



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

DEPRESSÃO PÓS-PARTO: AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE  
CORTISOL E INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *5-HTTLPR* E *5-HTTVNTR*  
NO GENE DO TRANSPORTADOR DE SEROTONINA

JOSI MARIA ZIMMERMANN-PERUZATTO

Dissertação de Mestrado

PORTO ALEGRE, 2011

JOSI MARIA ZIMMERMANN-PERUZATTO

DEPRESSÃO PÓS-PARTO: AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE  
CORTISOL E INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS 5-HTTLPR E 5-HTTVNTR  
NO GENE DO TRANSPORTADOR DE SEROTONINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Giovenardi

Co-Orientadora: : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana de Almeida

PORTO ALEGRE, 2011

*“A glória de uma boa obra reside em  
abrir caminho a coisas melhores e assim  
rapidamente levar a seu próprio eclipse.  
O objetivo da pesquisa é o progresso do  
conhecimento.”*

*Alexandre Fleming*

*Dedico este trabalho aos meus amores:*

*Murillo, Marcelo, mãe e pai.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela vida, paz de espírito e pelos frutos acolhidos.

À orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Giovenardi** e à co-orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana de Almeida** agradeço pela amizade, confiança, atenção, tempo e compreensão dispensados. A vocês obrigada pela excelente orientação! À Márcia agradeço também pelo incentivo, conversas e valiosas sugestões na escrita. À Silvana pelos conhecimentos de Biologia Molecular e de Estatística. Um carinho muito especial as nossas pequeninas **Eduarda e Clarissa**, pelo tempo delas “roubados” durante essa orientação.

Aos **colaboradores de Pelotas** Dr. Ricardo Pinheiro, Dr. Ricardo Silva e Dr. Jean Pierre Ozes obrigada pelo banco de dados e coletada das amostras de sangue e saliva.

À turma maravilhosa do **Laboratório de Biologia Molecular** obrigada por tudo, principalmente pelas amigas que aí conquistei. Em especial as laboratoristas Grasiela Agnes e Magda Brasil pelas condições de trabalho e as colegas: Luciana Lima, Raquel Krüger, Crisciele Fontana, Lisiane Smiderle, Aline Gasparotto e Marília Zdoná por contribuírem em momentos especiais do meu trabalho.

Agradeço à **UFGRS** e a todos os **colaboradores do PPG da Fisiologia** (professores, funcionários, amigos e colegas do programa). Em especial agradeço as funcionárias **Silvia e Alice**.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa.

Aos **familiares** pelo apoio que sempre demonstraram e pelos cuidados com o Murillo. Em especial a querida **Marlene**, ao **mano Charles, Nádia, Eduardo e Laura**.

Aos meus pais **Bertilo e Vânia**, agradeço todo o amor, investimento e educação. A eles agradeço o incentivo na busca do conhecimento.

Aos amigos queridos pela amizade. Em especial à **Márcia Kratz** pelas risadas, cuidados com o Murillo, empréstimos de livros, longas discussões e pela pessoa agradável que és. À **Roberta** pelo apoio, carinho, amizade e pelo presente **Maurício**. À **Tata** que mesmo longe esteve sempre presente. A **Jaque** pela força positiva. Ao **Eduardo Nedel** pelo aprendizado em inglês e ao **Uwe** pelo amigo e profissional inspirador.

Um agradecimento especial ao meu marido **Marcelo** que a cada dia faz com que nosso amor cresça e se solidifique. Obrigada pelo valioso tempo dedicado, pelos detalhes observados, por ser um pai e marido amoroso. Obrigada pelo incentivo, conselhos, sugestões, pelo colo e principalmente pela calma. Tu és o meu porto seguro!

**Ao Murillo agradeço todos os dias por existir.** Por me fazer a pessoa mais completa. Pelo amor diário, pelos sorrisos, pela alegria, pela educação e por ser essa criança extremamente doce e amorosa.

## LISTA DE SIGLAS

- 5-HT:** 5-hidroxitriptamina ou serotonina
- 5-HTTLPR:** polimorfismo de inserção/deleção na região promotora do gene *SLC6A4*
- 5-HTTVNTR:** polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* do gene *SLC6A4*
- 5-HIAA:** metabólito da serotonina
- APA:** Associação Americana de Psiquiatria
- BDI:** Inventário de Depressão de Beck
- Cl<sup>-</sup>:** cloreto
- CORT:** cortisol
- DMS-IV:** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fourth Ed.)
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- DPP:** depressão pós-parto
- EG:** esteróides gonadais
- Kb:** quilobase
- L:** long (longo)
- MAO:** monoaminaoxidase
- mRNA:** ácido ribonucléico mensageiro
- Na<sup>+</sup>:** sódio
- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- PB:** pares de base
- PCR:** reação em cadeia da polimerase
- S:** short (curto)
- SERT:** transportador de serotonina
- SLC6A4:** gene que codifica o transportador de serotonina
- SNC:** sistema nervoso central
- TP:** triptofano
- VNTRs:** número variável de repetições em *tandem*
- XL e XXL:** super longo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Gene <i>SLC6A4</i> que codifica o SERT .....	26
FIGURE 2. Escores de sintomas depressivos de acordo com os diplótipos dos polimorfismos <i>5-HTTLPR</i> e <i>5-HTTVNTR</i> .....	41
FIGURA 3. Foto do gel de agarose dos produtos da PCR do polimorfismo <i>5-HTTLPR</i> .....	65
FIGURA 4. Foto do gel de agarose dos produtos da PCR do polimorfismo <i>5-HTTVNR</i> .....	65



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos <i>5-HTTLPR</i> e <i>5-HTTVNTR</i> de acordo com a classificação do BDI .....	40
TABELA 2. Mediana e intervalo interquartil das concentrações de cortisol salivar nos polimorfismo <i>5-HTTLPR</i> e <i>5-HTTVNTR</i> .....	42
TABELA 3. Mediana das concentrações do cortisol salivar entre as mulheres com (BDI $\geq$ 18) ou sem DPP (BDI < 18) .....	42

## RESUMO

A depressão pós-parto (DPP) é um importante problema de saúde pública podendo provocar uma ruptura do vínculo entre a mãe e o bebê e até estar associada com respostas trágicas, como suicídio materno e infanticídio. A DPP é multifatorial e o seu surgimento pode ser favorecido por componentes hormonais, genéticos e ambientais. O ciclo gravídico-puerperal é considerado um período de risco, pois algumas mulheres possuem uma sensibilidade particular as alterações hormonais. O risco de DPP é aumentado em mulheres que possuem histórico de depressão na família, logo, um componente genético determina maior suscetibilidade. Segundo o DMS-IV, existe uma relação entre a sintomatologia depressiva e as alterações na concentração cerebral de neurotransmissores, com destaque para serotonina. O transportador de serotonina (SERT) controla a intensidade e duração da re-captação da serotonina nas sinapses serotoninérgicas. Diversos trabalhos associam os polimorfismos do SERT com transtornos mentais, como unipolar, bipolar, depressão e esquizofrenia. Nosso objetivo foi analisar as concentrações salivares de cortisol (CORT), as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos *5-HTTVNTR* e *5-HTTLPR* no gene *SLC6A4* entre mulheres que desenvolveram ou não DPP. A amostra foi constituída por 128 mulheres brancas da cidade de Pelotas/RS, triadas em ambulatórios do SUS. A avaliação diagnóstica foi realizada através de entrevista psiquiátrica e diagnóstica usando como instrumento o *Beck Depression Inventory* entre 30 a 45 dias após o nascimento das crianças. A coleta de material biológico (leucócitos e saliva) foi realizada no turno da manhã, respeitando o período de duas horas de jejum. A região promotora do gene contendo o polimorfismo *5-HTTLPR* (inserção/deleção) e a região do segundo íntron contendo o polimorfismo *5-HTTVNTR* (repetições em *tandem*) foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase. A dosagem do CORT foi realizada a partir da saliva por técnica de ELISA utilizando *kit* específico. A mediana e o intervalo interquartil das concentrações salivares do CORT entre os portadores dos diferentes genótipos foram comparados entre os grupos estudados usando o teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A comparação das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados entre as mulheres que apresentarem ou não DPP foram feitas pelo teste do Qui-quadrado com correção de Yates ( $p \leq 0,05$ ). A análise da distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* do SERT permitiu verificar que a população está sob Equilíbrio Hardy-Weinberg. Quando os polimorfismos foram analisados isoladamente, não foi observada associação entre os polimorfismos *5-HTTLPR* ( $p=0,48$ ) e *5-HTTVNTR* ( $p=0,77$ ) e o diagnóstico para DPP. Porém, a análise combinada dos haplótipos dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* demonstraram que mulheres portadoras do diplótipo L-12/L-12 apresentaram escores menores de sintomas depressivos (mediana: 0,5; intervalo inter-quartil: 0,00-4,00,  $p=0,04$ ) quando comparadas com mulheres portadoras de outros diplótipos (mediana: 4,0; intervalo inter-quartil: 1,00-10,00). O polimorfismo *5-HTTVNTR* foi associado com as concentrações salivares de CORT ( $p=0,03$ ), já o polimorfismo *5-HTTLPR* não foi associado ( $p=0,41$ ). Nossos achados são inovadores, visto que até a presente data a associação dos genótipos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* com DPP e concentrações salivares de CORT ainda não haviam sido investigados.

**Palavras-chave:** Transportador de serotonina. *SLC6A4*. *5-HTTLPR*. *5-HTTVNTR*. Cortisol.

## ABSTRACT

The postpartum depression (PPD) is an important public health problem that may cause a rupture of the bond between the mother and the baby and may even be associated with tragic responses such as maternal suicide and infanticide. The DPP is multifactorial and its appearance can be favored by hormonal components, genetic and environmental factors. The pregnancy and childbirth is considered a risk period, because some women have a particular sensitivity to hormonal changes. The rate of DPP is increased in women who have a record of depression in the family, so a genetic component determines higher susceptibility. According to the DSM-IV, there is a relationship between depressive symptoms and brain concentration changes of neurotransmitters, particularly serotonin. The serotonin transporter (SERT) controls the intensity and duration of re-uptake of serotonin in serotonergic synapses. Several studies linking polymorphisms of SERT with mental disorders such as unipolar, bipolar, depression, and schizophrenia. Our objective was to analyze the concentrations of salivary cortisol (CORT), the allele and genotype frequencies of polymorphisms *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* *SLC6A4* gene in women who developed or not DPP. The sample consisted of 128 white women from Pelotas, RS, sorted out from public health clinics. The diagnostic evaluation was conducted through interviews and psychiatric diagnostic instrument as using the Beck Depression Inventory among 30 to 45 days after the birth of children. The collection of biological materials (leukocytes and saliva) was performed in the morning, observing the two-hour period of fasting. The promoter region of the gene containing the *5-HTTLPR* polymorphism (insertion/deletion) and the region containing the second intron polymorphism *5-HTTVNTR* (tandem repeats) were amplified by polymerase chain reaction. The dose of CORT was performed from the saliva by ELISA using the specific kit. The median and interquartile interval of salivary concentrations of CORT among patients of different genotypes were compared between groups using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. The comparison of allele and genotype frequencies of polymorphisms among women who developed or not DPP were made by chi-square test with Yates correction ( $p < 0.05$ ). The analysis of the distribution of genotype frequencies of polymorphisms *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* SERT showed that the population is under Hardy-Weinberg Equilibrium. When the polymorphisms were analyzed alone, no association was observed between the *5-HTTLPR* ( $p=0.48$ ) and *5-HTTVNTR* ( $p=0.77$ ) polymorphisms and the PPD diagnosis. But, the information from these analyses combined with information regarding the haplotypes of the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms demonstrated that women carriers of diplotype L-12/L-12 have a lower depression symptoms score (median: 0.5; interquartile range: 0.00-4.00;  $p=0.04$ ) than women with other diplotypes (median: 4.0; interquartile range: 1.00-10.00). The *5-HTTVNTR* polymorphism was associated with the salivary concentrations of CORT ( $p=0.03$ ), whereas the *5-HTTLPR* polymorphism was not associated ( $p=0.41$ ). Our findings are innovative since the association of *5-HTTLPR* genotypes and *5-HTTVNTR* with DPP and salivary concentrations of CORT had not been investigated before.

**Keywords:** Serotonin transporter. *SLC6A4*. *5-HTTLPR*. *5-HTTVNTR*. Cortisol.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 DEPRESSÃO .....	15
1.2 DEPRESSÃO PÓS-PARTO .....	16
1.3 FATORES BIOLÓGICOS .....	21
1.4 FATORES GENÉTICOS .....	22
1.4.1 A serotonina .....	23
1.4.2 O gene codificador do transportador de serotonina ( <i>SLC6A4</i> ) .....	25
1.4.3 Polimorfismos do <i>SLC6A4</i> e fatores de risco associados aos transtornos do humor .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
2.2.1 Analisar e comparar as frequências dos polimorfismos <i>5-HTTLPR</i> e <i>5-HTTVNTR</i> no gene <i>SLC6A4</i> em mulheres com e sem DPP. ....	31
2.2.2 Analisar e comparar as frequências dos haplótipos dos polimorfismos <i>5-HTTLPR</i> e <i>5-HTTVNTR</i> no gene <i>SLC6A4</i> em mulheres com e sem DPP. ....	31
2.2.3 Investigar a associação das variantes <i>5-HTTLPR</i> e <i>5-HTTVNTR</i> no gene <i>SLC6A4</i> e as dosagens salivares do cortisol. ....	31
2.2.4 Analisar as concentrações salivares do cortisol em mulheres com e sem diagnóstico para DPP. ....	31
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
3.1 AMOSTRA.....	33
3.2 DIAGNÓSTICOS PSIQUIÁTRICO E PSICOLÓGICO DE DPP .....	34
3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
3.3.1 Coleta e dosagem do cortisol salivar .....	35
3.3.2 Análises moleculares .....	36
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	41
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>51</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>

<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>65</b>
<b>10 ARTIGO .....</b>	<b>67</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO

A depressão é uma desordem psiquiátrica na qual o indivíduo apresenta obrigatoriamente estado deprimido ou sintomas depressivos relacionados. O estado deprimido pode ser definido como: sentir-se deprimido a maior parte do tempo ou ter falta de motivação para as tarefas diárias, pelo período maior que duas semanas. Os sintomas depressivos relacionados são: anedônia (interesse diminuído ou perda de prazer para realizar as atividades de rotina), sensação de inutilidade ou culpa excessiva, dificuldade de concentração (habilidade freqüentemente diminuída para pensar e concentrar-se), fadiga ou perda de energia, distúrbios do sono (insônia ou hipersônia praticamente diárias), problemas psicomotores (agitação ou retardo psicomotor), perda ou ganho significativo de peso na ausência de regime alimentar e idéias recorrentes de morte ou suicídio (*DMS - IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Ed*).

Os transtornos depressivos são freqüentes e ocorrem em todas as culturas e níveis socioeconômicos. Estudos apontam que cerca de 20% dos pacientes atendidos em ambulatórios médicos podem ser portadores de sintomas depressivos (Lecrubier, 2001), tais percentagens são semelhantes ao número de casos de hipertensão arterial (Passos *et al.*, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2020 os transtornos depressivos serão a segunda maior causa de comprometimento funcional, perdendo apenas para as doenças coronarianas. Esta projeção, associada à alta prevalência de sintomas depressivos na população associado a outras doenças, reforça a necessidade da familiarização de equipes da saúde com o diagnóstico e tratamento desta problemática de saúde pública (OMS, 2001; Vieira *et al.*, 2007).

Os sintomas da depressão interferem drasticamente na qualidade de vida e estão associados a altos custos sociais, entre eles: perda de dias no trabalho, atendimento médico, tratamentos medicamentosos e suicídio (Stahl, 1998; OMS, 2001).

A maioria dos casos depressivos tem seu início entre os 20 e os 40 anos, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária (Stahl, 1998; Michelon *et al.*, 2008). A depressão ocorre em episódios, estes se não tratados podem se estender por períodos de seis a vinte e quatro meses, seguidos de recuperação ou remissão do quadro clínico, pois o paciente apresenta uma melhora de pelo menos 50% dos sintomas. Estudos realizados nos Estados Unidos apontam que 5% a 11% dos quadros depressivos perduram por toda a vida, resultando em uma doença crônica, impedindo os pacientes de retornar à vida normal (Stahl, 1998).

Após períodos depressivos, os pacientes estão mais vulneráveis ao desencadeamento de episódios subseqüentes, pois a depressão é uma doença recorrente (McIntyre & O'Donovan, 2004). Em pessoas acometidas por apenas um episódio deste transtorno, o risco de uma nova manifestação é de 50%. Em dois episódios, este risco é aumentado, chegando a 70% de probabilidade de recorrência. Em três episódios depressivos, a probabilidade de recorrência ultrapassa 90% (Stahl, 1998).

Dados epidemiológicos de diferentes países têm estabelecido que em adultos, a depressão alcança a prevalência ao longo da vida de 10% a 25% para mulheres e de 5% a 12% para homens (Weissman *et al.*, 1993). Provavelmente, a maior ocorrência de quadros depressivos em mulheres deve-se às alterações hormonais que ocorrem durante os ciclos reprodutivos (ovulação, gestação, puerpério e climatério) e que têm repercussão sobre a ação dos neurotransmissores, podendo responder em parte pelas alterações de humor associadas a esses ciclos (Lafer, 2000). Durante a gestação cerca de 20% das mulheres apresentam sintomas depressivos e em torno de 10% delas desenvolvem um transtorno depressivo (Cohen *et al.*, 2004).

## 1.2 DEPRESSÃO PÓS-PARTO

A depressão pós-parto (DPP) é um transtorno do humor grave de ordem psicológica que pode afetar homens e mulheres após o parto. De acordo com os critérios de diagnósticos psiquiátricos da Associação Americana de Psiquiatria (APA,



2000), a principal característica da DPP é uma forma de depressão que ocorre por pelo menos duas semanas durante a qual uma mulher tem humor depressivo ou perda de interesse/prazer em atividades que antes eram prazerosas. A depressão paterna ainda é um fenômeno pouco estudado (Goodman, 2004), ocorrendo após o nascimento do bebê e têm características similares a depressão materna, tais como mudanças de humor, irritabilidade, desesperança e ansiedade (Condon, 2006). A longo prazo, a manifestação da DPP pode ter sérias implicações negativas para o desenvolvimento da criança (Ramchandani *et al.*, 2005).

Durante o período da gravidez e parto, algumas mulheres são mais propensas ao desenvolvimento de transtornos de humor (O'Hara *et al.*, 1990), pois possuem sensibilidade particular as alterações hormonais, ocorridas em determinadas fases da vida sexual feminina (Steiner *et al.*, 2003). Diferenças biológicas propiciam este aumento de prevalência em mulheres suscetíveis, nas quais estressores desencadeiam a alteração de um estado já vulnerável para a manifestação de um transtorno do humor, em momentos de altas flutuações hormonais como, por exemplo, o período puerperal e a menopausa (Zinga *et al.*, 2005).

O período pós-parto divide-se em pós-parto imediato (1º ao 10º dia após o parto), pós-parto tardio (10º ao 45º dia) e pós-parto remoto (além do 45º dia). No pós-parto imediato predominam os fenômenos catabólicos e involutivos das estruturas hipertrofiadas e hiperplasiadas da gravidez. No período pós-parto tardio surge uma transição, onde as funções começam a ser influenciadas pela lactação e no último período estão envolvidas as manifestações involutivas, como a recuperação da genitália materna (Rezende & Montenegro, 1999).

A APA define que o diagnóstico de DPP requer um episódio depressivo maior iniciando nas primeiras quatro semanas após o parto. Porém, uma meta-análise revelou que cerca de 5% dos casos iniciam posterior ao terceiro mês pós-parto, e sugeriu que a definição de DPP deveria ser expandida para incluir mulheres com início tardio, ao longo do primeiro ano após o parto (Goodman, 2004). Esta definição é a mesma considerada pela *Marcé Society*, importante organização internacional que se dedica ao estudo de transtornos mentais do período pós-parto (*The Marcé Society*, 2003) e, dessa forma, atualmente os pesquisadores consideram a DPP iniciando dentro dos doze primeiros meses após o nascimento da criança.

Zinga *et al.* (2005) apontam que o ciclo gravídico-puerperal é considerado

um período de risco para o psiquismo devido à intensidade da experiência vivida. Segundo Steiner *et al.* (2003), após o parto, a vulnerabilidade é maior e podem ocorrer períodos de baixa emocional, classificados em:

1. Tristeza materna ou *baby blues*: condição comum a qual pode acometer entre 50% a 75% das novas mães (O'Hara *et al.*, 1984). Segundo Beck *et al.* (1992) os sintomas tendem a aumentar do segundo até o sexto dia pós-parto, regredindo posteriormente. Dentre os sintomas destacam-se a irritabilidade, ansiedade generalizada, labilidade do humor e alterações de sono e apetite. Este transtorno não requer tratamento farmacológico, o apoio a mãe é fundamental e a recuperação ocorre em poucos dias (Pitt, 1973). Esta condição não parece estar relacionada com história psiquiátrica, estressores psicossociais, contexto cultural, ou lactação (Hapgood *et al.*, 1988), mas, podem influenciar o surgimento de DPP (Miller, 2002). Das mulheres que apresentam *baby blues* 20% parecem estar mais predispostas a desenvolver um episódio de depressão maior no primeiro ano de pós-parto (O'Hara *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1992).

2. DPP: condição que ocorre algumas semanas após o parto, com prevalência entre 10-20% em mulheres e acarreta conseqüências substanciais para as mães, crianças e familiares (Moraes *et al.*, 2006). Esse quadro patológico altera a dinâmica familiar e a mãe torna-se incapaz de reconhecer e responder às exigências do seu filho, levando a um prejuízo na relação mãe-bebê (Beck *et al.*, 1996). Para as mães, este transtorno pode predispor futuros episódios depressivos e para a criança, pode haver alterações cognitivas, comportamentais, emocionais ou interpessoais mesmo tardias (Robinson & Drotar, 2001).

3. Psicose puerperal: condição incomum. O quadro desenvolve-se dentro das quatro primeiras semanas após o parto e manifesta-se em 0,1 a 0,2% das parturientes. Em virtude da severidade das características psicóticas há um grande risco para a mãe e seu bebê, requerendo hospitalização para o tratamento (Nonacs & Cohen 1998). Os sintomas que geralmente acompanham esse quadro incluem elação do humor ou depressão, comportamento desorganizado, humor lábil, delírios e alucinações (Brockington *et al.*, 1981). As mães acometidas por psicose puerperal têm elevado risco de negligenciar seus filhos, ou mesmo de obedecer às alucinações e delírios deste transtorno (Attia *et al.*, 1999).

A DPP é um importante problema de saúde pública que contribui para a

elevação de serviços de saúde, elevando os custos econômicos e sociais ligados aos transtornos depressivos (Simon, 2003). De todas as complicações psiquiátricas que ocorrem após o parto, a DPP é mais comum (O'Hara & Swain, 1996; Ramchandani *et al.*, 2005). Em uma meta-análise avaliando-se a literatura referente à persistência dos sintomas ao longo do tempo, Goodman (2004) considera que, para algumas mulheres, a DPP pode permanecer além do primeiro ano pós-parto, tornando-se crônica.

O diagnóstico da DPP é feito com base em sintomas de Depressão Maior que se iniciam nas primeiras quatro semanas após o parto (APA, 1994). Não existe uma classificação distinta deste transtorno, devendo ser diagnosticado como parte de Transtornos Afetivos ou de Humor nos sistemas do DSM-IV e CID-10 (Classificação Internacional de Doenças). O DSM-IV solicita que seja especificado “com início no pós-parto” para diferenciar quadros depressivos e psicóticos que ocorrem dentro das primeiras quatro semanas após o parto. Na CID-10, o episódio deve ser diagnosticado dentro de uma categoria principal, especificando a sua associação com o período puerperal (World Health Organization, 1993).

A escala utilizada, os diferentes pontos de corte utilizados, o período de avaliação de DPP e a escolha da amostra populacional podem apresentar diferentes taxas de prevalência. Foram encontradas no primeiro semestre pós-parto, taxas entre 9,1%-38,2% de prevalência de DPP, e uma variação 8,1%-18% no segundo semestre (Goodman, 2004). Numa meta-análise, incluindo 59 estudos e considerando uma população de mais de 12.000 indivíduos com sintomas que ocorriam depois da segunda semana pós-parto O'Hara & Swain (1996) encontraram uma taxa de DPP de 13%. Em mães adolescentes, com idade entre 14 e 18 anos, a prevalência de DPP é bem maior, aproximadamente 26% (Troutman & Cutrona, 1990). No Brasil são relatadas taxas de 12% (Da-Silva *et al.*, 1998) a 15,9% (Faisal-Cury *et al.*, 2004) da prevalência de puérperas com sintomatologia depressiva.

A sintomatologia da DPP é semelhante aos de uma depressão não relacionada com o puerpério, excetuando-se os aspectos relacionados com o parto ou o bebê (Wisner *et al.*, 2002). A correta distinção entre sintomas associados a uma depressão daqueles sintomas que ocorrem naturalmente no período pós-parto é um desafio, mas conhecer os fatores de risco e os sintomas podem auxiliar detectar precocemente a DPP nas mulheres, estimulando a procura pelo tratamento (Correia, 2006). Os sintomas de DPP incluem medo, labilidade emocional, sentimentos de

culpa, perda de apetite, alterações de sono, ou sensação de incapacidade de lidar satisfatoriamente com o bebê, dificuldades em memória e concentração, fadiga e irritabilidade. Algumas mães podem se preocupar excessivamente com a saúde dos seus bebês, se perceberem como más, inadequadas ou mães pouco amorosas (Robinson *et al.*, 2001). Em algumas mulheres, o *blues* materno pode permanecer e posteriormente se tornar mais grave. Para outras mulheres, os sintomas iniciais podem diminuir até relativo bem-estar com surgimento posterior de sintomas depressivos.

Beck (1995) correlacionou dificuldades na interação mãe-bebê e o menor comportamento afetivo demonstrado por mulheres com DPP, além da ausência nas respostas às necessidades infantis se comparadas com mães sem sintomas depressivos. A depressão na maternidade pode acarretar consequências ao longo da vida de uma mulher e sua família, normalmente se observa uma ruptura do vínculo entre a mãe e o bebê, tais como: na atenção, comunicação visual e verbal, assim como poucas interações de toque e sorriso (Righetti-Veltema *et al.*, 2002; Horowitz & Goodman 2005). As mães deprimidas tendem a perceber seus filhos de uma forma mais negativa e considerar mais difíceis os cuidados necessários com o bebê (Newport *et al.*, 2002), além de terem maior chance de interromper precocemente a amamentação (Henderson *et al.*, 2003). A DPP pode ainda estar associada com respostas trágicas, como suicídio materno e infanticídio (Wisner *et al.*, 2006).

A DPP prejudica também o desempenho cognitivo, emocional, e social da criança. Trabalhos apontam que os filhos de mulheres com DPP podem apresentar altos índices de insegurança vincular, atrasos no desenvolvimento cognitivo e emocional e mais disforia (Cummings & Davies, 1999). Problemáticas relacionadas ao sono, alimentação, alterações na motricidade, forte irritabilidade em bebês durante o período neonatal, dificuldades na comunicação e linguagem reduzida parecem estar presentes com maior frequência em filhos de mães com DPP (Righetti-Veltema *et al.*, 2002). Bem como, alterações na aquisição de peso e maior número de episódios de diarreia (Rahman *et al.*, 2004).

A etiologia da DPP é multifatorial podendo ser favorecida por componentes hormonais, genéticos e ambientais. Fatores de risco foram identificados, incluindo estímulos psico-sociais, biológicos e eventos estressores, tais como: conflitos conjugais, idade jovem, suporte social inadequado, histórico de depressão ou

ansiedade durante a gravidez e história familiar prévia de depressão ou transtorno disfórico pré-menstrual (Wisner *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2004).

### 1.3 FATORES BIOLÓGICOS

A etiologia da DPP tem sido associada a hormônios, neuroreguladores e neurotransmissores, incluindo estrógenos gonadais (EG), progesterona, cortisol (CORT), prolactina, norepinefrina, cálcio e adenosina monofosfato cíclico (Hopkins *et al.*, 1987). Wisner *et al.* (2002) propuseram que o rápido declínio dos hormônios reprodutivos poderia ser a causa para a patologia no período pós-parto. Esses investigadores postularam que uma modificação abrupta dos níveis hormonais gonadais ou do CORT, ou ainda a influência de tal modificação na atividade dos neurotransmissores, seria a base para o surgimento da DPP.

Bloch *et al.* (2000, 2003) detectaram que mulheres com DPP são mais sensíveis às variações de EG. Estes aumentam a síntese, secreção e/ou recaptação de serotonina (*5-hidroxitriptamina ou 5-HT*) nos núcleos da rafe (Bodo & Rissman, 2006). Os baixos níveis dos EG, que são típicos do puerpério, podem diminuir a atividade serotoninérgica central e proporcionar uma vulnerabilidade maior ao desenvolvimento de sintomas de humor em mulheres suscetíveis (Bloch *et al.*, 2003).

As flutuações dos EG estimulam a produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH). O aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) na depressão maior (Schmider *et al.*, 1995; Holsboer & Barden, 1996; Gold & Chrousos, 2002; Watson *et al.*, 2004) é um importante achado em psiquiatria, pois se observa um percentual significativo de pacientes demonstrando o aumento da concentração de CORT no plasma, urina e fluido cerebrospinal (Holsboer & Barden, 1996). Yim *et al.* (2009) sugerem que o hormônio CRH placentário é uma possível ferramenta de diagnóstico para identificar mulheres com risco para o desenvolvimento de sintomas de DPP.

A relação entre hipercortisolemia e risco para a depressão não estão claros, pois não são todos os pacientes com depressão maior que apresentam essa

disfunção (Holsboer & Barden, 1996). Goodyer *et al.* (2000) estudaram uma amostra de adolescentes de alto risco e concluíram que a ocorrência o pico da concentração do CORT matinal, em vários dias de coleta, podem prever o início dos transtornos depressivos nos 12 meses subseqüentes. Outros estudos (Holsboer *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2007) sugerem que alguns subtipos de depressão maior, como a depressão maior psicótica, estão associados com altos índices de hiperatividade do eixo HPA, porém alguns pacientes deprimidos não exibem nenhum distúrbio nesse eixo.

#### 1.4 FATORES GENÉTICOS

As desordens psiquiátricas são doenças de etiologia complexa, sendo crucial considerar que múltiplas causas contribuem para o surgimento de determinado transtorno. Um histórico familiar positivo para depressão tem sido relatado como fator que aumenta a probabilidade para o desenvolvimento de DPP (O'Hara *et al.*, 1984; O'Hara *et al.*, 1991). Treolar *et al.* (1999) em um estudo com mulheres australianas destaca a importância de diferenças genéticas na suscetibilidade do desenvolvimento de DPP.

Payne *et al.*, 2008 sugerem que pode haver uma base genética para o traço de sintomas depressivos pós-parto e puerpério em mulheres com transtorno bipolar. Dessa forma, um componente genético determina maior suscetibilidade ao desencadeamento da depressão após o parto, porém mesmo que o indivíduo apresente fatores genéticos, é provável que fatores biológicos ou psicossociais necessitem interagir para ocasionar a doença. Estudos têm demonstrado ainda que história pessoal de depressão também parece aumentar o risco de DPP (Gotlib *et al.*, 1991; Graff *et al.*, 1991; O'Hara *et al.*, 1991).

Recentemente, Forty *et al.* (2006) detectaram um efeito importante da história familiar em mulheres que desenvolveram os primeiros sintomas de depressão em até quatro semanas após o nascimento. Neste estudo 42% das mulheres, que possuíam história de episódios de depressão após o parto na família, desenvolveram DPP, enquanto que apenas 15% das mulheres, sem histórico

familiar, desenvolveram a doença. Os dados deste estudo indicam que deve existir um componente genético que determina maior suscetibilidade ao desencadeamento da depressão após o nascimento dos filhos.

#### 1.4.1 A serotonina

Segundo o DMS-IV, existe uma relação entre a sintomatologia depressiva e as alterações nas concentrações cerebrais de neurotransmissores, com destaque para *5-HT*, noradrenalina e dopamina, bem como uma complexa interação entre esses neurotransmissores.

A *5-HT* é uma amina, encontrada principalmente nas células enterocromafins intestinais, em plaquetas humanas e no sistema nervoso central (SNC). A adequada produção do neurotransmissor *5-HT* exige o aminoácido triptofano (TP), o qual pertence ao grupo dos aminoácidos essenciais. Após absorvido, o TP poderá permanecer na periferia ou pode ser levado para SNC onde será convertido em *5-HT* (Oldendorf & Szabo, 1976). Dentro dos corpos dos neurônios serotoninérgicos, principalmente naqueles localizados no núcleo da rafe, o TP é transformado em *5-HT* (Gallagher & Aghajantan, 1976). O processo da síntese de *5-HT* envolve uma enzima limitante, a triptofano hidroxilase (TPH). Nos sítios do SNC, onde a *5-HT* é produzida, esta enzima encontra-se somente 50% saturada, onde converte o TP em *5-hidroxitriptofano* (Young & Galthier, 1981). Esse composto intermediário é encontrado em pequena quantidade, pois sua conversão a *5-HT* é rápida. A enzima responsável por essa eficiente transformação, a descarboxilase dos aminoácidos aromáticos, é amplamente distribuída e age sobre um grande espectro de substratos, tendo reservas capazes de responder a cargas de *5-hidroxitriptofano*, muitas vezes superiores ao normal (Kapczinski *et al.*, 1998).

A *5-HT* produzida é armazenada em vesículas pré-sinápticas localizadas nos terminais axônicos. Estudos em ratos demonstraram que a atividade de liberação das vesículas obedece a um padrão rítmico lento (Gallagher & Aghajantan, 1976) e que a liberação é dependente da atividade neuronal. Após ser liberada na fenda sináptica para desempenhar sua ação como neurotransmissor, a *5-HT* pode

ser re-captada para o terminal axônico pelos receptores pré-sinápticos ou, então, ser degradada na sinapse (Kapczinski *et al.*, 1998).

Os receptores de *5-HT* ligam-se e desencadeiam mudanças intracelulares que influenciam o comportamento das células. Estes receptores são proteínas de superfície celular que diferem em sua farmacologia, biologia molecular e modo de ação. A multiplicidade das respostas funcionais em nível metabólico e fisiopatológico da *5-HT* é mediada por sete tipos de receptores (*5-HT1-7*) distribuídos por vários tecidos e envolvidos com diversas ações (Wouters *et al.*, 2007).

A *5-HT* é lançada das vesículas terminais dos neurônios serotoninérgicos na fenda sináptica, onde ela ativa receptores de *5-HT* nos dendritos nos neurônios adjacentes. A chave reguladora da neurotransmissão serotoninérgica (Owens & Nemeroff, 1994; Heils *et al.*, 1996) é a proteína específica transportadora de *5-HT* (SERT) localizada na membrana pré-sináptica dos neurônios serotoninérgicos, onde controla a intensidade e tempo de duração da sinalização serotoninérgica, fundamentalmente através de re-captação do neurotransmissor na sinapse (Torres *et al.*, 2003).

O SERT é membro da família dos transportadores de membrana dependentes de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). Ocorre o transporte ativo simultaneamente de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e *5-HT* da fenda sináptica, imediatamente após a sua liberação, retornando-a para o terminal pré-sináptico onde é metabolizada pela monoaminaoxidase (MAO) que transforma a *5-HT* em um metabólito inativo (Murphy *et al.*, 2004). A MAO é enzima que inicia o processo de degradação da *5-HT* a 5-hidroxi-indol-acético (*5-HIAA*), principal metabólito da *5-HTT* no corpo humano. O metabolismo de *5-HT* envolve uma rota de dois passos, a MAO fornece o primeiro metabólito o 5-hidroxiindol acetaldéido, a enzima aldeído desidrogenase, converte-o em *5-HIAA*. O *5-HIAA* é facilmente medido e considerado um metabólito marcador da função serotoninérgica, seus níveis estarão elevados quando houver um aumento na produção de *5-HT*. Logo, a ação da *5-HT* depende da expressão e atividade de transportadores, receptores e enzimas responsáveis por sua metabolização (Forty *et al.*, 2006).



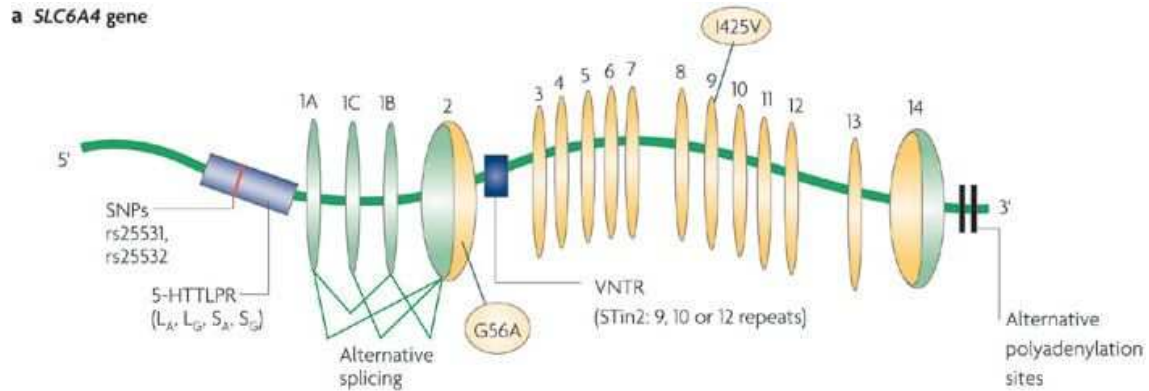
#### 1.4.2 O gene codificador do transportador de serotonina (*SLC6A4*)

Em humanos, o gene *SLC6A4*, 37,8 kb, está localizado no cromossomo 17q11.2., codifica uma proteína de 630 aminoácidos, o SERT (Ramamoorthy *et al.*,1993; Lesch *et al.*,1994). O gene *SLC6A4* possui sua expressão modulada por uma região polimórfica denominada *Serotonin transporter-linked polymorphism region (5-HTTLPR)* e, também, por dois polimorfismos de seqüência única (SNPs) (*rs25531* e *rs25532*) localizados a 5' do sítio de início da transcrição do gene (Lesch *et al.*,1994), além de um polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* (VNTR) no segundo íntron, denominado *5-HTTVNTR* ou *STin2 VNTR* (Lesch *et al.*, 1999).

O polimorfismo *5HTTLPR* de inserção/deleção consiste em repetições de 20 a 23 pb de uma seqüência de DNA na região promotora do gene SERT. Os alelos mais comuns do polimorfismo são compostos de catorze repetições desta unidade, o qual é denominado alelo "curto" ou "S", e o de dezesseis repetições deste nucleotídeo, o qual é denominado alelo longo ou "L". Alelos com até vinte repetições desta unidade já foram descritas ("super longo", XL e XXL), porém estes alelos são raros e ocorrem ocasionalmente (Heils *et al.*, 1995; Lesch & Moessner, 1998).

O polimorfismo *5-HTTVNTR* é caracterizado por conter uma seqüência de 16 ou 17pb em repetições em *tandem*, resultando em três variantes alélicas: 9, 10 e 12 repetições (Collier *et al.*, 1996; Hranilovic *et al.*, 2004).

A Figura 1a esboça a estrutura do gene *SLC6A4* e a ocorrência dos polimorfismos anteriormente citados nesse gene.



**Figura 1.** a) Estrutura do gene *SLC6A4*. (Traduzido e modificado do artigo: Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. Dennis L. Murphy & Klaus-Peter Lesch. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 85-96 (February 2008) doi:10.1038/nrn2284).

Estudos *in vitro* demonstraram que as células com genótipo L/L produzem mais mRNA (RNA mensageiro) do SERT que as células com os genótipos S/S ou L/S (Heils *et al.*, 1996). Lesch *et al.* (1996) observou que o alelo \*S aparenta ser funcionalmente dominante sobre o alelo \*L, assim, células heterozigotos comportam-se como células homozigotas para o alelo \*S. Dessa forma, homozigotos L/L possuem uma transcrição mais eficiente da região promotora do que os portadores da variante \*S, levando a uma maior expressão e captação celular de *5-HT* no neurônio serotoninérgico pré-sináptico. Esta maior captação celular resulta em uma rápida remoção e, conseqüentemente, redução na neurotransmissão da *5-HT*. Aparentemente o alelo \*S está associado com uma redução da eficiência de transcrição do SERT (Heils *et al.*, 1996; Lesch *et al.*, 1996). Gutiérrez *et al.* (1998) hipotetizam que o polimorfismo *5-HTTVNTR* pode afetar a regulação da expressão do SERT ao nível transcricional.

Analisando diferentes grupos étnicos, observa-se uma variabilidade na distribuição da freqüência dos alelos do polimorfismo *5-HTTLPR*. Gelernter *et al.* (1999) encontraram uma freqüência do alelo \*L em torno de 70% em populações africanas e afro-americanas, enquanto que em populações européias a freqüência deste alelo foi de 50%. Lerman *et al.* (1998) em um trabalho envolvendo 424 caucasianos e 74 afro-americanos, observaram uma distribuição dos genótipos respectivamente de: 52,6% e 37,8% de L/S; 30,7% e 50,0% de L/L; 16,7% e 12,2% de S/S. Thompson *et al.* (2000) numa amostra de 152 controles descendentes de europeus, encontrou uma freqüência de 61% do alelo \*L e de 39% do alelo \*S, a

freqüência dos genótipos foi de 44% para o genótipo L/S, 41% para o L/L e 15% para o S/S. Em uma amostra da população brasileira a distribuição dos genótipos do polimorfismo *5-HTTLPR*, em pacientes saudáveis, foi de: L/S 43%, L/L 39% e S/S 16%, e a freqüência alélica observada foi 62% \*L e 38% \*S (Oliveira *et al.*, 1998). Victória *et al.* (2005), em uma outra amostra da população brasileira, encontrou a seguinte distribuição: L/S 42,8%, L/L 37,2% e S/S 20,0%, o alelo \*L foi encontrado em 58% dos cromossomos analisados.

### **1.4.3 Polimorfismos do *SLC6A4* e fatores de risco associados aos transtornos do humor**

Trabalhos prévios sugerem que os polimorfismos da região promotora do *SLC6A4* possam estar associados à agressividade, alterações do humor e depressão (Lesch *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 2000; Herman *et al.*, 2003; Jernej *et al.*, 2004). Kohen *et al.* (2008) associam os polimorfismos do *SLC6A4* com transtornos de doenças mentais. No entanto, as evidências são conflitantes no que diz respeito à relação entre os polimorfismos do gene *SLC6A4* e o risco de depressão (Taylor *et al.*, 2006). Joiner *et al.* (2003) encontraram uma relação significativa entre a história familiar de depressão com o genótipo S/S. Caspi *et al.* (2003), concluíram que pelo menos uma cópia do alelo \*S do polimorfismo *5-HTTLPR*, quando associada a maus tratos na infância, predisseram o início da depressão. Wilhelm *et al.* (2006), demonstraram que eventos adversos na vida têm um impacto mais significativo no início da depressão em indivíduos com o alelo \*S, concluindo que o genótipo *5-HTTLPR* é um preditor de início de depressão após múltiplos eventos adversos. Zalsman *et al.* (2006) estudou uma amostra de brancos diagnosticados para depressão maior e observaram que a presença do alelo \*S, aumentou a sensibilidade aos impactos dos eventos estressantes da vida e a severidade da depressão maior. Em uma meta-análise embasada em 22 estudos, Munafò *et al.* (2004) não encontraram elementos que confirmem a associação do alelo \*S com o neuroticismo. Surtees *et al.* (2006) não encontraram associação do alelo \*S com o aumento de risco para desordem depressiva entre indivíduos expostos à adversidade social.

Segundo Veletza *et al.* (2009), os alelos \*S e \*L parecem interagir de forma diferente com a gravidade das adversidades e portadores do alelo \*S parecem estar mais susceptíveis as adversidades. Porém, os resultados deste estudo, não replicaram diferenças encontradas previamente, em estudantes, com relação aos escores dos testes psicológicos e com a hipótese de que a combinação do alelo \*S com graves efeitos adversos no passado aumentam a vulnerabilidade psicopatológica. Segal *et al.* (2009) em amostra brasileira, não relata diferenças significativas na frequência dos alelos e dos genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR em pacientes deprimidos que tentaram o suicídio. Xie *et al.*, 2009 sugerem que o genótipo do polimorfismo 5-HTTLPR sozinho não prevê o início do transtorno, o risco é aumentado em indivíduos com uma ou duas cópias do alelo \*S em comparação com os homozigotos L/L expostos ao meio estressor. Para estes autores a interação gene/ambiente é o fator decisivo no desenvolvimento de depressão (Xie *et al.*, 2009). Porém, Risch *et al.* (2009) em meta-análise recente, com 14.250 participantes, não encontraram evidências sobre a associação significativa entre o polimorfismo 5-HTTLPR ou a interação deste polimorfismo com eventos estressantes de vida e a depressão ou risco aumentado para o quadro depressivo. Resultados contrastantes com os estudos previamente descritos foram demonstrados por Laucht *et al.* (2009) em amostra de adolescentes de ascendência europeia. Os resultados deste estudo indicaram que a depressão e ansiedade em adolescentes foram fortemente associadas com a adversidade familiar e com eventos estressantes da vida. Os indivíduos homozigotos L/L que foram expostos a altas adversidades familiares exibiram taxas significativamente maiores de depressão ou ansiedade.

Com relação ao polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* localizado no segundo *intron* do gene, Collier *et al.* (1996) verificaram o aumento da frequência do alelo de 12 de repetições do 5-HTTVNTR em pacientes com depressão bipolar, mas não em indivíduos com depressão unipolar. Liu *et al.* (1999) não encontraram associação de depressão bipolar com o polimorfismo 5-HTTVNTR, porém encontraram com esquizofrenia e depressão unipolar. Pascual *et al.* (2007) verificaram a existência de uma associação significativa entre o SERT e algumas dimensões de personalidade em pacientes com transtorno limite de personalidade (TLP), sugerindo que o gene *SLC6A4* tem um papel na etiologia deste transtorno. Os pacientes portadores do alelo \*L do polimorfismo 5-HTTLPR e portadores do alelo com 10 repetições no polimorfismo 5-HTTVNTR pontuaram mais baixo na escala

pelo gosto por festa e amigos. Assal *et al.* (2004) não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo *5-HTTVNTR* e agitação, agressão, depressão ou ansiedade. Estes mesmos autores buscaram replicar estudos prévios sobre o polimorfismo *5-HTTLPR*, mas não associaram o polimorfismo com agitação/agressão, psicose ou depressão. Battersby *et al.* (1996) atribui maior chance de depressão maior e transtorno bipolar aos portadores do alelo de 9 repetições. Em pessoas com condições médicas crônicas, os genótipos S/S do polimorfismo *5-HTTLPR* e 9/12 repetições do polimorfismo *5-HTTVNTR*, foram mais freqüentes entre os indivíduos com a comorbidade depressiva (Jarrett *et al.*, 2007). Alaerts *et al.* (2008) investigaram os polimorfismos *5-HTTVNTR* e *5-HTTLPR* e concluíram que a variação no gene *SLC6A4* ou nas suas regiões reguladoras não contribui para a susceptibilidade ao transtorno de desordem bipolar na população do Norte da Suécia. Garcia *et al.* (2010) relataram que em presos portadores do alelo \*S para o polimorfismo *5-HTTLPR* e homozigotos 12/12 para o polimorfismo *5-HTTVNTR* exibem um maior risco de serem classificados no grupo de transtorno de personalidade anti-social.

Estudos dos polimorfismos do *SLC6A4* no período pós-parto são escassos. Kumar *et al.* (2007) observaram associação do fenótipo de psicose puerperal em mulheres que apresentavam o alelo de 10 repetições do polimorfismo *5-HTTVNTR*, sugerindo a existência de fatores genéticos modulando a vulnerabilidade para a psicose puerperal. Em relação aos estudos dos polimorfismos do *SLC6A4* e DPP, somente dois trabalhos prévios estão registrados na literatura. Sanjuan *et al.* (2008) relatou que em oito semanas pós-parto, os genótipos de alta expressão dos polimorfismos do *SLC6A4* (L/L do *5-HTTLPR* e 12/12 do *5-HTTVNTR*) foram associados com aumento dos escores da escala *Edinburgh Postnatal Depression Scale* (EPDS). Doornbos *et al.* (2009) apontaram que mulheres portadoras do alelo \*L do polimorfismo *5-HTTLPR* apresentaram aumento na incidência de depressão seis semanas pós- parto.

**OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de associações entre as variantes genéticas *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* no gene *SLC6A4*, as concentrações salivares do cortisol e o diagnóstico psiquiátrico de DPP em mulheres.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**2.2.1 Analisar e comparar as frequências dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* no gene *SLC6A4* em mulheres com e sem DPP.**

**2.2.2 Analisar e comparar as frequências dos haplótipos dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* no gene *SLC6A4* em mulheres com e sem DPP.**

**2.2.3 Investigar a associação das variantes *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* no gene *SLC6A4* e as dosagens salivares do cortisol.**

**2.2.4 Analisar as concentrações salivares do cortisol em mulheres com e sem diagnóstico para DPP.**

***METODOLOGIA***

---



## 3 METODOLOGIA

### 3.1 AMOSTRA

Esse estudo contemplou gestantes de baixo e alto risco, maiores de 18 anos, residentes em zona urbana, capazes de compreender e responder ao questionário sócio-demográfico. As gestantes foram triadas em ambulatórios do SUS da cidade de Pelotas/RS, provenientes dos seguintes locais: Posto de Saúde PAM-Fragata, Posto de Saúde Navegantes, Posto de Saúde Bom Jesus, Posto de Saúde Simões Lopes, Postos de Saúde do Fátima, Posto de Saúde Dunas e Posto de Saúde Cohab Lindóia.

A amostra inicial foi constituída por 207 mulheres, destas 147 mulheres de descendência europeia, 56 de descendência africana e 4 de descendência oriental. Para classificação por grupos étnicos, as características fenotípicas analisadas foram: cor da pele, textura do cabelo, espessura dos lábios, formato do nariz e cor dos olhos (Parra *et al.* 2003). Optamos por incluir nesse estudo apenas as 147 mulheres brancas, 71,01% da amostra total, devido à representatividade em relação ao número da amostra.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre com parecer número 270/07 e CONEP com parecer número 44/08. Todas as pacientes que concordaram em participar desta pesquisa leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

## 3.2 DIAGNÓSTICOS PSIQUIÁTRICO E PSICOLÓGICO DE DPP

### **Escala Beck de Depressão**

A Escala Beck de Depressão ou Inventário de Depressão de Beck (BDI-II) (Beck *et al.*, 1996) foi criada por Aaron Beck, contém medidas padronizadas de depressão e tem sido usado para determinar sintomas de DPP. Trata-se de um questionário padronizado para avaliação do humor depressivo, bastante utilizado na literatura, apresentando a característica de ser auto-aplicativo. A escala consiste de 21 itens de múltipla escolha, com níveis de intensidade, incluindo sintomas e atitudes, cuja intensidade varia de 0 a 3. Esses itens referem-se à tristeza, pessimismo, sensação de fracasso, falta de satisfação, sensação de culpa, sensação de punição, autodepreciação, auto-acusações, idéias suicidas, crises de choro, irritabilidade, retração social, indecisão, distorção da imagem corporal, inibição para o trabalho, distúrbio do sono, fadiga, perda de apetite, perda de peso, preocupação somática, diminuição de libido (Beck *et al.*, 1988). O *Center for Cognitive Therapy* recomenda os seguintes pontos de corte: abaixo de 10 correspondem à pacientes sem sintomas de depressão ou sintomas mínimos; entre 10 e 18 pontos à pacientes com sintomas de depressão leve; os sintomas de depressão moderada equivalem à pontuação entre 19 e 29, e pacientes com sintomas de depressão grave apresentam pontuação igual ou superior a 30, podendo chegar a 63 (Beck *et al.*, 1988).

No presente estudo, todas as mulheres foram avaliadas do ponto de vista psiquiátrico/psicológico, tanto no pré quanto no pós-parto, e diagnosticadas ou não para a DPP. O instrumento utilizado foi o BDI em sua versão validada em português (Gzorenstein *et al.*, 1996) e o ponto de corte utilizado foi de 18 pontos.

### 3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Entre 30 a 45 dias após o nascimento das crianças, a coleta de material biológico (sangue e saliva) foi realizada no turno da manhã, respeitando o período de duas horas de jejum, onde o sangue foi coletado por punção venosa de 10 mL de sangue na fossa cúbita (dobra do cotovelo) com material descartável, além disso, foram coletados aproximadamente 4,0 mL de saliva. O sangue coletado foi distribuído em 1 tubo *vacutainer* sem anticoagulante (5,0 mL) e 1 tubo *vacutainer* com anticoagulante (EDTA) (5,0 mL). Logo após, o sangue foi centrifugado durante 15 minutos a 4.500 rpm. O soro resultante foi separado em microtubos com 200µL, o plasma e a camada de leucócitos foram separados para posterior extração do DNA. O material biológico foi codificado por números e armazenado no laboratório de pesquisa do Hospital Universitário São Francisco de Paula da Universidade Católica de Pelotas, estocado em ultrafreezer (-80 °C) para posterior dosagem e análise.

#### 3.3.1 Coleta e dosagem do cortisol salivar

Para determinar os níveis de CORT salivar (ng/mL) foi utilizado um *kit* comercial (DSL-10-67100 ACTIVE ® Cortisol EIA (FOR SALIVA)) segundo as normas do fabricante. Padrões, controles e amostras foram ensaiados em duplicatas. A dose mínima de detecção foi de 0,3 ng/mL e o erro intra-ensaio foi de 4%. As dosagens hormonais foram realizadas no laboratório de Neurociências da Universidade Católica de Pelotas.

### 3.3.2 Análises moleculares

#### Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir da camada de leucócitos obtidos de sangue periférico, utilizando a técnica descrita por Lahiri & Nurnberger (1991). O material foi transferido para um tubo do tipo Falcon (15mL), adicionado 200µL de NONIDET® e 3,5 mL de tampão TKM1 (Tris/HCl 10mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EDTA 2mM), o tubo foi agitado vigorosamente e após centrifugado a 3000 rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado, e adicionado aproximadamente 4mL de TKM1 ao tubo com o pellet, o tubo foi bem agitado até o pellet se dissolver e centrifugado novamente a 3000 rpm por 10min. O sobrenadante foi desprezado novamente, sendo este procedimento de lavagem repetido por mais duas vezes. Após o desprezado do sobrenadante, foi adicionado 640µL de TKM2 (Tris/HCl 10mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EDTA 2mM; NaCl 0,4mM) em cada tubo, homogeneização do pellet com auxílio de uma pipeta Pasteur. A mistura do pellet e TKM2 foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 400µL de SDS 10% e agitado de forma manual e suave, os tubos foram em seguida incubados em banho-maria por 10min a 55°C. Após a incubação foi adicionado 240µL de cloreto de sódio 6M, os tubos agitados, posteriormente centrifugados a 12000-14000 rpm por 15min. O sobrenadante foi transferido com uma pipeta Pasteur para outro tubo do tipo Falcon, onde se adicionou 5 mL de etanol absoluto (temperatura ambiente) e o DNA foi precipitado. O DNA precipitado foi retirado com auxílio de uma pipeta de vidro com a ponta curva e armazenado -20°C em microtubo de 1,5 mL com tampão Tris-EDTA .

#### Análise dos Polimorfismos

Após a extração de DNA, os fragmentos contendo os polimorfismos do gene *SLC6A4* foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com protocolo descrito por Koskela *et al.*, 2008.

Resumidamente, a PCR do polimorfismo *5-HTTLPR* no gene *SLC6A4*, foi

realizada em um volume total de 25 ml contendo 1,0 mg de DNA genômico, 10 pmol de cada um dos *primers* (*SLC6A4* \*F:5'-CGC TCC TGC ATC CCC CAT TA-3' e *SLC6A4* \*R:5'-GGG ATG CGG GGG AATACT GGT-3'), 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de  $MgCl_2$ , 0,75U de Taq polimerase, solução tampão 1X (Com Persulfato de Amônio  $[(NH_4)_2SO_4]$  e sem Cloreto de Magnésio  $[MgCl_2]$ ) e água. Uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, depois de realizados 30 ciclos consistindo de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos; seguidos de uma extensão final a 72°C por 3 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, usando um marcador de peso molecular de 50 bp (ladder) (Koskela *et al.*, 2008). Os genótipos do polimorfismo de inserção/deleção foram visualizados sob luz ultra-violeta (Figura 3) e apresentaram bandas de 528pb (LL), 484pb (SS) e 528pb/484pb (LS) conforme Murphy *et al.* (2004).

A PCR do polimorfismo 5-*HTTVNTR* no gene *SLC6A4*, foi realizada em um volume total de 25 ml contendo 1,0 mg de DNA genômico, 10 pmol de cada um dos *primers* (*SLC6A4* \*F:5'-GTC AGT ATC ACA GGC TGC GAG-3' e *SLC6A4* \*R:5'-TGT TCC TAG TCT TAC GCC AGT G-3'), 0,2 mM de dNTP, 2,0mM de  $MgCl_2$ , 0,1U de Taq polimerase, solução tampão 10X (Com Persulfato de Amônio  $[(NH_4)_2SO_4]$  e sem Cloreto de Magnésio  $[MgCl_2]$ ) e água. Uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, após realizados 35 ciclos consistindo de: desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 62°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, usando um marcador de peso molecular de 50 bp (ladder), foram visualizados sob luz ultra-violeta (Figura 4) e apresentaram bandas de 248pb (9 repetições), 265pb (10 repetições) e 299pb (12 repetições) conforme descrito por Lee *et al.* (2009).

Todas as análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A mediana e o intervalo interquartil das concentrações salivares do CORT foram comparados entre os portadores dos diferentes genótipos usando o teste de Kruskal-Wallis. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para fazer a comparação das concentrações de CORT salivar entre as mulheres com (BDI  $\geq$  18) e sem DPP (BDI  $<$  18).

As freqüências alélicas foram estimadas por contagem simples. Um teste de  $\chi^2$  de ajustamento foi utilizado para determinar se a distribuição das freqüências alélicas observadas estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os haplótipos foram estimados usando o programa *Multiple Locus Haplotype Analysis*, versão 2.0 (Long *et al.*, 1995, Peterson, 1999) e o desequilíbrio de ligação foi testado usando o software Arlequin, versão 3.1 (Excoffier, 2005).

As comparações das freqüências alélicas e genótípicas dos polimorfismos 5-*HTTLPR* e 5-*HTTVNTR* entre os indivíduos com DPP (BDI  $\geq$  18) e sem DPP (BDI  $<$  18) foram realizadas através de um Teste de  $\chi^2$  com correção de Yates. Devido à baixa freqüência do genótipo 12/09 (5-*HTTVNTR*) nesta amostra, pois apenas uma mulher apresentou-o, a portadora deste genótipo foi excluída das análises estatísticas para a associação deste polimorfismo com o diagnóstico de DPP e com as concentrações salivares do CORT. Os escores do BDI foram comparados entre os portadores dos diferentes diplótipos com um teste de Mann-Whitney.

O nível de significância aceito foi de  $p \leq 0,05$  e IC de 95%.

**RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS

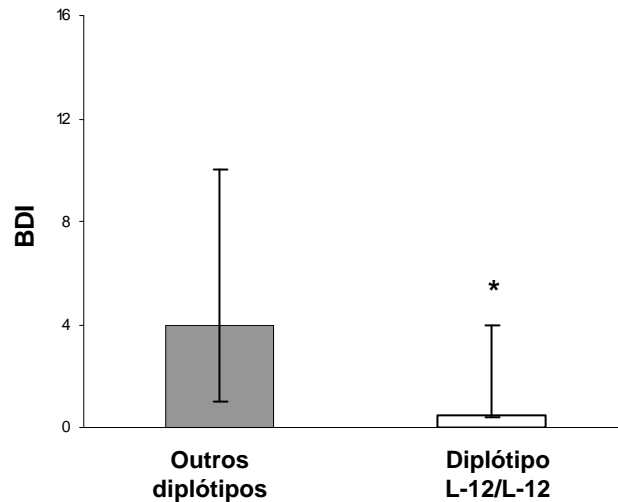
A análise da distribuição das freqüências genotípicas dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* do SERT permitiram verificar que a população está sob Equilíbrio Hardy–Weinberg, conforme o esperado. As freqüências genotípicas do polimorfismo *5-HTTLPR* foram de 17,0% para S/S, 51,0% para L/S e 32,0% para L/L. As freqüências genotípicas do polimorfismo *5-HTTVNTR* foram de 0,70% para 9/12, 14,70% para 10/10, 44,00% para 10/12 e 40,60% para 12/12. Um desequilíbrio de ligação foi detectado entre os dois polimorfismos (o valor de  $D'$  foi de 0,61,  $p=0,003$ ). Todos os haplótipos foram encontrados na nossa amostra, os haplótipos mais freqüentes foram: S-12 (com uma freqüência de 36,24%), L-10 (29,71%), L-12 (27,17%) e S-10 (6,88%).

A distribuição das freqüências genotípicas e os resultados das análises de associação entre o diagnóstico de DPP segundo a classificação do BDI com os polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* em mulheres são apresentados na Tabela 1. Em mulheres brancas, não foi observada associação entre os polimorfismos *5-HTTLPR* ( $p=0,48$ ) e *5-HTTVNTR* ( $p=0,77$ ) analisados isoladamente com o diagnóstico de DPP. As análises realizadas com os haplótipos dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* demonstraram que mulheres portadoras dos diplótipos L-12/L-12 pontuaram menor nos sintomas depressivos (mediana: 0,5; intervalo interquartil: 0,00-4,00,  $p=0,04$ ) comparadas com mulheres portadoras de outros diplótipos (mediana: 4,0; intervalo interquartil: 1,00-10,00) (Figura 2).

**Tabela 1.** Distribuição das freqüências genotípicas dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* de acordo com a classificação do BDI.

<b>5-HTTLPR</b>				
<b>Genótipos</b>	S/S	L/S	L/L	<b>p</b>
BDI < 18	16,90% (19)	50,40% (57)	32,70% (37)	0,48
BDI > 18	13,30% (2)	66,70% (10)	20,00% (3)	
<b>5-HTTVNTR</b>				
<b>Genótipos</b>	10/10	10/12	12/12	<b>p</b>
BDI < 18	15,10% (16)	41,50% (44)	43,40% (46)	0,77
BDI > 18	9,00% (1)	45,50% (5)	45,50% (5)	





**Figure 2.** Escores de sintomas depressivos de acordo com os diplótipos dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR*.

#### 4.1 RESULTADOS COMPLEMENTARES

##### **Investigação da associação das concentrações de cortisol salivar com os polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR***

Neste estudo, as concentrações do CORT salivar não foram diferentes entre os genótipos do polimorfismo *5-HTTLPR*, como demonstra a Tabela 2. Porém, em relação ao polimorfismo *5-HTTVNTR* as concentrações do CORT salivar foram diferentes. Podemos observar na Tabela 2, que mulheres portadoras do genótipo 10/10 deste polimorfismo, apresentaram maiores concentrações do CORT salivar quando comparadas com as mulheres portadores dos genótipos 12/10 e 12/12.

Na Tabela 3 observamos que as concentrações do CORT salivar não

apresentaram diferença significativa quando comparamos mulheres com DPP (BDI  $\geq$  18) ou sem DPP (BDI < 18).

**Tabela 2.** Mediana e intervalo interquartil das concentrações de cortisol salivar nos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR*.

<b>5-HTTLPR</b>				
<b>Genótipos (n)</b>	S/S (22)	L/S (68)	L/L (45)	p
<b>Mediana</b>	0,80	0,94	0,92	0,41
<b>Interquartil</b>	(0,43-1,13)	(0,42-1,36)	(0,57-2,03)	
<b>5-HTTVNTR</b>				
<b>Genótipos (n)</b>	10/10 (20)	10/12 (56)	12/12 (49)	p
<b>Mediana</b>	1,27	0,72	0,93	0,03
<b>Interquartil</b>	(0,61-2,19)	(0,39-1,23)	(0,64-1,46)	

Teste de Kruskal-Wallis

**Tabela 3.** Mediana das concentrações do cortisol salivar entre as mulheres com (BDI  $\geq$  18) ou sem DPP (BDI < 18).

<b>BDI</b>	<b>n</b>	<b>Mediana do cortisol salivar</b>	<b>p</b>
<b>Menor que 18</b>	119	68,28	
<b>Maior ou igual a 18</b>	15	61,40	0,52

Teste de Mann-Whitney

***DISCUSSÃO***

---

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, não foi detectada associação dos polimorfismos no gene *SLC6A4* quando analisados isoladamente com diagnóstico de DPP, mas, os haplótipos dos polimorfismos *5-HTTVNTR* e *5-HTTLPR* foram associados com o escore de depressão em mulheres na 12<sup>a</sup> semana pós-parto. Dessa forma, sugerimos que a diferente susceptibilidade para DPP entre mulheres pós-parto pode ser devido à combinação de variantes genéticas que conferem maior risco.

Até o presente momento, os motivos pelos quais algumas mulheres após o parto desenvolvem DPP não estão completamente elucidados. Vários estudos têm analisado a associação de polimorfismos do gene *SLC6A4* com transtornos do humor. No entanto, apenas dois estudos semelhantes foram realizados com o DPP e resultados contraditórios têm sido relatados.

A relação entre os polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* e a expressão funcional do SERT não estão totalmente esclarecidos. Embora algumas investigações indiquem evidências da existência desta relação, ainda existem dúvidas sobre a relação entre estes polimorfismos e o risco de desenvolver transtornos mentais como a depressão. Heils *et al.*, (1996) realizaram estudos funcionais *in vitro* e demonstram que a o alelo \*L do polimorfismo *5-HTTLPR* determina maior eficiência para o promotor do gene. Portanto, indivíduos com genótipo L/L têm mais expressão do SERT do que indivíduos com os genótipos L/S e S/S. Outros estudos também associam a presença do alelo \*S do polimorfismo *5-HTTLPR* (Lesch *et al.*, 1996; Pezawas *et al.*, 2005, Wilhelm *et al.*, 2006; Zalsman *et al.*, 2006) e os alelos de 10 e 12 repetições do polimorfismo *5-HTTVNTR* (Collier *et al.*, 1996.; Pascual *et al.*, 2007) com a menor eficiência de transcrição do SERT. Em análises por ressonância magnética, foram detectadas diferenças funcionais em regiões relacionadas com a emoção e redução do volume do córtex cingulado anterior perigenual e amígdala em portadores do alelo S do polimorfismo *5-HTTLPR* (Pezawas *et al.*, 2005).

Alguns estudos investigaram a associação do polimorfismo *5-HTTLPR* com transtornos de humor. Segundo Gonda *et al.* (2008), a presença do alelo \*S foi significativamente associada com ansiedade, depressão, desesperança, culpa, hostilidade, agressão, presença de sintomas neuróticos e temperamentos afetivos

carregando um componente depressivo. Pascual *et al.* (2007) encontraram associação do polimorfismo *5-HTTLPR* com o desenvolvimento de transtorno mental. Caspi *et al.* (2003) detectaram associação de maus tratos na infância com depressão na vida adulta em indivíduos portadores do alelo S. Xie *et al.* (2009) observaram que em indivíduos com uma ou duas cópias do alelo \*S, quando expostos a eventos estressores ambientais, tornou-se maior o risco de transtorno de estresse pós-traumático. Zalsman *et al.* (2006) demonstraram que portadores do alelo \*S têm maior sensibilidade para eventos estressores ambientais associados com a gravidade da depressão maior. Wilhelm *et al.* (2006) e Taylor *et al.* (2006) observaram que indivíduos homocigotos para o alelo \*S, se expostos a eventos estressores ambientais, apresentaram sintomatologia depressiva maior, comparados aos portadores dos genótipos L/S ou L/L. Quando tomados em conjunto, os resultados destes trabalhos indicam que apenas o genótipo *5-HTTLPR* não parece determinar ou iniciar o transtorno, porém o risco para o início do transtorno, aumenta em indivíduos com uma ou duas cópias do alelo \*S, quando expostos aos eventos estressores ambientais. Contrastando com os resultados dos estudos descritos, Chorbov *et al.* (2007) e Laucht *et al.* (2009) demonstram que os indivíduos com genótipo L/L expostos aos eventos estressores ambientais apresentam um risco aumentado de depressão.

Nossos resultados não demonstraram nenhuma associação entre o genótipo *5-HTTLPR* sozinho e DPP em mulheres brancas. Além disso, apesar dos estudos descritos acima detectaram associação deste polimorfismo com transtornos do humor, vários estudos não encontraram associação significativa do polimorfismo *5-HTTLPR* com desenvolvimento de transtornos de humor, tais como: depressão maior (Gutiérrez *et al.*, 1998; Surtees *et al.*, 2006), depressão em indivíduos que tentaram suicídio (Segal *et al.*, 2009), depressão e eventos estressantes (Araya *et al.*, 2009; Veletza *et al.*, 2009) e transtornos bipolares (Alaerts *et al.*, 2009). Em uma meta-análise, Risch *et al.*, (2009) não observaram que o genótipo *5-HTTLPR* sozinho ou interagindo com os eventos estressantes estivessem associados com o risco de depressão em ambos os sexos. Nossos resultados também não demonstraram nenhuma associação entre o polimorfismo *5-HTTVNTR* e DPP em mulheres brancas. No entanto, em estudo anterior, o aumento na frequência do alelo de 12 repetições deste polimorfismo foi observado em indivíduos com transtorno bipolar, mas não em depressão maior (Collier *et al.*, 1996). Kumar *et al.* (2007)

observaram uma associação do alelo de 10 repetições do polimorfismo *5-HTTVNTR* com a psicose puerperal. Já, Liu *et al.* (1999) e Alaerts *et al.* (2009) não encontraram associação do polimorfismo do *5-HTTVNTR* com transtorno bipolar. Assal *et al.* (2004) não encontraram nenhuma associação do polimorfismo *5-HTTVNTR* com agitação/agressão, depressão ou ansiedade.

Ao melhor de nosso conhecimento, há apenas dois estudos sobre polimorfismos relacionados com o SERT e DPP. Sanjuan *et al.* (2008) relataram que em oito semanas após o parto, os genótipos de elevada expressão do SERT (L/L do polimorfismo *5-HTTLPR* e 12/12 do polimorfismo *5-HTTVNTR*) foram associados com o aumento da pontuação pós-natal da escala Edimburgo Depression Scale (EPDS). Doornbos *et al.* (2009) indicaram que mulheres portadores do alelo \*L do polimorfismo *5-HTTLPR* tenderam para os escores aumentados de depressão em seis semanas após o parto.

Nossos dados não estão de acordo com os resultados expostos por Sanjuan *et al.* (2008), no entanto esses dois trabalhos não são totalmente comparáveis, pois a escala para diagnóstico e o período pós-parto da avaliação dos sintomas depressivos foram diferentes. Além disso, nossos achados são parcialmente corroborados por vários estudos que associaram a presença do alelo \*S do polimorfismo *5-HTTLPR* (Caspi *et al.*, 2003, Taylor *et al.*, 2006; Wilhelm *et al.*, 2006; Zalsman *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2009) e alelo de 10 repetições do polimorfismo *5-HTTVNTR* (Kumar *et al.*, 2007) com transtornos do humor, uma vez que em nosso estudo o diplótipo L-12/L-12 foi associado com menor pontuação dos sintomas depressivos, indicando que esse poderia ser um diplótipo protetor para o quadro DPP.

Nossos resultados são importantes, pois poucos estudos investigam a associação dos polimorfismos do *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* com DPP. Além disso, estes dois trabalhos (Sanjuan *et al.*, 2008 e Doornbos *et al.*, 2009) sobre polimorfismos do SERT e DPP apresentaram resultados conflitantes com outros estudos de associação com transtornos do humor.

Há evidências conflitantes sobre a relação entre hipercortisolemia e risco para a depressão. Goodyer *et al.* (2000) verificou o aumento de CORT matinal em amostra de adolescentes de alto risco. Há relatos da hiperatividade do eixo HPA na depressão maior (Schmider *et al.*, 1995; Holsboer & Barden, 1996; Gold & Chrousos,

2002; Watson *et al.*, 2004) e na depressão maior psicótica em alguns pacientes deprimidos (Holsboer, 2000; Mello *et al.*, 2007).

A depressão é um distúrbio complexo e heterogêneo, o eixo HPA é um dos sistemas mais importantes a ser estudado para elucidar a etiologia da depressão, mas outros fatores também precisam receber atenção, como o tipo e a gravidade da depressão, genótipo, história de estresse durante a infância e, provavelmente, resiliência (pessoas que têm a capacidade de retornar ao seu equilíbrio emocional após sofrer grandes pressões ou estresse, ou seja, são dotadas de habilidades que lhes permitem lidar com problemas sob pressão ou estresse mantendo o equilíbrio). Todos esses fatores juntos resultam em um endofenótipo propenso à depressão.

Como já descrito na introdução deste trabalho, DPP é uma doença multifatorial e dessa forma espera-se que o efeito de uma ou duas variantes genéticas isoladas, seja pequeno. Portanto, a análise de associação com as variantes genéticas deste endofenótipo (traços discretos, mensuráveis que podem estar ligados a genes específicos), pode indicar a associação desta variante com a fisiopatologia deste transtorno. No entanto, estes resultados, necessitam de confirmações em estudos independentes, pois este é o primeiro relato na literatura.

Nossos resultados são inovadores, pois não existem estudos que investigaram a associação dos genótipos dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* com DPP e a concentração de CORT salivar. Embora nosso trabalho tenha algumas limitações, como tamanho da amostra moderada e análises de variações genéticas sem fatores de risco ambiental, a nossa investigação pode ser considerado como o estudo exploratório para a compreensão da susceptibilidade para o quadro de DPP.

**CONCLUSÕES**

---



## 6 CONCLUSÕES

Em nosso estudo, nenhuma associação significativa foi observada entre os polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* e o diagnóstico DPP, quando estes foram analisados isoladamente. No entanto, quando as duas variantes genéticas foram analisadas conjuntamente como haplótipos, as mulheres portadoras do diplótipo L-12/L-12 tiveram redução da pontuação de sintomas de depressão da escala BDI, quando comparadas às mulheres portadoras de outros diplótipos.

Além disso, o polimorfismo *5-HTTLPR* não foi associado com as concentrações do CORT salivar. Porém, o polimorfismo *5-HTTVNTR* foi associado com as concentrações desse hormônio. As mulheres com o genótipo 10/10 do polimorfismo *5-HTTVNTR* apresentaram maiores concentrações do CORT salivar quando comparadas com as mulheres portadoras dos genótipos 12/10 e 12/12.

***PERSPECTIVAS FUTURAS***

---

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos resultados são inéditos quanto à análise da relação entre os polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* no gene *SLC6A4* e as concentrações do CORT salivar.

Dessa forma, temos como perspectivas futuras:

- Aumentar o tamanho da amostra;
- A partir dessa nova coleta de DNA de mães com e sem DPP, analisar e comparar as freqüências dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* no gene *SLC6A4*;
- Dosar o CORT salivar nesse novo grupo de mães com e sem DPP;
- Realizar coletas do CORT salivar matinal em mulheres que desenvolveram ou não DPP em intervalos de 6, 8 e 12 semanas pós-parto. Após, comparar os resultados obtidos com demais relatos conflitantes na literatura.
- Analisar e comparar as freqüências dos polimorfismos *5HT1B* e *G861C* do receptor serotoninérgico subtipo *1B* em mulheres com e sem DPP;
- Analisar e comparar as freqüências dos polimorfismos *5HT2A T102C* e *C516T* do receptor serotoninérgico subtipo *2A* em mulheres com e sem DPP.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAERTS M, CEULEMANS S, FORERO D, MOENS LN, DE ZUTTER S, HEYRMAN L, LENAERTS A-S, NORRBACK K-F, GOOSSENS D, DE RIJK P, NILSSON LG, ADOLFSSON R, DEL-FAVERO J. Detailed Analysis of the Serotonin Transporter Gene (*SLC6A4*) Shows no Association With Bipolar Disorder in the Northern Swedish Population. **Am J Med Genet Part B**.150B: 585-592, 2008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION DSM IV: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Porto Alegre: **Artmed**: 1994.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION DSM IV-TR: Diagnostic and statistical manual of mental disorders-Text revision (Fourth Ed.). Washington, D.C.: **American Psychiatric Association**: 2000.

ARAYA R, HU X, HERON J, ENOCH M-A, EVANS J, LEWIS G, NUTT D, GOLDMAN D. Effects of Stressful Life Events, Maternal Depression and 5-HTTLPR Genotype on Emotional Symptoms in Pre-Adolescent Children. **Am J Med Genet Part B**.;150B: 670–682, 2009.

ASSAL F, ALARCÓN M, SOLOMON EC, MASTERMAN D, GESCHWIND DH, CUMMINGS JL. Associação do transportador de serotonina e os polimorfismos do gene receptor de sintomas neuropsiquiátricos na doença de Alzheimer. **Archives of Neurology** 61 (8): 1249-1253, 2004.

ATTIA E, DOWNEY J, OBERMAN M. Postpartum psychoses. In L.J.Miller. Postpartum mood disorders. Washington, DC: **American Psychiatric Press**. 99-118, 1999.

BATTERSBY S, OGILVIE AD, SMITH CA, BLACKWOOD DH, MUIR WJ, QUINN JP, FINK G, GOODWIN GM, HARMAR AJ. Structure of a variable number tandem repeat of the serotonin transporter gene and association with affective disorder. **Psychiatric Genetics** 6:177–181, 1996.

BECK AT, STEER RA, GARBIN MG. Psychometric properties of the Beck depression inventory: twenty five years of evaluation. **Clean Psychol Rev** (8): 77-100, 1988.

BECK CT, REYNOLDS MA, *et al.* "Maternity blues and postpartum depression." **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs** 21 (4): 287-93, 1992.

BECK CT. "The effects of postpartum depression on maternal-infant interaction: a meta-analysis." **Nurs Res** 44 (5): 298-304, 1995.

BECK AT, STEER RA, BALL R, RANIERI W. "Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients". **Journal of personality assessment** 67 (3): 588–97, 1996.

BLOCH M, SCMIDT PJ, DANACEAU M, MURPHY J, NIEMAN L, RUBINOW DR.

Effects of gonadal steroids in women with a history of postpartum depression. **Am J Psychiatry** **157**: 924-930, 2000.

BLOCH M, DALY RC, RUBINOW DR. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. **Compr Psychiatry** **44**: 234-246, 2003.

BODO C & RISSMAN EF. New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology. **Neuroendocrinol** **27** (2): 217-32, 2006.

BROCKINGTON IF, CERNIK KF *et al.* "Puerperal Psychosis. Phenomena and diagnosis." **Arch Gen Psychiatry** **38** (7): 829-33, 1981.

CAMPBELL JC, POLAND ML *et al.* "Correlates of battering during pregnancy." **Res Nurs Health** **15** (3): 219-26, 1992.

CASPI A, SUGDEN K, MOFFITT TE, TAYLOR A, CRAIG IW, HARRINGTON H, MCCLAY J, MILL J, MARTIN J, BRAITHWHITE A, BOULTON R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the *5-HTT* gene. **Science** **301** (5631):386-9, 2003.

CHORBOV VM, LOBOS EA, TODOROV A.A, HEATH AC, BOTTERON KN, TODD RD. Relationship of *5-HTTLPR* genotypes and depression risk in the presence of trauma in a female twin sample. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics.**;144B:830-833, 2007.

COHEN LS, NONACS R, VIGUERA AC, REMINICK A. Diagnosis and treatment of depression during pregnancy. **CNS Spectr** **9**: 209-16, 2004.

COLLIER DA, ARRANZ MJ, SHAM P, BATTERSBY S, VALLADA H, GILL P, AITCHISON KJ, SODHI M, LI T, ROBERTS GW, SMITH B, MORTON J, MURRAY RM, SMITH D, KIROV G. The serotonin transporter is a potential susceptibility factor for bipolar affective disorder. **Neuroreport** **7** (10):1675-9, 1996.

CONDON JT. What about dad? Psychosocial and mental health issues for new fathers. **Reprinted from Australian Family Physician** **35** (9): 690-692, 2006.

CORREIA ALV. Prevalência e Fatores de Risco em Depressão Pós-parto em um Serviço de Referência em João Pessoa – Paraíba. **Dissertação de Mestrado em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.** Recife, 2006.

CUMMINGS EM & DAVIES PT. Depressed parents and family functioning: Interpersonal effects and children's functioning and development. In: Joiner TE, Coyne JC, editors. The interactional nature of depression: advances in interpersonal approaches. Washington, DC: **American Psychological Association**: 299-327, 1999.

FAISAL-CURY A, TEDESCO JJ, KAHHALE S, MENEZES PR, ZUGAIB M. "Postpartum depression: in relation to life events and patterns of coping." **Arch Women Ment Health** **7** (2): 123-31, 2004.

DA-SILVA VA, MORAES-SANTOS AR, CARVALHO MS, MARTINS MLP AND TEIXEIRA NA. "Prenatal and postnatal depression among low income Brazilian women." **Braz J Med Biol Res** 31 (6): 799-804, 1998.

DOORNBOS B, DIJCK-BROUWER J, KEMA IP, TANKE MA, VAN GOOR SA, MUSKIET FAJ *et al.* The development of peripartum depressive symptoms is associated with gene polymorphisms of MAOA, 5-HTT and COMT. **Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 33 (7): 1250-1254, 2009.

EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform Online** 1: 47-50, 2005.

FORTY L, JONES L, MACGREGOR S, CAESAR S, COOPER C, HOUGH A, DEAN L, DAVE S, FARMER A, MCGUFFIN P, BREWSTER S, CRADDOCK N, JONES I. Familiality of postpartum depression in unipolar disorder: results of a family study. **Am J Psychiatry** 163: 1549-1553, 2006.

GALLAGHER DW & AGHAJANTAN GK. Inhibition of firing of raphe nucleus by tryptophan and 5-hydroxytryptophan blockade by inhibiting serotonin synthesis with Ro-4-4602. **Neuropharmacol** 15: 149-156, 1976.

GARCIA LF, ALUJA A, FIBLA J, CUEVAS L, GARCÍA O. Incremental effect for antisocial personality disorder genetic risk combining 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms. **Psychiatry research** 177 (1-2):161-6, 2010.

GELERNTER J, KRANZLER H, CUBELLS JF. Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. **Hum Genet.** 101: 243–246, 1997.

GOLD PW & CHROUSOS GP. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. **Mol Psychiatry** 7 (3):254-75, 2002.

GONDA X, FOUNTOULAKIS KN, JUHASZ G, RIHMER Z, LAZARY J, LASZIK A, AKISKAL HS, BAGDY G. Association of the s allele of the 5-HTTLPR with neuroticism-related traits and temperaments in a psychiatrically healthy population. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.** 2008.

GOODMAN JH. "Postpartum depression beyond the early postpartum period." **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs** 33 (4): 410-20, 2004.

GOODYEAR LM, HERBERT J, TAMPLING A, ALTHAM PME. Recent life events, cortisol, dehydroepiandrosterone and the onset of major depression in high-risk adolescents. **Br J Psychiatry** 177: 499-504, 2000.

GOTLIB IH, WHIFFEN VE *et al.* "Prospective investigation of postpartum depression: factors involved in onset and recovery." **J Abnorm Psychol** 100 (2): 122-32, 1991.

GRAFF LA, DYCK DG *et al.* "Predicting postpartum depressive symptoms: a structural modelling analysis." **Percept Mot Skills** **73** (3 Pt 2): 1137-8, 1991.

GUTIÉRREZ B, PINTOR L, GASTÓ C, ROSA A, BERTRANPETIT J, VIETA E, FAÑANÁS L. Variability in the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia. **Hum Genet**: 103: 319–322, 1998.

GZORENSTEIN C, ANDRADE L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. **Braz J Med Biol Res.**: 29:453–457, 1996.

HAPGOOD CC, ELKIND GS, WRIGHT JJ. "Maternity blues: phenomena and relationship to later post partum depression." **Aust N Z J Psychiatry** **22** (3): 299-306, 1988.

HEILS A, TEUFEL A, PETRI S, SEEMANN M, BENDEL D, BALLING U, RIEDERER P, and LESCH KP. Functional promoter and polyadenylation site mapping of the human serotonin (5-HT) transporter gene. **J. Neural Transm. Gen. Sect.** **102**, 247–254, 1995.

HEILS A, TEUFEL A, PETRI S, STOBBER G, RIEDERER P, BENDEL D, LESCH KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. **Journal of Neurochemistry** **66**: 2621–2624, 1996.

HENDERSON JJ, EVANS SF, STRATON JA, PRIEST SR, HAGAN R. "Impact of postnatal depression on breastfeeding duration." **Birth** **30** (3): 175-80, 2003.

HERMAN AI *et al.* Serotonin transporter promoter polymorphism and differences in alcohol consumption behaviour in a college student population. **Alcohol** **38** (5): 446-49, 2003.

HOLSBOER F & BARDEN N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocr Rev.** **17** (2):187-205, 1996.

HOLSBOER F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology** **23** (5): 477-501, 2000.

HOPKINS J, CAMPBELL SB, MARCUS M. Role of infant-related stressors in postpartum depression. **J Abnorm Psychol** **96** (3): 237-41, 1987.

HOROWITZ JA & GOODMAN JH. "Identifying and treating postpartum depression." **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs** **34** (2): 264-73, 2005.

HRANILOVIC D, STEFULJ J, SCHWAB S, BORRMANN-HASSENBACH M, ALBUS M, JERNEJ B, WILDENAUER D. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. **Biological Psychiatry** **55** (11): 1090-1094, 2004.

JARRETT ME, KOHEN R, CAIN KC, BURR RL, POPPE A, NAVAJA GP, HEITKEMPER MM. Relationship of SERT polymorphisms to depressive and anxiety



symptoms in irritable bowel syndrome. **Biological Research for Nursing** 9: 161–169, 2007.

JERNEJ B *et al.* Intronic polymorphism of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter: indication for combined effect in predisposition to suicide. **J Neural Transm** 111 (6): 733-38, 2004.

JOINER TE JR, JOHNSON F, SODERSTROM K, BROWN JS. Is there an association between serotonin transporter gene polymorphism and family history of depression? **J Affect Disord.**: 77:273–275, 2003.

KAPCZINSKI F, BUSNELLO JV, ABREU MR, CARRÃO AD. Aspectos da Fisiologia do Triptofano. **Rev. Psiq. Clin.** 25 (4): 158-165, 1998.

KOHEN M, CAIN KC, MITCHELL PH, BECKER KJ, BUZAITIS A, MILLARD SP, NAVAJA GP, TERI L, TIRSCHWELL D, VEITH R. Association of Serotonin Transporter Gene Polymorphisms with Post-Stroke Depression. **Arch Gen Psychiatry** November 65 (11): 1296–1302, 2008.

KOSKELA AK, KAURIJOKI S, PIETILÄINEN, KH, KARHUNEN L, PESONEN U, KUIKKA JT, KAPRIO J, RISSANEN A. Serotonin transporter binding and acquired obesity — An imaging study of monozygotic twin pairs. **Physiology & Behavior.** 93. 724–732. 2008.

KUMAR HB, PURUSHOTTAM M, KUBENDRAN S, GAYATHRI P, MUKHERJEE O, MURTHY AR, GHOSH S, CHANDRA P, REDDY YC, BENEGAL V, BRAHMACHARI SK, JAIN S. Serotonergic candidate genes and puerperal psychosis: an association study. **Psychiatr Genet (Psychiatric genetics)** 17: 253-60, 2007.

LAFER B. Depressão no ciclo da vida. **Artmed:** 1ª ed. São Paulo, 2000.

LAHIRI DK & NURNBERGER JIJR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res** 19: 5444, 1991.

LAUCHT M, TREUTLEIN J, BLOMEYER D, BUCHMANN AF, SCHMID B, BECKER K *et al.* Interaction between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: Evidence from a high-risk community sample of young adults. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 12: 737-747, 2009.

LECRUBIER Y. The burden of depression and anxiety in general medicine. **J Clin Psychiatry** 62: 4-9, 2001.

LEE HY, KIM DJ, LEE HJ, CHOI JE, KIM YK. No association of serotonin transporter polymorphism (5-HTTVNTR and 5-HTTLPR) with characteristics and treatment response to atypical antipsychotic agents in schizophrenic patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 33: 276–280, 2009.

LERMAN C *et al.* The role of the serotonin transporter gene in cigarette smoling.

**Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 7 (3): 253-55, 1998.

LESCH KP, BALLING U, GROSS J, STRAUSS K, WOLOZIN BL, MURPHY DL, RIEDERER P. Organization of the human serotonin transporter gene. **Journal of Neural Transmission-General Section**: 95:157–162, 1994.

LESCH KP, BENDEL D, HEILS A, SABOL SZ, GREENBERG BD, PETRI S, BENJAMIN J, MULLER CR, HAMER DH, MURPHY DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science** 274: 1527–1531, 1996.

LESCH KP & MOESSNER R. Genetically driven variation in serotonin uptake: Is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? **Biol. Psychiatry** 44: 179–192, 1998.

LESCH KP, JATZKE S, MEYER J, STÖBER G, OKLADNOVA O, MOSSNER R and RIEDERER P. Mosaicism for a serotonin transporter gene promoter-associated deletion: Decreased recombination in depression. **J. Neural Transm.** 106, 1223–1230, 1999.

LONG J, WILLIAMS R, URBANEK M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. **Am J Hum Genet** 56: 799-810, 1995.

LIU W, GU N, FENG G *et al.* Tentative association of the serotonin transporter with schizophrenia and unipolar depression but not with bipolar disorder in Han Chinese. **Pharmacogenetics** 9: 491-495, 1999.

MCINTYRE RS & O'DONOVAN C. The human cost of not achieving full remission in depression. **Can J Psychiatry** 49: 10-6, 2004.

MELLO AF, JURUENA MF, PARIANTE CM, TYRKA AR, PRICE LH, CARPENTER LL, DEL PORTO JÁ. Depressão e estresse: existe um endofenótipo? **Revista Brasileira de Psiquiatria** 29 (1), 2007.

MICHELON L, CORDEIRO Q, VALLADA H. Depressão. **RBM - Revista Brasileira De Medicina**: Moreira Jr. Editora: 15-25; 2008.

MILLER LJ. "Postpartum depression." **Jama** 287 (6): 762-5, 2002.

MORAES IGS, PINHEIRO RT, SILVA RA, HORTA BL, SOUSA PLR, FARIA AD. Prevalência da depressão pós-parto e fatores associados. **Rev Saúde Pública** 40: 65-70 2006.

MUNAFÒ MR, CLARK TG, FLINT J. Are there sex differences in the association between the *5HTT* gene and neuroticism? A meta-analysis. **Pers Individ Dif** 37 (3): 621-26, 2004.

MURPHY DL, LERNER A, RUDNICK G, LESCH KL. Serotonin Transporter: Gene, Genetic Disorders, and Pharmacogenetics. **Molecular interventions** 4 (2): 2004.

MURPHY DL & LESCH P. "Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology". **Nature Reviews Neuroscience** **9** (2):85–86. doi:10.1038/nrn2284. PMID 18209729, 2008.

NEWPORT DJ, HOSTETTER A, ARNOLD A, STOWE ZN. "The treatment of postpartum depression: minimizing infant exposures." **J Clin Psychiatry** **63 Suppl 7**: 31-44, 2002.

NONACS R & COHEN LS. "Postpartum mood disorders: diagnosis and treatment guidelines." **J Clin Psychiatry** **59 Suppl 2**: 34-40, 1998.

O'HARA MW, NEUNABER DJ, ZEKOSKI EM. "Prospective study of postpartum depression: prevalence, course, and predictive factors." **J Abnorm Psychol** **93** (2): 158-71, 1984.

O'HARA MW, ZEKOSKI EM *et al.* "Controlled prospective study of postpartum mood disorders: comparison of childbearing and nonchildbearing women." **J Abnorm Psychol** **99** (1): 3-15, 1990.

O'HARA MW, SCHLECHTE JA, LEWIS DA *et al.* "Controlled prospective study of postpartum mood disorders: psychological, environmental, and hormonal variables." **J Abnorm Psychol** **100** (1): 63-73, 1991.

O'HARA MW & SWAIN AM. Rates and risk of postpartum depression: meta-analysis. **Int Rev Psychiatry** **8**: 37-56, 1996.

OLDENDORF WH & SZABO J. Amino acids assignment to one of three blood-brain Barrier amino acid carriers. **Am J Physiol** **230**: 94-98, 1976.

OLIVEIRA JRM *et al.* Analysis of a novel functional polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene (*5-HTT*) in Brazilian patients affected by bipolar disorder and schizophrenia. **Am J Med Genet** **81** (3): 225-27, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **CID-10**: 5ª ed. Editora da USP (1): 181-187, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Relatório sobre a saúde no mundo 2001 Saúde mental: nova concepção, nova esperança. **Gráfica Brasil**: 1ª ed., 2001.

OWENS MJ & NEMEROFF CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. **Clin Chem** **40** (2): 288-95, 1994.

PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR, ROCHA J, ANTUNES CM, PENA SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA** **100** (1): 177-82, 2003.

PASCUAL JC, SOLER J, BAIGET M, CORTÉS A, MENOYO A, BARRACHINA J, ROPERO M, GOMÀ M, ÁLVAREZ E, PÉREZ V. Asociación entre el gen del transportador de la serotonina y rasgos de personalidad en pacientes con trastorno límite de la personalidad evaluados mediante el *Zuckerman-Kuhlman Personality*

*Questionnaire* (ZKPQ). **Actas Esp Psiquiatr** 35 (6): 382-386, 2007.

PASSOS VMA, ASSIS TD, BARRETO SM. Hypertension in Brazil: estimates from population-based prevalence studies *Epidemiol. Serv. Saúde* 15 (1): 2006.

PAYNE JL, MACKINNON DF, MONDIMORE FM, MCINNIS MG, SCHWEIZER B, ZAMOISKI RB, MCMAHON FJ, NURNBERGER JR JI, RICE JP, SCHEFTNER W, CORYELL W, BERRETTINI WH, KELSOE JR, BYERLEY W, GERSHON ES, DEPAULO JR JR, POTASH JB. Familial aggregation of postpartum mood symptoms in bipolar disorder pedigrees. **Bipolar Disord** 10: 38–44, 2008.

PETERSON R, GOLDMAN D, LONG J. Nucleotide sequence diversity in non-coding regions of ALDH2 as revealed by restriction enzyme and SSCP analysis. **Hum Genet.**104: 177-187, 1999.

PEZAWAS L, MEYER-LINDENBERG A, DRABANT EM, VERCHINSKI BA, MUNOZ KE, KOLACHANA BS, EGAN MF, MATTAY VS, HARIRI AR, WEINBERGER DR. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. **Nat Neurosci.** 8(6): 828-34, 2005.

PITT, B. "Maternity blues'." **Br J Psychiatry** 122 (569): 431-3, 1973.

RAHMAN A, IQBAL Z, BUNN J, LOVEL H, HARRINGTON R. "Impact of maternal depression on infant nutritional status and illness: a cohort study." **Arch Gen Psychiatry** 61 (9): 946-52, 2004.

RAMAMOORTHY S, BAUMAN AL, MOORE KR, HAN H, YANG-FENG T, CHANG AS, GANAPATHY V, BLAKELY RD. Antidepressant-and cocaine-sensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization. **Comprehensive report of cloned hSERT from placenta Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 90: 2542–2546, 1993.

RAMCHANDANI P, STEIN A, EVANS J, O'CONNOR TG. ALSPAC study team. Paternal depression in the postnatal period and child development: a prospective population study. **Lancet** 365: 2201-2205, 2005.

REZENDE J DE & MONTENEGRO CAB. *Obstetrícia Fundamental*. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 8ª ed., 1999.

RIGHETTI-VELTEMA M, CONNE-PERREARD E, BOUSQUET A, MANZANO J. "Postpartum depression and mother-infant relationship at 3 months old." **J Affect Disord** 70 (3): 291-306,2002.

RISCH N, HERRELL R, LEHNER T, LIANG, KY, EAVES L, HOH J *et al*. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: A meta-analysis. **JAMA** 301: 2462-2471, 2009.

ROBINSON JR, DROTAR D *et al*. "Problem-solving abilities among mothers of infants with failure to thrive." **J Pediatr Psychol** 26 (1): 21-32,2001.

SANJUAN J, MARTIN-SANTOS R, GARCIA-ESTEVE L, CAROT JM, GUILLAMAT R, GUTIERREZ-ZOTES A *et al.* Mood changes after delivery: Role of the serotonin transporter gene. **British Journal of Psychiatry** **193**: 383-388, 2008.

SCHMIDER J, LAMMERS CH, GOTTHARDT U, DETTLING M, HOLSBOER F, HEUSER IJ. Combined dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in acute and remitted manic patients, in acute depression, and in normal controls: I. **Biol Psychiatry** **38** (12): 797-802, 1995.

SEGAL J, SCHENKEL LC, OLIVEIRA MH, SALUM GA, BAU CH, MANFRO GG, LEISTNER-SEGAL S. Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) among depressed patients with suicide attempt. **Neurosci Lett.** **451** (1): 79-82, 2009.

SIMON GE. Social and economic burden of mood disorders. **Biol Psychiatry** **54**: 208-15, 2003.

STAHL SM. Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações clínicas. Editora: **Guanabara**, 1998.

STEINER M, DUNN E, BORN L. Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond. **J Affect Disord** **74**: 67-83, 2003.

SURTEES PG, WAINWRIGHT NW, WILLIS-OWEN SA, LUBEN R, DAY NE, FLINT J. Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. **Biological Psychiatry** **59**: 224-229, 2006.

TAYLOR SE, WAY BM, WELCH WT, HILMERT CJ, LEHMAN BJ, EISENBERGERNI. Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology. **Biol Psychiatry** **60** (7): 671-6, 2006.

THE MARCÉ SOCIETY [homepage on the internet]. London: FCP Internet Ltd:c2001 [cited 2003 sep 19]. Available from: <http://www.marcesociety.com/>.

THOMPSON MD *et al.* Serotonin transporter gene polymorphisms in alcohol dependence. **Alcohol** **22** (2): 61-67, 2000.

TORRES GE, GAINETDINOV RR, CARON MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. **Nature Reviews Neuroscience** **4**: 13-25, 2003.

TRELOAR SA, MARTIN NG, BUCHOLZ KK, MADDEN PA, HEATH AC. Genetic influences on post-natal depressive symptoms: findings from an Australian twin sample. **Psychol Med** **29**: 645-654, 1999.

TROUTMAN BR & CUTRONA CE. "Nonpsychotic postpartum depression among adolescent mothers." **J Abnorm Psychol** **99** (1): 69-78, 1990.

VELETZA S, SAMAKOURI M, EMMANOUIL G, TRYPSIANIS G, KOURMOULI N,

LIVADITIS M. Psychological Vulnerability Differences in Students—Carriers or Not of the Serotonin Transporter Promoter Allele S: Effect of Adverse Experiences. **Synapse** **63**: 193–200, 2009.

VICTÓRIA JMN, Correia-Silva JF, Pimenta FJ, Kalapothakis E, Gomez RS. Serotonin transporter gene polymorphism (*5-HTTLPR*) in patients with recurrent aphthous stomatitis. **J Oral Pathol Med** **34** (8): 494-7, 2005.

VIEIRA MEB, CORDEIRO Q, ALVARENGA PG, LEITE PCS, VARGAS NS. Educação em psiquiatria. In: Alvarenga PG, Andrade AG. Fundamentos em psiquiatria. **Manole**, 1ed. 12, 2007.

WATSON S, GALLAGHER P, RITCHIE JC, FERRIER IN, Young AH. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. **Br J Psychiatry** **184**: 496-502, 2004.

WEISSMAN MM, BLAND R, JOYCE PR, NEWMAN S, WELLS JE, WITTCHEN HU. "Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives." **J Affect Disord** **29** (2-3): 77-84, 1993.

WILHELM K, MITCHELL PB, NIVEN H, FINCH A, WEDGWOOD L, SCIMONE A, BLAIR IP, PARKER G, SCHOFIELD PR. Life events, first depression onset and the serotonin transporter gene. **British Journal of Psychiatry** **188**: 210- 215, 2006.

WISNER KL, PARRY BL, PIONTEK CM. "Clinical practice. Postpartum depression." **N Engl J Med** **347** (3): 194-9, 2002.

WISNER KL, HANUSA BH, PEREL JM, PEINDL KS, PIONTEK CM, SIT DK, *et al*. Postpartum depression: a randomized trial of sertraline versus nortriptyline. **J Clin Psychopharmacol** **26**:353-360, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders - Diagnostic Criteria for Research. Geneve,1993.

WOUTERS MM, FARRUGIA G, SCHEMANN M. *5-HT* receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. **Neurogastroenterol Motil** **19**: 5-12, 2007.

YIM IS, GLYNN LM, SCHETTER CD, HOBEL CJ, CHICZ-DEMET A, SANDMAN CA. Risk of Postpartum Depressive Symptoms With Elevated Corticotropin-Releasing Hormone in Human Pregnancy. **Arch Gen Psychiatry** **66** (2):162-169, 2009.

YOUNG SN, GALTHIER S. Effect of tryptophan administration on tryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid and indoleacetic acid in human lumbar and cisternal cerebrospinal fluid. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **44**: 323-328, 1981.

XIE P, KRANZLER HR, POLING J, STEIN MB, ANTON RF, BRADY K, WEISS RD, FARRER L, GELERNTER J. Interactive Effect of Stressful Life Events and the Serotonin Transporter *5-HTTLPR* Genotype on Posttraumatic Stress Disorder Diagnosis in 2 Independent Populations. **Arch Gen Psychiatry** **66** (11):1201-1209, 2009.

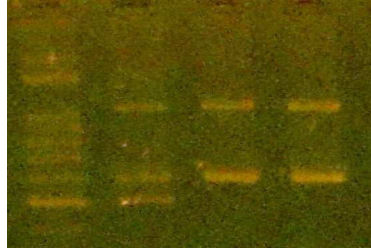
ZALSMAN G, HUANG YY, OQUENDO MA, BURKE AK, HU XZ, BRENT DA, ELLIS SP, GOLDMAN D, MANN JJ. Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. **Am J Psychiatry** **163** (9):1588-93, 2006.

ZINGA D, PHILLIPS SD, BORN L. Postpartum depression: we know the risks, can it be prevented? **Rev Bras Psiquiatr** **27 (supl II)**: 56-64, 2005.

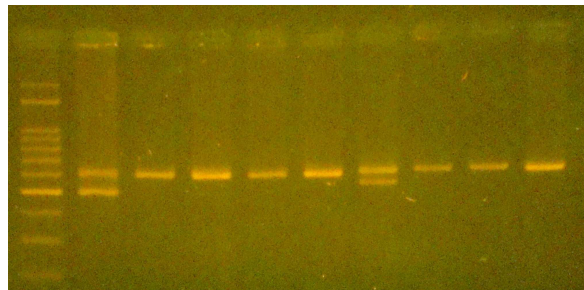




## 9 ANEXOS



**Figura 3.** Foto do gel de agarose contendo os produtos da PCR do polimorfismo 5-*HTTLPR*. À esquerda, posição 1: observamos o marcador de peso molecular de 50 pb, posição 2: heterozigoto L/S e posições 3-4: homozigotos L/L. O alelo longo (L) apresenta banda de 528pb, e o alelo curto (S) apresenta banda de 484 pb. Observamos na parte superior do gel, bandas inespecíficas de aproximadamente 700pb.



**Figura 4.** Foto do gel de agarose contendo os produtos da PCR do polimorfismo 5-*HTTVNTR*. À esquerda, observamos o marcador de peso molecular de 50 pb, posição 2: heterozigoto 9/12, posições 3-6: homozigotos 12/12, posição 7: heterozigoto 10/12 e posições 8-10: homozigotos 12/12. O alelo de 9 repetições apresenta fragmento de 248pb, 10 repetições fragmento de 265pb e 12 repetições fragmento de 299pb.



**10 ARTIGO**

SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE PSIQUIATRIA, NO DIA 19 DE OUTUBRO DE 2010.

19-Oct-2010

Dear Dr. Giovenardi: Your manuscript entitled "Evaluation of the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms in the serotonin transporter gene in women with postpartum depression" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Revista Brasileira de Psiquiatria.

Your manuscript ID is RBP-2010-OA-0309.

**Evaluation of the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms in the serotonin transporter gene in women with postpartum depression**

Josi Maria Zimmermann Peruzatto<sup>a</sup>, Silvana Almeida<sup>b</sup>, Aldo Bolten Lucion<sup>a</sup>, Jean Pierre Oses<sup>c</sup>, Luciana Ávila Quevedo<sup>c</sup>, Karen Amaral Tavares Pinheiro<sup>c</sup>, Ricardo Azevedo da Silva<sup>c</sup>, Ricardo Tavares Pinheiro<sup>c</sup>, Márcia Giovenardi<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde & Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Brazil.

Requests for reprints should be addressed to Márcia Giovenardi, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Sarmiento Leite 245, sala 308, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

E-mail: mgiovenardi@yahoo.com.br; Fone: 00 55 51 33038751

## Resumo

**OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre os polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* no gene do transportador de serotonina (*SLC6A4*) em mulheres brasileiras com diagnóstico para depressão pós-parto (DPP) e presença de sintomas depressivos. **MÉTODOS:** A amostra foi constituída de 207 mulheres, 147 (71,01%) brancas e 60 (28,99%) não-brancas; agrupadas com base na cor da pele e características morfológicas. O Inventário de Depressão de Beck foi utilizado para diagnosticar DPP e para apontar os sintomas depressivos. Os polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* foram analisados pela técnica de PCR. O estudo da associação foi feita apenas nas mulheres brancas. **RESULTADOS:** Quando os polimorfismos foram analisados sem as variáveis ambientais, não foi observada associação entre o diagnóstico de DPP ou os polimorfismos *5-HTTLPR* ( $p=0,48$ ) e *5-HTTVNTR* ( $p=0,77$ ). Mas, analisados em conjunto com os dados sobre seus haplótipos, as análises demonstraram que as mulheres portadoras do diplótipo L-12/L-12 pontuaram menor nos sintomas de depressão quando comparadas com os demais diplótipos ( $p=0,04$ ). **DISCUSSÃO:** Poucos estudos investigaram a associação de polimorfismos no *SLC6A4* com a DPP, e o papel dos polimorfismos *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR* na susceptibilidade para DPP ainda não foi estabelecida. Nossos resultados contribuem para a compreensão da susceptibilidade para DPP.

Palavras-chave: depressão pós-parto, transportador de serotonina, *SLC6A4*, *5-HTTLPR* e *5-HTTVNTR*

## Abstract

**OBJECTIVE:** The purpose of the present study was to evaluate the association between the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms in the serotonin transporter gene (*SLC6A4*) in Brazilian women with postpartum depression (PPD) diagnostic and the presence of depressive symptoms. **METHOD:** The sample consisted of 207 women, 147 (71.01%) white and 60 (28.99%) non-white; women were grouped based on skin color and morphological characteristics. The Beck Depression Inventory was used to diagnose PPD and to score the depressive symptoms. The *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms were analyzed by PCR-based methods. The association study was performed only in the sub-group containing white women. **RESULTS:** When the polymorphisms were analyzed without environmental variables, no association was observed between the PPD diagnosis and either the *5-HTTLPR* ( $p=0.48$ ) or the *5-HTTVNTR* ( $p=0.77$ ) polymorphism. When the polymorphisms were analyzed in conjunction with data regarding their haplotypes, the analyses demonstrated that women carriers of the diplotype L-12/L-12 have a lower depression symptoms score than women with other diplotypes ( $p=0.04$ ). **DISCUSSION:** Few studies have investigated the association of *SLC6A4* polymorphisms with PPD, and the role of *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms in PPD susceptibility has not yet been established. Therefore, our findings linking the haplotypes of these two variants with the depression symptoms score contributes to our understanding of PPD susceptibility.

*Keywords:* postpartum depression, serotonin transporter, *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR*

## Introduction

Postpartum depression (PPD) is the most commonly studied mood disorder; it is similar to major depressive disorder but has its onset within the first 4 to 6 weeks after delivery<sup>1</sup>. A meta-analysis has estimated that PPD is prevalent worldwide and affects 10% to 15% of women<sup>2</sup>. In the Brazilian population, the incidence of maternal depression in the samples studied ranged from 10% to 20%<sup>3</sup>. PPD differs from the baby blues because in most cases it affects the functionality of the mother and endangers the well-being of both mother and baby. PPD can be a devastating disease for the mother, can harm the neurocognitive and socio-emotional development of the child, and can increase the risk of mental and medical disorders in the offspring later in life<sup>4</sup>. PPD is a multifactorial disease; the susceptibility for its development is related to psychological, biological (including hormonal changes and genetic vulnerability) and social factors<sup>5</sup>. The risk for its occurrence is higher in women with a history of major depression<sup>6</sup>, previous PPD<sup>7</sup>, or a family history of depression<sup>8</sup>. Therefore, according to Forty et al.<sup>8</sup>, there is a genetic component of the susceptibility for this disorder.

According to the DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fourth Edition)<sup>1</sup>, there is a relationship between depressive symptoms and changes in the concentration of neurotransmitters, especially serotonin, in the brain. Decreased levels of 5-HT is one of the factors contributing to the etiology of major depression<sup>9</sup>. The serotonin transporter (SERT) is located in the presynaptic membrane of serotonergic neurons, where it controls the intensity and duration of the serotonergic signaling through the re-uptake of this neurotransmitter in the synaptic cleft<sup>10</sup>.

The SERT is encoded by the *SLC6A4* gene located in the 17q11.1-q12 region<sup>11</sup>. The expression of this gene is influenced by its genetic variants. Two polymorphisms are widely studied. The *5-HTTLPR* polymorphism (resulting from an insertion/deletion) is located in the promoter region<sup>12</sup> and has a long allele (L – with an insertion of 44 bp) and short allele (S). The *5-HTTVNTR* polymorphism (containing a variable number of tandem repeats) is in the second intron and has a repetition unit consisting of 17 bp. Three alleles of *5-HTTVNTR* have been described and contain 9, 10 or 12 repetitions)<sup>13</sup>.

*SLC6A4* has been identified as a candidate gene for mood disorders, since several studies have associated *SLC6A4* polymorphisms with the development of major depression<sup>13-16</sup> and bipolar disorder<sup>17</sup>. The best of our knowledge, only two previous studies investigated the association of *SLC6A4* polymorphisms with depression scores in postpartum women<sup>18-19</sup>. These results contradicted studies that evaluated these polymorphisms with respect to mood disorders in other life periods<sup>5,13-15,20-21</sup>. The present study aimed to determine the association between the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms and both the PPD diagnosis and the depressive symptoms score in a group of Brazilian women. These results may impact the treatment of PPD.

## **Materials and Methods**

### **Subjects**

This was a nested cohort study with pregnant women who were recruited from the Brazilian National System of Public Health from 2006 to 2008. All women



seeking prenatal care in the public health system of Pelotas City were visited and invited to participate in the study. The participants were all over 18 years old, lived in the urban area, and were able to understand and answer the sociodemographic questionnaire included in the study. Participants from an Eastern origin were excluded from this study. The sample consisted of 207 women, 147 (71.01%) of which were white women and 60 (28.99%) of which were non-white women. The participants were grouped by their skin color and morphological characteristics as described in Parra et al.<sup>22</sup>. This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (n.270/07) and CONEP (n. 44-08). All subjects signed an informed consent form.

#### **Depressive symptoms access:**

The mothers had received a domiciliary visit to be interviewed and had provided blood samples for genetic analyses between 45 to 90 days after delivery. The Beck Depression Inventory (BDI) in its validated Portuguese version<sup>23</sup> was employed to detect depressive symptomatology in the mother for diagnosis of PPD. A cutoff point of 18 was used to differentiate between mild and moderate/severe depression.

#### **DNA Analyses**

The blood used for DNA extraction was collected by a trained professional in the residence of each participant. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a salting-out procedure<sup>24</sup>. DNA fragments with the *5-HTTVNTR* polymorphism were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the forward primer 5'GTCAGTATCACAGGCTGCGAG3' and the reverse primer

5'TGTTCTAGTCTTACGCCAGTG3' and using the same conditions as previously described<sup>25</sup>. The amplification of the *5-HTTLPR* polymorphism was performed using the forward primer 5'GCGCTCCTGCATCCCCCATTA3' and the reverse primer 5'GGGATGCGGGGAATACTGGT3', which produced a 297 bp (L allele) and 253 bp (S allele) fragment<sup>26</sup>. The genotypes of *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* were determined by separating the amplified products by electrophoresis on a 2.5% agarose gel containing ethidium bromide and using a 50 bp ladder to measure band sizes.

### Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by gene counting. A  $\chi^2$  test for goodness of fit was used to determine whether or not the observed allele frequencies agreed with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. Haplotype frequencies and linkage disequilibrium were estimated using the Multiple Locus Haplotype Analysis program version 2.0<sup>27-28</sup> and Arlequin software version 3.1<sup>29</sup>. The  $X^2$  test with Yates correction was used to compare allele and genotype frequencies of the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms between individuals with a PPD diagnosis (with BDI  $\geq 18$ ) and without a PPD diagnosis (with BDI  $< 18$ ). Because of the lower frequency of the 9/12 genotype (*5-HTTVNTR*) in this sample (only one woman), this woman was excluded from statistical analyses of association of this polymorphism with the PPD diagnosis. The BDI scores were compared between carriers of different diplotypes with Mann-Whitney tests at a significance level of  $p < 0.05$ .

### Results

The genotype frequency distributions of the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms were in agreement with Hardy–Weinberg expectations. Although our

initial sample consisted of 207 women classified as both white and nonwhite, we only included white women in this study for two reasons: white women composed the majority of our sample (71.01%), and previous works showed a difference in the allelic and genotypic frequencies of the *5-HTTLPR* polymorphism in different ethnic groups<sup>30</sup>. The genotype frequencies of the *5-HTTLPR* polymorphism were 17.0% for S/S, 51.0% for L/S and 32.0% for L/L. The genotype frequencies of the *5-HTTVNTR* polymorphism were 0.70% for 9/12, 14.70% for 10/10, 44.0% for 10/12 and 40.60% for 12/12. Linkage disequilibrium was detected between the two polymorphisms (the  $D'$  value was 0.61,  $p=0,003$ ). All four possible haplotypes were found in this sample; the more frequent haplotypes were S-12 (with a frequency of 36.24%), L-10 (29.71%), L-12 (27.17%) and S-10 (6.88%).

The results of the association analyses between the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms and the PPD diagnosis according to the BDI (Beck Depression Inventory) in women are presented in Table 1. When the polymorphisms were analyzed alone, no association was observed between the *5-HTTLPR* ( $p=0.48$ ) and *5-HTTVNTR* ( $p=0.77$ ) polymorphisms and the PPD diagnosis. The information from these analyses combined with information regarding the haplotypes of the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms demonstrated that women carriers of diplotype L-12/L-12 have a lower depression symptoms score (median: 0.5; inter-quartile range: 0.00-4.00;  $p=0.04$ ) than women with other diplotypes (median: 4.0; inter-quartile range: 1.00-10.00 – Figure 1).

## Discussion

The present study analyzed the PPD diagnosis of women between 45 and 90 days after delivery. When PPD was the only diagnostic, with no co-morbidity, did

not reveal an association between *SLC6A4* gene polymorphisms. However, the results indicated that the haplotypes of the *5-HTTVNTR* and *5-HTTLPR* polymorphisms were associated with the depression score.

The relationship between the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms and SERT function and expression is not yet fully understood, although some evidence of this correlation has been previously shown. Heils et al.<sup>31</sup> performed an *in vitro* functional study and demonstrated that the promoter region promoted transcription of the *5-HTTLPR*\*L allele more efficiency than it promoted transcription of the S allele. Therefore, individuals with the L/L genotype expressed more SERT than those with S/L and S/S genotypes. Other studies also associated the presence of the *5-HTTLPR*\*S allele<sup>13-15,32</sup> and the 10 and 12 alleles of the *5-HTTVNTR* polymorphism<sup>17,21</sup> with lower SERT transcription efficiency. Functional magnetic resonance imaging analyses have revealed the reduced volume of the perigenual anterior cingulate cortex and amygdala in carriers of the S allele<sup>32</sup>. Although these studies have advanced the knowledge of the relationship between these polymorphisms and the risk of developing mental disorders such as depression, more information is required to fully understand this relationship.

Some studies have investigated the association of the *5-HTTLPR* polymorphism with mood disorders. According to Pascual et al.<sup>21</sup>, the presence of the S allele was significantly associated with the development of a mental disorder. Caspi et al.<sup>13</sup> determined that individuals carrying the S allele had a higher incidence of child maltreatment and depression in adulthood. Xie et al.<sup>5</sup> found that individuals with one or two copies of the S allele have an increased of developing posttraumatic stress disorder when exposed to adverse environmental events. Moreover, Zalsman et al.<sup>15</sup> demonstrated that individuals who carry the S allele are more reactive to

aversive environmental events associated with the severity of major depression. Wilhelm et al.<sup>14</sup> and Taylor et al.<sup>20</sup> observed that individuals homozygous for the S allele showed greater depressive symptomatology when exposed to stress compared with those harboring the S/L or L/L genotype. Taken together, these studies indicate that the *5-HTTLPR* genotype does not determine the development of the disorder per se. However, when exposed to stressful events, individuals with one or two copies of the S allele are more likely than L/L homozygotes to develop the disorder. Conversely, the results of Chorbov et al.<sup>33</sup> and Laucht et al.<sup>34</sup> suggest an opposite conclusion than as described above. These studies showed that individuals with the L/L genotype who were exposed to adverse environmental events exhibited an increased risk of depression.

Specifically regarding postpartum depression, our results showed no association between the *5-HTTLPR* genotype alone and PPD in white women (Table 1). This conclusion agreed with several studies that found no significant relationship between the *5-HTTLPR* polymorphism and development of mood disorders such as major depression<sup>35</sup>, depression and attempted suicide<sup>36</sup>, depression and stressful life events<sup>37</sup>, and bipolar disorders<sup>38</sup>. Indeed, in a meta-analysis, Risch et al.<sup>16</sup> did not observe that the *5-HTTLPR* genotype alone or in conjunction with stressful events was associated with a risk for depression in both genders.

Our results showed no association between the *5-HTTVNTR* polymorphisms and PPD in white women. Alaerts et al.<sup>38</sup> did not find an association between the *5-HTTVNTR* polymorphisms and bipolar disorder. Assal et al.<sup>39</sup> did not find a relationship between the *5-HTTVNTR* polymorphism and agitation/aggression, depression, or anxiety. However, in a previous study the increased frequency of the *5-HTTVNTR*\* 12 allele was observed in subjects with bipolar disorder but not major

depression<sup>17</sup>. Kumar et al.<sup>40</sup> observed an association between the *5-HTTVNTR\*10* allele and puerperal psychosis.

To the best of our knowledge, only two studies have focused on the relationship between serotonin-related polymorphisms and PPD. Sanjuan et al.<sup>18</sup> reported that at 8 weeks postpartum, high expression of SERT genotypes (L/L of *5-HTTLPR* and 12/12 of *5-HTTVNTR* polymorphisms) was associated with an increase in the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) score. Doornbos et al.<sup>19</sup> indicated that female *5-HTTLPR\* L* carriers trended toward increased depression scores at 6 weeks postpartum. In our study, no significant associations between the *SLC6A4* gene polymorphism and the PPD diagnosis were detected when the analyses were performed separately for each polymorphism (Table 1). When the two genetic variants were analyzed together with the haplotypes, women carrying the L-12/L-12 diplotype showed a lower depression symptoms score (BDI scale) when compared to women carrying other diplotypes (Figure 1). The present data are different than those of Sanjuan et al.<sup>18</sup> However, these two studies are not totally comparable because both the scale for the diagnosis and the postpartum period were different. Additionally, our findings are partially corroborated by several studies that associated the presence of the *5-HTTLPR\*S* allele<sup>13-14-15-20-5</sup> and the *5-HTTVNTR\* 10* allele<sup>39</sup> with mood disorders; in our study, the L-12/L-12 diplotype was associated with a lower depression symptoms score, indicating that this diplotype could protect an individual from developing PPD.

Our findings are important because few studies have investigated the association of haplotypes determined by the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms with PPD. In summary, we present evidence that postpartum women carrying the L-12/L-12 diplotype show less depression symptoms than those carrying

other diplotypes. Moreover, this result implicates genetic variations in the SERT gene on the etiology of PPD. Our study has limitations, such as the moderate sample size and analyses of genetic variants without environmental risk factors. However, the present analyses may be considered an exploratory study for understanding PPD susceptibility in a specific life period, in which stress responses are considerably altered by several factors, the most notable of which are the hormones of the hypothalamus-pituitary-gonad axis.

### **Acknowledgments**

We thank the CNPq for financial support.

## References

1. American Psychiatric Association. DSM IV-TR: Diagnostic and statistical manual of mental disorders-Text revision (Fourth ed.). Washington, D.C.: *American Psychiatric Association*. 2000.
2. Bennett HA, Einarson A, Taddio A, Koren G, Einarson TR. Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. *Am. Coll. Obstet. Gynecol.* 2004;103(4):698–709.
3. Moraes IGS, Pinheiro RT, Silva RA, Horta BL, Sousa PLR, Faria AD. Prevalência da depressão pós-parto e fatores associados. *Rev Saúde Pública.* 2006;40:65-70.
4. Parry BL, Meliska CJ, Sorenson DL, Lopes AM, Martinez LF, Nowakowski S, Elliott JA, Hauger RL, Kripke DF. Plasma Melatonin Circadian Rhythm Disturbances During Pregnancy and Postpartum in Depressed Women and Women With Personal or Family Histories of Depression. *Am J Psychiatry.* 2008;165:1551-1558.
5. Xie R, He G, Koszycki D, Walker M, Wen SW. Prenatal social support, postnatal social support, and postpartum depression. *Annals of Epidemiology.* 2009;19:637-643.
6. Frank E, Kupfer DJ, Jacob M, Blumenthal SJ, Jarrett DB. Pregnancy-related affective episodes among women with recurrent depression. *Am J Psychiatry.* 1987;144:288–293.



7. Payne JL, MacKinnon DF, Mondimore FM, McInnis MG, Schweizer B, Zamoiski RB, McMahon FJ, Nurnberger Jr JI, Rice JP, Scheftner W, Coryell W, Berrettini WH, Kelsoe JR, Byerley W, Gershon ES, DePaulo Jr JR, Potash JB. Familial aggregation of postpartum mood symptoms in bipolar disorder pedigrees. *Bipolar Disord.* 2008;10:38–44.
8. Forty L, Jones L, Macgregor S, Caesar S, Cooper C, Hough A, Dean L, Dave S, Farmer A, McGuffin P, Brewster S, Craddock N, Jones I. Familiality of postpartum depression in unipolar disorder: results of a family study. *Am J Psychiatr.* 2006;163:1549-1553.
9. Meltzer HY, Lowy MT. The serotonin hypothesis of depression. In: Meltzer HY, ed. *Psychopharmacology: the Third Generation of Progress.* Raven Press. 1987;513-26.
10. Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature Reviews Neuroscience.* 2003;4:13-25.
11. Koskela AK, Kaurijoki S, Pietiläinen, KH, Karhunen L, Pesonen U, Kuikka JT, Kaprio J, Rissanen A. Serotonin transporter binding and acquired obesity — An imaging study of monozygotic twin pairs. *Physiology & Behavior.* 2008;93:724-732.
12. Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission-General Section.* 1994;95:157-162.

13. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996;274:1527-1531.

13. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003;301:386-389.

14. Wilhelm K, Mitchell PB, Niven H, Finch A, Wedgwood L, Scimone A, Blair IP, Parker G, Schofield PR. Life events, first depression onset and the serotonin transporter gene. *British Journal of Psychiatry*. 2006;188:210-215.

15. Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, Burke AK, Hu XZ, Brent DA, Ellis SP, Goldman D, Mann JJ. Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. *Am J Psychiatry*. 2006;163(9):1588-93.

16. Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang, KY, Eaves L, Hoh J et al. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: A meta-analysis. *JAMA*. 2009;301:2462-2471.

17. Collier DA, Arranz MJ, Sham P, Battersby S, Vallada H, Gill P, Aitchison KJ, Sodhi M, Li T, Roberts GW, Smith B, Morton J, Murray RM, Smith D, Kirov G. The serotonin transporter is a potential susceptibility factor for bipolar affective disorder. *Neuroreport*. 1996;7(10):1675-9.

18. Sanjuan J, Martin-Santos R, Garcia-Esteve L, Carot JM, Guillamat R, Gutierrez-Zotes A, Gornemann I, Canellas F, Baca-Garcia E, Jover M, Navines R, Valles V, Vilella E, de Diego Y, Castro JA, Ivorra JL, Gelabert E, Guitart M, Labad A, Mayoral F, Roca M, Gratacos M, Costas J, van Os J, de Frutos R. Mood changes after delivery: Role of the serotonin transporter gene. *British Journal of Psychiatry*. 2008;193:383-388.

19. Doornbos B, Dijck-Brouwer J, Kema IP, Tanke MA, van Goor SA, Muskiet FAJ et al. The development of peripartum depressive symptoms is associated with gene polymorphisms of MAOA, 5-HTT and COMT. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2009;33(7):1250-1254.

20. Taylor SE, Way BM, Welch WT, Hilmert CJ, Lehman BJ, Eisenberger NI. Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology. *Biological Psychiatry*. 2006;60: 671-676.

21. Pascual JC, Soler J, Baiget M, Cortés A, Menoyo A, Barrachina J, Ropero M, Gomà M, Álvarez E, Pérez V. Asociación entre el gen del transportador de la serotonina y rasgos de personalidad en pacientes con trastorno límite de la personalidad evaluados mediante el *Zuckerman-Kuhlman Personality Questionnaire* (ZKPQ). *Actas Esp Psiquiatr*. 2007;35(6):382-386.

22. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 200;100,1:177-82.
23. Gzorenstein C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29:453–457.
24. Lahiri DK, Nurnberger JIJr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:5444.
25. Kohen R, Cain KC, Mitchell PH, Becker KJ, Buzaitis A, Millard SP, Navaja GP, Teri L, Tirschwell D, Veith R. Association of Serotonin Transporter Gene Polymorphisms with Post-Stroke Depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2008; 65(11):1296-1302.
26. Koskela AK, Kaurijoki S, Pietiläinen, KH, Karhunen L, Pesonen U, Kuikka JT, Kaprio J, Rissanen A. Serotonin transporter binding and acquired obesity — An imaging study of monozygotic twin pairs. *Physiology & Behavior*. 2008;93:724–732.
27. Long J, Williams R, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56. 1995;799-810.

28. Peterson R, Goldman D, Long J. Nucleotide sequence diversity in non-coding regions of *ALDH2* as revealed by restriction enzyme and SSCP analysis. *Hum Genet.* 1999;104:177-187.
29. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1. 2005; 47-50.
30. Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF Serotonin transporter protein (*SLC6A4*) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. *Hum Genet.* 1997;101:243–246.
31. Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of Neurochemistry.* 1996;66:2621–2624.
32. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR. *5-HTTLPR* polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):828-34.
33. Chorbov VM, Lobos EA, Todorov AA, Heath AC, Botteron KN, Todd RD. Relationship of *5-HTTLPR* genotypes and depression risk in the presence of trauma in a female twin sample. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics.* 2007;144B:830-833.

34. Laucht M, Treutlein J, Blomeyer D, Buchmann AF, Schmid B, Becker K et al. Interaction between the *5-HTTLPR* serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: Evidence from a high-risk community sample of young adults. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2009;12:737-747.
35. Surtees PG, Wainwright NW, Willis-Owen SA, Luben R, Day NE, Flint J. Social adversity, the serotonin transporter (*5-HTTLPR*) polymorphism and major depressive disorder. *Biological Psychiatry*. 2006;59:224-229.
36. Segal J, Schenkel LC, Oliveira MH, Salum GA, Bau CH, Manfro GG, Leistner-Segal S. Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (*5-HTTLPR*) among depressed patients with suicide attempt. *Neurosci Lett*. 2009;451(1):79-82.
37. Veletza S, Samakouri M, Emmanouil G, Trypsianis G, Kourmouli N, Livaditis M. Psychological Vulnerability Differences in Students—Carriers or Not of the Serotonin Transporter Promoter Allele S: Effect of Adverse Experiences. *Synapse*. 2009;63:193–200.
38. Alaerts M, Ceulemans S, Forero D, Moens LN, De Zutter S, Heyrman L, Lenaerts A-S, Norrback K-F, Goossens D, De Rijk P, Nilsson L-G, Adolfsson R, Del-Favero J. Detailed Analysis of the Serotonin Transporter Gene (*SLC6A4*) Shows no Association With Bipolar Disorder in the Northern Swedish Population. *Am J Med Genet Part B*. 2008;150B:585-592.

39. Assal F, Alarcón M, Solomon EC, Masterman D, Geschwind DH, Cummings JL. Association of the Serotonin Transporter and Receptor Gene Polymorphisms in Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 2004;61:1249-1253.
40. Kumar HB, Purushottam M, Kubendran S, Gayathri P, Mukherjee O, Murthy AR, Ghosh S, Chandra P, Reddy YC, Benegal V, Brahmachari SK, Jain S. Serotonergic candidate genes and puerperal psychosis: an association study. *Psychiatr Genet.* 2007;17:253-60.

## Legends

Table 1. Genotypic frequencies of the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms in women with postpartum depression, determined by the Beck Depression Inventory. The number of women (n) is given in parentheses.

Figure 1. Depression symptoms score according to the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphism diplotypes.



Table 1. *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphisms genotypes frequencies in women with postpartum depression according classification of Beck Depression Inventory. The number of women (n) is given between parentheses.

<b>5-HTTLPR</b>				
<b>Genotypes</b>	S/S	L/S	L/L	p
BDI < 18	16.90% (19)	50.40% (57)	32.70% (37)	0.48
BDI > 18	13.30% (2)	66.70% (10)	20.00% (3)	
<b>5-HTTVNTR</b>				
<b>Genotypes</b>	10/10	10/12	12/12	p
BDI < 18	15.10% (16)	41.50% (44)	43.40% (46)	0.77
BDI > 18	9.00% (1)	45.50% (5)	45.50% (5)	

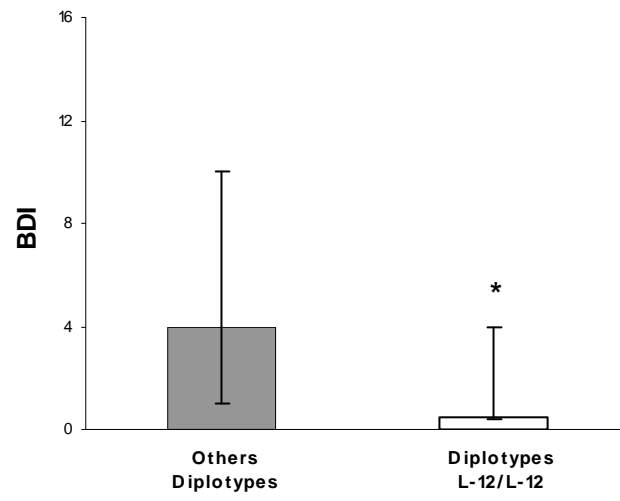


Figure 1. Depression symptoms score according to the *5-HTTLPR* and *5-HTTVNTR* polymorphism diplotypes.