

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

CLARISSA RIBEIRO BASTOS

ALTERAÇÕES NO RECEPTOR CRHR1 E NÍVEIS DE IL-1 β NO
COMPORTAMENTO SUICIDA.

Pelotas,
2016

CLARISSA RIBEIRO BASTOS

**ALTERAÇÕES NO RECEPTOR CRHR1 E NÍVEIS DE IL-1 β NO
COMPORTAMENTO SUICIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Comportamento.

Orientador: Prof. Dra. Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Coorientador: Prof. Dra. Fernanda Nedel

Pelotas,
Fevereiro 2016

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
COMPORTAMENTO

Clarissa Ribeiro Bastos

ALTERAÇÕES NO RECEPTOR CRHR1 E NÍVEIS DE IL-1 β
NO COMPORTAMENTO SUICIDA

Conceito final: _____.

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Rachel Krolow Santos Silva Bast

Prof^a Dr^a Luciana de Avila Quevedo

Orientador – Prof^a. Dr^a. Gabriele Cordenonzi Ghisleni

DEDICATÓRIA:

Aos meus pais Alexandre Bastos e Clarice Bastos e a minha irmã Flúvia Bastos pelo apoio e amor incondicional durante toda essa trajetória e a minha tia Maria Cristina (in memoriam) uma das melhores pessoas que tive a honra de conhecer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter chegado até aqui e por ter me enviado anjos que ao trilharem esse caminho comigo tornaram tudo isso possível!

Agradeço aos meus pais e a minha irmã que nunca mediram esforços para me ajudar, obrigado por todo amor, por toda dedicação e por todas as palavras de incentivo, vocês com certeza são o motivo de eu chegar até aqui!

Ao meu amor, por me impulsionar e por toda confiança e fé que deposita em mim. Por ficar ao meu lado até de madrugada enquanto estudava, sempre tendo as palavras certas para me animar. Agradeço por toda a paciência, dedicação e por estar sempre ao meu lado!

A minha família que está sempre presente e torcendo por mim, aqui faço uma menção especial a minha tia Maria Cristina, que infelizmente não está mais aqui, mas que sempre foi uma das pessoas que mais torceu por mim e comemorou todas as minhas conquistas como se fossem as suas, muito obrigado tia!

Aos meus pequenos por toda a luz que trazem para minha vida!

Aos meus amigos que me distraíram, fazendo com que eu mante-se a minha sanidade.

A minha orientadora por ter me recebido de braços abertos no laboratório e por ter me ensinado com maior carinho e paciência todas as técnicas precisas. Agradeço por mesmo em meio as milhões de responsabilidades estar sempre presente e me incentivando.

Agradeço ao pessoal do laboratório que me proporcionou um ambiente de trabalho extremamente agradável, em especial a Fernanda Kaufmann e a Marta Gazal por todos os ensinamentos e por toda a ajuda que me deram!

“Quem conheceu a alegria da compreensão conquistou um amigo infalível para a vida. O pensar é para o homem, o que é o voar para os pássaros. Não toma como exemplo a galinha quando podes ser uma cotovia”.

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: O suicídio é umas das dez principais causas de morte no mundo, emergindo de uma interação complexa entre fatores genéticos, ambientais e psicossociais. Neste aspecto, estudos identificaram que indivíduos com tendências suicidas apresentam elevações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e alterações no funcionamento do eixo HPA. **Objetivo:** Investigar a associação de um polimorfismo gene do CRHR1 (rs110402) com o comportamento suicida, bem como os efeitos do genótipo sobre os níveis de IL-1 β . **Métodos:** A amostra foi composta de 171 indivíduos, e destes 15 apresentavam risco de suicídio, 20 já haviam tentado o suicídio e 136 eram controles. Realizamos a genotipagem dos indivíduos por PCR em tempo real e a dosagem de IL-1 β pela técnica de Elisa. **Resultados:** Indivíduos com um diagnóstico clínico de tentativa de suicídio que carregavam o alelo A do SNP rs110402 mostraram aumento dos níveis de IL-1 β (19,3 IQR: 6,84 - 36,47) em relação ao grupo controle (4,91 IQR: 3,22-6,39; p = 0,027). Avaliações isoladas em relação aos níveis dessa interleucina e aos genótipos desse polimorfismo não mostraram relação com o comportamento suicida. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que alterações no gene do CRHR1 podem afetar os níveis de moléculas pró-inflamatórias, mostrando as interações complexas de marcadores biológicos no comportamento suicida.

Palavras-chave: Tentativa de suicídio; Risco de suicídio; eixo HPA; CRHR1; polimorfismo; IL-1 β .

ABSTRACT

Introduction: Suicide is one of the ten leading causes of death worldwide, emerging from a complex interaction between genetic, environmental and psychosocial factors. In this aspect studies found that individuals with suicidal tendencies have elevations in the levels of pro-inflammatory cytokines and alterations in the functioning of the HPA axis. **Objective:** Investigate the association of the polymorphism in the CRHR1 gene (rs110402) with the suicidal behavior, as well as the genotype effects on IL-1 β levels. **Methods:** Sample consisted in 171 individuals that participated in the study, from which 15 were at risk of suicide, 20 had attempted suicide and 136 were controls. We perform genotyping of individuals by real-time PCR and IL-1 β levels measured by ELISA technique. **Results:** Individuals with a clinical diagnosis of attempted suicide carrying the A allele of SNP rs110402 showed increased IL-1 β levels (19.3 IQR: 6.84 to 36.47) compared to the control group (4.91 IQR: 3.22 to 6.39; $p = 0.027$). Ratings isolated from the levels of this interleukin and genotypes of the rs10402 SNP showed no relationship with suicidal behavior. **Conclusion:** Our results suggest that alterations in CRHR1 gene can affect the levels of pro-inflammatory molecules, showing the complex interactions of biological markers in suicidal behavior.

Keywords: Suicide attempt, Suicide risk, HPA axis, CRHR1, Polymorphism, IL-1 β

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Adrenocorticotrópico
AMP cíclico	Monofosfato de Adenosina Cíclico
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
CRHR1	Receptor 1 do Hormônio Liberador de Corticotropina
CRHR2	Receptor 2 do Hormônio Liberador de Corticotropina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imuno Adsorvente ligado à enzima
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição
FKBP5	Proteína de ligação FK506 5
HPA	Hipotálamo- Pituitária- Adrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
MINI	Mini Internacional Neuropsychiatric Interview
mRNA	RNA mensageiro
NR3C1	Receptor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PKA	Proteína kinase A
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPGSC	Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento
PTSD	Transtorno de estresse pós-traumático
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UCN'S	Urocortinas
UCPel	Universidade Católica de Pelotas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Mecanismo de funcionamento do eixo HPA.....	24
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Descritores utilizados para busca bibliográfica.....	19
Tabela 2.	Polimorfismo analisado	33
Quadro 1.	Estudos selecionados sobre o tema	28
Quadro 2.	Cronograma	35
Quadro 3.	Orçamento.....	36

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	13
PROJETO.....	14
1 IDENTIFICAÇÃO.....	15
1.1 TÍTULO	15
1.2 TITULAÇÃO EM ANDAMENTO QUE DESIGNA O AUTOR DO TRABALHO	15
1.3 ORIENTADOR	15
1.4 INSTITUIÇÃO	15
1.5 CURSO	15
1.6 LINHA DE PESQUISA	15
1.7 DATA	15
2 INTRODUÇÃO	16
3 OBJETIVOS	17
4 HIPÓTESES	18
5 REVISÃO DE LITERATURA	19
5.1 DESCRITORES.....	19
5.2 SELEÇÃO DOS ARTIGOS ENCONTRADOS.....	19
5.3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
5.3.1 Comportamento suicida.....	20
5.3.2 Sistema imunológico e comportamento suicida: papel da IL-1β.....	21
5.3.3 Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal.....	23
5.3.4 Alterações no eixo HPA, polimorfismo no CRHR1 e CRHR2.....	25
6 MÉTODO	31
6.1 DELINEAMENTO	31
6.2 PARTICIPANTES	31
6.2.1 Cálculo Amostral.....	31

6.2.2 Critérios de inclusão.....	31
6.2.3 Critérios de exclusão.....	32
6.3 PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS.....	32
6.3.1 Desfecho primário.....	32
6.3.2 Desfecho secundário.....	32
6.3.3 Critérios Diagnósticos e Medidas Psicológicas.....	32
6.3.4 Coleta de Dados Sociodemográficos.....	32
6.3.5 Coleta de Material Biológico.....	32
6.3.6 Análise dos polimorfismos.....	32
6.3.7 Dosagem da IL-1β.....	33
6.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	33
6.5 ASPECTOS ÉTICOS	33
6.5.1 Riscos.....	34
6.5.2 Benefícios.....	34
6.6 CRONOGRAMA	35
6.7 ORÇAMENTO	36
7 REFERÊNCIAS	37
8 ARTIGO	45
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
ANEXOS	64
Anexo A: Carta de aprovação no comitê de ética.....	65
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido	66
Anexo C: Entrevista diagnóstica Mini International Neuropsychiatric Interview	67
Anexo D: Indicador Econômico Nacional.....	72

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento (PPGSC). O mesmo encontra-se dividido em três partes, sendo elas: o projeto intitulado: “Alterações no receptor CRHR1 e níveis de IL-1 β no comportamento suicida”, o artigo: “Polymorphism in CRHR1 gene affects the IL-1 β levels in suicidal attempters”, e as considerações finais. O projeto está formatado segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e o artigo segue a formatação indicada pela revista Journal of Psychiatric Research.

O trabalho seguiu o modelo de dissertação indicado pelo PPGSC. A primeira parte do mesmo está subdividida em Identificação; Introdução; Objetivos; Hipóteses; Revisão de Literatura; Metodologia, e Referências. A segunda parte consiste no artigo científico produzido, no qual avaliamos os níveis séricos de IL-1 β e genotipamos o polimorfismo rs110402 no gene do CRHR1 buscando investigar se alterações no eixo HPA podem interferir nos níveis de IL-1 β em indivíduos com comportamento suicida.

Na terceira parte da dissertação estão as considerações finais, as quais buscam compilar os principais resultados do estudo, respondendo aos objetivos e hipóteses propostas.

PROJETO

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Alterações no receptor CRHR1 e níveis de IL-1 β no comportamento suicida.

1.2 Mestranda: Clarissa Ribeiro Bastos

1.3 Orientador: Gabriele Cordenonzi Ghisleni

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

1.5 Curso: Mestrado em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de pesquisa: Genética Médica e Imunologia

1.7 Data da Defesa: 26/02/2016

2. INTRODUÇÃO

O suicídio é umas das dez principais causas de morte no mundo acometendo aproximadamente um milhão de pessoas por ano (WHO, 1999). A tentativa e o risco de suicídio são ainda mais comuns (TONDO *et al.*, 2007), tornando se essencial entender os mecanismos biológicos que contribuem com esse comportamento. O mesmo está ligado a diversos tipos de transtornos psiquiátricos e apresenta uma correlação positiva com marcadores de ativação imunitária independente do transtorno (STEINER *et al.*, 2008).

Dentre os marcadores imunitários associados ao comportamento suicida, destacamos a IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória que tem sido implicada na dor, inflamação e doenças auto-imunes (REN & TORRES, 2009), ela também atua na modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), interferindo tanto na secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH), como do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), os quais são extremamente importantes no mecanismo de resposta ao estresse (SUDA *et al.*, 1990; TSAGARAKIS *et al.*, 1989).

Desregulações no eixo HPA também tem sido encontradas em indivíduos com comportamento suicida, havendo mais especificamente uma hiperativação do eixo nos mesmos (TSAGARAKIS *et al.*, 1989). O CRH, neuropeptídeo chave deste eixo exerce um efeito anti-inflamatório indiretamente através da produção de cortisol, e um efeito pró-inflamatório direto sob as células do sistema imune, o que mostra uma relação mútua entre as citocinas e o CRH (KARALIS *et al.*, 1991). Polimorfismos no gene do receptor para CRH do tipo 1 (CRHR1) tem se mostrado associados à susceptibilidade ao suicídio (WASSERMAN *et al.*, 2008; WASSERMAN *et al.*, 2009). Neste contexto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar se o polimorfismo de troca única (SNP) rs110402 no gene do CRHR1 está associado ao comportamento suicida assim como aos níveis da IL-1 β em jovens adultos da cidade de Pelotas/RS que apresentam comportamento suicida.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar alterações no eixo HPA e níveis de IL-1 β no comportamento suicida em jovens adultos residentes da cidade de Pelotas/RS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a associação do polimorfismo rs110402 no gene do CRHR1 com o comportamento suicida;
- Investigar a associação dos níveis de IL-1 β com o comportamento suicida;
- Analisar se existe relação entre o genótipo e as características sociodemográficas;
- Avaliar a interação entre o polimorfismo rs110402 com os níveis séricos de IL-1 β de acordo com o diagnóstico de risco ou tentativa de suicídio.

4. HIPÓTESES

- Existe associação entre o polimorfismo rs110402 no gene do CRHR1 com o risco e a tentativa de suicídio;
- Os níveis de IL-1 β estão associados ao risco e a tentativa de suicídio, estando aumentados nos mesmos;
- Não existe relação entre o genótipo e as características sociodemográficas;
- Indivíduos que apresentam o alelo A do polimorfismo rs110402 têm maiores níveis de IL-1 β nos indivíduos com comportamento suicida em relação ao controle.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 DESCRITORES

A busca bibliográfica do presente trabalho foi realizada na base de dados do PUBMED, onde foram utilizados os seguintes descritores: Suicide; Suicide attempt; Suicide risk; Suicide behavior; HPA axis; Corticotropin-Releasing Hormone Receptors (CRHR); CRHR1; Polymorphisms; Cytokine e IL-1 β . Para a realização das buscas não se utilizou filtro.

5.2 SELEÇÃO DOS ARTIGOS ENCONTRADOS

O total da busca através dos descritores utilizados foi de 270 artigos. Deste total, 54 foram incluídos no estudo após um refinamento na busca (Tabela 1). Além disso, alguns artigos utilizados neste projeto foram advindos das referências dos artigos selecionados e através de pesquisadores importantes na área.

Tabela 1. Descritores utilizados para busca bibliográfica

Busca PUBMED		
Descritores	Total de artigos	Artigos selecionados
Suicide behavior AND Cytokines	131	18
Suicide behavior AND HPA axis	79	12
HPA axis AND CRHR1 AND Polymorphism	35	10
Suicide attempt OR Suicide Risk AND Corticotropin-Releasing Hormone Receptors	14	7
Suicide attempt OR Suicide Risk AND IL-1 β	6	5
CRHR1 AND Suicide AND Polymorphism	5	2
Total	270	54

5.3 REFERENCIAL TEÓRICO

5.3.1 Comportamento Suicida

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente um milhão de pessoas cometem suicídio por ano, sendo este considerado uma das dez principais causas de morte no mundo (1999). O suicídio é um fenômeno complexo, no qual fatores genéticos, sociais e psicológicos estão implicados. O risco de suicídio tem sido associado com o estado civil solteiro (KPOSOWA 2000), desemprego (WONG *et al.*, 2008), baixa classificação econômica, gênero masculino (LAWRENCE *et al.*, 1999), doenças somáticas, transtornos psiquiátricos (BLACK & MILLER, 2015; SANTOS, *et al.*, 2009), e história de tentativa de suicídio (HAWTON *et al.*, 2003; NORDENTOFT *et al.*, 2002). Além destes fatores, há um crescente reconhecimento de que a tendência suicida e o suicídio apresentam um comportamento familiar que pode ser mediado pela transmissão de endofenótipos, bem como pelas condições ambientais. Neste sentido, o comportamento suicida apresenta agregação familiar, e ambos fatores genéticos e não genéticos envolvidos na transmissão familiar deste comportamento podem ser identificáveis no indivíduos com tentativa de suicídio e tornam-se alvos de uma intervenção terapêutica preventiva (MANN *et al.*, 2005).

Evidências biológicas tem demonstrado que indivíduos com comportamento suicida apresentam alterações na resposta inflamatória independente da doença psiquiátrica (STEINER *et al.*, 2008), tendo níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias quando comparados aos controles ou a indivíduos com transtornos psiquiátricos sem o risco de suicídio (O'DONOVAN *et al.*, 2013; BLACK & MILLER, 2015; MONFRIM, *et al.*, 2014). Além da ativação da resposta imune, o comportamento suicida parece estar ligado a uma resposta exacerbada ao estresse, através da hiperfunção do eixo HPA (JOKINEN & NORDSTRÖM, 2008). No transtorno depressivo, a hiperativação é um achado consistente (DIETRICH, 1998; JURUENA, 2013) sendo que muitos estudos demonstram que a exposição ao estresse crônico está envolvida na sua patofisiologia, através de uma disfunção nos sistemas de resposta do organismo que culmina em níveis elevados de cortisol (CLAES, 2009).

5.3.2 Sistema imunológico e comportamento suicida: papel da Interleucina-1 β

O sistema imunológico é composto por uma rede de células, tecidos e órgãos, que funcionam em conjunto para defender o organismo contra ataques de invasores (CRUVINEL *et al.*, 2010). Respostas desse sistema são constituídas de barreiras físicas e químicas (ex: pele e secreções), mecanismos imunitários não específicos (resposta inata) e o sistema imune específico (resposta adaptativa) (STOREY & JORDAN, 2008).

A resposta inata oferece a primeira linha de defesa contra a ação de microorganismos, através da liberação de leucócitos (principalmente macrófagos e neutrófilos), os quais irão agir na fagocitose e destruição destes agentes. Quando a ação destes leucócitos não é capaz de eliminar todos os agentes patogênicos, até por não conseguir fazer o reconhecimento dos mesmos, entram em ação os linfócitos do sistema adaptativo, os quais proporcionam um meio mais versátil de defesa e maior proteção contra uma reinfecção subsequente (JANEWAY *et al.*, 2001). O sistema inato e o sistema adaptativo trabalham juntos, sendo que após a migração dos leucócitos para o lugar infectado e a execução da fagocitose dos microorganismos, os macrófagos digerem os mesmos e transportam para a superfície algumas de suas partículas (antígenos), que serão reconhecidas pelos linfócitos dando continuidade à resposta imune (BRIETZKE, 2010).

Existem dois tipos principais de linfócitos que agem no sistema adaptativo, os linfócitos B e os linfócitos T, os linfócitos T se desenvolvem no timo, e os linfócitos B, em mamíferos, desenvolvem-se na medula óssea em adultos ou no fígado em fetos (ALBERTS & JOHNSON A & LEWIS, 2002). Os linfócitos B são responsáveis pela produção e secreção dos anticorpos, e os linfócitos T apresentam diferentes funções de acordo com a classe a qual pertencem. Entre estas classes está a das células T auxiliares (T helper), sendo consideradas as células mais importantes da imunidade adaptativa, elas reconhecem o antígeno na superfície do macrófago e passam a secretar mediadores do processo inflamatório, as citocinas (ALBERTS & JOHNSON A & LEWIS, 2002).

As citocinas são peptídeos reguladores que agem nos processos de defesa do hospedeiro, na reparação de tecidos e na interação e comunicação entre as células (TONELLI *et al.*, 2008). As mesmas são moléculas pleiotrópicas, ou seja, podem atuar sobre uma grande variedade de células diferentes, por vezes produzindo diferentes efeitos (antagônicas), e por outras efetuando as mesmas ações (redundantes)

(TOWNSEND & MCKENZIE, 2000). As ações das citocinas podem ocorrer sobre as células que as secretam (ação autócrina), sobre as células vizinhas (ação parácrina), e em alguns casos sobre as células distantes (ação endócrina) (ZHANG & AN, 2007). As mesmas podem ser pró-inflamatórias, envolvidas no aumento da inflamação, ou anti-inflamatórias, atuando no controle das pró-inflamatórias (OPAL & DEPALO, 2000).

No cérebro, as citocinas mais estudadas são a IL-1 β , o fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), e a Interleucina 6 (IL-6), citocinas pró-inflamatórias classicamente associadas à mediação da inflamação, elas são expressas em pequena quantidade no Sistema Nervoso Central (SNC) em condições normais, porém após uma infecção ou injúria, essas citocinas passam a ser expressas em quantidades elevadas, as quais têm sido relacionadas a processos patológicos (SCHOBITZ & HOLSBOER & KLOET, 1994). Das citocinas apresentadas acima, os dados mais consistentes em relação aos transtornos mentais são associados a IL-6, onde há um aumento nos níveis da mesma em transtornos depressivos, bipolares, esquizofrênicos e no suicídio (GANANÇA *et al.*, 2016; FONSEKA *et al.*, 2015; KOVACS *et al.*, 2016; MARINI *et al.*, 2016; LINDQVIST *et al.*, 2009; BLACK & MILLER, 2015; GOLDSTEIN *et al.*, 2015; AL-HAKEIM & AL-RAMMAHI & AL-DUJAILI, 2015). O TNF- α e a IL-1 β também têm sido associados com essas patologias, porém de forma um pouco menos consistente (STRAWBRIDGE *et al.*, 2015; BORTOLATO *et al.*, 2015; AL-HAKEIM & AL-RAMMAHI & AL-DUJAILI, 2015; WANG *et al.*, 2016; PANDEY *et al.*, 2012; REMLINGER-MOLENDA *et al.*, 2012).

Dentre as citocinas citadas, nosso foco é na IL-1 β por ser um mediador crítico da resposta adaptativa ao estresse (GADEK-MICHALSKA *et al.*, 2011) participando da modulação do eixo HPA, onde interfere na secreção de CRH e de ACTH (SUDA *et al.*, 1990; TSAGARAKIS *et al.*, 1989). A mesma é liberada principalmente por monócitos e macrófagos, bem como por fibroblastos e células endoteliais durante a inflamação, infecção, invasão e lesão celular (ZHANG & AN, 2007). A IL-1 β tem sido amplamente estudada ao falarmos de transtornos psiquiátricos (DINIZ *et al.*, 2010; MOTA *et al.*, 2013; REMLINGER-MOLENDA *et al.*, 2012; THOMAS *et al.*, 2005), porém não se sabe muito da sua relação com o comportamento suicida, sendo que os estudos sobre sua concentração no mesmo trazem resultados controversos. Pandey e colaboradores (2012) encontraram níveis aumentados de proteína e mRNA da IL-1 β no córtex pré-frontal de vítimas de suicídio, resultados esses que foram compatíveis com os dados publicados por uma meta-análise que mostrou uma associação entre os níveis de IL-1 β e

tendências suicidas (risco, tentativa e suicídio consumado) (BLACK & MILLER, 2015). Divergindo destes resultados, o estudo de Tonelli e colaboradores (2008), não encontrou alteração nos níveis de IL-1 β no córtex orbitofrontal de vítimas de suicídio. No estudo de Gabbay et al. (2009) alterações nessa citocina também não foram observadas no plasma de adolescentes deprimidos com tendências suicidas. As diferenças entre os resultados apresentados mostram a importância de estudos que visem elucidar o papel da IL-1 β no comportamento suicida e verificar outras variáveis que possam estar exercendo influência sobre a mesma.

5.3.3. Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

O eixo HPA envolve a interação direta entre estas três glândulas endócrinas na regulação da secreção hormonal (YOUNG *et al.*, 1995) e efetua um papel fundamental em resposta a estímulos internos e externos (JURUENA, 2004). Na etapa inicial da ativação do eixo, o hipotálamo secreta uma série de hormônios liberadores e inibidores que atuam sobre a pituitária anterior regulando a secreção hipofisária de hormônios de acordo com o estímulo. Em especial, dentre os vastos tipos de hormônios liberados pelo hipotálamo, o CRH atua via ligação aos seus receptores metabotrópicos CRHR1 e CRHR2 na pituitária produzindo um aumento do influxo de cálcio e dos níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) (NEMEROFF, 1996). Este processo desencadeia por sua vez, a ativação de vias de sinalização intracelulares através da fosforilação da proteína kinase A (PKA), resultando em uma maior transcrição do gene pró-opiomelanocortina (POMC), o antecessor imediato do ACTH e da beta endorfina (AYALA, 2002). A liberação hipofisária do ACTH estimula a produção de glicocorticóides pelo córtex da glândula adrenal (ISHITOBI *et al.*, 2012) (Figura 1). Uma vez liberado, o cortisol por meio de um mecanismo de retroalimentação negativa, será responsável pela inibição da secreção do ACTH pela pituitária e do CRH pelo hipotálamo (JURUENA, 2004).

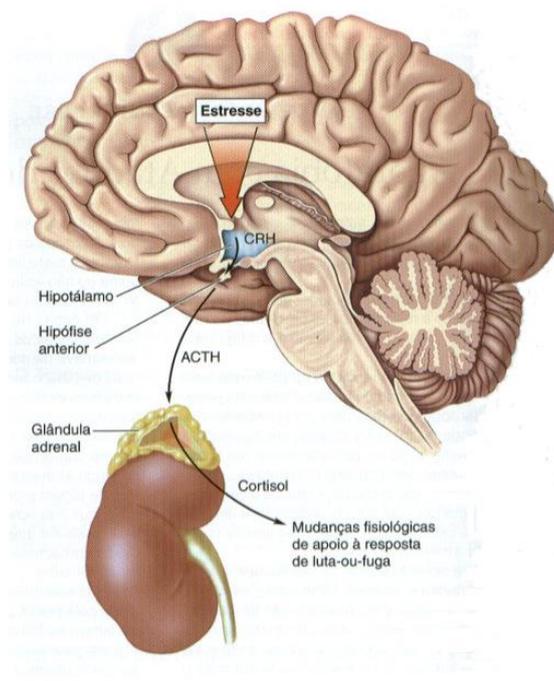


Figura 1. Mecanismo de funcionamento do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal¹

Em humanos o CRH apresenta 41 aminoácidos, sendo sintetizado por um precursor de 91 aminoácidos, chamado pré-pró CRH (AYALA, 2002). A região promotora do gene do CRH contém sítios de ligação para diferentes elementos de resposta, como por exemplo, aos glicocorticóides (ROCHE *et al.*, 1988; XU *et al.*, 2001; PARHAM *et al.*, 2004) permitindo que fatores externos possam controlar a transcrição do seu gene. Além da sua produção pelo hipotálamo, o CRH também é produzido em locais inflamatórios periféricos onde em contraste com seus efeitos imunossupressores indiretos, exerce um efeito pró-inflamatório direto (KARALIS *et al.*, 1991; PAEZ *et al.*, 1995).

Como citado acima, a ação biológica do CRH é mediada por dois subtipos de receptores diferentes, ambos acoplados a proteína G, o receptor CRHR1 e o receptor CRHR2, os quais diferem-se quanto aos seus perfis farmacológicos, afinidade de ligantes e distribuição anatômica (MULLER, 2001). Estes receptores não só se ligam ao CRH, como também a outros peptídeos relacionados ao mesmo, como as urocortinas (UCN's) (HOLSBOER, 2008).

O CRHR1 é principalmente encontrado na pituitária, amígdala, hipocampo, cerebelo e córtex (KOOB & HEINRICH, 1999). Os efeitos do CRHR1 nos padrões de

¹ Figura disponível em: <http://www.psiquiatriageral.com.br/cerebro/texto13.htm>

potenciais de ação nos neurônios e na expressão gênica são dependentes tanto da dose de CRH liberada quanto da região cerebral na qual a estimulação está ocorrendo (WASSERMAN *et al.*, 2010). O gene do CRHR1 está localizado no braço longo do cromossomo 17q21-31 abrangendo 51 Kb de DNA genômico e contendo 13 éxons (BRADLEY *et al.*, 2008).

Em relação ao CRHR2, podemos dizer que o mesmo apresenta três subtipos, sendo eles, o alfa, beta e gama. Apesar de entre eles existirem diferenças estruturais ambos os subtipos apresentam características farmacológicas similares. O gene do CRHR2 está localizado no braço curto do cromossomo 17p14-15, abrangendo 30kb e contendo 12 éxons (VILLAFUERTE *et al.*, 2002). O CRHR2 é encontrado abundantemente nos tecidos periféricos, mais especificamente no trato gastrointestinal, pulmão, ovário e nos miócitos cardíacos, apresentando uma menor quantidade no sistema nervoso central (RIVIER *et al.*, 2003). Diferentemente do CRHR1, o CRHR2 apresenta elevada afinidade pelas urocortinas e pouca afinidade pelo CRH (BALE *et al.*, 2005). O mesmo tem uma importante participação nos processos metabólicos envolvidos nos mecanismos de resposta para manutenção da homeostase do nosso organismo.

5.3.4 Alterações no eixo HPA, polimorfismos no CRHR1 e CRHR2

Alterações no eixo HPA podem causar uma inabilidade de regular e terminar uma resposta a um evento estressor, causando um desequilíbrio prejudicial ao indivíduo. Estas alterações têm sido observadas em pacientes diagnosticados com transtornos psiquiátricos (KECK, 2006; MAXWELL & BENNETT, 2008; JURUENA, 2013), bem como em indivíduos que tentaram ou cometeram suicídio (ARATÓ *et al.*, 1989; JOKINEN *et al.*, 2007; JOKINEN & NORDSTROM, 2009; LINDQVIST *et al.*, 2008, NEMEROFF *et al.*, 1988). Acredita-se que essa desregulação no eixo possa estar acompanhada ou ser fruto de variações genéticas, gerando uma busca por associações entre genes importantes para o funcionamento do eixo e diferentes transtornos.

Neste contexto devido ao papel fundamental dos glicocorticóides no mecanismo de feedback negativo do eixo HPA, polimorfismos no gene dos seus receptores (gene NR3C1) vem sendo alvos de estudos, os quais já apresentaram uma relação com a susceptibilidade ao transtorno depressivo, com o curso da doença no transtorno bipolar e com comportamentos relacionados ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

(TDAH) (SZCZEPANKIEWICZ *et al.*, 2011; FORTIER *et al.*, 2013). A proteína de ligação FK506 5 (FKBP5) que regula a sensibilidade do receptor de glicocorticóide também tem sido um gene candidato nos estudos de transtornos psiquiátricos, sendo que polimorfismos na mesma já foram associados a depressão, ao transtorno de estresse pós-traumático (PTSD), a tentativa de suicídio e ao suicídio consumado (ZIMMERMANN *et al.*, 2011; BINDER *et al.*, 2008; BINDER *et al.*, 2004; ROY *et al.*, 2010). Além dos polimorfismos que interferem nos receptores dos glicocorticóides, existe uma vasta literatura visando alterações que acometem os receptores do CRH.

O gene do CRHR1 tem sido considerado um gene candidato nos estudos farmacogenéticos, sendo que variações no mesmo têm sido associadas a diferentes tipos de transtornos psiquiátricos (ISHITOB *et al.*, 2012; WEBER *et al.*, 2015; AMSTADTER *et al.*, 2011) e à susceptibilidade genética para o suicídio, como demonstrado no estudo de De Luca e colaboradores (2010) no qual eles encontraram uma interação significativa entre o CRHR1 e a proteína de ligação CRH com a tentativa de suicídio e a gravidade do comportamento suicida em indivíduos com esquizofrenia. E no estudo de Wasserman *et al.* (2008) onde eles demonstraram uma associação entre alterações no gene do CRHR1 e a tentativa de suicídio em indivíduos expostos a baixos níveis de estresse.

Dentre os SNPs no gene do CRHR1, o rs110402 tem sido amplamente estudado, demonstrando associação com transtorno depressivo (ISHITOB *et al.*, 2012), com risco aumentado de apresentar padrão sazonal e idade precoce de início do primeiro episódio de depressão (PAPIOL *et al.*, 2007), com aumento na resposta de cortisol, com traços de ansiedade (MAHON *et al.*, 2013) e com tendências suicidas (WASSERMAN *et al.*, 2009). Estudos de haplótipos formados com este polimorfismo também já demonstraram um efeito protetor na depressão e no trauma na infância (POLANCZYK *et al.*, 2009; KRANZLER *et al.*, 2011).

Em relação ao CRHR2, estudos com animais geneticamente modificados deficientes para esse receptor mostram que os mesmos ficam hipersensíveis ao estresse, apresentam um aumento de ansiedade, agressividade e uma perda de mobilidade durante o estresse agudo (VILLAFUERTE *et al.*, 2002; COSTE *et al.*, 2006). Alterações no gene desse receptor, também já relataram associação com a depressão, o que foi demonstrado no estudo realizado por Ishtobi e colaboradores (2012) na população japonesa, o qual encontrou uma associação com o polimorfismo rs3779250 e o transtorno depressivo.

Outro estudo que fortalece esta ideia foi realizado com uma população espanhola onde se observou um risco aumentado dos sintomas depressivos em portadores do alelo G do polimorfismo rs2270007 no gene do CRHR2 (PAPIOL *et al.*, 2007).

Autor, ano e revista	População estudada	Avaliações Biológicas	Objetivo	Principais resultados
<p>Gabbay, V et al. 2009 Journal of child and adolescent psychopharmacology</p>	<p>12 adolescentes com depressão com tendências suicidas, 18 adolescentes não suicidas com depressão e 15 indivíduos saudáveis</p>	<p>IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-4</p>	<p>Verificar se adolescentes deprimidos com tendências suicidas apresentariam aumento dos níveis plasmáticos do IFN- γ, TNF-α, IL-6, e IL-1β, e verificar se existe um desequilíbrio pró-inflamatório =anti-inflamatório (IFN-γ = IL-4), em comparação com adolescentes deprimidos não suicidas e controles saudáveis.</p>	<p>Adolescentes suicidas com depressão apresentaram níveis plasmáticos significativamente diminuídos de TNF-α quando comparados aos adolescentes não suicidas com depressão. Os níveis de IFN-γ foram significativamente maiores no grupo de depressão suicida e não suicida quando comparados controles. A mensuração das outras citocinas não diferiu entre os grupos</p>
<p>Pandey , G.N. et al. 2012 Journal of Psychiatric Research</p>	<p>24 vítimas de suicídio adolescentes e 24 controles pareados</p>	<p>IL-1β, IL-6 e TNF-α</p>	<p>Verificar se existe diferença na expressão dos genes e nos níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α no córtex pré-frontal (PFC) de vítimas de suicídio em comparação aos controles</p>	<p>A expressão do mRNA e os níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α foram significativamente aumentados no córtex pré-frontal de vítimas de suicídio em comparação aos controles.</p>

<p>Tonelli, L.H.</p> <p>2008</p> <p>Acta Psychiatrica Scandinavica</p>	<p>34 vítimas de suicídio e 17 controles</p>	<p>Espécies de mRNA para TNF α, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.</p>	<p>Analisar a expressão de algumas citocinas no córtex orbitofrontal de vítimas de suicídio.</p>	<p>A IL-4 foi encontrada aumentada em mulheres vítimas de suicídio e a IL-13 nos homens vítimas de suicídio. Não houve diferença em relação as outras citocinas.</p>
<p>Jokinen, J. et al.</p> <p>2009</p> <p>Journal of affective disorders</p>	<p>36 jovens adultos, 18 com tentativa de suicídio e 18 sem a tentativa</p>	<p>Níveis séricos de cortisol</p>	<p>Investigar os resultados do teste de supressão de dexametasona (DST) e os níveis séricos de cortisol pós-dexametasona em jovens pacientes com transtorno de humor com e sem tentativa de suicídio</p>	<p>A não-supressão do DST foi associada a tentativa de suicídio. O cortisol sérico pós-dexametasona foi significativamente maior em quem tinha tentativa de suicídio dos que não a tinham, fortalecendo a ideia da hiperatividade do eixo HPA no comportamento suicida</p>
<p>Wasserman D. et al.</p> <p>2008</p> <p>Genes, Brain and Behavior</p>	<p>272 trios de famílias com descendentes que tentaram suicídio</p>	<p>CRH \rightarrow rs1870393 e rs3176921</p> <p>CRHR1 \rightarrow rs1396862 e rs4792887</p>	<p>Investigar os genes do CRH e do CRHR1, sob maior nível de estimulação do fator de transcrição T-box19 (fator de transcrição do gene POMC)</p>	<p>Estratificação com base nos níveis de estresse da vida mostrou uma associação do SNP rs 4792887 no gene CRHR1 com a tentativa de suicídio em indivíduos expostos a baixos níveis de estresse, identificando esse SNP como um possível marcador para susceptibilidade genética do suicídio.</p>

<p>Bradley, R. G. et al. 2008</p> <p>Archives of General Psychiatry</p>	<p>422 indivíduos Afro-americanos, de baixo nível socioeconômico, e com altos índices de trauma de vida e uma amostra independente de 199 indivíduos brancos e com maior nível socioeconômico</p>	<p>CRHR1 → rs7209436, rs110402, rs242924</p>	<p>Examinar as interações gene x ambiente entre polimorfismos genéticos no locus CRHR1 e medidas de abuso infantil nos sintomas depressivos em adultos.</p>	<p>Os SNPs rs110402 e rs7209436 no CRHR1 apresentaram interações significativas com o abuso de crianças. Alelos raros no rs7209436 (TT) ou rs110402(AA), apresentaram um efeito genético protetor em pessoas expostas ao abuso infantil.</p>
<p>Ishitobi, Y et al. 2013</p> <p>American Journal of Medical Genetics Part B</p>	<p>173 casos de DM e 285 controles</p>	<p>CRHR1 → rs4076452, rs7209436, rs110402, rs242924, rs242940 e rs173365</p> <p>CRHR2 → rs4722999, rs3779250, rs2267710, rs1076292, rs2284217 e rs226771</p>	<p>Confirmar a associação da variação genética no CRHR1 e CRHR2 em relação à depressão e ao transtorno de pânico (TP)</p>	<p>O estudo mostrou uma associação entre os SNPs rs110402 e rs242924 no CRHR1 e o rs3779250 no CRHR2 com a DM, e uma associação do polimorfismo rs242924 no CRHR1 com o TP.</p>

6. METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO

O estudo seguiu um delineamento do tipo transversal de base populacional da zona urbana de Pelotas-RS, e fez 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 [Anexo A]. Todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido [Anexo B].

6.2 PARTICIPANTES

A seleção amostral foi 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). Os participantes foram diagnosticados através da entrevista diagnóstica estruturada Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI).

6.2.1 Cálculo Amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado com o objetivo de determinar o tamanho mínimo necessário para que fosse detectada uma diferença entre os portadores da variante genética analisada. Essa análise foi feita pelo programa Pepi Win, e o cálculo utilizou um estudo prévio com 159 indivíduos e tomou como base a proporção do alelo mutado, resultando em um total de 262 indivíduos requeridos para encontrar uma diferença significativa utilizando um alfa de 5% e poder de 80% (PAPIOL *et al.*, 2007).

6.2.2 Critérios de inclusão

- Os participantes tinham entre 18 e 35 anos de idade;
- Residiam na zona urbana de Pelotas-RS, bem como no domicílio sorteado;
- Aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

6.2.3 Critérios de exclusão

- Foram excluídos do estudo indivíduos incapazes de responder à entrevista por problemas físicos ou cognitivos.

6.3 PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS

6.3.1 Desfecho primário: Risco ou tentativa de suicídio

6.3.2 Desfecho secundário: Polimorfismo e níveis séricos da IL-1 β

6.3.3 Critérios diagnósticos e Medidas psicológicas

O comportamento suicida foi avaliado através do Mini Internacional Neuropsychiatric Interview (MINI). O Mini é uma entrevista clínica estruturada, que dura de 15 a 30 minutos, a mesma é constituída por módulos diagnósticos independentes, que visam reduzir o tempo de entrevista, tendo como prioridade a exploração dos transtornos atuais [Anexo C].

6.3.4 Coleta de dados sociodemográficos

As características da amostra foram determinadas através do questionário sociodemográfico, incluindo avaliação socioeconômica, sendo esta feita através do uso do Indicador Econômico Nacional [Anexo D].

6.3.5 Coleta de material biológico

A coleta do material biológico foi realizada pela equipe de bioquímicos e enfermeiros através de punção venosa de 12 ml de sangue no momento da aplicação do questionário, no qual entrevistadores treinados (psicólogos ou psiquiatras) aplicaram os instrumentos e avaliação diagnóstica.

6.3.6 Análise do polimorfismo

Após a coleta do material biológico, o DNA total foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o método descrito por Lahiri e Nurnberger (1987). Posteriormente o DNA total foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a -20°C até a análise molecular. O polimorfismo apresentado na tabela 2 foi 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* foram 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 foram 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 foram analisados no software *System Sequence Detection* v.1.4 (Applied Biosystems).

Tabela 2. Polimorfismo analisado

Nome Gene	Posição cromossômica	Alelos	Identificação do SNP
CRHR1	17q21-31	C/T	rs110402

6.3.7 Dosagem da IL-1 β

O níveis séricos da IL-1 β foram avaliados através do método de Elisa utilizando kits comerciais disponíveis (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., USA) em um leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190) .

6.4 ANÁLISE DE DADOS

Os questionários foram digitados e codificados diretamente no programa EpiInfo6, no momento da entrevista, sem necessidade de usar questionário de papel. As frequências genotípicas e alélicas foram estimadas por contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg, testado pelo teste de qui-quadrado. As distribuições alélicas e genotípicas entre os grupos de indivíduos foram avaliadas pelo qui-quadrado. Para a comparação de variáveis contínuas com distribuição normal entre os grupos de pacientes foi utilizados o testet *t de Student* ou análise da variância (ANOVA), e o teste do qui-quadrado para comparação entre variáveis nominais. Para análise da interação entre os fatores realizamos a regressão logística multinomial. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas através do pacote estatístico SPSS 21.0 para Windows.

6.5 ASPECTOS ÉTICOS

Foram respeitados todos os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nº 466 de 12 de Dezembro de 2012. Sendo 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 apresentaram transtornos psiquiátricos receberam encaminhamento para atendimento psicológico/psiquiátrico no Campus da Saúde da UCPel.

6.5.1 Riscos

O presente estudo apresentou riscos mínimos, ligados apenas ao momento da coleta de sangue, onde poderia ocorrer edema, ou dor local;

6.5.2 Benefícios

Além de gerar informações que vem a contribuir com a comunidade científica, os participantes identificados com risco ou tentativa de suicídio receberam atendimento;

6.6 CRONOGRAMA

	2014										2015										2016			
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise do polimorfismo											X	X	X	X										
Dosagem da IL-1 β										X	X	X	X											
Análise dos resultados															X	X	X							
Elaboração do artigo e defesa do mestrado																		X	X	X	X	X	X	X

6.7 ORÇAMENTO

<i>Produto</i>	<i>Valor unitário (R\$)</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Valor total</i>
<i>Material de Consumo</i>			
Master Mix	2.300,00	1	2.300,00
SNP Genotyping Assay	1.270,00	1	1.270,00
TMB	500,00	1	500,00
Kits Elisa (IL-1 β)	3.500,00	1	3.500,00
		Total	7.570,00

REFERÊNCIAS

- AGELAKI, S.; TSATSANIS, C.; GRAVANIS, A.; MARGIORIS, A.N. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *In: Infect Immun*. v. 70, p. 6068-6074, 2002.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science. 4th edition, cap. 24, p. 1540-1589, 2002.
- AL-HAKEIM, H.K.; AL-RAMMAHI, D.A.; AL-DUJAILI, A.H. IL-6, IL-18, sIL-2R, and TNF α proinflammatory markers in depression and schizophrenia patients who are free of overt inflammation. *In: J Affect Disord*. v. 182, p.106-114, 2015.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-IV**: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Artmed: Porto Alegre, 2013.
- AMSTADTER, A.B.; NUGENT, N.R.; YANG, B.Z.; MILLER, A.; SIBURIAN, R.; MOORJANI, P.; HADDAD, S.; BASU, A.; FAGERNESS, J.; SAXE, G.; SMOLLER, J.W.; KOENEN, K.C. Corticotrophin-releasing hormone type 1 receptor gene (CRHR1) variants predict posttraumatic stress disorder onset and course in pediatric injury patients. *In: Dis Markers*. v. 30, p. 89-99, 2011.
- ARATÓ, M.; BÁNKI, C.M.; BISSETTE, G.; NEMEROFF, C.B. Elevated CSF CRF in suicide victims. *In: Biol Psychiatry*. v. 25, p.355–359, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724:2011**. Disponível em: <http://www.usp.br/prolam/ABNT_2011.pdf>. Acesso 26 maio 2014.
- AYALA, A. R. Antagonistas do Hormônio Liberador da Corticotrofina: Atualização e Perspectivas. *In: Arq Bras Endocrinol Metab*. v. 46, p. 619-625, 2002.
- BALE, T. L. Sensitivity to stress: Dysregulation of CRF pathways and disease development. *In: Horm Behav*. V. 48, p. 1-10, 2005.
- BINDER, E.B.; BRADLEY, R.G.; LIU, W.; EPSTEIN, M.P.; DEVEAU, T.C.; MERCER, K.B.; TANG, Y.; GILLESPIE, C.F.; HEIM, C.M.; NEMEROFF, C.B.; SCHWARTZ, A.C.; CUBELLS, J.F.; RESSLER, K.J. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *In: JAMA*. v. 299, p. 1291-1305, 2008.
- BINDER, E.B.; SALYAKINA, D.; LICHTNER, P.; WOCHNIK, G.M.; ISING, M.; PÜTZ, B.; PAPIOL, S.; SEAMAN, S.; LUCA, E.S.; KOHLI, M.A.; NICKEL, T.; KÜNZEL, H.E.; FUCHS, B.; MAJER, M.; PFENNIG, A.; KERN, N.; BRUNNER, J.; MODELL, S.; BAGHAI, T.; DEIML, T.; ZILL, P.; BONDY, B.; RUPPRECHT, R.; MESSER, T.; KÖHNLEIN, O.; DABITZ, H.; BRÜCKL, T.; MÜLLER, N.; PFISTER, H.; LIEB, R.; MUELLER, J.C.; LÖHMUSSEAR, E.; STROM, T.M.; BETTECKEN, T.; MEITINGER, T.; UHR, M.; REIN, T.; HOLSBOER, F.; MULLER-MYHSOK, B. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *In: Nat Genet*. v. 36, p. 1329-1325, 2004.

BLACK, C.; MILLER, B.J. Meta-Analysis of Cytokines and Chemokines in Suicidality: Distinguishing Suicidal Versus Nonsuicidal Patients. *In: Biol Psychiatry*. v. 1, p.28–37, 2015.

BORTOLATO, B.; CARVALHO, A.F.; SOCZYNSKA, J.K.; PERINI, G.I.; MCINTYRE, R.S. The Involvement of TNF- α in Cognitive Dysfunction Associated with Major Depressive Disorder: An Opportunity for Domain Specific Treatments. *In: Curr Neuropharmacol*. v.13, p.558-756, 2015.

BRADLEY, R.G.; BINDER, E.B.; EPSTEIN, M.P.; TANG, Y.; NAIR, H.P.; LIU, W. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *In: Arch Gen Psychiatry*. v. 65, p. 190–200, 2008.

BRIETZKE, E.M. **Mediadores inflamatórios no transtorno bipolar**. 2010. 155p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas: Psiquiatria) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/24601/000747552.pdf?...0>>. Acesso: 20 jan. 2016.

CLAES, S. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. *In: Ann N Y Acad Sci*. 2009, p. 216–228.

COSTE, S. C.; HEARD, A. D.; PHILLIPS, T. J.; STENZEL-POORE, M. P. Corticotropin-releasing factor receptor type 2- deficient mice display impaired coping behaviors during stress. *In: Genes Brain Behav*. v. 5, p. 131-138, 2006.

CRUVINEL, W.N.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *In: Bras J Rheumatol*. v.50, p.434-461, 2010.

DE LUCA, V.; THARMALINGAM, S.; ZAI, C.; POTAPOVA, N.; STRAUSS, J.; VINCENT, J.; KENNEDY, J.L. Association of HPA axis genes with suicidal behaviour in schizophrenia. *In: J Psychopharmacol*. v. 25, p. 677-682. 2010.

DIETRICH, V. H. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *In: Adv Study Behav*. v. 27, p.1–131. 1998.

DINIZ, B.S.; TEIXEIRA, A.L.; TALIB, L.; GATTAZ, W.F.; FORLENZA, O.V. Interleukin-1beta serum levels is increased in antidepressant-free elderly depressed patients. *In: Am J Geriatr Psychiatry*. v. 18, p.172-176. 2010.

FONSEKA, T.M.; MCINTYRE, R.S.; SOCZYNSKA, J.K.; KENNEDY, S.H. Novel investigational drugs targeting IL-6 signaling for the treatment of depression. *In: Expert Opin Investig Drugs*. v. 24, p. 459-475. 2015.

FORTIER, M.È.; SENGUPTA, S.M.; GRIZENKO, N.; CHOUDHRY, Z.; THAKUR, G.; JOOBER, R. Genetic evidence for the association of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis with ADHD and methylphenidate treatment response. *In: Neuromolecular Med*. v.15, p.122-132. 2013.

GABBAY, V.; KLEIN, R.G.; GUTTMAN, L.E.; BABB, J.S.; ALONSO, C.M.; NISHAWALA, M.; KATZ, Y.; GAIT, M.R.; GONZALEZ, C.J. A preliminary study of

cytokines in suicidal and nonsuicidal adolescents with major depression. *In: J Child Adolesc Psychopharmacol.* v. 19, p.423-430. 2009.

GADEK-MICHALSKA, A.; BUGAJSKI, J. Interleukin-1 (IL-1) in stress-induced activation of limbic-hypothalamic-pituitary adrenal axis. *In: Pharmacol Rep.* v. 62, p. 969-82. 2010.

GANANÇA, L.; OQUENDO, M.A.; TYRKA, A.R.; CISNEROS-TRUJILLO, S.; MANN, J.J., SUBLETTE, M.E. The role of cytokines in the pathophysiology of suicidal behavior. *In: Psychoneuroendocrinology.* v. 63, p.296-310. 2016.

GOLDSTEIN, B.I.; LOTRICH, F.; AXELSON, D.A.; GILL, M.K.; HOWER, H.; GOLDSTEIN, T.R.; FAN, J.; YEN, S.; DILER, R.; DICKSTEIN, D.; STROBER, M.A.; IYENGAR, S.; RYAN, N.D.; KELLER, M.B.; BIRMAHER, B. Inflammatory markers among adolescents and young adults with bipolar spectrum disorders. *In: J Clin Psychiatry.* v. 76, p. 1556-1563. 2015.

HAWTON, K.; ZAHL, D.; WEATHERALL, R. Suicide following deliberate self-harm: long-term follow-up of patients who presented to a general hospital. *In: Br J Psychiatry.* v.182, p.537-542. 2003.

HOLSBOER, F.; LSBOER, M. Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *In: Eur J Pharmacol.* v. 583, p. 350-357. 2008.

ISHITOBI, Y.; NAKAYAMA, S.; YAMAGUCHI, K.; KANEHISA, M.; HIGUMA, H.; MARUYAMA, Y.; NINOMIYA, T.; OKAMOTO, S.; TANAKA, Y.; TSURU, J.; HANADA, H.; ISOGAWA, K.; AKIYOSHI, J. Association of CRHR1 and CRHR2 with Major Depressive Disorder and Panic Disorder in a Japanese Population. *In: Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* v. 159B, p. 429-436. 2012.

JANEWAY, C.A. Jr.; TRAVERS, P.; SHLOMCHIK, M.; WALPORT, M. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.** New York: Garland Science, 5th edition. 2001.

JOKINEN J.; NORDSTROM P. HPA axis hyperactivity and attempted suicide in young adult mood disorder inpatients. *In: J Affect Disord.* v. 116, p. 17–20. 2009.

JURUENA, M. F. Early life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *In: Epilepsy Behav.* v. 13, p. 553-562. 2013.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J. ; PARIANTE, C. M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. *In: Rev Bras Psiquiatria.* v. 26, p. 189-201. 2004.

KARALIS, K.; SANO, H.; REDWINE, J.; LISTWAK, S., WILDER, R.L.; CHROUSOS, G.P. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *In: Science.* v. 254, p. 421-423. 1991.

- KECK, M. E. Corticotropin-releasing-factor, vasopressin and receptor systems in depression and anxiety. *In: Amino acids*. v. 31, p. 241-250. 2006.
- KOOB, G. F.; HEINRICHS, S. C. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *In: Brain Res*. v. 848, p. 141-152. 1999.
- KOVACS, D.; ESZLARI, N.; PETSCHNER, P.; PAP, D.; VAS, S.; KOVACS, P.; GONDA, X.; BAGDY, G.; JUHASZ, G. Interleukin-6 promoter polymorphism interacts with pain and life stress influencing depression phenotypes. *In: J Neural Transm* (Vienna). 2016.
- KPOSOWA, A.J. Marital status and suicide in the National Longitudinal Mortality Study. *In: J Epidemiol Community Health*. v. 54, p. 254-261. 2000.
- KRANZLER, H. R.; FEINN, R.; NELSON, E. C.; COVAULT, J.; ANTON, R. F.; FARRER, L.; GERLERNTER, J. A CRHR1 haplotype moderates the effect of adverse childhood experiences on lifetime risk of major depressive episode in African-American women. *In: Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. v. 156, p. 960-968. 2011.
- LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *In: Nucleic Acids Res*. v. 19, p.5444. 1991.
- LAWRENCE, D.M.; HOLMAN, C.D.; JABLENSKY, A.V.; FULLER, S.A. Suicide rates in psychiatric in-patients: an application of record linkage to mental health research. *In: Aust N Z J Public Health*. v. 23, p. 468-470. 1999.
- LINDQVIST, D.; JANELIDZE, S.; HAGELL, P.; ERHARDT, S.; SAMUELSSON, M.; MINTHON, L.; HANSSON, O.; BJÖRKQVIST, M.; TRÄSKMAN-BENDZ, L.; BRUNDIN, L. Interleukin-6 is elevated in the cerebrospinal fluid of suicide attempters and related to symptom severity. *In: Biol Psychiatry*. v. 66, p. 287-292. 2009.
- MANN, J.J.; BORTINGER, J.; OQUENDO, M.A.; CURRIER, D.; LI, S.; BRENT, D.A. Family history of suicidal behavior and mood disorders in probands with mood disorders. *In: Am J Psychiatry*. v. 162, p. 1672-1679. 2005.
- MARINI, S.; VELLANTE, F.; MATARAZZO, I.; DE BERARDIS, D.; SERRONI, N.; GIANFELICE, D.; OLIVIERI, L.; DI RENZO, F.; DI MARCO, A.; FORNARO, M.; ORSOLINI, L.; VALCHERA, A.; IASEVOLI, F.; MAZZA, H.; PERNA, L.; MARTINOTTI, L.; DI GIANNANTONIO H.; INT, J. Inflammatory markers and suicidal attempts in depressed patients: A review. *In: Immunopathol Pharmacol*. 2016, p. 1-12.
- MAXWELL, R.; BENNETT, A. O. Stress and anxiety in schizophrenia and depression: glucocorticoids, corticotropin-releasing-hormone and synapse regression. *In: Aust N Z J Psychiatry*. v. 42, p. 995-1002. 2008.
- MONFRIM, X.; GAZAL, M.; DE LEON, P.B.; QUEVEDO, L.; SOUZA, L.D.; JANSEN, K.; OSES, J.P.; PINHEIRO, R.T.; SILVA, R.A.; LARA, D.R.; GHISLENI, G.; SPESSATO, B.; KASTER, M.P. Immune dysfunction in bipolar disorder and suicide risk: is there an association between peripheral corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 β ? *In: Bipolar Disord*. v. 16, p. 741-747. 2014.
- MOTA, R.; GAZAL M.; ACOSTA, B.A.; DE LEON, P.B.; JANSEN, K.; PINHEIRO, R.T.; SOUZA, L.D.; SILVA, R.A.; OSES J.P.; QUEVEDO,L.; LARA, D.R.; GHISLENI

G.; KASTER M.P; Interleukin-1beta is associated with depressive episode in major depression but not in bipolar disorder. *In: J Psychiatr Res.* v. 47, p. 2011-2014. 2013.

MULLER, M. B.; PREIL, J.; RENNER, U.; ZIMMERMANN, S.; KRESSE, A. E.; STALLA, G. K.; KECK, M. E.; HOLSBOER, F.; WURST, W. Expression of CRHR1 and CRHR2 in mouse pituitary and adrenal gland: implications for HPA system regulation. *In: Endocrinology.* v. 142, p. 4150-4153. 2001.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J.; BISSETTE, G.; ANDORN, A. C.; STANLEY, M. Reduced corticotropin-releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *In: Arch Gen Psychiatry.* v. 45, p. 577–579. 1988.

NEMEROFF, C.B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *In: Mol Psychiatry.* v. 1, p. 336-342. 1996.

NORDENTOFT, M.; JEPPESEN, P.; ABEL, M.; KASSOW, P.; PETERSEN, L.; THORUP, A.; KRARUP, G.; HEMMINGSEN, R.; JORGENSEN, P. OPUS study: suicidal behaviour, suicidal ideation and hopelessness among patients with first-episode psychosis. One-year follow-up of a randomised controlled trial. *In: Br J Psychiatry Suppl.* v. 43, p. 98-106. 2002.

O'DONOVAN, A.; RUSH, G.; HOATAM, G.; HUGHES, B.M.; MCCROHAN, A.; KELLEHER, C.; O'FARRELLY, C.; MALONE, K.M. Suicidal ideation is associated with elevated inflammation in patients with major depressive disorder. *In: Depress Anxiety.* v. 30, p. 307—314. 2013.

OPAL, S.M.; DEPALO, V.A. Anti-inflammatory cytokines. *In: Chest.* v. 117, p. 1162-1172. 2000.

PAEZ, M.P.; SAUER, J.; PEREZ, C.C.; FINKIELMAN, S.; STALLA, G.K.; HOLSBOER, F.; ARZT E. Corticotropin-releasing hormone differentially modulates the interleukin-1 system according to the level of monocyte activation by endotoxin. *In: Endocrinology.* v. 136, p. 5504-5510. 1995.

PANDEY, G.N.; RIZAVI, H.S.; REN, X.; FAREED, J.; HOPPENSTEADT, D.A.; ROBERTS, R.C.; CONLEY, R.R.; DWIVEDI, Y. Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims. *In: J Psychiatr Res.* v. 46, p. 57-63. 2012.

PAPIOL, S.; ARIAS, B.; GASTÓ, C.; GUITIÉRREZ, B.; CATALÁM, R.; FANANÁS, L. Genetic variability at HPA axis in major depression and clinical response to antidepressant treatment. *In: J Affect Disord.* v. 104, p. 83-90. 2007.

PARHAM, K. L.; ZERVOU, S.; KARTERIS, E.; CATALANO, R. D.; OLD, R. W.; HILLHOUSE, E. W. Promoter analysis of human corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor and regulation by CRF and Urocortin. *In: Endocrinology.* v. 145, p. 3971–3983. 2004.

POLANCZYK, G.; CASPI, A.; WILLIAMS, B., PRICE, T. S.; DANESE, A., SUGDEN, K.; UHER, R.; POULTON, R.; MOFFITT, T. E. Protective Effect of CRHR1 Gene Variants on the Development of Adult Depression Following Childhood Maltreatment. *In: Arch Gen Psychiatry.* v. 66, p. 978-985. 2009.

- REMLINGER-MOLENDA A., WÓJCIAK P., MICHALAK M. & RYBAKOWSKI J. Activity of selected cytokines in bipolar patients during manic and depressive episodes. *In: Psychiatr Pol.* v. 46, p. 599-611. 2012.
- REN K, TORRES R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *In: Brain Res Rev.* v. 60, p. 57-64. 2009.
- RIVIER C. L.; GRIGORIADIS, G.P.; RIVIER, J.E. Role of corticotropin- releasing factor receptors type 1 and 2 modulating the rat adrenocorticotropin response to stressors. *In: Endocrinology.* v. 144, p. 2396-2403. 2003.
- ROCHE, P. J.; CRAWFORD, R. J.; FERNLEY, R. T.; TREGEAR, G. W.; COGHLAN, J. P. Nucleotide sequence of gene coding for ovine corticotropin-releasing factor and regulation of its mRNA levels by glucocorticoids. *In: Gene.* 1988, v. 71, p. 421-431.
- ROY, A.; GORODETSKY, E.; YUAN, Q.; GOLDMAN, D.; ENOCH, M.A. Interaction of FKBP5, a stress-related gene, with childhood trauma increases the risk for attempting suicide. *In: Neuropsychopharmacology.* v. 35, p.1674-1683. 2010.
- SANTOS, C.M.; MELEIRO, A.; SOUSA, K.A. Como Prevenir o Risco e a Tentativa de Suicídio. 2009. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/pesquisas/como_prevenir_o_risco_e_a_tentativa_de_suicidio.htm> Acesso em: 02 fev.2016.
- SCHOBITZ, B.; HOLSBOER, F.; KLOET E, .R. Cytokines in the Healthy and Diseased Brain. *In: Physiology.* v. 9, p. 138-142. 1994.
- STEINER, J.; BIELAU, H.; BRISCH, R.; DANOS, P.; ULLRICH, O.; MAWRIN, C.; BERNSTEIN, H.G.; BOGERTS, B. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *In: J Psychiatr Res.* v. 42, p. 151-157. 2008.
- STOREY M.; JORDAN S. An overview of the immune system. *In: Nurs Stand.* v. 23, p.15-17. 2008.
- STRAWBRIDGE, R.; ARNONE, D.; DANESE, A.; PAPADOPOULOS, A.; HERANE VIVES, A.; CLEARE, A.J. Inflammation and clinical response to treatment in depression: A meta-analysis. *In: Eur Neuropsychopharmacol.* v. 25, p. 1532-1543. 2015.
- SUDA, T.; TOZAWA, F.; USHIYAMA, T.; SUMITOMO, T.; YAMADA, M.; DEMURA, H. Interleukin-1 stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in rat hypothalamus. *In: Endocrinology.* v. 126, p. 1223-1228. 1990.
- SUPRIYANTO, I.; SASADA, T.; FUKUTAKE, M.; ASANO, M.; UENO, Y; NAGASAKI, Y.; SHIRAKAWA, O.; HISHIMOTO, A. Association of FKBP5 gene haplotypes with completed suicide in the Japanese population. *In: Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* v.32, p.1295-1301. 2007.
- SZCZEPANKIEWICZ, A.; LESZCZYŃSKA-RODZIEWICZ, A.; PAWLAK, J.; RAJEWSKA-RAGER, A.; DMITRZAK-WEGLARZ, M.; WILKOSC, M.; SKIBINSKA, M.; HAUSER, J. Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and

predominance of depression in the course of bipolar disorder. *In: J Affect Disord.* v.134, p.138-144. 2011.

THOMAS, A.J.; DAVIS, S.; MORRIS, C.; JACKSON, E.; HARRISON, R.; O'BRIEN, J.T. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *In: Am J Psychiatry.* v.162, p.175-177. 2005.

TONDO, L.; LEPRI, B.; BALDESSARINI, R.J. Suicidal risks among 2826 Sardinian major affective disorder patients. *In: Acta Psychiatr Scand.* 2007, v. 116, p. 419-428.

TONELLI, L.H.; STILLER, J.; RUJESCU, D.; GIEGLING, I.; SCHNEIDER, B.; MAURER, K.; SCHNABEL, A.; MÖLLER, H.J.; CHEN, H.H.;POSTOLACHE, T.T. Elevated cytokine expression in the orbitofrontal cortex of victims of suicide. *In: Acta Psychiatr Scand.* v. 117, p. 198-206. 2008.

TOWNSEND, M.J.; MCKENZIE, A.N. Unravelling the net cytokines and diseases. *In: J Cell Sci.* v. 113, p. 3549-3550. 2000.

TSAGARAKIS, S.; GILLIES, G.; REES, L.H.; BESSER, M.; GROSSMAN, A. Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotrophin releasing factor from rat hypothalamus. *In: Neuroendocrinology.* v. 49, p. 98-101. 1989.

VILLAFUERTE, S. M.; DELFAVERO, J.; ADOLFSSON, R.; SOUERY, D.; MASSAT, I.; MENDLEWICZ, J.; VAN, B.; CLAES, S. Gene-based SNP genetic association study of the corticotropin-releasing hormone receptor-2 (CRHR2) in major depression. *In: Am. J. Med. Genet.* v. 114, p. 222–226. 2002.

WANG, T.Y.; LEE, S.Y.; CHEN, S.L.; CHANG, Y.H.; WANG, L.J.; CHEN, P.S.; CHEN, S.H.; CHU, C.H.; HUANG, S.Y.; TZENG, N.S.; LI, C.L.;CHUNG, Y.L.; HSIEH, T.H.; CHIU, Y.C.; LEE, I.H.; CHEN, K.C.; YANG, Y.K.; HONG, J.S.; LU, R.B. The differential levels of inflammatory cytokines and BDNF among bipolar spectrum disorders. *In: Int J Neuropsychopharmacol.* 2016.

WASSERMAN, D.; SOKOLOWSKI, M.; ROZANOV, V.; WASSERMAN, J. The CRHR1 gene: a marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. *In: Genes Brain Behav.* v. 7, p. 14–19. 2008.

WASSERMAN, D.; WASSERMAN, J.; ROZANOV, V.; SOKOLOWSKI, M. Depression in suicidal males: genetic risk variants in the CRHR1 gene. *In: Genes Brain Behav.* v. 8, p. 72–79. 2009.

WEBER, H.;RICHTER, J.; STRAUBE, B.; LUEKEN, U.; DOMSCHKE, K.; SCHATNER, C.; KLAUKE, B.; BAUMANN, C.; PANÉ-FARRÉ, C.; JACOB, C.P.; SCHOLZ, C.J.; ZWANZGER, P.; LANG, T.; FEHM, L.; JANSEN, A.; KONRAD, C.; FYDRICH, T.; WITTMANN, A.; PFLEIDERER, B.; STRÖHLE, A.; GERLACH, A.L.; ALPERS, G.W.; AROLT, V.; PAULI, P.; WITTCHEN, H.U.; KENT, L.; HAMM, A.; KIRCHER, T.; DECKERT, J.; REIF, A. Allelic variation in CRHR1 predisposes to panic disorder: evidence for biased fear processing. *In: Mol Psychiatry.* p. 1-10. 2015.

WONG, P.W.; CHAN, W.S.; CHEN, E.Y.; CHAN, S.S.; LAW, Y.W.; YIP, P.S. Suicide among adults aged 30–49: a psychological autopsy study in Hong Kong. *In: BMC Public Health.* v. 8, p.147. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental Health:** Depression. 1999. Disponível em: <www.who.int/mental_health/mhgap/en/index.html> Acesso em: 20 abr. 2014.

XU, G.; RABADAN-DIEHL, C.; NIKODEMOVA, M.; WYNN, P.; SPIESS, J.; AGUILERA, G. Inhibition of corticotropin hormone type-1receptor translation by an upstream AUG triplet in the 5' untranslated region. *In: Mol Pharmacol.* v. 59, p. 485–492. 2001.

YOUNG, E. A.; HUDA A.; HASKETT, R. F.; WATSON, S. J. Evidence against changes in corticotroph CRF receptors in depressed patients. *In: Biol Psychiatry.* v. 37, p. 355-363. 1995.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. *In: Int Anesthesiol Clin.* v. 45, p. 27-37. 2007.

ZIMMERMANN, P.; BRÜCKL, T.; NOCON, A.; PFISTER, H.; BINDER, E.B.; UHR, M.; LIEB, R.; MOFFITT, T.E.; CASPI, A.; HOLSBOER, F.; ISING, M. Interaction of FKBP5 gene variants and adverse life events in predicting depressiononset: results from a 10-year prospective community study. *In: Am J Psychiatry.* v. 168, p. 1107-1116. 2011.

ARTIGO

Title: Polymorphism in CRHR1 gene affects the IL-1 β levels in suicidal attempters.

Authors: Clarissa Bastos^a, Marta Gazal^b, Luciana de A. Quevedo^a, Joice Luisa Costa^a, Carolina D. Wiener^a, Karen Jansen^a, Christian Loret de Mola^c, Jean P. Oses^a, Luciano D.M. Souza^a, Luiz Valmor Portela^d, Ricardo T. Pinheiro^a, Ricardo A. da Silva^a, Diogo R. Lara^b, Gabriele Ghisleni^{a*}.

Affiliations: ^a Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas, Brazil; ^b Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil; ^c Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas, Brazil; ^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Running title: Suicide attempters carrying the A allele of the rs110402 SNP presented higher levels of this cytokine.

Correspondence to: 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

Abstract

Approximately one million people commit suicide every year, being suicide attempts and ideation even more common. Changes in the stress response and activation of immune system have been associated with suicide risk. Here we investigated the interaction between immune system and HPA axis alterations in the suicide risk, looking for the influence of rs110402 CRHR1 SNP in the IL-1 β levels according to suicide ideation and attempt. This study evaluated 171 subjects of which 15 were at suicidal ideation, 20 had suicide attempt and 136 were controls. Genotyping was performed by real-time PCR and IL-1 β levels were measured by ELISA. Our data showed that IL-1 β levels increase in 1.05 (95% CI: 1.0-1.10) the relative risk for suicide attempt in total sample. After the sample stratification by rs110402 SNP genotypes, we observed that this risk rises for 1.15 (95% CI: 1.03-1.28) in subjects carrying the A allele, showing an apparent modifier effect of this allele. Thus, this study showed that alterations in CRHR1 gene were associated with higher levels of IL-1 β , and increased risk for suicide, reinforcing the importance of multifactorial interactions of biological markers for psychiatric disorders.

Keywords: Suicide risk, HPA axis, CRHR1, Polymorphism, Inflammation, Interleukin-1 β

1. Introduction

Approximately one million people commit suicide every year (WHO, 2013), being one of the ten leading causes of death worldwide (Bertolete and Fleischmann, 2002). Suicide ideation and attempt are even more common (Tondo *et al.*, 2007), and identifying risk factors in patients with psychiatric disorders is an area of increasing public health concern. The etiology of suicidal behavior is complex in that genetic, psychological and environmental factors can play a role (Correa *et al.*, 2004).

Neurobiological findings suggest that inflammation is a possible trigger for the suicide behavior independently of psychiatric disorders (Steiner *et al.*, 2008). Studies have been shown that an increase in pro-inflammatory cytokines is associated with the suicide behavior (Tonelli *et al.*, 2008; Steiner *et al.*, 2008), where higher levels of IL-1 β were linked to suicidal tendencies, including risk, attempt and completed suicide (Black and Miller, 2015). IL-1 β is an endogenous signaling molecule released by macrophages and monocytes during the acute phase of the inflammatory response. This pro-inflammatory cytokine is capable of modulating cerebral functions during systemic and localized inflammation, acting as a critical mediator of adaptive response to stress (John and Buckingham, 2003) by stimulation of corticotrophin-releasing hormone (CRH) release (Gadek-Michalska and Bugajski, 2010; Goshen and Yirmiya, 2009; Lopez-Castejon and Brough, 2011). In turn, CRH via corticotrophin-releasing hormone receptors (CRHR) activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), promoting subsequent release of cortisol.

Furthermore, HPA axis and the immune system communicate at multiple levels through the CRH, which can indirectly exert an anti-inflammatory effect via stimulation of cortisol release, and directly exerts a pro-inflammatory effect on immune cells promoting the secretion of cytokines as interleukine-1 β (IL-1 β) (Karalis *et al.*, 1991). In this context, consistent findings show that the direct pro-inflammatory effect of CRH is mediated for its CRHR1 receptor binding, which appears to be necessary for the development of local inflammation and direct

paracrine effect on resident cells at the site of inflammation (Agelaki *et al.*, 2002). However, data from modulation of immune system by CRHR is scarce in the literature, and require investigations.

Genetic variations of HPA axis could be related to the dysregulation on this axis and immune response, increasing vulnerability for psychiatric disorders and suicidal behavior (Domschke *et al.*, 2013; Wasserman *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2011; Szczepankiewicz *et al.*, 2011). One of the most extensively studied polymorphisms in the CRHR1 gene is the rs110402, which has been associated with increased risk for seasonal pattern and early age of onset of the first depressive episode (Papiol *et al.*, 2007), as well as differences in cortisol response, and anxiety traits (Mahon *et al.*, 2013). However, taking into account the hypothesis of HPA axis dysregulation in psychiatric disorders little is known about the role of CRHR1 polymorphisms and suicide susceptibility. Thus, this study aim to investigate the interaction between immune system and HPA axis alterations in the suicide risk, looking for the influence of rs110402 CRHR1 SNP in in the IL-1 β levels according to ideation and attempt suicide.

2. Methods

2.1 Study design and participants

This cross-sectional study consisted of 171 individuals aged 18–35, enrolled from a population-based study carried out in the urban Pelotas, Southern Brazil, in the period between June 2011 to May 2013. Sample selection was previously described (Moreira *et al.*, 2015), and after identification of individuals, home visits were conducted in the morning when participants answered a standard questionnaire to collect sociodemographic information, life style, psychiatric medication, and comorbidities. The subjects were evaluated using a structured diagnostic interview, the Mini International Neuropsychiatric Interview according to the DSM-IV criteria (M.I.N.I. 5.0., Brazilian version/DSM IV, Medical Outcome Systems Inc.,

Jacksonville, FL, USA). Those who answered yes to the questions on having tried suicide or made some suicide attempt were framed in suicide attempt group. Those who answered yes to the question on thoughts that it would be better to be dead (a) or wished to be dead (b), wanted to hurt himself (c), thought of suicide or thought of a way to commit suicide (d), were classified as suicidal ideation group. The study was approved by the Ethical Committee of the Catholic University of Pelotas, Brazil (Protocol number 2010/15) and all participants signed the informed consent. This study was conducted with 15 individuals with suicidal ideation, 20 with suicidal attempt, and 136 control subjects without any history of mood disorder.

2.2 Biochemical assay

Blood samples were obtained by venipuncture after the clinical interview. The blood was immediately centrifuged at 3500g for 15 min and serum isolated was kept frozen at -80°C . Serum levels of IL-1 β were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for IL-1 β (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Serum IL-1 β was expressed in pg/ml. All samples and standards were measured in duplicate and the coefficient of variation was less than 5%.

2.3 Molecular analyses

Total DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a standardized salting-out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). CRHR1 rs110402 (G/A) SNP was genotyped using primers and probes contained in the 40x Human Custom TaqMan Genotyping Assay (Life Technologies, Foster City, CA, USA). The reactions were conducted in a 96-well plate, in a total 5 μl reaction volume using 2 ng of genomic DNA, TaqMan Genotyping Master Mix 1x (Applied Biosystems), and Custom TaqMan Genotyping Assay 1x. Then plates were positioned in a real-time PCR thermal cycler (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems) and heated for 10 min at 95°C , followed by 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

Fluorescence data files from each plate were analyzed using automated allele-calling software (SDS 2.0.1; Applied Biosystems).

2.3 Statistic Analysis

Allelic frequencies were determined by gene counting and departures from the Hardy–Weinberg equilibrium were verified using χ^2 -tests. Comparisons of allelic and genotypic frequencies among groups of patients were evaluated using χ^2 -tests. Sociodemographic and clinical characteristics were compared using χ^2 -tests or One-Way ANOVA, as appropriate. Variables with a normal distribution were presented as mean \pm SD or percentage. Serum IL-1 β levels showed a skewed distribution and were logarithmically transformed before two-way analyses of variance and represented as median and interquartile range (IQR: 25–75%). Multinomial logistic regression analysis was performed to evaluate the risk of IL-1 β and rs110402 SNP in suicide risk adjusting for covariables such as gender, age, psychiatric medication, diagnosis of mood disorder and body mass index. Results with p-values \leq 0.05 were considered statistically significant. Subjects were categorized based on the presence of A alleles of the rs110402, resulting in 90 A-allele carriers (AA or AG genotype) and 81 non-carriers (GG genotype).

3. Results

A total of 171 individuals were included in this study, with 136 controls, 15 participants with suicide ideation and 20 with suicide attempt. The sociodemographic and clinical characteristics according to suicide risk are compiled in Table 1. We found a significant association between the groups in relation to gender ($p \leq 0.030$), diagnosis of mood disorder ($p \leq 0.001$) and smoke ($p \leq 0.001$), with higher prevalence of women, major depression and smoke in the groups of subjects with suicide ideation and attempt when compared to control

group. In our study, participants made little use of psychiatric medication and this variable did not differ between the groups ($p=0.470$). Regarding the biological variables, we observed a marginally significant association between IL-1 β levels and suicide attempt ($p=0.070$). Moreover, the distribution of rs110402 SNP did not differ between groups ($p=0.140$) as showed in Table 1. Regarding suicide risk, the frequency of A allele in control group was 52.2% (71), suicide ideation 73.3% (11) and suicide attempt 40.0% (8) ($p=0.140$). The genotypes were in agreement with those predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium for the rs110402 SNP ($\chi^2=1.52$; $p\geq 0.05$).

When evaluating the sociodemographic and biological characteristics according to genotype distribution no significant differences were found for gender ($p=0.22$), ethnicity ($p=0.77$), age ($p=0.47$), socioeconomic class ($p=0.97$), mood disorders diagnosis ($p=0.78$), body mass index ($p=0.35$), smoke ($p=0.33$) medication ($p=0.13$), and IL-1 β levels ($p=0.53$). However, when we stratified the sample by the genotypes, subjects with suicide attempt carrying the A allele presented increased levels of IL-1 β levels [median = 19.3 (IQR: 6.84–36.47) in relation to control group 4.91 (IQR: 3.22–6.39; $p = 0.027$)] (Figure 1).

The multinomial logistic regression analysis adjusted by gender, age, psychiatric medication, diagnosis of mood disorder, and body mass index, shows that each point of IL-1 β increase in 1.05 (95% CI: 1.0–1.10) the relative risk for suicide attempt in the total sample. According to genotypes of rs110402 SNP, our data shows that just in subjects carrying the A allele each point of IL-1 increase in 1.15 (95% CI: 1.03–1.28) the relative risk for suicide attempt, showing an apparent modifier effect of this allele (Table 2).

Discussion

Suicide risk etiology is known to be linked to inflammation, and immune response has been proven to be genetically influenced. Literature speculated that genetic factors in immune dysfunction may be involved in the pathophysiology of suicide risk. Our data are in agreement

with previous data, showing that IL-1 β levels confers a risk for suicide attempt and that the A allele of rs110402 SNP in the CRHR1 gene increase in 3-fold the risk in those subjects.

The role of IL-1 β in suicide risk is not well established, with controversial results showing an increase of this cytokine or none alteration in its levels associated with suicide risk (Gabbay *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2012; Tonelli *et al.*, 2008). Nonetheless, a recent meta-analysis showed that increased levels of IL-1 β and IL-6 were robustly associated with suicidality, helping to distinguish suicidal from non-suicidal patients (Black and Miller, 2015). In this context, our results suggest that an increase in IL-1 β levels can possibly help to distinguish suicide attempt subjects from those with suicide ideation and control group. Important to note that IL-1 β plays a regulatory role in the HPA axis by stimulation of CRH and ACTH release, contributing to hyperactivity of the axis, one of the mechanisms associated to several psychiatric disorders and suicide risk (Suda *et al.*, 1990; Tsagarakis *et al.*, 1989). In turn, CRH can indirectly regulate the inflammatory response by cortisol and catecholamines (Elenkov and Chrousos, 1999), or directly through local modulatory actions of the peripheral immune system (Karalis *et al.*, 1991), and the direct pro-inflammatory effect of CRH was postulated to be mediated by CRHR1 binding which appears to increase the inflammation process (Agelaki *et al.*, 2002).

Exposure to stress strongly contributes to suicide attempts, where HPA disturbances are thought to be partially predictive of suicide risk (Coryell and Young and Carroll, 2006; Mann and Currier, 2007; Pfennig *et al.*, 2005). Thus, the level of HPA activity in response to stress may be altered by CRHR1 expression and functionality. In this context, Merali and colleagues found higher levels of CRH and decreased CRHR1 mRNA expression in the frontal cortices of suicide victims (Merali *et al.*, 2004). Moreover, CRH binding sites are reduced in the frontal cortex of depressed suicides (Nemeroff *et al.*, 1988), and CRHR1 desensitization may develop within hours after exposure to physiological concentrations of CRH (Aguilera *et al.*, 2001; Roseboom *et al.*, 2001). Taking together, these data suggest that diminished CRHR1 expression

in suicide victims may have been secondary to a sustained increase of CRH activity. Moreover, although not yet established, polymorphisms in the CRHR1 gene could be suggested for differential patterns of functionality, leading to a dysregulation of immune system.

A limited number of genetic studies have been conducted relating SNP in genes of HPA axis and suicidal behavior, with inconsistent results (Leszczyńska-Rodziewicz *et al.*, 2013; Wasserman *et al.*, 2008). A recent study reported lack of association for haplotype genetic variations in the CRHR1 gene and suicide attempt (Leszczyńska-Rodziewicz *et al.*, 2013). Wasserman *et al.* (2009) found an association between the T and A alleles of SNPs rs4792287 and rs110402, respectively and the T allele of rs12936511 of the CRHR1 gene in suicidal males, and also identified a CRHR1 SNP associated with suicide attempters in individuals exposed to low-medium stress (Wasserman *et al.*, 2008). Furthermore, the A allele of rs110402 SNP has been also associated with age of onset and seasonal pattern of major depression (Papiol *et al.*, 2007), while the G allele was linked with major depression and increased cortisol levels (Bradley *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2012; Tyrca *et al.*, 2009).

An important finding of our study, is that suicide attempt subjects carrying A allele of rs110402 SNP in CRHR1 gene presented higher levels of IL-1 β with a increase of 3-fold in the risk for suicide, suggesting a conditional effect of the A allele in the association of IL-1 β and suicide attempt. In line with our results, genetic studies showed that A allele of rs110402 SNP is associated with lower levels of cortisol, an important moderator of immune activation (Heim *et al.*, 2009). Here, we did not analyze CRH and cortisol levels, but based on previous studies, we can suggest that the genetic variability of the rs110402 SNP is able to change CRHR1 functionality when risk haplotypes are inherited, subsequently culminating in increased IL-1 β production and, possibly, modulating HPA axis hormones. However, although the rs110402 SNP has been studied in relation to psychiatric disorders, the functionality of this SNP remains unclear (Binder *et al.*, 2010). Looking for haplotype studies, rs110402 SNP was found in linkage disequilibrium with other SNP associated with psychiatric disorders (Ishitobi *et al.*,

2012). Ben-Efraim and colleagues (2013) for gene-environment interactions showed that the rs7209436 SNP, in linkage disequilibrium with rs110402, and childhood physical assault were more predominant among female suicide attempters. Moreover, rs4792887 also in linkage disequilibrium with rs110402 and cumulative stressful life events were reported among male depressed suicide attempters (Ben-Efraim *et al.*, 2011). Furthermore, the haplotype TAT of rs7209436, rs110402 and rs242924 was found as protective for major depression disorder and childhood trauma (Kranzler *et al.*, 2011; Polanczyk *et al.*, 2009).

In summary, our report give evidence that IL-1 β increase the risk for suicide and genetic variability in CRHR1 gene produce an additional risk for suicide attempt by the increase in the IL-1 β levels, showing the significance of interactions studies. These interactions may provide a better understanding of suicidal causality. However, the present study presents some important limitations to be considered. Firstly, the limited sample size studied, mainly for those with suicide risk may be overshadowing the real association between IL-1 β and genetic variations on CRHR1 gene with suicidal risk, and a longitudinal study design could better clarify the causality of the association. Also, in this study we do not performed the clinical interview for axis II personality disorder, an important point due its association with suicide risk. Furthermore, analysis of other polymorphisms in the CRHR1 gene with recognized alteration in functionality and expression, as well as measurement of HPA axis hormones, could be essential to the comprehension of this association. This opens a range of opportunities for future studies searching to clarify the complex neurobiology of suicidal behavior.

Conflict of Interest

All authors disclose no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq and CAPES for their research fellowships.

Funding

This study was partly funded by the *FAPERGS (08/2009) and CNPq (PRONEX 10/0055)*.

References

- Agelaki, S., Tsatsanis, C., Gravanis, A., Margioris, A., 2002. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect. Immun.* 70, 6068-6074.
- Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C., Nikodemova, M., 2001. Regulation of pituitary corticotropin-releasing hormone receptors. *Peptides* 22, 769–774.
- Ben-Efraim, Y.J., Wasserman, D., Wasserman, J., Sokolowski, M., 2011. Gene-environment interactions between CRHR1 variants and physical assault in suicide attempts. *Genes Brain Behav.* 10, 663-672.
- Bertolete, J.M., Fleischmann, A., 2002. Suicide and psychiatric diagnosis: a worldwide perspective. *World Psychiatry* 1, 181-185.
- Binder, E.B., Nemeroff, C.B., 2010. The CRF system, stress, depression and anxiety – insights from human genetic studies. *Mol. Psychiatry* 15, 574-588.
- Black, C., Miller, B.J., 2015. Meta-analysis of cytokines and chemokines in suicidality: Distinguishing suicidal versus nonsuicidal patients. *Biol. Psychiatry* 78, 28-37.
- Bradley, R.G., Binder, E.B., Epstein, M.P., Tang, Y., Nair, H.P., Liu, W., Gillespie, C.F., Berg, T., Evces, M., Newport, D.J., Stowe, Z.N., Heim, C.N., Nemeroff, C.B., Schwartz, A., Cubells, J.F., Ressler, K.J., 2008. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch. Gen. Psychiatry* 65, 190–200.
- Correa, H., Campi-Azevedo, A.C., De Marco, L., Boson, W., Viana, M.M., Guimarães, M.M., Costa, E., Miranda, D.M., Romano-Silva, M.A., 2004. Familial suicide behaviour: association with probands suicide attempt characteristics and 5-HTTLPR polymorphism. *Acta Psychiatr. Scand.* 110, 459-464.
- Coryell, W., Schlessler, M., 2001. The dexamethasone suppression test and suicide prediction. *Am. J. Psychiatry* 158, 748-753.
- Coryell, W., Young, E., Carroll, B., 2006. Hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and mortality in major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 142, 99-104.
- Coryell, W., Schlessler, M., 2007. Combined biological tests for suicide prediction. *Psychiatry Res.* 150, 187-191
- Diniz, B.S., Teixeira, A.L., Talib, L., Gattaz, W.F., Forlenza, O.V., 2010. Interleukin-1beta serum levels is increased in antidepressant-free elderly depressed patients. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 18, 172-176.
- Domschke, K., Maron, E., 2013. Genetic factors in anxiety disorders. *Mod. Trends Pharmacopsychiatri.* 29, 24-46.

Elenkov, I. J., Chrousos, G.P., 1999. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 10, 359–368.

Gabbay, V., Klein, R.G., Guttman, L.E. Babb, J.S., Alonso, C.M., Nishawala, M., Katz, Y., Gaite, M.R., Gonzalez, C.J., 2009. A preliminary study of cytokines in suicidal and nonsuicidal adolescents with major depression. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 19, 423-430.

Gadek-Michalska, A., Bugajski, J., 2010. Interleukin-1 (IL-1) in stress-induced activation of limbic-hypothalamic pituitary adrenal axis. *Pharmacol. Rep.* 62, 969–982.

Goshen, I., Yirmiya, R., 2009. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 30–45.

Heim, C., Bradley, B., Mletzko, T., Deveau, T., Musselman, D., Nemeroff, C., Ressler K., Binder E., 2009. Effect of childhood trauma on adult depression and neuroendocrine function: sex-specific moderation by CRH receptor 1 gene. *Front Behav Neurosci.* 3, 1–10.

Hsu, D.T., Mickey, B.J., Langenecker, S.A., Heitzeg, M.M., Love, T.M., Wang, H., Kennedy, S.E., Peciña, M., Shafir, T., Hodgkinson, C.A., Enoch, M.A., Goldman, D., Zubieta, J.K., 2012. Variation in the corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) gene influences fMRI signal responses during emotional stimulus processing. *J. Neurosci.* 32, 3253-3260.

Ishitobi, Y., Nakayama, S., Yamaguchi, K., Kanehisa, M., Higuma, H., Maruyama, Y., Ninomiya, T., Okamoto, S., Tanaka, Y., Tsuru, J., Hanada, H., Isogawa, K., Akiyoshi, J., 2012. Association of CRHR1 and CRHR2 with major depressive disorder and panic disorder in a Japanese population. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 159B, 429-436.

John, C.D., Buckingham, J.C., 2003. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 78-84.

Jokinen, J., Nordstrom, P., 2009. HPA axis hyperactivity and attempted suicide in young adult mood disorder inpatients. *J. Affect. Disord.* 116, 17–20.

Karalis, K., Sano, H., Redwine, J., Listwak, S., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., 1991. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254, 421-423.

Kranzler, H.R., Feinn, R., Nelson, E.C., Covault, J., Anton, R.F., Farrer, L., Gelernter, J., 2011. A CRHR1 haplotype moderates the effect of adverse childhood experiences on lifetime risk of major depressive episode in African-American women. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 156B, 960-968.

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

Lester, D., 1992. The dexamethasone suppression test as an indicator of suicide: A meta-analysis. *Pharmacopsychiatry* 25, 265–270.

Leszczyńska-Rodziewicz, A., Szczepankiewicz, A., Pawlak, J., Dmitrzak-Weglarczyk, M., Hauser, J., 2013. Association, haplotype, and gene-gene interactions of the HPA axis genes with suicidal behaviour in affective disorders. *ScientificWorldJournal* 207, 207361.

Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22,189-195.

Mann, J.J., Currier, D., Stanley, B., Oquendo, M.A., Amsel, L.V., Ellis, S.P., 2006. Can biological tests assist prediction of suicide in mood disorders? *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9, 465-474.

Mann, J.J., Currier, D., 2007. A review of prospective studies of biologic predictors of suicidal behavior in mood disorders. *Arch. Suicide Res.* 11, 3-16.

Mahon, P.B., Zandi, P.P., Potash, J.B., Nestadt, G., Wand, G.S., 2013. Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults. *Psychopharmacology (Berl.)* 227, 231-241.

McEwen, B.S., 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* 338, 171-179.

McEwen, B.S., 2000. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 22, 108-124.

Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., Anisman, H., 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J. Neurosci.* 24, 1478-1485.

Moreira, F.P., Fabião, J.D., Bittencourt, G., Wiener, C.D., Jansen, K., Oses, J.P., Quevedo, L.Á., Souza, L.D., Crispim, D., Portela, L.V., Pinheiro, R.T., Lara, D.R., Kaster, M.P., da Silva, R.A., Ghisleni, G., 2015. The Met allele of BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF levels in generalized anxiety disorder. *Psychiatr. Genet.* 25, 201-207

Mota, R., Gazal, M., Acosta, B.A., de Leon, P.B., Jansen, K., Pinheiro, R.T., Souza, L.D., Silva, R.A., Oses, J.P., Quevedo, L., Lara, D.R., Ghisleni, G., Kaster, M.P., 2013. Interleukin-1 β is associated with depressive episode in major depression but not in bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* 47, 2011-2014.

Nemeroff, C.B., Owens, M.J., Bissette, G., Andorn, A.C., Stanley, M., 1988. Reduced corticotropin-releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch. Gen. Psychiatry* 45, 577-579.

Pandey, G.N., Rizavi, H.S., Ren, X., Fareed, J., Hoppensteadt, D.A., Roberts, R.C., Conley, R.R., Dwivedi, Y., 2012. Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims. *J. Psychiatr. Res.* 46, 57-63.

Papiol, S., Arias, B., Gastó, C., Gutiérrez, B., Catalán, R., Fañanás, L., 2007. Genetic variability at HPA axis in major depression and clinical response to antidepressant treatment. *J. Affect. Disord.* 104, 83-90.

Pfennig, A., Kunzel, H.E., Kern, N., Ising, M., Majer, M., Fuchs, B., Ernst, G., Holsboer, F., Binder, E.B., 2005. Hypothalamus-pituitary-adrenal system regulation and suicidal behavior in depression. *Biol. Psychiatry* 57, 336-342

Polanczyk, G., Caspi, A., Williams, B., Price, T.S., Danese, A., Sugden, K., Uher, R., Poulton, R., Moffitt, T.E., 2009. Protective effect of CRHR1 gene variants on the development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 978-985.

Roseboom, P.H., Urben, C.M., Kalin, N.H., 2001. Persistent corticotropin-releasing factor1 receptor desensitization and downregulation in the human neuroblastoma cell line IMR-32. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 92, 115–127.

Remlinger-Molenda, A., Wójciak, P., Michalak, M., Rybakowski, J., 2012. Activity of selected cytokines in bipolar patients during manic and depressive episodes. *Psychiatr. Pol.* 46, 599-611.

Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H.G., Bogerts, B., 2008. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J. Psychiatr. Res.* 42, 151-157.

Suda, T., Tozawa, F., Ushiyama, T., Sumitomo, T., Yamada, M., Demura, H., 1990. Interleukin-1 stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in rat hypothalamus. *Endocrinology* 126, 1223-1228.

Szczepankiewicz, A., Leszczyńska-Rodziewicz, A., Pawlak, J., Rajewska-Rager, A., Dmistrzak-Weglarz, M., Wilkosc, M., Skibinska, M., Hauser, J., 2011. Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 134, 138-144.

Thomas, A.J., Davis, S., Morris, C., Jackson, E., Harrison, R., O'Brien, J.T., 2005. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *Am. J. Psychiatry* 162,175-177.

Tondo, L., Lepri, B., Baldessarini, R.J., 2007. Suicidal risks among 2826 Sardinian major affective disorder patients. *Acta Psychiatr. Scand.* 116, 419-428.

Tonelli, L.H., Stiller, J., Rujescu, D., Giegling, I., Schneider, B., Maurer, K., Schnabel, A., Möller, H.J., Chen, H.H., Postolache, T.T., 2008. Elevated cytokine expression in the orbitofrontal cortex of victims of suicide. *Acta Psychiatr. Scand.* 117, 198-206.

Tsagarakis, S., Gillies, G., Rees, L.H., Besser, M., Grossman, A., 1989. Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotrophin releasing factor from rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 49, 98-101.

Tyrka, A.R., Price, L.H., Gelernter, J., Schepker, C., Anderson, G.M., Carpenter, L.L., 2009. Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biol. Psychiatry* 66, 681-685.

Xiao, Z., Liu, W., Gao, K., Wan, Q., Yang, C., Wang, H., Wang, X., Wang, G., Liu, Z., 2011. Interaction between CRHR1 and BDNF genes increases the risk of recurrent major depressive disorder in Chinese population. *PLoS One* 6, e28733.

Wasserman, D., Sokolowski, M., Rozanov, V., Wasserman, J., 2008. The CRHR1 gene: a marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. *Genes Brain Behav.* 7, 14–19.

Wasserman, D., Wasserman, J., Rozanov, V., Sokolowski, M., 2009. Depression in suicidal males: genetic risk variants in the CRHR1 gene. *Genes Brain Behav.* 8, 72–79.

WHO, 2013. *Figures and Facts About Suicide*. World Health Organization, Geneva.

Table 1. Characteristics of the sample according to the suicide risk.

Variables	Control	Ideation	Suicide attempted	p-value
Gender				0.03
Female	68 (50.0%)	11 (73.3%)	15 (75.0%)	
Male	68 (50.0%)	4 (26.7%)	5 (25.0%)	
Ethnicity				0.11
Caucasian	105 (77.2%)	9 (60.0%)	12 (60.0%)	
Non-caucasian	31 (22.8%)	6 (40.0%)	8 (40.0%)	
Age	26.10±4.9	28.73±5.33	26.00±4.71	0.14
Socioeconomic class				0.06
Low	29 (21.3%)	7 (46.7%)	7 (35.0%)	
Intermediate	72 (52.9%)	5 (33.3%)	12 (60.0%)	
High	35 (25.7%)	3 (20.0%)	1 (5.0%)	
MD Diagnosis				0.00
No MD	112 (83.0%)	5 (33.3%)	6 (30.0%)	
Bipolar	11 (8.1%)	3 (20.0%)	4 (20.0%)	
Depression	13 (8.9%)	7 (46.7%)	10 (50.0%)	
Genotype CRH				0.14
GG	65 (47.8%)	4 (26.7%)	12 (60.0%)	
GA/AA	71 (52.2%)	11 (73.3%)	8 (40.0%)	
II-1β	5.75 (1.04-45.65)	6.36 (1.05-40.23)	10.54 (1.04-53.76)	0.07
BMI	25.93±5.30	28.75±5.40	26.14±5.35	0.15
Smoke*				0.00
No	101 (75.4%)	8 (53.3%)	7 (35.0%)	
Yes	33 (24.6%)	7 (46.7%)	13 (65.0%)	
Medication				0.47
Not use	72 (52.9%)	9 (60.0%)	8 (40.0%)	
Psychiatric med	4 (2.9%)	1 (6.7%)	-----	
Others	60 (44.1%)	5 (33.3%)	12 (60.0%)	
Total	136	15	20	

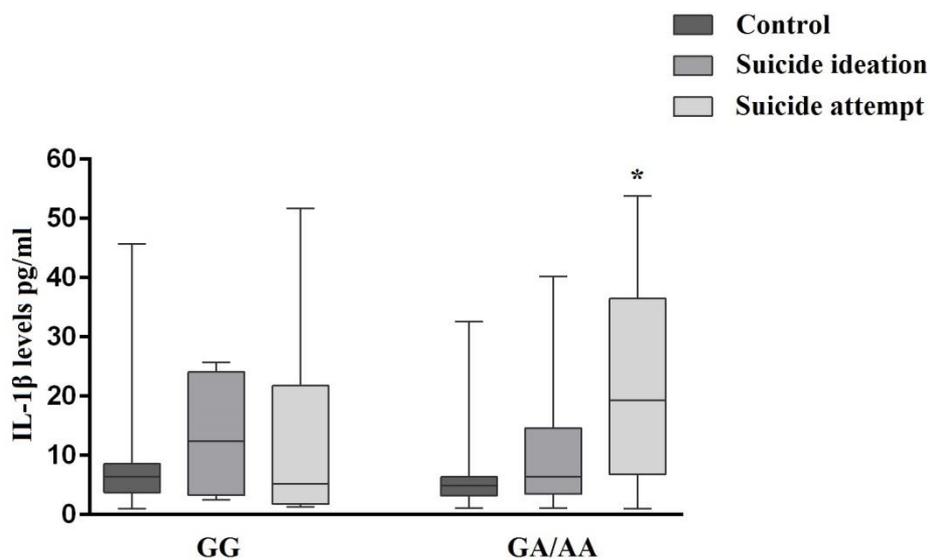
Values expressed as mean ± SD, median (interquartile range) or n (%). MD=Mood disorders; BMI=Body Mass

Index. *missing

Table 2. Relative risk of IL- 1 β levels for suicidal ideation or attempt, according to genotypes of rs110402 SNP.

	Suicide ideation		Suicide attempt	
	RR (95% CI)	P value	RR (95% CI)	P value
rs110402 Genotypes				
GG (n=81)	1.03 (0.95-1.13)	0.50	1.00 (0.95-1.07)	0.74
GA/AA (n=90)	1.03 (0.95-1.12)	0.48	1.15 (1.03-1.28)	0.01
Total sample (n=171)	1.02 (0.97-1.08)	0.32	1.05 (1.0- 1.10)	0.03

Reference group:“control subjects”. Multinomial logistic regression adjusted by gender, age, body mass index, psychiatric medication, mood disorders. *P \leq 0.05 was considered statistically significant. RR=relative risk (95% CI).

Figure 1:

Serum IL-1 β levels according to genotype distribution of rs110402 polymorphism in the diagnosis of suicide risk and control group. Values are presented as median and interquartile range (IQR). * $P \leq 0.05$ is considered statistically significant as evaluated by two-way analysis of variance.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que o alelo A do SNP rs110402 no gene do CRHR1 aumenta os níveis de IL-1 β em indivíduos que tentaram suicídio. Esse foi o primeiro estudo a investigar a associação entre o receptor do CRH e os níveis de interleucina, e os resultados encontrados reforçam o papel da interação mútua entre a função do eixo HPA e a IL-1 β .

Em relação aos objetivos específicos, algumas hipóteses sugeridas no início do projeto foram confirmadas por nossos resultados e outras refutadas. Esperávamos observar uma associação do SNP com o risco e a tentativa de suicídio, porém essa associação não foi encontrada. Em relação aos níveis de IL-1 β , apesar dos dados sobre sua associação com o comportamento suicida serem conflitantes o estudo esperava encontrar níveis elevados da mesma nesses indivíduos e nossos dados não confirmaram tal associação.

Como esperado o genótipo não teve associação com as características sociodemográficas ($p > 0.05$) e nossa última hipótese também foi confirmada, sendo que os indivíduos que tentaram suicídio e apresentavam o alelo A do polimorfismo tiveram maiores níveis de IL-1 β em relação ao grupo controle.

Infelizmente durante a execução do projeto por problemas metodológicos acabamos perdendo alguns participantes, não atingindo o número amostral indicado pelo cálculo da amostra, porém apesar do número reduzido conseguimos observar uma diferença significativa entre os grupos utilizando um poder de 80% e alfa de 5%.

Investigações sobre o papel das citocinas como marcadores biológicos de transtornos psiquiátricos e do comportamento suicida, vem crescendo na última década mostrando consistência nas associações. Nossos resultados sugerem então que os níveis da IL-1 β , a qual apresenta ainda dados controversos na literatura, pode depender do perfil genético para ser um bom biomarcador no comportamento suicida. Concluindo, nosso estudo abre um leque para que pesquisas futuras incluam a análise do perfil inflamatório concomitante com o perfil genético, avaliando possíveis interações entre os mesmos.

ANEXOS

ANEXO A- Carta de aprovação do Comitê de Ética



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

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS - UCPEL CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“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 2011.

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

Os dados fornecidos por você durante a aplicação do questionário será utilizado posteriormente para análise, produção de artigos científicos científica e relatórios (para a coordenação dos serviços de saúde e CNPq). Entretanto, a equipe envolvida na pesquisa garante que a sua identidade permanecerá em sigilo, respeitando a sua privacidade. Esta pesquisa não apresenta qualquer risco importante 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 sangue (15ml) para que possamos dosar hormônios, que podem influenciar a presença de sintomas relacionados com o temperamento/comportamento dos participantes da pesquisa. Além disso será coletado 3 ml de saliva, por profissionais treinados. Posteriormente, as amostra de sangue e saliva serão examinados 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/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.

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) 8403-8723 (Jerônimo Branco); (53) 8122-8378 (Ricardo Silva); - (53) 9156-8075 (Jean Osés).

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.

M.I.N.I.**Mini International Neuropsychiatric Interview****Brazilian version 5.0.0****DSM IV**

Y. Lecrubier, E. Weiller, T. Hergueta, P. Amorim, L.I. Bonora, J.P. Lépine
Hôpital Salpêtrière – Paris - França

D. Sheehan, J. Janavs, R. Baker, K.H. Sheehan, E. Knapp, M. Sheehan
University of South Florida – Tampa – E.U.A.

Tradução para o português (Brasil) : P. Amorim

© 1992, 1994, 1998, 2000, Sheehan DV & Lecrubier Y.

Todos os direitos são reservados. Este documento não pode ser reproduzido, todo ou em parte, ou cedido de qualquer forma, incluindo fotocópias, nem armazenado em sistema informático, sem a autorização escrita prévia dos autores. Os pesquisadores e os clínicos que trabalham em instituições públicas (como universidades, hospitais, organismos governamentais) podem fotocopiar o M.I.N.I. para utilização no contexto estrito de suas atividades clínicas e de investigação.

A. EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR



SIGNIFICA : IR DIRETAMENTE AO(S) QUADRO(S) DIAGNÓSTICO(S), ASSINALAR **NÃO** EM CADA UM E PASSAR AO MÓDULO SEGUINTE

A1	Nas duas últimas semanas, sentiu-se triste, desanimado(a), deprimido(a), durante a maior parte do dia, quase todos os dias?	NÃO	SIM	1
A2	Nas duas últimas semanas, quase todo tempo, teve o sentimento de não ter mais gosto por nada, de ter perdido o interesse e o prazer pelas coisas que lhe agradam habitualmente?	NÃO	SIM	2
		➔		
A1 <u>OU</u> A2 SÃO COTADAS SIM ?		NÃO	SIM	

A3	Durante as duas últimas semanas, quando se sentia deprimido(a) / sem interesse pela maioria das coisas:			
a	O seu apetite mudou de forma significativa, <u>ou</u> o seu peso aumentou ou diminuiu sem que o tenha desejado ? (variação de $\pm 5\%$ ao longo do mês, isto é, $\pm 3,5$ Kg, para uma pessoa de 65 Kg) COTAR SIM , SE RESPOSTA SIM NUM CASO OU NO OUTRO	NÃO	SIM	3
b	Teve problemas de sono quase todas as noites (dificuldade de pegar no sono, acordar no meio da noite ou muito cedo, dormir demais)?	NÃO	SIM	4
c	Falou <u>ou</u> movimentou-se mais lentamente do que de costume <u>ou</u> pelo contrário, sentiu-se agitado(a) e incapaz de ficar sentado quieto(a), quase todos os dias?	NÃO	SIM	5
d	Sentiu-se a maior parte do tempo cansado(a), sem energia, quase todos os dias?	NÃO	SIM	6
e	Sentiu-se sem valor <u>ou</u> culpado(a), quase todos os dias?	NÃO	SIM	7
f	Teve dificuldade de concentrar-se <u>ou</u> de tomar decisões, quase todos os dias?	NÃO	SIM	8
g	Teve, por várias vezes, pensamentos ruins como, por exemplo, pensar que seria melhor estar morto(a) <u>ou</u> pensar em fazer mal a si mesmo(a) ?	NÃO	SIM	9

A4 HÁ PELO MENOS 3 RESPOSTAS "SIM" EM A3 ?
(ou 4 se A1 OU A2 = "NÃO")

SE o(A) ENTREVISTADO(A) APRESENTA UM EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR ATUAL:

NÃO	SIM *
EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR ATUAL	

A5a	Ao longo da sua vida, teve outros períodos de 2 semanas ou mais, em que se sentiu deprimido (a) <u>ou</u> sem interesse pela maioria das coisas e durante os quais teve os problemas dos quais falamos [SINTOMAS EXPLORADOS DE A3a à A3g]?	➔	NÃO	SIM	10
b	Entre esses períodos de depressão que apresentou ao longo de sua vida, alguma vez teve um intervalo de pelo menos 2 meses em que não apresentou nenhum problema de NÃO SIM 11 depressão <u>ou</u> de perda de interesse ?				

A5b É COTADA SIM ?

Não	Sim
Episódio Depressivo Maior Recorrente	

C. RISCO DE SUICÍDIO

Durante o último mês:				Pontos
C1	Pensou que seria melhor estar morto (a) ou desejou estar morto (a) ?	NÃO	SIM	1
C2	Quis fazer mal a si mesmo (a) ?	NÃO	SIM	2
C3	Pensou em suicídio ?	NÃO	SIM	6
C4	Pensou numa maneira de se suicidar ?	NÃO	SIM	10
C5	Tentou o suicídio ?	NÃO	SIM	10

Ao longo da sua vida:

C6	Já fez alguma tentativa de suicídio ?	NÃO	SIM	4
----	---------------------------------------	-----	-----	----------

HÁ PELO MENOS UM "SIM" DE C1 À C6 ?

SE SIM, SOMAR O NÚMERO TOTAL DE PONTOS DAS QUESTÕES COTADAS SIM DE C1 - C6 E ESPECIFICAR O RISCO DE SUICÍDIO ATUAL COMO SE SEGUE:

NÃO	SIM
RISCO DE SUICÍDIO ATUAL	
1-5 pontos	Baixo
6-9 pontos	Moderado
≥ 10 pontos	Alto

D. EPISÓDIO (HIPO)MANÍACO

→ SIGNIFICA : IR DIRETAMENTE AO(S) QUADRO(S) DIAGNÓSTICO(S), ASSINALAR **NÃO** EM CADA UM E PASSAR AO MÓDULO SEGUINTE

D1 a	Alguma vez teve um período em que se sentia tão eufórico(a) ou cheio(a) de energia que isso lhe causou problemas, ou em que as pessoas à sua volta pensaram que não estava no seu estado habitual ? (NÃO CONSIDERAR PERÍODOS QUE OCORREM APENAS SOB O EFEITO DE DROGAS OU ÁLCOOL)	NÃO	SIM	1
	SE O(A) ENTREVISTADO(A) NÃO COMPREENDE O SIGNIFICADO DE “EUFÓRICO” OU “CHEIO DE ENERGIA”, EXPLICAR DA SEGUINTE MANEIRA: Por eufórico ou cheio de energia, quero dizer estar excessivamente ativo(a), excitado(a), ter menos necessidade de dormir, ter pensamentos rápidos, estar cheio(a) de idéias ou extremamente motivado(a) ou criativo(a) ou extremamente impulsivo(a).	NÃO	SIM	2
	SE D1a = SIM:			
b	Sente-se, atualmente, eufórico (a) ou cheio (a) de energia?			
D2 a	Alguma vez teve um período em que, por vários dias, estava tão irritável que insultava as pessoas, gritava ou chegava até a brigar com quem não era de sua família? Você mesmo ou alguém achou que você estava mais irritável ou hiperativo(a), comparado(a) a outras pessoas, mesmo em situações em que isso lhe parecia justificável ? (NÃO CONSIDERAR OS PERÍODOS QUE OCORREM APENAS SOB O EFEITO DE DROGAS OU ÁLCOOL)	NÃO	SIM	3
	SE D2a = SIM:			
b	Sente-se, continuamente irritável atualmente?	NÃO	SIM	4
	D1a OU D2a SÃO COTADAS “SIM” ?	NÃO	SIM	

D3 SE **D1b** OU **D2b** = “**SIM**”: EXPLORAR O EPISÓDIO ATUAL
SE **D1b** E **D2b** = “**NÃO**” : EXPLORAR O EPISÓDIO MAIS GRAVE

Quando se sentiu mais eufórico(a), cheio(a) de energia ou mais irritável :

a	Tinha a sensação que podia fazer coisas que os outros seriam incapazes de fazer ou que você era alguém especialmente importante?	NÃO	SIM	5
b	Tinha menos necessidade de dormir do que costume (por ex., sentia-se repousado(a) com apenas poucas horas de sono) ?	NÃO	SIM	6
c	Falava sem parar ou tão rapidamente que as pessoas não conseguiam compreendê-lo(a) ?	NÃO	SIM	7
d	Os pensamentos corriam tão rapidamente na sua cabeça que não conseguia acompanhá-los ?	NÃO	SIM	8
e	Distraía-se com tanta facilidade que a menor interrupção o fazia perder o fio daquilo que estava fazendo ou pensando ?	NÃO	SIM	9
f	Estava tão ativo(a) e agitado(a) que as outras pessoas se preocupavam por sua causa ?	NÃO	SIM	10
g	Desejava tanto fazer coisas que lhe pareciam agradáveis ou tentadoras que não pensava nos riscos ou nos problemas que isso poderia causar (gastar demais, dirigir de forma imprudente, ter uma atividade sexual pouco habitual para você...) ?	NÃO	SIM	11
	HÁ PELO MENOS 3 RESPOSTAS "SIM" EM D3			
	OU 4 SE D1a = “NÃO” (EPISÓDIO PASSADO) OU D1b = “NÃO” (EPISÓDIO ATUAL) ?	NÃO	SIM	

- D4 Esses problemas dos quais acabamos de falar já duraram pelo menos uma semana E lhe causaram dificuldades em casa, no trabalho / na escola ou nas suas relações sociais OU você foi hospitalizado(a) por causa desses problemas? NÃO SIM

12

COTAR **SIM**, SE **SIM** NUM CASO OU NO OUTRO

D4 É COTADA “NÃO” ?

SE **SIM**, ESPECIFICAR SE O EPISÓDIO É ATUAL OU PASSADO

NÃO	SIM
EPISÓDIO HIPOMANÍACO	
Atual	<input type="checkbox"/>
Passado	<input type="checkbox"/>

D4 É COTADA “SIM” ?

SE **SIM**, ESPECIFICAR SE O EPISÓDIO É ATUAL OU PASSADO

NÃO	SIM
EPISÓDIO MANÍACO	
Atual	<input type="checkbox"/>
Passado	<input type="checkbox"/>

15. Forno de micro-ondas: (0) não (1) sim microond __
16. Telefone fixo (não considerar celular): (0) não (1) sim telfix __
17. Microcomputador: (0) não (1) sim microc __
18. Aparelho de ar condicionado: (0) não (1) sim arcond __
- 19. Até a série que tu completaste na escola, são quantos anos de estudo?**
 (00) se nunca estudou ____ anos completos. escolj __
- 20. Qual o teu estado civil?**
 (0) solteiro (1) casado/vive junto (2) separado/divorciado ecivil __
- 21. Estás trabalhando atualmente?**
 (0) não (1) sim (8) Nunca trabalhou trabatu __
- 22. Tu tens pais separados?**
 (0) não (1) sim apisepa __
- 23. Atualmente, moras com:**
Pai? (0) Não (1) sim mpai __
 SE NÃO: Até que idade morou? ____ anos completos (88) quando mora até hoje iddpai __
- Mãe?** (0) Não (1) sim mmae __
 SE NÃO: Até que idade morou? ____ anos completos (88) quando mora até hoje iddmae __
- 24. Morastes por pelo menos um mês com padrasto ou madrasta? (mesmo que more com os pais)** (0) Não (1) sim padrast __
- 25. Tu tens filhos? SE SIM: Quantos?**
 (00) Não tem filhos (pule para questão 27) ____ filhos filho __
- 26. Com quantos anos tiveste o primeiro filho?** ____ anos (88) NSA iddfilho __
- SE: TEVE FILHOS com 20 anos ou mais pule para questão 29.**
- 27. Teu primeiro filho foi planejado?**
 (0) não (1) sim (8) NSA planej __

28. Tu moras com teu filho?
 (0) não (1) já morei, não moro mais (2) sim (8) NSA mfilho __
- 29. Você faz atividade física regularmente?**
 (0) Não (1) Sim (pule para a questão 29) ativreg __

30. 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

princnao ____

31. 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

prinsim ____

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

32. 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 34) ____ dias na semana

lpaq1 ____

33. 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

lpaq2 ____

❖ 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 feitas no trabalho)

34. 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 36) ____ dias na semana

lpaq3 ____

35. 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

lpaq4 ____

❖ 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 feitas no trabalho)

36. 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 38) _____ dias na semana

lpaq5 __

37. 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

lpaq6 _____

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

38. 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

lpaq7 __

39. 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

lpaq8 _____

40. 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 42) _____ dias na semana

lpaq9 __

41. 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

lpaq10 _____

❖ Agora vamos falar sobre alguns aspectos de tua saúde.

42. Tu tens algum problema de saúde?

(0) não (pule para a questão 44) (1) sim

doenca __

<p>SE SIM: 43. Qual a doença? _____ Qual a doença? _____ Qual a doença? _____ Qual a doença? _____</p>

quald1 __

quald2 __

quald3 __

quald4 __

cons __

44. Tu já consultaste com psiquiatra ou psicólogo?

(0) não (1) sim

tratpsi __

45. Tu já fizeste ou fazes tratamento psicoterapêutico com psiquiatra ou psicólogo?

(0) não (1) sim

intern __

46. Tu baixaste hospital alguma vez por problemas de nervos/psiquiátricos?

(0) não (1) sim. SE SIM: Quantas vezes tu foi internado? _____ internações

nintern _____

47. Nos últimos 30 dias, tu tomaste alguma medicação?

(0) não (1) sim

medic __

SE SIM: Qual a medicação?		tmediq1 ___
Medicação 1: _____		tmediq2 ___
Medicação 2: _____		tmediq3 ___
Medicação 3: _____		tmediq4 ___
Medicação 4: _____		tmediq5 ___
Medicação 5: _____		

48. Alguma vez na vida tu fizeste tratamento com acupuntura?
 (0) não (*pule para a questão 50*) (1) sim

49. SE SIM: Por quais problemas de saúde procurastes o tratamento com acupuntura?

Motivo 1: _____ (88) Não se aplica

Motivo 2: _____ (88) Não se aplica

Motivo 3: _____ (88) Não se aplica

acupunt ___

mot1acu ___

mot2acu ___

mot3acu ___

❖ Neste momento, gostaríamos que você lesse com atenção os eventos vitais listados abaixo, marcando se eles aconteceram ou não com você ÚLTIMO ANO.

50. Morte do cônjuge	(1) sim	(0) não	eventa ___
51. Separação	(1) sim	(0) não	eventb ___
52. Casamento	(1) sim	(0) não	eventc ___
53. Morte de alguém da família	(1) sim	(0) não	eventd ___
54. Gravidez	(1) sim	(0) não	evente ___
55. Doença na família	(1) sim	(0) não	eventf ___
56. Acréscimo ou diminuição do número de pessoas morando em sua casa	(1) sim	(0) não	eventg ___
57. Nascimento na família	(1) sim	(0) não	eventh ___
58. Mudança de casa	(1) sim	(0) não	eventi ___
59. Mudança de escola	(1) sim	(0) não	eventj ___
60. Reconciliação matrimonial	(1) sim	(0) não	eventk ___
61. Aposentadoria	(1) sim	(0) não	eventl ___
62. Perda de emprego	(1) sim	(0) não	eventm ___
63. Mudança de trabalho (favorável ou desfavorável)	(1) sim	(0) não	eventn ___
64. Dificuldades com a chefia	(1) sim	(0) não	evento ___
65. Reconhecimento profissional	(1) sim	(0) não	eventp ___
66. Acidentes	(1) sim	(0) não	eventq ___
67. Perdas financeiras	(1) sim	(0) não	eventr ___

68. Dificuldades sexuais	(1) sim	(0) não	events __
69. Problemas de saúde	(1) sim	(0) não	eventt __
70. Morte de um amigo	(1) sim	(0) não	eventu __
71. Dívidas	(1) sim	(0) não	eventw __
72. Mudanças de hábitos pessoais	(1) sim	(0) não	eventv __
73. Mudanças de atividades recreativas	(1) sim	(0) não	eventx __
74. Mudanças de atividades religiosas	(1) sim	(0) não	eventy __
75. Mudanças de atividades sociais	(1) sim	(0) não	eventz __