altera de forma significativa o índice EADS-21, quer se tratem de estratégias positivas ($p < 0,001$), quer de negativas ($p < 0,001$). Observou-se que os indivíduos com níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress*, tendem a apresentar índices mais elevados de estratégias *coping* negativas. Pelo contrário, aqueles que apresentam índices mais elevados de estratégias positivas, caracterizam-se por níveis mais baixos de ansiedade, depressão e *stress*. É referido na literatura que o recurso frequente a estratégias *coping* negativas é mais comum em indivíduos depressivos e ansiosos do que em indivíduos sem perturbação psicológica (Garnefsky & Kraaij, 2006). Na amostra estudada, caracterizada globalmente por níveis baixos de ansiedade, depressão e *stress*, verificou-se o recurso mais frequente a estratégias positivas ($2,28 \pm 0,66$) comparativamente às negativas ($1,97 \pm 0,68$).

Quando colocados no modelo sob a forma de interação, as estratégias negativas e a depressão da mãe, mostraram interagir de forma significativa ($p=0,046$) na variação do índice EADS-21. Contudo, as diferenças no índice EADS-21 entre grupos definidos pela depressão da mãe foram pouco acentuadas. O índice de estratégias negativas foi mais elevado nos indivíduos com a *mãe não deprimida*. Isto pode significar, que na presença do fator ambiental *depressão da mãe*, o efeito modelador do perfil de resposta cognitiva dos indivíduos no fenótipo deixa de ser tão evidente, o que pode explicar a

semelhança entre de EADS-21 nos dois grupos ($15,5 \pm 11$ para o grupo com a *mãe deprimida* e $15,82 \pm 13,12$ para o grupo com a *mãe não deprimida*).

É referido na literatura que os indivíduos com a mãe deprimida reagem de forma mais negativa ao *stress* e mostram, mais frequentemente, baixa autoestima e comportamentos desviantes (Elgar *et al.*, 2004). Os filhos de mães deprimidas podem herdar não só a tendência para a depressão, mas também características associadas à vulnerabilidade para a depressão e risco aumentado para experienciar acontecimentos de vida negativos. Estas tendências podem ser despoletadas por fatores ambientais de *stress*, nomeadamente a própria depressão da mãe (Goodman & Gotlib, 1999). O temperamento e os aspetos cognitivos do comportamento do filho serão igualmente importantes como moderadores do impacto da depressão da mãe e podem refletir-se de volta no comportamento da própria mãe. Desta forma, quando a mãe está deprimida pode criar-se um circuito de feedback positivo em que ambos serão afetados pela perturbação psicológica da mãe (Elgar *et al.*, 2004). Alguns autores referem a importância da exposição à depressão da mãe mesmo que em níveis não patológicos, ainda durante a gravidez. Quando isto acontece, dão-se alterações epigenéticas no filho que modificam a reatividade ao *stress* mais tarde (Oberlander *et al.*, 2008).

4.3 Considerações finais

De uma forma geral podemos dividir os fatores incluídos nos modelos de interação em dois grupos distintos, consoante o seu efeito aumentador ou diminuidor na escala de ansiedade, depressão e *stress*.

Por um lado, o grupo de indivíduos com genótipo L1L1 que apresenta níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress* quando comparado com o grupo de indivíduos S1S1. Da mesma forma, o recurso a estratégias *coping* cognitivas negativas, bem como a presença de um ambiente familiar marcado por níveis moderados de perturbações dos pais e maus tratos na infância, parecem atuar como aumentadores dos níveis de ansiedade, depressão e *stress*. Já o recurso a estratégias *coping* cognitivas positivas e níveis elevados de bem-estar atuam como diminuidores dos níveis de ansiedade, depressão e *stress*. Os fatores não interagem de forma unidirecional e o

efeito regulador que têm sobre o fenótipo dos indivíduos pode ser menos evidente quando colocados isoladamente (Tabela 30).

Tabela 30 – Tabela de classificação geral das variáveis incluídas nos modelos de avaliação G x A em moderadores positivos e negativos da escala EADS-21 de ansiedade, depressão e *stress*.

Moderadores positivos ou Aumentadores	Fenótipo	Moderadores Negativos ou Diminuidores
Genótipo 5-HTTLPR/rs25531 L1L1		Genótipo 5-HTTLPR/25531 S1S1
Estratégias de coping cognitivas Negativas	Ansiedade Depressão Stress	Estratégias de coping cognitivas Positivas
Depressão dos pais e Maus tratos na infância		Bem-estar Emocional Psicológico e Social

Ainda que um determinado fator module tendencialmente o fenótipo numa dada direção, na presença de outros fatores, pode haver uma mudança nessa tendência. As variações fenotípicas registadas no modelo reforçam a ideia de que os efeitos dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 estão claramente dependentes do ambiente. Enquanto modeladores particulares, mostraram que os indivíduos homocigóticos para o alelo longo (L1L1) apresentam fenótipos caracterizados por níveis mais elevados de ansiedade, depressão e *stress*. Mas quando postos em interação com fatores de risco, o efeito modelador foi reajustado e a tendência inverteu-se, mostrando que os mesmos indivíduos L1L1 apresentavam fenótipos caracterizados por níveis mais baixos de ansiedade, depressão e *stress*.

A grande maioria dos estudos realizados até ao presente e que seguiram um *design* experimental de interação G x A, recorreram a uma genotipagem bialélica baseada, unicamente, no polimorfismo 5-HTTLPR. São ainda muito escassos, os estudos que incluíram o polimorfismo rs25531. São também muito escassos, ou mesmo inexistentes, os estudos que recorreram aos modelos de análise estatística usados no presente estudo, o que limitou a análise comparativa dos resultados. Porém, a metodologia utilizada permitiu confirmar a hipótese inicial de que o genótipo no locus SLC6A4, determinado pelos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531, poderá estar associado ao risco individual para desenvolver ansiedade, depressão e *stress*, em

resposta a fatores de stress ambiental. Em ambientes marcados pela depressão dos pais, os portadores da variante S1 apresentaram fenótipos mais suscetíveis.

5. Referências bibliográficas

- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, A. R. (1998). The human amygdala in social judgment. *Nature* 393, 470-474.
- Allen N. B., Badcock, P. B. (2003) The social risk hypothesis of depressed mood: evolutionary, psychosocial, and neurobiological perspectives. *Psychol Bull* 129(6), 887-913.
- Allen, N. B., Badcock, P. B. T. (2006). Darwinian models of depression: A review of evolutionary accounts of mood and mood disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 30, 815-826.
- Alexander, N., Kuepper, Y., Schmitz, A., Osinsky, R., Kozyra, E., Hennig, J. (2009). Gene-environment interactions predict cortisol responses after acute stress: Implications for the etiology of depression. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1294-1303.
- Åslund, C., Leppert, J., Comasco, E., Nordquist, N., Orelund, L., and Nilsson, K. W. (2009). Impact of the interaction between the 5HTTLPR polymorphism and maltreatment on adolescent depression. A population-based study. *Behavior Genetics* 39, 524-531.
- Bellivier, F., Henry, C., Szoke, A., Schurhoff, F., Nosten-Bertrand, M., Feingold, J., Launay, J. M., Leboyer, M., Laplanche, J. L. (1998). Serotonin transporter gene polymorphisms in patients with unipolar or bipolar depression. *Neuroscience Letters* 255, 143-146.
- Belmaker, R. H., Agam, G. (2008). Major depressive disorder. *The New England Journal of Medicine*, 358, 55-68.
- Bernstein, D. P., Stein, J. A., Newcomb, M. D., Walker, E., Pogge, D., Ahluvalia, T., Stokes, J., Handelsman, L., Medrano, M., Desmond, D., Zule, W., (2003). Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse and Neglect* 27, 169-190.
- Bonvicini, C., Minelli, A., Scassellati, C., Bortolomasi, M., Segala, M., Sartori, R., Giacomuzzi, M., Gennarelli, M. (2010). Serotonin transporter gene polymorphisms and treatment-resistant depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 34, 934-939.
- Brummett, B. H., Boyle, S. H., Siegler, I. C., Kuhn, C. M., Williams, R. B. (2008). Effects of Environmental Stress and Gender on Associations among Symptoms of Depression and the Serotonin Transporter Gene Linked Polymorphic Region (5-HTTLPR). *Behavior Genetics*, 38(1), 34-43.

- Buss, D. M. (1991). Evolutionary personality psychology. *Annual review of psychology* 42, 459-491.
- Cahill, L., Haier, R. J., Fallon, J., Alkire, M. T., Tang, C., Keator, D., Wu, J., and McGaugh, J. L. (1996). Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8016-8021
- Campbel, M. C., Tishkoff, F. A. (2010). The evolution of human genetic and phenotypic variation in Africa. *Curr Biol.*20(4).
- Canli, T., Lesch, K.-P. (2007). Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nature neuroscience* 10, 1103-1109.
- Carskadon, M. A., Sharkey, K. M., Knopik, V. S., McGeary, J. E. (2012). Short Sleep as an Environmental Exposure: A Preliminary Study Associating 5-HTTLPR Genotype to Self-Reported Sleep Duration and Depressed Mood in First-Year University Students. *Sleep*, 35(6), 791–796.
- Cartwright, J. (2000). Mental disorders, Em:Evolution and Human Behavior: Perspectives on Human Natures. 2nd edition, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, Great Britain.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301(5631).
- Champion, L. A., Power, M. J. (1995). Social and cognitive approaches to depression: towards a new synthesis. The British journal of clinical psychology. *The British Psychological Society* 34(4), 485-503.
- Chen, M. C., Joormann, J., Hallmayer, J., Gotlib, I. H. (2009). Serotonin transporter polymorphism predicts waking cortisol in young girls. *Psychoneuroendocrinology* 34, 681-686.
- Davidson, R. J., Irwin, W. (1999). The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends in Cognitive Sciences* 3, 11-21.
- Deakin, J. F. W. (1996). 5-HT, antidepressant drugs and the psychosocial origins of depression. *J Psychopharmacol*, 10, 31–8.
- Del Porto, J. A. (1999). Conceito e diagnóstico. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 21, 06–11.

- Eley, T. C., Sugden, K., Corsico, A., Gregory, A., M., Sham, P., McGuffin, P., Plomin, R., Craig, I. W. (2004). Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression. *Molecular Psychiatry*, 9(10), 908–915.
- Elgar, F. J., McGrath, P. J., Waschbusch, D. a., Stewart, S. H., Curtis, L. J. (2004). Mutual influences on maternal depression and child adjustment problems. *Clinical Psychology Review*, 24(4), 441–459.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* 1, 47-50. Available at:<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19325852&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/uuid/218B5AA9-3EAB-4B3D-87A2-4B144D33857B>.
- Ferrari, A. J., Somerville, A. J., Baxter, A. J., Norman, R., Patten, S. B., Vos, T., Whiteford, H. A. (2012). Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. *Psychological Medicine*, 43(3). 471-481.
- Garnefski, N., Kraaij, V. (2006). Cognitive emotion regulation questionnaire - development of a short 18-item version (CERQ-short). *Personality and Individual Differences* 41, 1045-1053
- Garnefski, N., Kraaij, V., Spinhoven, P. (2001). Negative life events, cognitive emotion regulation and emotional problems. *Personality and Individual Differences*, 30(8), 1311–1327.
- Gelernter, J., Cubells, J. F., Kidd, J. R., Pakstis, A. J., Kidd, K. K. (1999). Population studies of polymorphisms of the serotonin transporter protein gene. *American Journal of Medical Genetics*, 88(1), 61–66.
- Gelernter, J., Kranzler, H., Cubells, J. F. (1997). Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. *Human Genetics*, 101(2).
- Gibb, B. E., Beevers, C. G., McGeary, J. E. (2013). Toward an integration of cognitive and genetic models of risk for depression. *Cognition & emotion* 27, 193-216.
- Gilbert, P. (2001). Depression and Stress: A Biopsychosocial Exploration of Evolved Functions and Mechanisms. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 4, 121-135

- Goldman, N., Gleib, D. A., Lin, Y. H., Weinstein, M. (2010). The serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR): Allelic variation and links with depressive symptoms. *Depression and Anxiety*, 27(3), 260–269.
- Gonda, X., Juhasz, G., Laszik, A., Rihmer, Z., and Bagdy, G. (2005). Subthreshold depression is linked to the functional polymorphism of the 5HT transporter gene. *Journal of Affective Disorders* 87, 291-297
- Goodman, S. H., Gotlib, I. H. (1999). Risk for psychopathology in the children of depressed mothers: a developmental model for understanding mechanisms of transmission. *Psychological Review*, 106(3), 458–490.
- Guhathakurta, S., Ghosh, S., Sinha, S., Chatterjee, A., Ahmed, S., Chowdhury, S. R., Gangopadhyay, P. K., Ghosh, S., Singh, M., Usha, R. (2006). Serotonin transporter promoter variants: Analysis in Indian autistic and control population. *Brain Research* 1092, 28-35
- Haberstick, B. C., Smolen, A., Williams, R. B., Bishop, G. D., Foshee, V. A., Thornberry, T. P., Conger, R., Siegler, I. C., Zhang, X., Boardman, J. D., Frjzngier, Z., Stallings, M. C., Donnellan, M. B., Halpern, C. T., Harris, K. M. (2015). Population frequencies of the triallelic 5HTTLPR in six ethnically diverse samples from North America, Southeast Asia, and Africa. *Behavior Genetics*, 45(2), 255–261.
- Hammen, C., Brennan, P. A., Keenan-Miller, D., Hazel, N. A., Najman, J. M. (2010). Chronic and acute stress, gender, and serotonin transporter gene-environment interactions predicting depression symptoms in youth. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 51, 180-187.
- Harmer, C. J., Goodwin, G. M., Cowen, P. J. (2009). Why do antidepressants take so long to work? A cognitive neuropsychological model of antidepressant drug action. *British Journal of Psychiatry*, 195(2), 102–108.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Seemann, M., Bengel, D., Balling, U., Riederer, P., Lesch, K. P. (1995). Functional promoter and polyadenylation site mapping of the human serotonin (5-HT) transporter gene. *Journal of Neural Transmission*, 102(3).
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K. P. (1996) Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *Journal of Neurochemistry* 66(6): 2621-2624.
- Hoeksma, S. (2001). Gender differences in Depression. *Current Directions in Psychological Science*, 10(5), 173-176.

- Hu, X., Oroszi, G., Chun, J., Smith, T. L., Goldman, D., Schuckit, M. A. (2005). An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29(1), 8–16.
- Hu, X. Z., Lipsky, R. H., Zhu, G., Akhtar, L. A., Taubman, J., Greenberg, B. D., Xu, K., Arnold, P. D., Richter, M. A., Kennedy, J. L., Murphy, D. L., Goldman, D. (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Human Genetics*, 78(5), 815–826.
- Ingram, R. (2003). Origins of cognitive vulnerability to depression. *Cognitive Therapy and Research* 27, 77-88.
- Jabbi, M., Korf, J., Ormel, J., Kema, I. P., Den Boer, J. A. (2008). Investigating the Molecular basis of Major Depressive Disorder etiology: a Functional Convergent Genetic Approach. *Ann N Y Acad Sci*, 1148, 42–56.
- Jabbi, M., Korf, J., Kema, I. P., Hartman, C., Pompe, G. van der, Minderaa, R. B., Ormel, J., den Boer, J. A. (2007). Convergent genetic modulation of the endocrine stress response involves polymorphic variations of 5-HTT, COMT and MAOA. *Molecular psychiatry* 12, 483-490.
- Jacobs, N., Kenis, G., Peeters, F., Derom, C., Vlietinck, R., Os, J. van (2006). Stress-related negative affectivity and genetically altered serotonin transporter function: evidence of synergism in shaping risk of depression. *Archives of general psychiatry* 63, 989-996.
- Jobling, M., Hollox, E., Hurler, M., Kivisild, T., Tyler-Smith, C. (2014). *Human Evolutionary Genetics* (2nd edition). 670pp., Garland Science, New York/London.
- Katz, L. D. (1999). Dopamine and serotonin: Integrating current affective engagement with longer-term goals. *Behavioral and Brain Sciences* 22, 527-527.
- Kendall-Tackett, K. A., Williams, L. M., Finkelhor, D. (1993). Impact of sexual abuse on children: A review and synthesis of recent empirical studies. *Psychological Bulletin*, 113(1), 164-180.
- Kendler, K. S., Kessler, R. C., Neale, M. C., Heath, A. C., Eaves, L. J. (1993). The prediction of major depression in women: Toward an integrated etiologic model. *American Journal of Psychiatry*, 150(8), 1139-1148.
- Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Swartz, M., Blazer, D. G., Nelson, C. B. (1993). Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *Journal of Affective Disorders*, 29(2-3), 85–96.

- Keyes, C. L. M., Wissing, M., Potgieter, J. P., Temane, M., Kruger, A., van Rooy, S. (2008). Evaluation of the mental health continuum-short form (MHC-SF) in Setswana-speaking South Africans. *Clinical Psychology and Psychotherapy*, 15(3).
- Kunugi, H., Hattori, M., Kato, T., Tatsumi, M., Sakai, T., Sasaki, T., Hirose, T., Nanko, S. (1997). Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. *Molecular Psychiatry* 2, 457-462.
- Lesch, K. P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B. L., Murphy, D. L., Riederer, P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 95(2), 157–162.
- Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamim, J., Müller, C. R., Harmer, D. H., Murphy, D. L. (1996). Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science*, 274(5292), 1527–1531.
- Loewenstein, G. F., Weber, E. U., Hsee, C. K., Welch, N. (2001). Risk as feelings. *Psychological bulletin* 127, 267-286.
- Lovibond, P. F., Lovibond, S. H. (1995). The structure of negative emotional states: Comparison of the depression anxiety stress scales (DASS) with the Beck Depression and Anxiety Inventories. *Behaviour Research and Therapy*, 33(3).
- Michaelovsky, E., Frisch, A., Rockah, R., Peleg, L., Magal, N., Shohat, M., Weizman, R. (1999). A novel allele in the promoter region of the human serotonin transporter gene. *Mol Psychiatry* 4, 97-99.
- Nakamura, M., Ueno, S., Sano, A., Tanabe, H. (2000). The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Molecular Psychiatry*, 5(1), 32–38.
- Nesse, R. M. (1991). What good is feeling bad? The evolutionary benefits of psychic pain. *Mood and Anxiety Disorders*, 6–11.
- Nesse, R. M. (2000). Is Depression an Adaptation? *The Archives of General Psychiatry*, 57, 14–20.
- Nesse, R. M. (2006). Darwinian medicine and mental disorders. *International Congress Series* 1269, 83-94.
- Nesse, R. M. (2011). Why has natural selection left us so vulnerable to anxiety and mood disorders? *Canadian Journal of Psychiatry*, 56(12), 705–706.

- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1), 13–25.
- Nettle, D. (2004). Evolutionary origins of depression: A review and reformulation. *Journal of Affective Disorders* 81, 91-102.
- Noskova, T., Pivac, N., Nedic, G., Kazantseva, A., Gaysina, D., Faskhutdinova, G., Gareeva, A., Khalilova, Z., Khusnutdinova, E., Kovacic, D. D., Kovacic, Z., Jokic, M., Seler, D. M. (2008). Ethnic differences in the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in several European populations. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(7), 1735–1739.
- Oberlander, T. F., Weinberg, J., Papsdorf, M., Grunau, R., Misri, S., Devlin, A. M. (2008). Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*, 3(2), 97–106.
- Ogilvie, A. D., Battersby, S., Fink, G., Harmar, A. J., Goodwin, G. M., Bubb, V. J., Dale Smith, C. A. (1996). Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *The Lancet*, 347(9003), 731–733.
- Pais-ribeiro, J. L., Honrado, A., Leal, I. (2004). CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA ADAPTAÇÃO PORTUGUESA DAS ESCALAS DE ANSIEDADE , DEPRESSÃO E STRESS (EADS) DE 21 ITENS DE LOVIBOND E LOVIBOND. *Psicologia, Saúde & Doenças* 5, 229-239.
- Price, J. (1998). The adaptive function of mood change. *The British Journal of Medical Psychology* 71(4), 465-477.
- Price, J. L., Drevets, W. C. (2012). Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. *Trends in Cognitive Sciences*, 16(1), 61–71.
- Price, J., Sloman, L., Gardner, R., Gilbert, P., and Rohde, P. (1994). The social competition hypothesis of depression. *British Journal of Psychiatry* 164, 309-315.
- Ramamoorthy, S., Bauman, A. L., Moore, K. R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A. S., Blakely, R. D. (1993). Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(6), 2542–2546.
- Rot, M. A. H., Mathew, S. J., Charney, D. S. (2009). Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ* 180, 305-313

- Ruhé, H. G., Mason, N. S., Schene, A., H. (2007). Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Molecular Psychiatry*, 12(4), 331–359.
- Stein, M. B., Schork, N. J., Gelernter, J. (2008). Gene-by-environment (serotonin transporter and childhood maltreatment) interaction for anxiety sensitivity, an intermediate phenotype for anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(2), 312–319.
- Stoneking, M., Delfin, F. (2010). The human genetic history of East Asia: weaving a complex tapestry. *Curr. Biol.* 20(4).
- Sullivan, P. F., Neale, M. C., Kendler, K. S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*, 157(10).
- Watson, P. J., Andrews, P. W. (2002). Toward a revised evolutionary adaptationist analysis of depression: The social navigation hypothesis. *Journal of Affective Disorders* 72, 1-14.
- Weissman, M. M., Bland, R. C., Canino, G. J., Faravelli, C., Greenwald, S., Hwu, H.-G., Joyce, P. R., Karam, E. G., Lee, C.-K., Lellouch, J., Lépine, J.-P., Newman, S. C., Rubio-Stipec, M., Wells, E., Wickramaratne, P. J., Wittchen, H.-U., Yeh, E.-K. (1996). Cross National Epidemiology of Major Depression and Bipolar Disorder. *JAMA*, 276(4), 293–299.
- Wendland, J. R., Martin, B. J., Kruse, M. R., Lesch, K.-P., Murphy, D. L. (2006). Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Molecular Psychiatry*, 11(3), 224–226.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15, 323-354.

Apêndice 1

CERQ

(Garnefski, N., Kraaij, V. & Spinhoven, P., 2001; Tradução e Adaptação de Cherpe, S., Matos, A. P., & Serra, A. R., 2009)

Como é que lida com os acontecimentos?

Todas as pessoas são confrontadas com acontecimentos negativos ou desagradáveis, de vez em quando, aos quais respondem à sua própria maneira. Nas questões que se seguem, é-lhe pedido que indique **o que é que geralmente pensa quando é confrontado com estes acontecimentos negativos ou desagradáveis**.

Por favor, leia as questões abaixo e indique com que frequência tem os seguintes pensamentos, assinalando um número de 1 a 5, de acordo com a resposta que melhor se aplica a si.

Não existem respostas certas ou erradas.

	(quase) Nunca	Às vezes	Regularmente	Muitas vezes	(quase) Sempre
Sinto que sou o culpado por isto.	<input type="checkbox"/>				
Penso que tenho de aceitar que isto aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso muitas vezes no que sinto acerca do que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso em coisas mais agradáveis do que aquela que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso no que posso fazer de melhor.	<input type="checkbox"/>				
Penso que posso aprender alguma coisa com a situação.	<input type="checkbox"/>				
Penso que tudo poderia ter sido muito pior.	<input type="checkbox"/>				
Penso muitas vezes que o que me aconteceu foi muito pior do que aquilo que aconteceu aos outros.	<input type="checkbox"/>				
Sinto que os outros são culpados por isto.	<input type="checkbox"/>				
Sinto que sou o responsável pelo que aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso que tenho de aceitar a situação.	<input type="checkbox"/>				
Estou preocupado com o que penso e sinto acerca o que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso em coisas agradáveis que nada têm a ver com isto.	<input type="checkbox"/>				
Penso na forma como posso lidar melhor com a situação.	<input type="checkbox"/>				

Penso que posso tornar-me numa pessoa mais forte como resultado das coisas que aconteceram.	<input type="checkbox"/>				
Penso que as outras pessoas passam por experiências muito piores.	<input type="checkbox"/>				
Continuo a pensar no quão terrível foi aquilo que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso que os outros são responsáveis por aquilo que aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso nos erros que fiz nesta situação.	<input type="checkbox"/>				
Penso que não consigo mudar nada acerca disto.	<input type="checkbox"/>				
Quero entender porque é que me sinto da maneira como me sinto em relação ao que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso em alguma coisa agradável em vez de pensar naquilo que aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso em como mudar a situação.	<input type="checkbox"/>				
Penso que esta situação também tem algo de positivo.	<input type="checkbox"/>				
Penso que tenho de aceitar que isto aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso muitas vezes no que sinto acerca do que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso em coisas mais agradáveis do que aquela que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso no que posso fazer de melhor.	<input type="checkbox"/>				
Penso que posso aprender alguma coisa com a situação.	<input type="checkbox"/>				
Penso que tudo poderia ter sido muito pior.	<input type="checkbox"/>				
Penso muitas vezes que o que me aconteceu foi muito pior do que aquilo que aconteceu aos outros.	<input type="checkbox"/>				
Sinto que os outros são culpados por isto.	<input type="checkbox"/>				
Sinto que sou o responsável pelo que aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso que tenho de aceitar a situação.	<input type="checkbox"/>				
Estou preocupado com o que penso e sinto acerca o que me aconteceu.	<input type="checkbox"/>				
Penso em coisas agradáveis que nada têm a ver com isto.	<input type="checkbox"/>				

CTQ

(Bernstein, D. P.; Fink, L.; Handelsman, L.; Foote, J.; Lovejoy, M.; Wenzel, K.; Sapatero, E.; Ruggiero, J. 1994. Tradução e Adaptação de Cherpe, S.; Matos, A. P.; Pereira A. R. 2010).

As perguntas que vai encontrar a seguir são sobre algumas das suas experiências **enquanto crescia, como criança e como adolescente**. Embora estas questões sejam de natureza pessoal, por favor, procure responder o mais honestamente possível.

Para cada questão, selecione a resposta que melhor descreve como se sente/sentia.

	Nunca verdadeiro	Raramente verdadeiro	Algumas vezes verdadeiro	Frequentemente verdadeiro	Muito frequentemente verdadeiro
Eu não tinha o suficiente para comer.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eu sabia que havia alguém para cuidar de mim e para me proteger.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoas da minha família chamavam-me coisas como "estúpido(a)", "preguiçoso(a)", ou "feio(a)".	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Os meus pais estavam demasiado bêbedos ou drogados para tomar conta da família.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Havia alguém da minha família que me ajudava a sentir que eu era importante ou especial.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eu tinha de usar roupas sujas.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eu sentia-me amado(a).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eu pensava que os meus pais desejavam que eu nunca tivesse nascido.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alguém da minha família me batia tão violentamente que eu tive de ir a um médico ou ao hospital.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Não havia nada que eu quisesse mudar na minha família.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoas da minha família batiam-me tão violentamente que eu ficava com nódoas negras ou marcas.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fui castigado(a) com um cinto, com uma tábua, com uma corda ou com qualquer outro objeto duro.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
As pessoas da minha família cuidavam umas das outras.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pessoas da minha família diziam-me coisas dolorosas ou insultuosas.	<input type="checkbox"/>				
Eu creio que fui abusado(a) fisicamente.	<input type="checkbox"/>				
Eu tive a infância perfeita.	<input type="checkbox"/>				
Batiam-me ou espancavam-me tão violentamente que isso foi notado por alguém, como por exemplo, um(a) professor(a), um(a) vizinho(a) ou um(a) médico(a).	<input type="checkbox"/>				
Eu sentia que alguém da minha família me odiava.	<input type="checkbox"/>				
As pessoas da minha família sentiam-se próximas umas das outras.	<input type="checkbox"/>				
Alguém tentou tocar-me sexualmente ou tentou que eu o(a) tocasse.	<input type="checkbox"/>				
Alguém ameaçou magoar-me ou dizer mentiras a meu respeito a não ser que fizesse alguma coisa sexual com ele(a).	<input type="checkbox"/>				
Eu tive a melhor família do mundo.	<input type="checkbox"/>				
Alguém tentou obrigar-me a fazer coisas sexuais ou a ver coisas sexuais.	<input type="checkbox"/>				
Alguém me molestou.	<input type="checkbox"/>				
Eu creio que fui emocionalmente abusado(a).	<input type="checkbox"/>				
Havia alguém que me levava ao médico se eu precisasse.	<input type="checkbox"/>				
Eu creio que fui sexualmente abusado(a).	<input type="checkbox"/>				
A minha família era uma fonte de força e de apoio	<input type="checkbox"/>				

EADS-21

Pais-Ribeiro, J. L.; Honrado, A.; Leal, I., 2004.

Por favor, leia cada uma das afirmações abaixo e assinale, 0, 1, 2 ou 3 para indicar quanto cada afirmação se aplicou a si **durante a semana passada**.

Não há respostas certas ou erradas.

Não leve muito tempo a indicar a sua resposta em cada afirmação.

A classificação é a seguinte:

0 - Não se aplicou nada a mim;

1 - Aplicou-se a mim algumas vezes;

2 - Aplicou-se a mim muitas vezes;

3 - Aplicou-se a mim a maior parte das vezes.

	0	1	2	3
Tive dificuldades em me acalmar.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti a minha boca seca.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Não consegui sentir nenhum sentimento positivo.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti dificuldades em respirar.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tive dificuldades em tomar a iniciativa para fazer coisas.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tive tendência a reagir em demasia em determinadas situações.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti tremores (por exemplo, nas mãos).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti que estava a utilizar muita energia nervosa.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preocupe-me com situações em que podia entrar em pânico e fazer figura ridícula.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti que não tinha nada a esperar do futuro.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dei por mim a ficar agitado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti dificuldade em me relaxar.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti-me desanimado e melancólico.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estive intolerante em relação a qualquer coisa que me impedisse de terminar aquilo que estava a fazer.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Senti-me quase a entrar em pânico.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Não fui capaz de ter entusiasmo por nada.

Senti que não tinha muito valor como pessoa.

Senti que, por vezes, estava sensível.

Senti alterações no meu coração sem fazer exercício físico.

Senti-me assustado sem ter tido uma boa razão para isso.

Senti que a vida não tinha sentido.

Formulário Sociodemográfico

Data de preenchimento: ____/____/____

Código: _____

1. Sexo: F ____ M ____
2. Idade: _____
3. Local de residência _____
4. Qual é o seu rendimento académico? (indique a sua média de curso, até ao momento, por favor) _____
5. Já reprovou alguma vez? ____ Se sim, quantas vezes? ____ Em que ano (s) curricular(es)? _____
6. Costuma faltar às aulas? (Assinale o número que mais se adapta à sua situação)
(1) Nunca; (2) Poucas vezes; (3) Algumas vezes; (4) Muitas vezes; (5) Quase sempre
Quando falta, são faltas justificadas? (1) Sim; (2) Não
7. No passado, teve alguma Depressão? (1) Sim; (2) Não; (3) Não sei
8. Atualmente tem uma Depressão? (1) Sim; (2) Não; (3) Não sei
9. No passado, teve consulta(s) com Psiquiatra ou Psicólogo? _____
Se sim, quando? _____
Qual(ais) o(s) motivo(s)? _____

10. Atualmente tem consulta(s) com Psiquiatra ou Psicólogo? _____
Se sim, qual(ais) o(s) motivo(s)? _____

11. Tem, ou teve, alguma doença física? (1) Sim; (2) Não
Se sim, qual (quais)? _____

12. Habilitações do pai: _____
13. Profissão do pai: _____
14. Habilitação da mãe: _____
15. Profissão da mãe: _____
16. Qual o estado civil dos seus pais? _____
17. Algum dos seus pais teve, ou tem, alguma doença física ou mental? (1) Sim (2) Não (3) Não sei
18. Se sim, refira a(s) doença(s) do seu pai e/ou da sua mãe _____

19. O seu pai teve, ou tem, alguma Depressão? (1) Sim (2) Não (3) Não sei
20. A sua mãe teve, ou tem, alguma Depressão? (1) Sim (2) Não (3) Não sei
21. Qual o seu agregado familiar? _____

Para a concretização deste estudo a sua participação é imprescindível!

Declaração de consentimento informado

Os investigadores comprometem-se a garantir total confidencialidade dos dados e a utilizá-los apenas para fins de investigação. A participação, a recusa, ou a interrupção da participação no estudo, não terão quaisquer consequências.

Aceito ser contactado(a) pelos investigadores, se necessário para as avaliações longitudinais, e aceito participar neste estudo, tendo tomado conhecimento dos procedimentos desta investigação e do meu papel enquanto participante. _____

Apêndice 2

Extração de DNA Genômico de células da mucosa bucal - FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit FABGK com proteinase K (Favorgen Biotech Corp., Taiwan)

Passo 1. LISE

- a) Colher as células da mucosa bucal com zaragatoa/escova;
- b) Suspende em 1 ml de água destilada em tudo de 1,5 ml;
- c) Centrifugar a 10.000 rpm durante 3 minutos;
- d) Eliminar o sobrenadante;
- e) Adicionar 200 µl de FABG *Buffer*. Levar ao vortex (5 a 10 segundos)
- f) Incubar à temperatura ambiente, durante 15 a 30 minutos. Inverter tubo de 5 em 5 minutos;

(Adicionar 20 µl de Proteinase K; deixar na estufa a 56° C durante 1 hora)

(Pré-aquecer a *Elution Buffer* a 70° C para utilizar no Passo 4. Eluição)

Passo 2. BINDING

- a) Adicionar 200 µl de Etanol (96 – 100%). Levar ao vortex durante 10 segundos;
- b) Colocar coluna FABG em tubo de 2 ml. Transferir a mistura para a coluna;
- c) Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos. Esvaziar tubo e recolocar coluna;

Passo 3. LAVAGEM

- a) Adicionar à coluna 400 µl de W1 *Buffer*. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto. Esvaziar o tubo e recolocar a coluna;
- b) Adicionar à coluna 600 µl de W2 (*Wash Buffer*). Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto. Esvaziar o tubo e recolocar a coluna;
- c) Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos;

Passo 4. ELUIÇÃO

- a) Transferir a coluna FABG para tubo coletor de 1,5 ml;
- b) Adicionar 50 µl de *Elution Buffer* (pré-aquecida a 70° C) à coluna pra recolha de DNA;
- c) Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto;
- d) Armazenar DNA a 4° C ou a – 10° C.

Apêndice 3

Gel de agarose a 2%

Material

- Molde acrílico para gel de agarose;
 - Balão Erlenmeyer;
 - Agarose;
 - Tampão TBE (0,5x);
 - Brometo de etídio $C_{21}H_{20}BrN_3$.
1. Pesar 1 g de agarose no balão Erlenmeyer;
 2. Juntar 50 ml de tampão TBE (0,5x);
 3. Agitar suavemente e ferver até não haver partículas em suspensão. A solução deve estar completamente límpida;
 4. Na câmara de fluxo, juntar 2 μ l de brometo de etídio à solução no balão Erlenmeyer e deixar arrefecer ligeiramente;
 5. Colocar a solução na placa molde acrílica, lentamente para que não faça bolhas de ar;
 6. Deixar solidificar (colocar no frigorífico).

Tabela x – Composição do tampão TBE 10 x (1L)

	Volume	Concentração
<i>Tris</i>	180 g	890 mM
<i>EDTA-diNa</i>	9,3 g	20 mM
<i>Ácido Bórico</i>	55 g	890 mM
<i>dH₂O</i>	qbp	1 L

Apêndice 4

Gel Horizontal de Poliacrilamida

Material

- Placas de vidro moldes com poços;
- Fita gel transparente;
- Roldana;
- Molas metálicas para unir placas moldes;
- Tubo medidor (14 ml);
- Seringa

Preparação do molde

1. Na placa de vidro molde sem poços, colocar pequena quantidade de água. Colocar fita gel transparente em cima da água para aderir;
2. Com auxílio da roldana, retirar excesso de água e certificar que não existem bolhas de ar entre a fita gel e a placa molde;
3. Unir as placas com molas metálicas em posição vertical;

Stock T10C5

- 23,75 g Acrilamida
- 1,25 g Bisacrilamida

Volume final – 250 cc (tampão gel: 0,375M Tris/HCl, pH 8,8)

Preparação da solução gel

- a) 6 ml de stock T10C5;
- b) 0,71 ml de glicerol (85%);
- c) 3,4 ml de tampão gel;
- d) 20 µl de APS;
- e) 20 µl de TMED.

Agitar ligeiramente a solução e colocar entre as placas molde com auxílio da seringa.

Deixar repousar em posição vertical durante 30 a 40 minutos.

Técnica de coloração de Nitrato de Prata – *Silver Stained* – para leitura de bandas de DNA em gel horizontal de poliacrilamida

1. Colocar gel num recipiente imerso em etanol (10%) durante 10 minutos (no mínimo). Esvaziar o recipiente;
2. Colocar ácido nítrico – HNO_3 (1%) até imergir o gel durante 5 minutos. Esvaziar o recipiente;
3. Lavar o gel com água destilada sem colocar a água diretamente em cima do gel, duas vezes durante 30 segundos;
4. Colocar nitrato de prata – AgNO_3 (0,2%) até imergir o gel durante 20 minutos. Esvaziar o recipiente;
(Pesar previamente 9 g de carbonato de sódio – Na_2CO_3 e dissolver em 300 ml de água destilada com auxílio de um agitador magnético para utilizar o passo 6.);
5. Lavar o gel com água destilada sem colocar a água diretamente em cima do gel, duas vezes durante 30 segundos;
6. Colocar 60 μl de formaldeído – HCOH (0,02%) na solução previamente preparada de Na_2CO_3 (0,28M) e imergir o gel em 100 ml desta solução até que se obtenha uma cor acastanhada. Esvaziar o recipiente;
7. Imergir novamente o gel em 100 ml da mesma solução de Na_2CO_3 até começarem a ser visíveis algumas bandas de DNA mais escuras no gel. Esvaziar o recipiente;
8. Repetir o passo anterior com os 100 ml restantes da solução de Na_2CO_3 até serem visíveis todas as banda de DNA. Esvaziar o recipiente;
9. Colocar ácido acético – CH_3COOH (10%) até imergir o gel durante 2 minutos para fixação.
10. Esvaziar o recipiente e lavar com água destilada sem colocar a água diretamente em cima do gel. Fazer a leitura das banda de DNA, retirar o excesso de água e deixar secar naturalmente o gel.

