

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO**  
**LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO VAL66MET NO  
GENE DO BDNF COM TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA**

**FERNANDA PEDROTTI MOREIRA**

**PELOTAS, NOVEMBRO DE 2013**

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO**  
**LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO VAL66MET NO  
GENE DO BDNF COM TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA**

**FERNANDA PEDROTTI MOREIRA**

Projeto de pesquisa elaborado para o  
Mestrado em Saúde e Comportamento  
da Universidade Católica de Pelotas, sob  
a orientação da Prof. Dra. Gabriele  
Ghisleni

Pelotas, 2013

## **IDENTIFICAÇÃO**

**Título: Estudo de associação entre o polimorfismo Val66Met no gene do BDNF com Transtorno de Ansiedade Generalizada**

**Mestranda:** Fernanda Pedrotti Moreira

**Orientador:** Prof. Dra. Gabriele Ghisleni

**Instituição:** Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde e Comportamento (PPGSC)

**Data:** Novembro de 2013

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Estratégias de Busca</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Fundamentação Teórica</b> .....	<b>6</b>
3.1 Transtornos de Ansiedade .....	6
3.2 Fator Neurotrófico Derivado do cérebro .....	6
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>8</b>
4.1 Objetivos Gerais .....	8
4.2. Objetivos Específicos .....	8
<b>5. Hipóteses</b> .....	<b>8</b>
<b>6. Metodologia</b> .....	<b>8</b>
6.1 Delineamento do Estudo.....	8
6.2 Amostra .....	9
6.3 Instrumentos de Avaliação e Coleta de dados .....	9
6.4. Aspectos Éticos .....	10
6.5. Análise do Polimorfismo .....	10
6.6. Análise Estatística .....	10
<b>7.0. Cronograma</b> .....	<b>11</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>12</b>
<b>Artigo 1</b> .....	<b>16</b>
Abstract.....	18
Introduction .....	19
Methodology.....	21
Results .....	23
Discussion.....	25
Conclusion.....	28
<b>Anexos</b> .....	<b>40</b>
Anexo A- Termo de consentimento livre e esclarecido .....	41
Anexo B- Entrevista aplicada .....	42
Anexo C- MINI Interview .....	47
Anexo D- Encaminhamento médico.....	48
Anexo E- Aprovação do comitê de ética .....	49

## **1. Introdução**

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é uma doença crônica, caracterizada pelo excesso de ansiedade e preocupação somada à presença de outros sintomas, como tensão muscular, e irritabilidade (Hanrahan et al, 2013; Zargar et al, 2013). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), esse transtorno normalmente inicia na adolescência e afeta cerca de 5,7% da população em geral com altas taxas de incidência em mulheres (Kessler et al, 2005; Tempesta et al, 2013). Além disso, o TAG tem considerável impacto na qualidade de vida, sendo responsável por prejuízos na vida social, profissional e familiar dos seus portadores (Zargar et al, 2013; Tempesta et al, 2013). O TAG, geralmente é acompanhado de comorbidades psiquiátricas como a depressão maior, outros transtornos de ansiedade, e abuso de álcool, sendo caracterizado por altas taxas de falha na terapêutica, o que dificulta a resposta ao tratamento, bem como a resposta a psicoterapia (Zargar et al, 2013; Grant et al, 2005).

O TAG é uma doença complexa na qual ocorre a interação de múltiplos fatores ambientais, biológicos e genéticos, cuja neurobiologia exata permanece ainda desconhecida (Zargar et al, 2013; Chen et al, 2006). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), membro da família das neurotrofinas, age sobre certos neurônios do SNC e periférico, desempenhando um papel importante na sobrevivência, diferenciação e crescimento neuronal durante o desenvolvimento e na idade adulta (Gratacos et al, 2007; Egan et al, 2004). No cérebro está presente em regiões específicas como hipocampo, neocórtex e hipotálamo, regiões-chave na regulação do humor e comportamento, bem como na aprendizagem e memória, indicando um envolvimento direto na patofisiologia das doenças psiquiátricas (Yoshii and Constantine-Paton, 2010; Lu et al, 2008).

Estudos clínicos e pré-clínicos com transtornos de ansiedade demonstram que alterações no gene e nos níveis de BDNF podem estar associados a doença (Hartmann et al., 2001; Rasmusson et al., 2002; Molle et al., 2012). Porém os estudos nesta área são escassos e inconsistentes, mas indicam que indivíduos com TAG apresentam uma maior frequência do alelo Met (Suliman et al, 2013; Ball et al, 2013). Dessa forma, uma melhor compreensão de alguns fatores genéticos envolvidos nos transtornos de ansiedade poderá permitir avanços não só ao nível de tratamento, mas também de

prevenção e diagnóstico, podendo algumas alterações neurobiológicas vir a integrar os critérios de diagnóstico e monitoramento da doença, hoje exclusivamente semiológicos, e contribuir, assim, para a explicação da heterogeneidade desta patologia.

## 2. Estratégias de Busca

As buscas foram realizadas principalmente na base de dados Pubmed, complementadas com referências dos artigos encontrados, de cujo conteúdo utilizaram-se 12 estudos. A estratégia de busca está descrita na tabela abaixo.

Tabela 1. Estratégia de revisão bibliográfica

Base de Dados	Descritores	Artigos Encontrados	Incluídos no Estudo
PubMed	Val66met and (anxiety or GAD)	74	10
PubMed	rs6265 and (anxiety or GAD)	13	4
PubMed	(rs6265 or Val66Met) BDNF levels	120	15
PubMed	Anxiety Disorder and BDNF	354	8
PubMed	Generalized Anxiety Disorder and BDNF	10	6
Artigos encontrados nas referências de estudos		38	7

### **3. Fundamentação Teórica**

#### **3.1. Transtornos de Ansiedade**

Os transtornos de ansiedade são caracterizados como estados emocionais repetitivos ou persistentes nos quais a ansiedade patológica desempenha papel fundamental (Hetem e Graeff, 2004). Além disso, estão associados a um intenso grau de incapacidade e baixo nível de satisfação e qualidade de vida (Ball et al., 2013; Tempesta et al, 2013).

O estudo realizado pelo National Comorbidity Survey (NCS), com diagnóstico baseado na CID-10, confirmou uma prevalência ao longo da vida de 24,9% para os transtornos ansiosos, incluindo fobias específicas da infância e adolescência (Kessler et al.,2000). No Brasil, a prevalência dos transtornos de ansiedade em serviços primários de saúde está entre 26,7% e 39,6% do total dos pacientes atendidos e é duas vezes mais comum em mulheres (Bernik, 2001).

De acordo com o DSM-IV, os transtornos de ansiedade são classificados em TAG, transtorno de pânico com e sem agorafobia, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo compulsivo (TOC), transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Em relação a diagnósticos específicos, o transtorno de ansiedade mais comum é o TAG, o qual normalmente inicia na adolescência e afeta cerca de 5,7% da população mundial (Tempesta et al, 2013; Hetem e Graeff, 2004). O TAG é caracterizado por preocupação e ansiedade excessiva que ocorre na maior parte dos dias por pelo menos 6 meses. Além disso, está associado a manifestação de sintomas somáticos, com múltiplas queixas físicas como fadiga, irritabilidade, tensão muscular e dificuldade de concentração (DSM-IV).

Comorbidades psiquiátricas são comuns em indivíduos com TAG. Aproximadamente 29-62% dos indivíduos apresentam depressão maior e 38% abuso de álcool (38%), dificultando o diagnóstico específico e prejudicando o tratamento (Witcher et al, 2002), além de gerar um intenso grau de incapacidade e um impacto negativo na qualidade de vida (Kessler et al, 2000).

#### **3.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)**

O BDNF é uma neurotrofina importante na regulação de diversos aspectos do desenvolvimento e funções neuronais incluindo sobrevivência, neurogênese e plasticidade sináptica (Keller et al., 2010). O BDNF está amplamente distribuído no

SNC em regiões importantes para os processos envolvidos na aprendizagem, memória e padrões comportamentais (Gratacos et al, 2010; Pregelj et al, 2011). Alterações na expressão do BDNF podem reduzir a plasticidade neuronal e, portanto, dificultar a adaptação a eventos estressores, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurológicas, como o transtorno bipolar, epilepsia, depressão e suicídio (Egan et al, 2004). Essas modificações podem ocorrer por uma série de respostas como os níveis de glicocorticoides, esteroides sexuais e exercícios físicos (Lou et al, 2008).

Estudos atuais demonstram que os níveis de BDNF no soro são significativamente menores nos indivíduos com TEPT e TOC quando comparados com controles saudáveis (Dell’Osso et al, 2011; Dos Santos et al, 2011). Por outro lado, Hauck e colaboradores (2010), encontraram níveis aumentados de BDNF em pacientes com trauma recente (menos de um ano desde o evento traumático).

Estudos recentes têm demonstrado ainda que o polimorfismo rs6265 no gene do BDNF, o qual decorre da substituição de uma base guanina por uma adenina na posição 196, levando a uma troca do aminoácido valina por uma metionina no códon 66 (Val66Met), pode estar associado à maior susceptibilidade aos distúrbios psiquiátricos (Gratacos et al, 2010; Tempesta et al, 2013). A presença do polimorfismo promove uma alteração funcional em que há uma diminuição do tráfego intracelular e diminuição da secreção de BDNF (Egan et al., 2003; Miyajima et al. 2008), conferindo uma redução no dos níveis no sistema límbico (Chen et al., 2006; Gat et al. 2009.). Essas alterações tem sido relatadas em estudos de neuroimagem envolvendo indivíduos com doenças psiquiátricas (Karamohamed et al., 2005; Nagata et al., 2012; Chi et al, 2010; Gruber et al., 2010; Chen et al, 2006; Sun et al., 2012; Skibinska et al., 2004).

Este polimorfismo foi associado com transtorno bipolar, transtornos alimentares, transtorno ao uso de substâncias e esquizofrenia (Gratacos et al, 2010), porém sem resultados consistentes em relação a comportamentos ansiosos. Estudos pré-clínicos indicam que esse polimorfismo pode estar implicado no comportamento ansioso. Chen et al, 2006 gerou uma variante do polimorfismo no gene do BDNF em ratos, encontrando que portadores Met/Met tiveram aumento no comportamento relacionado a ansiedade, sustentando a hipótese de que o BDNF tem características neurobiológicas que o tornam um gene candidato de risco para a regulação da ansiedade. Estudos em humanos são escassos, mas sugerem que o alelo Met pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade (Jiang et al, 2005, Hemmings et al, 2008).

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

Estudar a associação entre o polimorfismo rs6265 (Val66Met) no gene que codifica o BDNF com o diagnóstico de TAG.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar a amostra populacional em estudo quanto às características sócio-demográficas e a distribuição dos genótipos.
- Verificar a associação do polimorfismo Val66Met com transtorno de ansiedade generalizada

## **5. Hipótese**

- Ausência de associação entre o polimorfismo Val66Met com características sócio-demográficas.
- Encontraremos uma associação positiva entre o polimorfismo Val66Met no gene do BDNF com transtorno de ansiedade generalizada, na qual indivíduos com TAG apresentarão maior frequência do alelo A em relação aos controles.

## **6. Metodologia:**

### **6.1. Delineamento do estudo**

O estudo segue um delineamento do tipo transversal de base populacional da zona urbana de Pelotas-RS, e faz parte de um estudo maior em andamento intitulado “Estudo do temperamento e transtornos psiquiátricos na interface entre psiquiatria, psicologia e neurociências”, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica de Pelotas, protocolo 2010/15.

## **6.2. Amostra**

A seleção amostral encontra-se em andamento sendo realizada por conglomerados, considerando a população de aproximadamente 97 mil adultos de 18 a 35 anos de idade e a divisão censitária atual de 448 setores na cidade de Pelotas-RS, ambos fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O tamanho amostral com parâmetros de confiabilidade de 95%, poder de 80%, prevalência do desfecho de 10% e menor prevalência esperada de 8% é de 1714 adultos, a serem avaliados em 68 setores censitários. O cálculo do tamanho amostral realizado com o objetivo de determinar o tamanho mínimo necessário para que seja detectada uma diferença entre os portadores das diferentes variantes genéticas que serão analisadas foi realizado pelo programa PEPI Win, utilizando um intervalo de confiança de 95% e tomando como base o alelo de menor frequência do polimorfismo rs6265 (18%) na população europeia visando encontrar uma diferença significativa ( $\alpha=0.05$ ). Baseado no tamanho amostral de 1714, a amostra inicial será de 201 controles e 201 pacientes com depressão. Os critérios de inclusão adotados serão: 1) ter entre 18 e 35 anos de idade; 2) residir na zona urbana de Pelotas-RS; bem como no domicílio sorteado; 3) aceitar participar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Quanto aos critérios de exclusão consta a incapacidade dos indivíduos em responderem à entrevista por problemas físicos ou cognitivos.

## **6.3. Instrumentos de avaliação e coleta de dados**

As características da amostra serão determinadas através do questionário sócio-demográfico, incluindo avaliação socioeconômica. Os transtornos psiquiátricos de Eixo I do DSM-IV serão avaliados através do Mini Internacional Neuropsychiatric Interview (MINI), para confirmação do diagnóstico de depressão.

A coleta do material biológico será realizada pela equipe de bioquímicos e enfermeiros através de punção venosa no momento da aplicação do questionário, no qual entrevistadores treinados (psicólogos ou psiquiatras) aplicam os instrumentos e avaliação diagnóstica.

#### **6.4. Aspectos éticos**

Serão respeitados todos os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nº 196 de 10 de Outubro de 1996. Será assegurado o direito à confidencialidade dos dados e o cuidado na utilização das informações nos trabalhos escritos, de modo que os participantes não possam ser identificados. As pessoas que apresentarem transtornos psiquiátricos receberão encaminhamento para atendimento psicológico/psiquiátrico no Campus da Saúde da UCPel.

#### **6.5. Análise do polimorfismo**

O DNA total será extraído a partir de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o método descrito por Lahiri e Nurnberger (1987). Após a extração, o DNA total será quantificado por espectrofotometria e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise molecular. O polimorfismo rs6265 (Val66Met) será genotipado utilizando-se ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real no termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). *Primers* e sondas do tipo *TaqMan MGB* serão designados utilizando-se o software *Primer Express v3.0* e a sequência consenso do gene obtida a partir do *GeneBank* ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih)). As reações de PCR serão realizadas utilizando-se o tampão *TaqMan Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems), 900nmol/l de cada *primer*, 200nmol/l cada sonda (VIC e FAM) e 2ng de DNA, conforme determinações do fabricante. Os resultados serão analisados no software *System Sequence Detection v.1.4* (Applied Biosystems).

#### **6.6. Análise estatística**

Os questionários serão digitados e codificados diretamente no programa EpiInfo6, no momento da entrevista, sem necessidade de usar questionário de papel. As frequências genotípicas e alélicas serão estimadas por contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg, será testado pelo teste de qui-quadrado. As distribuições alélicas e genotípicas entre os grupos de indivíduos serão avaliadas pelo qui-quadrado. Uma medida de magnitude de efeito será calculada através da razão de chances (odds ratio – OR) e intervalo de confiança de 95%. Para a comparação de variáveis contínuas com distribuição normal entre os grupos de pacientes serão utilizados o teste *t de*

*Student* ou análise da variância (ANOVA), e o teste do qui-quadrado para comparação entre variáveis nominais. Valores de  $p \leq 0,05$  serão considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas serão realizadas através do pacote estatístico SPSS 16.0 para Windows.

## 7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	1º Semestre 2012	2º Semestre 2012	1º Semestre 2013	2º Semestre 2013
Revisão Bibliográfica				
Elaboração do Projeto				
Análise do Polimorfismo (PCR)				
Coleta dos dados				
Análise dos dados				
Elaboração do Artigo				
Apresentação do artigo				

## Referências Bibliográficas:

1. American Psychiatric Association. DSM-IV: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Artmed, Porto Alegre, 2002.
2. Ball S, Marangell LB, Lipsius S, Russell JM. Brain-derived neurotrophic factor in generalized anxiety disorder: Results from a duloxetine clinical trial. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013;43: 217–221.
3. Bernik MA, Minuttag NW. Farmacoeconomia In: Hetem LA, Graeff FG. Transtornos de ansiedade. São Paulo: Edit Atheneu, 2004;18:409-19
4. Chen ZY, Jiang D, Bath K et al. Genetic Variant BDNF (Val66Met) Polymorphism Alters Anxiety- Related Behavior. *Science* 2006; 314 (5796): 140-143.
5. Chi MH, Chang HH, Lee SY, et al. Brain derived neurotrophic factor gene polymorphism (Val66Met) and short-term antidepressant response in major depressive disorder. *J Affect Disord* 2010;126(3):430-435.
6. Dell’Osso L, Carmassi C, Del Debbio A, et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels in patients suffering from post-traumatic stress disorder. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(5):899–902.
7. Dos Santos I, Ciulla L, Braga D, et al. Symptom Dimensional Approach and BDNF in Unmedicated Obsessive-Compulsive Patients: An Exploratory Study. *CNS Spectr.*2011:579-588.
8. Egan M, Kojima M, Callicot JH et al. The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell*, 2004; 112: 257–269
9. Gatt JM, Nemeroff CB, Dobson-Stone C, et al. Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Molecular Psychiatry* 2009; 14(7):681–695.
10. Grant BF, Hasin DS, Stinson FS, et al. Prevalence, correlates, co-morbidity, and comparative disability of DSM-IV generalized anxiety disorder in the USA: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychol Med.* 2005; 35(12):1747-1759.

11. Gratacos M, Gonzales JR, Mercader JM et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met and Psychiatric Disorders: Meta-Analysis of Case-Control Studies Confirm Association to Substance-Related Disorders, Eating Disorders, and Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007; 61:911–922.
12. Gruber O, Hasan A, Wobrock T et al. Association of the brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism with magnetic resonance spectroscopic markers in the human hippocampus: in vivo evidence for effects on the glutamate system. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2012; 262(1):23–31.
13. Hanrahan F, Field AP, Jones FWA et al. A meta-analysis of cognitive therapy for worry in generalized anxiety disorder. *Clinical Psychology Review* 33 (2013) 120–132.
14. Hartman M, Heumann R, Lessmann V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* 2001;20(21):5887-5897.
15. Hauck S, Kapczinski F, Roesler R, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34(3):459–462.
16. Hemmings SMJ, Kinnear CJ, Van der Merwe L et al. Investigating the role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) val66met variant in obsessive-compulsive disorder (OCD). *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2008; 9(2): 126-134
17. Hetem LA, Graeff FG. *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Ed. Atheneu; 2004.
18. Jiang X, Xu K, Hoberman J, et al. BDNF Variation and Mood Disorders: A Novel Functional Promoter Polymorphism and Val66Met are Associated with Anxiety but Have Opposing Effects. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30, 1353–1361
19. Karamohamed S, Latourelle JC, Racette BA, et al. BDNF genetic variants are associated with onset age of familial Parkinson disease: GenePD Study. *Neurology* 2005;65(11):1823-1825.

20. Keller, S.; Sarchiapone, M.; Zarrilli, F., et al., Increased Bdnf Promoter Methylation In The Wernicke Area Of Suicide Subjects. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67 (3).
21. Kessler R, Berglund P, Demler O et al. Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62:593-602
22. Kessler RC. The epidemiology of pure and comorbid generalized anxiety disorder: a review and evaluation of recent research. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 2000;102(406):7-13.
23. Lou, S.; Liu, J.; Chang, P. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Research*, 1210: 48-55, (2008)
24. Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(3):312-23.
25. Miyajima F, Ollier W, Mayes A, et al. Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly. *Genes Brain Behav*. 2008;7(4):411-7.
26. Molle RD, Portella AK, Goldani MZ, et al. Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. *Transl Psychiatry* 2012; 2(11):e195
27. Nagata T, Shinagawa S, Nukariya K, et al. Association between BDNF polymorphism (Val66Met) and executive function in patients with amnesic mild cognitive impairment or mild Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2012;33(4):266-272.
28. Pregelj P, Nedic G, Paska AV, Zupanc T, Nikolac M, Balazic J, et al. The association between brain-derived neurotrophic factor polymorphism (BDNF Val66Met) and suicide. *J Affect Disord*, Feb;128(3):287-90, 2011.
29. Rasmusson AM, Shi L, Duman R. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27(2):133-142.
30. Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, et al. Association analysis of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. *World J Biol Psychiatry* 2004; 5(4): 215–220.

31. Suliman S, Hemmings SMJ, Seedat S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integ Neurosci* 2013;7:55.
32. Sun MM, Liu LF, Yang LM, et al. Association study of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and clinical characteristics of first episode schizophrenia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Za Zhi* 2012; 29(2):155-159.
33. Tempesta D, Mazza M, Serroni N, et al. Neuropsychological functioning in young subjects with generalized anxiety disorder with and without pharmacotherapy. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013;45:236–241.
34. Wittchen HU, Kessler RC, Beesdo K, Krause P, Hofler M, Hoyer J. Generalized anxiety and depression in primary care: prevalence, recognition, and management. *J Clin Psychiatry* 2002;63(suppl 8):24-34.
35. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010;70:304–322.
36. Zargar F, Farid AA, Omid A et al. Comparing the effectiveness of acceptance-based behavior therapy and applied relaxation on acceptance of internal experiences, engagement in valued actions and quality of life in generalized anxiety disorder. *J Res Med Sci* 2013; 18(2): 118-122

## **ARTIGO 1**

MS submitted as an Original Report to the *Depression and Anxiety*

November 15<sup>th</sup>, 2013

**Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF levels in generalized anxiety disorder.**

Fernanda Pedrotti Moreira<sup>1</sup>, Júlia Damé Fabião<sup>1</sup>, Guilherme Bittencourt<sup>1</sup>, Carolina David Wiener<sup>1</sup>, Karen Jansen<sup>1</sup>, Jean Pierre Oses<sup>1</sup>, Luciana de Ávila Quevedo<sup>1</sup>, Luciano Dias de Mattos Souza<sup>1</sup>, Daisy Crispim Moreira<sup>3</sup>, Ricardo Tavares Pinheiro<sup>1</sup>, Diogo Rizzato Lara<sup>2</sup>, Manuella Pinto Kaster<sup>1</sup>, Ricardo Azevedo da Silva<sup>1</sup>, Gabriele Ghisleni<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento – Universidade Católica de Pelotas; <sup>2</sup> Biologia Celular e Molecular – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; <sup>3</sup> Serviço de Endocrinologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

\* Corresponding Author

Gabriele Ghisleni (ghisleni.g@gmail.com)

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Rua Gonçalves Chaves 373

96015560

Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Phone: +55 53 2128 8031

FAX: +55 53 2128 8229

**Running title:** Val66Met polymorphism in anxiety disorder

**Key words:** Anxiety disorders, generalized anxiety disorder, brain-derived neurotrophic factor, Val66Met polymorphism, neurotrophin.

## **Abstract**

**Background:** Generalized Anxiety Disorder (GAD) is a common psychiatric disorder characterized by long term worry, tension, nervousness, fidgeting and symptoms of autonomic system hyperactivity. The neurobiology of this disorder is still unclear, although it has been consistently demonstrated that the environment and the genetic profile could increase its risk. We examined whether a polymorphism in the BDNF gene, which plays a role in neuroplasticity and memory, could increase the vulnerability to this disorder. **Methods:** In our study, 816 subjects from a population-based study were genotyped by qPCR for the BDNF functional variant rs6265 (Val66Met) and the BDNF serum levels were measured by ELISA.

**Results:** Our results revealed a significant association between the Met allele and risk for GAD ( $p=0.014$ ), but no differences were observed in the serum levels of BDNF according to diagnosis ( $p=0.531$ ) or genotype distribution ( $p=0.197$ ). The interaction between Val66Met genotype and GAD in explaining serum BDNF levels approached significance ( $F=3.93$ ;  $p=0.048$ ). The logistic regression analysis confirmed the independent association of Met allele as a risk factor to develop GAD after adjusting for confounders ( $\beta=1.92$ ; 95% IC: 1.168-3.16;  $p=0.010$ ).

**Conclusion:** These results suggest that BDNF could be involved in the neurobiology of GAD and might represent a useful marker associated with the disease.

**Key words:** Anxiety disorders, generalized anxiety disorder, brain-derived neurotrophic factor, BDNF serum levels, Val66Met polymorphism.

## 1. Introduction

Generalized Anxiety Disorder (GAD) is characterized by a feeling of persistent worry that hinders an individual's ability to relax, and was related to physical, cognitive, and social concerns (American Psychiatric Association, 1994). Along with mood disorders, GAD has a high contribution to morbid-mortality through a negative impact on the life of patients, seriously damaging the daily function (Weisberg *et al.*, 2013). GAD usually begins in the adolescence and affects about 5.7% of the general population across the lifespan, with the highest incidence among women (Tempesta *et al.*, 2013). There is also a high comorbidity between several classes of anxiety and with other mental disorders, such as depression and alcohol/substance dependence (Weisberg *et al.*, 2013; Enoch *et al.*, 2008).

The physiopathology of GAD is unknown, but a body of evidence suggests a complex interaction between susceptibility genes, environmental stressors and biochemical mechanisms (Enoch *et al.*, 2008; Gatt *et al.*, 2009). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), is a member of the neurotrophin family involved in several forms of plasticity in the nervous system, including neuronal maturation and synaptic remodeling (Yoshii and Constantine-Paton, 2010). The involvement of BDNF in the pathophysiology of psychiatric disorders is mainly supported by the inverse correlation found between stress, psychiatric symptoms and the levels of this neurotrophin in limbic regions, which are restored after antidepressant treatment (Duman and Monteggia, 2006; Hartmann *et al.*, 2001). Indeed, BDNF is involved in anxiety-like behaviors in preclinical models, and numerous types of stressors reduced BDNF expression in different brain areas (Hartmann *et al.*, 2001; Rasmusson *et al.*, 2012; Dalle Molle *et al.*; 2012). In addition, it is well established that BDNF is a key mediator of synaptic

plasticity in fear circuits and recent research suggested that extinction learning, potentially involved in pathological anxiety, may be modulated by genetic variation in BDNF (Andero and Ressler, 2012; Fullana *et al.*, 2012).

The single nucleotide polymorphism (SNP) Val66Met (rs6265) is found in the coding region of BDNF gene and results in a valine to methionine change at position 66 (Gratacos *et al.*, 2008; Gatt *et al.*, 2009). This polymorphism is associated with a decrease in intracellular trafficking and activity-dependent secretion of BDNF (Egan *et al.*, 2003; Szeszko *et al.*, 2005). Besides this functional alteration, the Met allele of this SNP was also associated with morphological changes in the brain, especially volume reductions in areas strongly involved in the regulation of cognitive and emotional behavior such as hippocampus, prefrontal cortex, and amygdale (Szeszko *et al.*, 2005; Miyajima *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2004).

Epidemiological studies investigated an association between this BDNF polymorphism and several neuropsychiatric disorders. The presence of the Met allele increased susceptibility to psychiatric conditions including, GAD (Karamohamed *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2010; Skibinska *et al.*; 2004). On the other hand, a meta-analysis failed to find significant associations between the Val66Met SNP and anxiety disorders (Frustaci *et al.*, 2008). Thus, association studies attempting to link the Val66Met SNP with affective/anxiety disorders have inconsistent results (Enoch *et al.*, 2008; Frustaci *et al.*, 2008, Surtees *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2011). Since the neurobiological mechanisms linking anxiety disorders and BDNF have been scarcely studied, our aim was to investigate the impact of the genotype and peripheral levels of BDNF in the diagnosis of GAD. In the present study, we evaluated the role of the

functional Val66Met SNP, serum BDNF levels and the vulnerability to GAD in a population-based study.

## **2. Methods**

### **2.1. Subjects**

This cross-sectional study was carried out in 816 subjects participating in a population-based study with people between 18–35 years old, living in urban Pelotas, Southern Brazil in the period of June 2011 to May 2013. Sample selection was performed by multistage clusters, considering a population of 97,000 people in that age range in the current census of 495 sectors in the city. In order to ensure the necessary sample inclusion, 82 census-based sectors were systematically drawn. After identification, home visits were conducted in the morning and subjects answered a standard questionnaire to collect socio-demographic information, life style, psychiatric medication and comorbidities. Ethnicity and the use of psychiatry medication were self-reported. It is important to highlight that our sample consisted of young subjects possibly experiencing early stages of the illnesses and with a very low use of psychiatric medication.

All subjects were evaluated with a structured diagnostic interview—Mini International Neuropsychiatric Interview- MINI (Sheehan *et al.*, 1998), which uses the DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) as criterion for psychiatric diagnoses. The study was approved by the University’s Ethics Committee (2010/15) and all patients provided written informed consent to participate.

### **2.2. Biochemical assay**

Blood samples were obtained by venipuncture immediately after the clinical interview. The blood was immediately centrifuged at 3,500 x g for 15 min and serum isolated was kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Serum levels of BDNF were measured using a BDNF immunoassay kit (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., USA). Serum BDNF levels were expressed in ng/mL. All samples and standards were measured in duplicates and the coefficient of variation was less than 5%.

### **2.3. Molecular analyses**

DNA was extracted from peripheral blood leucocytes by a standardized salting-out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). Genotyping of the Val66Met polymorphism (rs6265) of the *BDNF* gene was determined using forward (GGCTTGACATCATTGGCTGAC) and reverse (GGTCCTCATCCAACAGCTCTT) primers and probes contained in the Human Custom TaqMan Genotyping Assay 40x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). One allelic probe was labeled with VIC dye and the other was labeled with FAM dye. The reactions were conducted in a 96-well plate, in a total 20  $\mu\text{l}$  reaction volume using 2 ng of genomic DNA, TaqMan Genotyping Master Mix 1x (Applied Biosystems), and Custom TaqMan Genotyping Assay 1x. The plates were then positioned in a real-time PCR thermal cycler (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems) and heated for 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , followed by 45 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Fluorescence data files from each plate were analyzed using automated allele-calling software (SDS 2.1; Applied Biosystems).

### **2.4 Statistical analyses**

Allelic frequencies were determined by gene counting and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using  $\chi^2$ -tests. Comparisons of allelic and

genotypic frequencies among groups of patients were evaluated using  $\chi^2$ -tests. Socio-demographic characteristics according to clinical diagnostic and genotypes were compared by using unpaired Student's t-test or  $\chi^2$ , as appropriate. Variables with normal distribution were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or percentage. Serum BDNF levels showed skewed distribution and were logarithmically transformed before analyses by unpaired Student's t-test and Two-Way ANOVA.

Logistic regression analysis was performed with the presence of GAD as dependent variable and gender, tobacco, psychiatric medication, socioeconomic class, mood disorder and Val66Met genotypes as independent variables. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical Program for Social Sciences (SPSS) 21.0 was used to perform the statistical analysis and values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

### **3. Results**

A total of 816 subjects were included in this report with 695 controls and 121 subjects diagnosed with GAD. Table 1 shows socio-demographic and clinical characteristics of the subjects according to the diagnosis. Our results reveal no difference between control and the GAD groups for ethnicity ( $p=0.510$ ), age ( $p=0.168$ ), body mass index (BMI) ( $p=0.354$ ), alcohol users ( $p=0.075$ ) and serum BDNF levels ( $p=0.531$ ). However, GAD was more prevalent in women ( $p \leq 0.001$ ), in subjects with lower socioeconomic class ( $p=0.003$ ), and with psychiatric comorbidity ( $p \leq 0.001$ ) and tobacco ( $p \leq 0.001$ ). Although the population of this study had low use of psychiatric

medication (14.9%), the use was higher between GAD subjects when compared to control ( $p \leq 0.001$ ), but no association was found for serum BDNF levels between medicated ( $7.20 \pm 2.43$  ng/mL) and non-medicated subjects ( $7.53 \pm 2.15$  ng/mL;  $p=0.542$ ).

In the whole sample, BDNF Val66Met genotypic distribution was 71.3% (n=582) homozygous Val/Val, 26.5% (n=216) heterozygous Val/Met, and 2.2% (n=18) homozygous Met/Met. The genotypic frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-

Weinberg equilibrium (HWE) for the BDNF polymorphism ( $\chi^2=0.01$ ;  $p>0.05$ ). In table 2, our

results showed that genotypic distributions of Val66Met polymorphism did not differ according clinical diagnostic of GAD and control group ( $p=0.029$ ). Similarly, no difference was demonstrated for allelic frequency between GAD and control group, respectively (21% and 15% for Met allele;  $p=0.157$ ). We analyzed the recessive model (Val/Val vs Val/Met and Met/Met) showing that the percentage of Met allele carriers differ between diagnosis with higher frequency in GAD subjects (38.0%) than control group (27.1%) ( $p=0.014$ ; Table 2).

Since one copy of the Met allele might induce both functional and morphological changes in the brain, further analysis was carried out in a recessive model. In this context, we demonstrated that socio demographic characteristics, psychiatric comorbidities and BDNF levels did not differ according to the genotype distribution (Table 3). However, the Met allele was significantly higher in caucasian ethnicity (30.7%) than in non-caucasian group (22.1%;  $p=0.022$ ).

Although no differences in serum BDNF levels were found according to diagnosis of GAD or genotypic distribution, the interaction between Val66Met

genotype and GAD in explaining serum BDNF levels approached significance ( $F=3.93$ ;  $p=0.048$ ) (Figure 1). The logistic regression analysis confirmed the independent association of Met allele as a risk factor to develop GAD after adjusting for sex, socioeconomic class, tobacco, mood disorders, and psychiatric medication ( $\beta=1.92$ ; 95% IC: 1.168-3.16;  $p=0.010$ ).

#### **4. Discussion**

The present study showed that the Met allele of the rs6265 polymorphism in BDNF gene confers risk for GAD. BDNF serum levels did not differ between diagnosis and genotypic distribution, but after sample stratification according to clinical diagnostic of GAD, Met66 variant was significantly associated with increased serum BDNF levels in subjects with GAD.

Studies have suggested that peripheral BDNF levels might be a biomarker for neuropsychiatric disorders, although there is no consensus in the literature (Gratacos *et al.*; 2008; Dos Santos *et al.*, 2011; Dell'Osso *et al.*, 2009; Hauck *et al.*, 2010). Until now, few clinical studies have investigated the relation between BDNF protein levels and GAD. In this context, peripheral levels of BDNF were lower in subjects with posttraumatic stress disorder (PTSD) and obsessive-compulsive disorder (OCD) when compared to control groups without anxiety disorders (Dos Santos *et al.*, 2011; Dell'Osso *et al.*, 2009; Hauck *et al.*, 2010). In fact, a recent meta-analysis showed that lower levels of BDNF are consistently found in OCD patients, in relation to other anxiety disorders, suggesting distinct biological and neurochemical features of this disorder (Suliman *et al.*, 2013). In addition, levels of BDNF were higher in subjects with recent trauma in comparison to the group with remote trauma, pointing to

important changes in the BDNF levels over time or according to the disease stage (Hauck *et al.*, 2010). On the other hand, recent studies failed to find differences in BDNF levels in distinct subtypes of anxiety disorders (Bonne *et al.*, 2011; Molendijk *et al.*, 2012; Ball *et al.*, 2013). Similarly, our results showed that BDNF protein levels were not associated with GAD, and we assume in the present study, that variants in the BDNF gene could be influencing the levels of BDNF.

Besides the evaluation of peripheral BDNF levels, a series of studies investigated the potential risk of the functional Val66Met polymorphism in the BDNF gene in the vulnerability for anxiety disorders (Enoch *et al.*, 2008; Gatt *et al.*, 2009; Egan *et al.*; 2003, Frustaci *et al.*, 2008). Some studies have reported that the Met variant of the polymorphism increases the risk for developing psychiatric disorders, such as mood disorders, eating disorders, and schizophrenia (Gratacos *et al.*, 2008; Schumacher *et al.*, 2005). Furthermore, in agreement with clinical studies in which the Met allele conveys risk for anxiety disorders,(Enoch *et al.*, 2008; Gatt *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2005; Hashimoto, 2007; Tocchetto *et al.*, 2011) our results reveal a higher prevalence of this allele in subjects diagnosed with GAD. Indeed, both preclinical and clinical studies showed that the presence of the Met allele impaired memory extinction to a conditioned fear response. This behavioral effect may play a role in anxiety disorders leading to impaired learning of cues that signal safety versus threat (Soliman *et al.*, 2010). On the other hand, a recent meta-analysis reported that the Val66Met polymorphism does not appear to be relevant for the anxiety disorder, (Suliman *et al.*, 2013) showing that literature data is still limited regarding the potential of variations in *BDNF* gene and GAD (Enoch *et al.*, 2008; Gatt *et al.*, 2009; Tocchetto *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2004; Zai *et al.*, 2005; Tükel *et al.*, 2012).

To our knowledge this study is the first to show that Met allele in GAD subjects is associated with higher serum levels of BDNF. These findings suggest a compensatory mechanism for low efficiency of intracellular BDNF trafficking and secretion reported to Met allele. It is important to highlight that the Met variant was recently identified to induce an increase in BDNF protein levels in healthy subjects (Lang *et al.*, 2009; Bus *et al.*, 2012). However, in our study, this effect seemed to be dependent on clinical diagnosis for GAD, and more studies are necessary in order to investigate the potential regulatory mechanisms of Met allele in BDNF production and secretion.

BDNF is an important factor involved in memory processing in anxiety and mood disorders (Enoch *et al.*, 2008; Nagata *et al.*, 2012). Based on animal studies, the increase in BDNF levels is implicated in emotional and fear memory formation and consolidation through increased BDNF gene expression and activation of its high-affinity TrkB receptor in the amygdala, hippocampus and prefrontal cortex (Takei *et al.*, 2011). BDNF-induced changes in the hippocampus may also play a role in stress-related pathology, since BDNF infusion in the hippocampus leads to anxiogenic effect in rats by enhancing the serotonergic signaling mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Casarotto *et al.*, 2012). Therefore, although the Met variant has been hypothesized to decrease the activity dependent BDNF secretion but not the constitutive one, the up regulation of peripheral BDNF concentrations in the Met allele carriers might compensate a defective intracellular protein signaling (Egan *et al.*, 2003).

The studies correlating BDNF and GAD are controversial, specially due to heterogeneity in sample characteristics, methodology, measures of the outcome, and the relatively small number of participants in most of them (Frustaci *et al.*, 2008). Some strengths and limitations should be taken into consideration when interpreting these

results. Firstly, GAD is highly comorbidity with other anxiety and mood disorders. In addition, it would be worthwhile identifying the relative importance of the Val66Met polymorphism in large-scale prospective studies. However, our study has the methodological strength of a community sample, divided in individual with GAD and controls which are free of this disorder, a very low use of psychiatric medication.

### **Conclusion**

The presence of the Met allele in the coding region of BDNF gene was associated with GAD and high serum BDNF levels in these subjects. This increase in BDNF protein levels may reflect a compensatory mechanism develop to counteract the presence of the less functional BDNF allele. Future studies are necessary in order to investigate the potential mechanisms involved in the regulation of BDNF production and secretion in Met allele carriers. The understanding of these effects can provide insights into the mechanism of risk, can refine existing treatments, and may lead to genotype-based personalized medicine.

### **Disclosures**

The authors of this paper do not have any potential conflict of interests in connection with this manuscript.

### **Acknowledgments**

This study was supported by CNPq and CAPES Brazil.

## References:

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (revised 4th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- ANDERO R, RESSLER KJ. (2012). Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behav*, 11: 503-12.
- BALL S, MARANGELL LB, LIPSIUS S, RUSSELL JM. (2013). Brain-derived neurotrophic factor in generalized anxiety disorder: results from a duloxetine clinical trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 43:217-21.
- BONNE O, GILL JM, LUCKENBAUGH DA, COLLINS C, OWENS M J, ALESCI S, *et al.* (2011). Corticotropin-releasing factor, interleukin-6, brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-1, and substance P in the cerebrospinal fluid of civilians with posttraumatic stress disorder before and after treatment with paroxetine. *J Clin Psychiatry*, 72: 1124-8.
- BUS BA, ARIAS-VASQUEZ A, FRANKE B, PRICKAERTS J, DE GRAAF J, VOSHAAR RC. (2012). Increase in serum brain-derived neurotrophic factor in met allele carriers of the BDNF Val66Met polymorphism is specific to males. *Neuropsychobiology*, 65: 183-7.
- CASAROTTO PC, DE BORTOLI VC, ZANGROSSI H JR. (2012). Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. *Behav Pharmacol*, 23:80-8.
- CHEN ZY, PATEL PD, SANT G, MENG CX, TENG K K, HEMPSTEAD BL *et al.* (2004). Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the

- intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci*, 24: 4401-11.
- CHI MH, CHANG HH, LEE SY, LEE IH, GEAN PW, YANG YK, *et al.* (2010). Brain derived neurotrophic factor gene polymorphism (Val66Met) and short-term antidepressant response in major depressive disorder. *J Affect Disord*, 126:430-5.
- DALLE MOLLE R, PORTELLA AK, GOLDANI MZ, KAPCZINSKI FP, LEISTNER-SEGAL S, SALUM GA, *et al.* (2012). Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. *Transl Psychiatry*, 2:e195.
- DELL'OSSO L, CARMASSI C, DEL DEBBIO A, CATENA DELL'OSSO M, BIANCHI C, DA POZZO E, *et al.* (2009). Brain-derived neurotrophic factor plasma levels in patients suffering from post-traumatic stress disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33:899-902.
- DOS SANTOS IM, CIULLA L, BRAGA D, CERESER KM, GAMA CS, KAPCZINSKI F, *et al.* (2011). Symptom dimensional approach and BDNF in unmedicated obsessive-compulsive patients: an exploratory study. *CNS Spectr*.
- DUMAN RS, MONTEGGIA LM. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59:1116-27.
- EGAN MF, KOJIMA M, CALLICOTT JH, GOLDBERG TE, KOLACHANA BS, BERTOLINO A, *et al.* (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 112:257-69.

- ENOCH MA, WHITE KV, WAHEED J, GOLDMAN D. (2008). Neurophysiological and genetic distinctions between pure and comorbid anxiety disorders. *Depress Anxiety*, 25: 383-92.
- FRUSTACI A, POZZI G, GIANFAGNA F, MANZOLI L, BOCCIA S. (2008). Meta-analysis of the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) Val66Met polymorphism in anxiety disorders and anxiety-related personality traits. *Neuropsychobiology*, 58: 163-70.
- FULLANA MA, ALONSO P, GRATACOS M, JAURRIETA N, JIMENEZ-MURCIA S, SEGALAS C, *et al.* (2012). Variation in the BDNF Val66Met polymorphism and response to cognitive-behavior therapy in obsessive-compulsive disorder. *Eur Psychiatry*, 27:386-90.
- GATT JM, NEMEROFF CB, DOBSON-STONE C, PAUL RH, BRYANT RA, SCHOFIELD PR, *et al.* (2009). Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry*, 14:681-95.
- GRATACOS M, SORIA V, URRETAVIZCAYA M, GONZALEZ JR, CRESPO JM, BAYES M, *et al.* (2008). A brain-derived neurotrophic factor (BDNF) haplotype is associated with antidepressant treatment outcome in mood disorders. *Pharmacogenomics J*, 8:101-12.
- HARTMANN M, HEUMANN R, LESSMANN V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J*, 20, 5887-97.
- HASHIMOTO, K. (2007). BDNF variant linked to anxiety-related behaviors. *Bioessays*, 29:116-9.

- HAUCK S, KAPCZINSKI F, ROESLER R, DE MOURA SILVEIRA E, JR., MAGALHAES, PV, KRUEL, L R, *et al.* (2010). Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 459-62.
- JIANG X, XU K, HOBERMAN J, TIAN F, MARKO AJ, WAHEED JF, *et al.* (2005). BDNF variation and mood disorders: a novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects. *Neuropsychopharmacology*, 30: 1353-61.
- KARAMOHAMED S, LATOURELLE JC, RACETTE BA, PERLMUTTER JS, WOOTEN GF, LEW M, *et al.* (2005). BDNF genetic variants are associated with onset age of familial Parkinson disease: GenePD Study. *Neurology*, 65:1823-5.
- LAHIRI DK, NURNBERGER JI, JR. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19: 5444.
- LAM P, CHENG CY, HONG CJ, TSAI, SJ. (2004). Association study of a brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) genetic polymorphism and panic disorder. *Neuropsychobiology*, 49:178-81.
- LANG UE, HELLWEG R, SANDER T, GALLINAT J. (2009). The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Mol Psychiatry*, 14: 120-2.
- MIYAJIMA F, OLLIER W, MAYES A, JACKSON A, THACKER N, RABBITT P, *et al.* (2008). Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly. *Genes Brain Behav*, 7, 411-7.

- MOLENDIJK ML, BUS BA, SPINHOVEN P, PENNINX BW, PRICKAERTS J, OUDE VOSHAAR RC, ELZINGA BM. (2012). Gender specific associations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor in anxiety. *World J Biol Psychiatry*, 13:535-43.
- NAGATA T, SHINAGAWA S, NUKARIYA K, YAMADA H, NAKAYAMA, K. (2012). Association between BDNF polymorphism (Val66Met) and executive function in patients with amnesic mild cognitive impairment or mild Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 33:266-72.
- RASMUSSEN AM, SHI L, DUMAN R. (2002). Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology*, 27, 133-42.
- SCHUMACHER J, JAMRA RA, BECKER T, OHLRAUN S, KLOPP N, BINDER EB, *et al.* (2005). Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry*, 58: 307-14.
- SHEEHAN DV, LECRUBIER Y, SHEEHAN KH, AMORIM P, JANAVS J, WEILLER E, *et al.* (1998). The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry*, 59 Suppl 20, 22-33;quiz 34-57.
- SKIBINSKA M, HAUSER J, CZERSKI PM, LESZCZYNSKA-RODZIEWICZ A, KOSMOWSKA M, KAPELSKI, P, *et al.* (2004). Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. *World J Biol Psychiatry*, 5:215-20.

- SOLIMAN F, GLATT CE, BATH KG, LEVITA L, JONES RM, PATTWELL SS, *et al.* (2010). A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science*, 327, 863-6.
- SULIMAN S, HEMMINGS SM, SEEDAT S. (2013). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integr Neurosci*, 7: 55.
- SURTEES PG, WAINWRIGHT NW, WILLIS-OWEN SA, SANDHU MS, LUBEN R, DAY NE, *et al.* (2007). No association between the BDNF Val66Met polymorphism and mood status in a non-clinical community sample of 7389 older adults. *J Psychiatr Res*, 41: 404-9.
- SZESZKO PR, LIPSKY R, MENTSCHER C, ROBINSON D, GUNDUZ-BRUCE H, SEVY S, *et al.* (2005). Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry*, 10: 631-6.
- TAKEI S, MORINOBU S, YAMAMOTO S, FUCHIKAMI M, MATSUMOTO T, YAMAWAKI S. (2011). Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res*, 45:460-8.
- TEMPESTA D, MAZZA M, SERRONI N, MOSCHETTA FS, DI GIANNANTONIO M, FERRARA M, DE BERARDIS D. (2013). Neuropsychological functioning in young subjects with generalized anxiety disorder with and without pharmacotherapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 236-41.
- TOCCHETTO A, SALUM GA, BLAYA C, TECHE S, ISOLAN L, BORTOLUZZI A, *et al.* (2011). Evidence of association between Val66Met polymorphism at

- BDNF gene and anxiety disorders in a community sample of children and adolescents. *Neurosci Lett*, 502:197-200.
- TUKEL R, GURVIT H, OZATA B, OZTURK N, ERTEKIN BA, ERTEKIN E. *et al.* (2012). Brain-derived neurotrophic factor gene Val66Met polymorphism and cognitive function in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 159B:850-8.
- WEISBERG RB, BEARD C, MOITRA E, DYCK I, KELLER MB. (2013). Adequacy of Treatment Received by Primary Care Patients with Anxiety Disorders. *Depress Anxiety*, 31: 443–450.
- YOSHII A, CONSTANTINE-PATON M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, 70:304-22.
- ZAI G, ARNOLD P, STRAUSS J, KING N, BURROUGHS E, RICHTER MA *et al.* (2005). No association between brain-derived neurotrophic factor gene and obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Genet*, 15: 235.

Table 1. Socio-demographic and clinical characteristics of the sample according to the clinical diagnostic

	<b>Controls</b>	<b>GAD</b>	<b>p value</b>
	<b>(n=695; 85.2%)</b>	<b>(n=121; 14.8%)</b>	
<b>Female Gender<sup>a</sup></b>	358 (51.5%)	85 (70.2%)	0.001
<b>Caucasian Ethnicity<sup>a</sup></b>	536 (77.1%)	90 (74.4%)	0.510
<b>Age (years)<sup>b</sup></b>	25.47 ± 5.30	26.71 ± 5.06	0.168
<b>Brazilian Economic Index<sup>a</sup></b>			0.003
1 (minor)	220 (31.7%)	55 (46.2%)	
2 (intermediate)	237 (34.1%)	38 (31.9%)	
3 (highest)	238 (34.2%)	26 (21.8%)	
<b>Body Mass Index (BMI) (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>b</sup></b>	24.00 ± 3.10	23.70 ± 3.28	0.354
<b>Alcohol use<sup>a</sup></b>	68 (9.8%)	18 (15.3%)	0.075
<b>Tobacco use<sup>a</sup></b>	139 (20.1%)	48 (40.3%)	0.001
<b>Psychiatric medication<sup>a</sup></b>	18 (2.6%)	18 (14.9%)	0.001
<b>Psychiatric Variables<sup>a</sup></b>			
Major Depressive	72 (10.4%)	77 (63.6%)	0.001
Bipolar Disorder	58 (8.3%)	50 (41.3%)	0.001
<b>Serum BDNF levels (ng/mL)<sup>b</sup></b>	7.55 ± 2.13	7.36 ± 2.28	0.531

— Displayed as mean ± standard deviation or n and %. p values ≤ 0.05 were considered significant for differences in socio demographic characteristics between clinical diagnoses of current generalized anxiety disorder. The differences were evaluated by Student t *test*<sup>a</sup>, and  $\chi^2$  *test*<sup>b</sup>, as appropriated.

Table 2: Genotypic and allelic distribution of Vall66Met polymorphism according to generalized anxiety disorder diagnosis.

	GAD		<i>p</i> value
	Yes (n = 121)	No (n = 695)	
<b>Genotypic distribution</b>			0.029
Val/Val	75 (62.0)	507 (72.9)	
Val/Met	41 (33.9)	175 (25.2)	
Met/Met	5 (4.1)	13 (1.9)	
<b>Allelic distribution</b>			0.157
Val	0.79	0.85	
Met	0.21	0.15	
<b>Recessive model</b>			0.014
Val/Val	75 (62.0)	507 (72.9)	
Val/Met and Met/Met	46 (38.0)	188 (27.1)	

Data are presented as number (%). \**p* values  $\leq 0.05$  were considered significant and were computed by the  $\chi^2$  test comparing patients with generalized anxiety disorder (GAD).

Table 3. Demographic and clinical characteristics distributed according to BDNF genotype

	<b>GG</b> (n=582; 71.3%)	<b>GA/AA</b> (n=234; 28.7%)	<b>p value</b>
<b>Gender<sup>a</sup></b>			0.760
Female	314 (70.9%)	129 (29.1%)	
Male	268 (71.8%)	105 (28.2%)	
<b>Ethnicity<sup>a</sup></b>			0.022
Caucasian	434 (69.3%)	192 (30.7%)	
Non-caucasian	148 (77.9%)	42 (22.1%)	
<b>Age (years)<sup>b</sup></b>	25.62 ± 5.31	25.74 ± 5.20	0.771
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>b</sup></b>	23.99 ± 3.06	23.87 ± 3.31	0.643
<b>Serum BDNF levels (ng/mL)<sup>b</sup></b>	7.44 ± 2.10	7.71 ± 2.27	0.197
<b>Psychiatric Variables<sup>a</sup></b>			
<b>Major Depressive</b>			0.799
No	477 (71.5%)	190 (28.5%)	
Yes	105 (70.5%)	44 (29.5%)	
<b>Bipolar Disorder</b>			0.995
No	505 (71.3%)	203 (28.7%)	
Yes	77 (71.3%)	16 (28.7%)	

Displayed as mean ± standard deviation or n and %. p values ≤ 0.05 were considered significant for differences in socio demographic characteristics between Val66Met polymorphism. The differences were evaluated by Student *t test*<sup>a</sup>, and  $\chi^2$  test<sup>b</sup>, as appropriated.

Figure 1

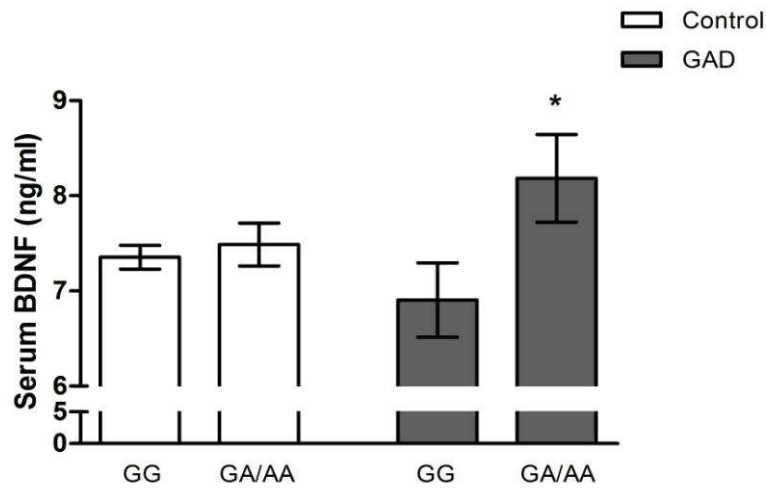


Figure Legend:

Figure 1. Serum BDNF levels according genotype distribution after stratification of sample by GAD diagnosis. White bars represents control group and grey bars represents GAD subjects. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M evaluated by One Way Anova followed by Tukey post-hoc. \*  $p \leq 0.05$ . GAD: Generalized Anxiety Disorder

## **ANEXOS**

## **ANEXO A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS – UCPEL**

#### **“PESQUISA SOBRE TEMPERAMENTO E TRANSTORNOS PSÍQUICOS DE JOVENS ADULTOS DE 18 A 35 ANOS DA CIDADE DE PELOTAS”**

Este estudo está sendo realizado com adultos de 18 a 35 anos, e pretende avaliar as relações do Temperamento/comportamento com as características psicológicas, psiquiátricas, sociais e neurobiológicas.

Iniciaremos as entrevistas em agosto de 2010 e pretendemos finalizá-las em 2012.

Se você aceitar fazer parte deste estudo, irá responder a um questionário que será aplicado por entrevistadores e precisará tirar uma amostra de sangue.

Os dados fornecidos por você durante a aplicação do questionário será utilizado posteriormente para análise, produção de artigos científicos e relatórios (para a coordenação dos serviços de saúde e CNPq). Entretanto, a equipe envolvida na pesquisa garante que sua identidade permanecerá em sigilo, respeitando a sua privacidade. Esta pesquisa não apresenta risco a sua saúde, o único inconveniente que o participante pode ter é formar um pequeno hematoma (mancha roxa) no braço, em função da coleta do sangue.

Será coletado 15ml de sangue para que possamos dosar hormônios, que podem influenciar a presença de sintomas relacionados com o temperamento/comportamento dos participantes da pesquisa. Além disso, serão coletados 3 ml de saliva, por profissionais treinados. Posteriormente, as amostras de sangue e saliva serão examinadas para determinar variações bioquímicas e hormonais. Ao final desse trabalho, todos os dados que possam vincular seu nome serão inutilizados, para que os resultados possam eventualmente ser utilizados em pesquisas futuras sobre o mesmo assunto.

Este estudo pode trazer vários benefícios, ainda que em longo prazo, poderemos saber diferenciar variantes bioquímicas e hormonais que possam aumentar a predisposição a sintomas relacionados a comportamento e temperamento. Essas descobertas ajudarão o desenvolvimento do conhecimento científico, que poderá eventualmente beneficiar você ou outras famílias.

Os participantes que forem diagnosticados com algum transtorno psicológico/psiquiátrico serão encaminhados para o Ambulatório do Campus da Saúde da UCPEL.

Sua participação é voluntária e você é livre para abandonar o estudo em qualquer momento, sem prejuízos ou danos.

Em caso de dúvidas sobre o estudo, maiores informações poderão ser obtidas com os pesquisadores e coordenadores do projeto: através dos números (53) 2128-8328 Laboratório do Mestrado; - (53) 81090937 (Jerônimo Branco); (53) 8122-8378 (Ricardo Silva); – (53) 9156-8075 (Jean Oses).

#### Declaração do Participante

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que após tomar conhecimento destas informações, aceito participar da presente pesquisa. Além disso, declaro ter recebido uma cópia deste consentimento e que uma cópia assinada por mim será mantida pela equipe da pesquisa.

Participante: \_\_\_\_\_

#### Declaração de Entrevistador

Eu, \_\_\_\_\_, declaro ter explicado sobre a natureza deste estudo, assim como também me coloquei a disposição do(a) entrevistado(a) para esclarecer as suas dúvidas

## ANEXO B- ENTREVISTA APLICADA

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

QUEST \_\_\_\_\_ Setor: \_\_\_\_\_ Pessoa: \_\_\_\_\_

**1. Sexo do entrevistado:**

(1) feminino (2) masculino

**2. Qual é a tua idade?** \_\_\_\_\_ em anos completos

**3. A tua cor ou raça é?** (LER AS OPÇÕES)

(1) branca

(2) preta

(3) mulata

(4) amarela

(5) indígena

**4. Qual a escolaridade do chefe da família?** (*chefe da família = pessoa de maior renda*)

(1) nenhuma ou até 3º série (primário incompleto)

(2) 4ª série (primário completo) ou 1º grau (ginasial) incompleto

(3) 1º grau (ginasial) completo ou 2º grau (colegial) incompleto

(4) 2º grau (colegial) completo ou nível superior incompleto

(5) nível superior completo

**5. Quantas peças são utilizadas como dormitórios nesta casa?** \_\_\_\_\_ peças

**6. Quantos banheiros existem na casa?** (Considere somente os que têm vaso mais chuveiro ou banheira). \_\_\_\_\_ banheiros (00) Caso não tenha banheiro

**NESTE DOMICÍLIO TÊM, E SE TÊM: QUANTOS?**

7. Televisão: (0) (1) (2) (3) (4 ou +)

8. Automóvel (de uso particular): (0) (1) (2) (3) (4 ou +)

**NESTE DOMICÍLIO TÊM?** (*em condições de uso*)

9. Rádio: (0) não (1) sim

10. Geladeira ou freezer: (0) não (1) sim

11. Videocassete ou DVD: (0) não (1) sim

12. Máquina de lavar roupa (não considerar o tanquinho): (0) não (1) sim

13. Forno de micro-ondas: (0) não (1) sim

14. Telefone fixo (não considerar celular): (0) não (1) sim

15. Microcomputador: (0) não (1) sim

16. Aparelho de ar condicionado: (0) não (1) sim

**17. Até a série que tu completaste na escola, são quantos anos de estudo?**

(00) se nunca estudou \_\_\_ anos completos.

**18. Qual o teu estado civil?**

(0) solteiro (1) casado/vive junto (2) separado/divorciado

**19. Estás trabalhando atualmente?**

(0) não (1) sim (8) Nunca trabalhou

**20. Tu tens pais separados?**

(0) não (1) sim

**23. Tu tens filhos? SE SIM: Quantos?**

(00) Não tem filhos (*pule para questão 27*) \_\_\_ filhos

**24. Com quantos anos tiveste o primeiro filho? \_\_\_ anos (88) NSA**

❖ **Agora vamos falar sobre prática de atividade física.** (*se o entrevistado tiver menos de 18 anos, pule para a questão 40*)

**27. Você faz atividade física regularmente?**

(0) Não (1) Sim (*pule para a questão 29*)

**28. Qual o principal motivo para tu NÃO fazeres atividade física REGULARMENTE?**

(01) Falta de tempo

(02) Falta de dinheiro

(03) Cansaço, preguiça

(04) Falta de companhia

(05) Falta de local apropriado

(06) Lesão, doença ou restrição médica

(07) Não precisa/não gosta

( ) Outro. Qual? \_\_\_\_\_

(88) Não se aplica

**29. Qual o principal motivo para tu fazeres atividade física REGULARMENTE?**

(01) Importante para a saúde/bem-estar

(02) Por problema(s) de saúde/doença

(03) Recomendação/orientação médica

(04) Preparo físico/condicionamento

(05) Emagrecimento/perda de peso

(06) Beleza/estética/manter a forma

(07) Porque gosta/por diversão ou lazer

( ) Outro. Qual? \_\_\_\_\_

(88) Não se aplica 93

❖ As seguintes perguntas referem-se às atividades físicas que você fez nos últimos sete dias, unicamente por recreação, esporte, exercício ou lazer.

**30. Desde <dia da semana> passada, quantos dias tu caminhastes por, "pelo menos, 10 minutos seguidos" no seu tempo livre? (não considere as caminhadas para ir ou voltar do seu trabalho ou escola) (0) Nenhum (pule para a questão 32) \_\_\_ dias na semana**

**31. Nos dias em que tu caminhaste no seu tempo livre, quanto tempo no total tu gastou em minutos por dia? \_\_\_ \_\_\_ minutos (888) Não se aplica**

❖ A próxima pergunta é sobre atividade física FORTE.

*Atividades física "fortes" é aquela que precisa de um grande esforço físico e que fazem você respirar "muito" mais forte que o normal (não considere as atividades feita no trabalho)*

**32. Desde <dia da semana> passada, quantos dias tu fez atividades FORTES no teu tempo livre, por pelo menos 10 minutos contínuos, como correr, fazer ginástica/academia, nadar rápido ou pedalar rápido? (0) Nenhum (pule para a questão 34) \_\_\_ dias na semana**

**33. Nos dias em que tu fizeste estas atividades FORTES no teu tempo livre, quanto tempo no total tu gastaste em minutos "por dia"? \_\_\_ \_\_\_ minutos (888) Não se aplica**

❖ A próxima pergunta é sobre atividade física MÉDIA.

*Atividades física "média" é aquela que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar "um pouco" mais forte que o normal (não considere as atividades feita no trabalho)*

**34. Sem considerar as caminhadas, desde <dia da semana> passada, quantos dias tu fez atividades MÉDIAS no seu tempo livre por pelo menos 10 minutos, como pedalar ou nadar a velocidade regular, jogar bola, vôlei, basquete, tênis?**

(0) Nenhum (pule para a questão 36) \_\_\_ dias na semana

**35. Nos dias em que tu fizeste atividades MÉDIAS no seu tempo livre, quanto tempo no total tu gastaste em minutos "por dia"? \_\_\_ \_\_\_ minutos (888) Não se aplica**

❖ Agora vamos falar sobre deslocamento. Pense em qualquer tipo de caminhada ou pedalada nos últimos sete dias, para ir de um lugar para outro.

**36. Em quantos dias da ultima semana você andou de bicicleta por pelo menos 10 minutos contínuos para ir de um lugar para outro? (Não incluir o pedalar por lazer ou exercício)**

(0) Nenhum (pule para a questão 38) \_\_\_ dias na semana

**37. Nos dias em que você pedala quanto tempo no total você pedalou por dia, para ir de um lugar para outro em minutos? \_\_\_ \_\_\_ minutos (888) Não se aplica 94**

**38. Em quantos dias da ultima semana você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos para ir de um lugar para outro? (Não incluir caminhadas por lazer ou exercício)**

(0) Nenhum (*pule para a questão 40*) \_\_\_ dias na semana

**39. Nos dias em que você caminha quanto tempo no total você caminha por dia para ir de um lugar para outro em minutos? \_\_\_ \_\_\_ minutos (888) Não se aplica**

**Agora vamos falar sobre alguns aspectos de tua saúde.**

**40. Tu tens algum problema de saúde?**

(0) não (*pule para a questão 42*) (1) sim **SE SIM: 41. Qual a**

*doença?* \_\_\_\_\_

Qual a doença? \_\_\_\_\_

Qual a doença? \_\_\_\_\_

**SE SIM: 41. Qual a doença?** \_\_\_\_\_

Qual a doença? \_\_\_\_\_

Qual a doença? \_\_\_\_\_

**45. Nos últimos 30 dias, tu tomaste alguma medicação?**

(0) não (1) sim

**SE SIM: Qual a medicação?**

*Medicação 1:* \_\_\_\_\_

*Medicação 2:* \_\_\_\_\_

*Medicação 3:* \_\_\_\_\_

*Medicação 4:* \_\_\_\_\_

**\*As seguintes questões referem-se ao uso de algumas substancias.**

**06. Alguma vez você sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida alcoólica ou parar de beber?**

(0) Não (1) Sim

**07. As pessoas o aborrecem porque criticam o seu modo de tomar bebida alcoólica? (0)**

Não (1) Sim

**08. Você se sente chateado pela maneira como você costuma tomar bebidas alcoólicas? (0)**

Não (1) Sim

**09. Costuma tomar bebidas alcoólicas pela manhã para diminuir o nervosismo ou ressaca?**

(0) Não (1) Sim

**10. No último mês você utilizou alguma destas substancias?**

**a) Maconha** (0) Não (1) Sim

**b) Cocaína** (0) Não (1) Sim

**c) crack** (0) Não (1) Sim

**11. Atualmente, você fuma pelo menos um cigarro por semana?**

(0) Não (1) Sim

**12. SE FUMA: Quantos cigarros você fuma por dia? \_\_ \_\_ cigarro/dia** (00) Menos de 1 cigarro por dia

ANEXO C- MINI INTERVIEW

# **M.I.N.I.**

## **Mini International Neuropsychiatric Interview**

### **English Version 5.0.0**

#### **DSM-IV**

Y. Lecrubier, E. Weiller, T. Hergueta, P. Amorim, L.I. Bonora, J.P. Lépine

Hôpital de la Salpêtrière - Paris - FRANCE.

D. Sheehan, J. Janavs, R. Baker, K.H. Sheehan, E. Knapp, M. Sheehan

University of South Florida - Tampa - USA.

© 1992, 1994, 1998 Sheehan DV & Lecrubier Y.

**All rights reserved. No part of this document may be reproduced or transmitted in any form, or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, or by any information storage or retrieval system, without permission in writing from the authors. Researchers and clinicians working in nonprofit or publicly owned settings (including universities, nonprofit hospitals, and government institutions) may make copies of a M.I.N.I. instrument for their own clinical and research use.**

**M.I.N.I. 5.0.0 English version / DSM-IV / current (August 1998)**

**ANEXO D - Encaminhamento médico**

**Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento  
Universidade Católica de Pelotas**

ENCAMINHAMENTO PSICOLÓGICO OU PSIQUIÁTRICO

Eu, \_\_\_\_\_, confirmo que fui orientado(a) à procurar acompanhamento psicológico ou psiquiátrico pelo(a) entrevistador(a) que esteve na minha residência.

O(a) entrevistador(a) sugeriu que buscasse o seguinte local:

*( ) Ambulatório de Saúde Mental do Centro de Especialidades (até 17 anos de idade. Rua Voluntários da Pátria, 1428, Centro)*

*( ) Hospital Espírita de Pelotas (com risco de suicídio)*

*( ) Laboratório de Pesquisa do Hospital Universitário São Francisco de Paula (transtornos de humor. Rua Marechal Deodoro, 1123)*

Se for encaminhado para HUSFP preencher:

Nome: \_\_\_\_\_ Telefones: \_\_\_\_\_ Setor: \_\_\_\_\_

## ANEXO E – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UCPel

### RESULTADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Pelotas analisou o projeto:

**Número:** 2010/15

**Título do projeto:** *"Estudo do temperamento e transtornos psiquiátricos na interface entre psiquiatria, psicologia e neurociências"*

**Investigador(a) principal:** Ricardo Azevedo da Silva

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da UCPel, em reunião datada de 29 de julho de 2010, ata n.º 05.

A avaliação foi realizada pelos membros do comitê, baseada na análise minuciosa do projeto, apresentada por um dos membros.

Outrossim, informamos que é **obrigatório** a entrega do relatório de conclusão pela coordenação do referido projeto ao Comitê de Ética – CEP/UCPel, na Secretaria da Pró-Reitoria Acadêmica da Universidade Católica de Pelotas.

Pelotas, 30 de julho de 2010

Prof. Ricardo Tavares Pinheiro  
Coordenador CEP/UCPel