



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

**MESTRADO EM TÉCNICAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS
FORENSES**

**INFLUÊNCIA DOS GENES DOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E
SEROTONINÉRGICO NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO NUMA
POPULAÇÃO UNIVERSITÁRIA.**

Trabalho submetido por

Filipa Alexandra Alfredo Saraiva Roso

para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Novembro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TÉCNICAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

INFLUÊNCIA DOS GENES DOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E SEROTONINÉRGICO NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO NUMA POPULAÇÃO UNIVERSITÁRIA.

Trabalho submetido por

Filipa Alexandra Alfredo Saraiva Roso

para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro

e coorientado por

Mestre Joana Morais Couceiro da Costa

Novembro de 2022

Agradecimentos

O meu eterno agradecimento à Prof. Doutora Ana Clara por todo o apoio, paciência, compreensão e ajuda que me deu neste último ano, sem ela nada seria possível.

À minha co-orientadora, Mestre Joana Couceiro, um agradecimento por sempre ter incentivado a pesquisa e procura do conhecimento e por todo o apoio e conhecimentos partilhados.

Obrigada ao Prof. Doutor Alexandre Quintas por todo o apoio sempre dado ao longo destes anos e pelo contínuo esforço que faz para lutar por nós e pelo curso, sem ele nada era possível. À Professora Cristina Soeiro por toda a ajuda prestada e entre ajuda na parte da psicologia.

Aos meus colegas nesta longa jornada, em especial às minhas companheiras de laboratório Ana Catarina Ribeiro, Daniela Eusébio e Joana Fernandes e aos meus colegas João Velez, Miguel Serol e Ricardo Santiago pela amizade e ajuda.

À Cooperativa Egas Moniz por fazer-me sentir sempre em casa e por ter um ensino de excelência.

Agradeço a todos os professores que me cruzei pois todos tiveram impacto na minha vida académica.

Um especial agradecimento aos meu pais. Ao meu pai António Roso que mesmo não estando presente fisicamente, sempre acreditou em mim e nunca me deixou desistir. À minha mãe Isabel Alfredo, por ter estado sempre presente, por todo o amor, compreensão e por sempre ter acreditado em mim. À minha avó Antónia Alfredo pelo apoio sempre dado.

Aos meus familiares e os meus amigos, em especial ao Rafael Ribeiro, Mariana Santos, Francisco Marcão, Diogo Teixeira, Marcos Folgado e Carolina Dinis pois sempre estiveram nas horas difíceis, nunca me deixaram desistir.

A todos aqueles que de alguma forma cruzaram-se comigo na realização deste trabalho e prestaram-me sempre ajuda.

Resumo

Vários estudos têm demonstrado que fatores genéticos e ambientais, cerca de 50% está relacionado com influências genéticas e os restantes 50% explicados por fatores ambientais não compartilhados com nenhum membro da família, influenciam uma grande variedade dos comportamentos humanos, incluindo o comportamento agressivo. A genética comportamental têm tentado correlacionar e compreender a base da genética da agressividade. Genes relacionados com serotonina (5-HT) e dopamina (DA) são os mais relacionados com a agressividade.

Este trabalho está inserido num projeto que visa a estudar a ‘Influência dos genes no comportamento agressivo numa população universitária’, assim tivemos apenas como objetivo a caracterização genotípica de apenas dois genes (*MAO-A* e *SLC6A4*) de entre outros genes todos eles descritos na literatura como associados à agressão humana.

A amostra para a caracterização genotípica inclui trinta e três jovens estudantes universitários com idades entre 17 e 31 anos. Os polimorfismos a estudar foram: VNTR 30pb do gene *MAO-A* e 5-HTTLPR e rs25531 do gene *SLC6A4*. Os genótipos dos indivíduos amostrados foram identificados por PCR ou PCR-RFLP.

Relativamente ao polimorfismo VNTR 30pb do gene *MAO-A*, revelou-se nove indivíduos homocigóticos para o alelo 4 (4R), treze indivíduos heterocigóticos para os alelos 4 (4R) e 3 (3R), dois indivíduos heterocigótico para os alelos 3 (3R) e 5 (5R), três indivíduos homocigóticos para o alelo 3 (3R) e três indivíduos homocigóticos para o alelo 5 (5R). Observamos mais indivíduos com alelos MAO-A-H do que para os alelos MAO-A-L, pois segundo a literatura os alelos com 3(3R) e 4(4R) repetições são os mais comuns na espécie humana. Em relação ao polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* revelou-se a presença de seis indivíduos heterocigóticos (L/S), um indivíduo homocigótico (S/S) e quatro indivíduos homocigóticos (L/L). O polimorfismo rs25531 do gene *SLC6A4* apenas conseguiu-se genotipar apenas quatro indivíduo: Um indivíduo homocigótico para o alelo SS, dois indivíduos heterocigóticos para o alelo LaS e um indivíduo homocigótico LaLa.

Palavras-chave: Agressividade; *MAO-A*; *SLC6A4*; Comportamento agressivo; Polimorfismos; Serotonina

Abstract

Several studies have shown that genetic and environmental factors influence a wide variety of human behaviours, including aggressive behaviour. About 50% of these factors are related to genetic influences and the remaining 50% are explained by environmental factors not shared with any family member. Behavioural genetics have attempted to correlate and understand the basis of the genetics of aggression. Serotonin (5-HT) and dopamine (DA) related genes are the most related to aggressiveness.

This work is part of a project aiming to study the "Influence of genes on aggressive behaviour in a university population" and it was our purpose to start with the genotypic characterisation of only two genes (*MAO-A* and *SLC6A4*) among other genes all described in the literature as associated with human aggression.

The sample for the genotypic characterisation included thirty-three young university students aged between 17 and 31 years. The polymorphisms to be studied were: VNTR 30pb of *MAO-A* gene, 5-HTTLPR and rs25531 of *SLC6A4* gene. The genotypes of the sampled individuals were identified by PCR or PCR-RFLP molecular biology techniques.

Regarding the 30bp VNTR polymorphism of the *MAO-A* gene, nine homozygote individuals carrying the 4 (4R) allele were identified, thirteen heterozygote individuals with the 4 (4R) and 3 (3R) alleles, two heterozygote individuals with the 3 (3R) and 5 (5R) alleles, three homozygote individuals with the 3 (3R) allele and three homozygote individuals with the 5 (5R) allele. We observed more individuals with MAO-A-H alleles than for MAO-A-L alleles, because according to the literature the alleles with 3(3R) and 4(4R) repeats are the most common in the human species. Regarding the 5-HTTLPR polymorphism of the *SLC6A4* gene we obtained the following results: six heterozygotic individuals (L/S), one homozygotic individual (S/S) and four homozygotic individuals (L/L). With the rs25531 polymorphism of the *SLC6A4* gene it was only possible to genotype four individuals: one homozygotic for the SS allele, two heterozygotes for the LaS allele and one homozygote LaLa.

Keywords: Aggressiveness; *MAO-A*; *SLC6A4*; Aggressive behavior; Polymorphisms; Serotonine

Índice

Resumo.....	1
Abstract	2
Índice de Figuras	6
Índice de Tabelas.....	8
Lista de Abreviaturas	6
1.Introdução	7
1.1.Sistema Serotoninérgico.....	12
1.2. <i>SLC6A4/ SERT</i> - Membro 4 da 6ª família de transportadores de solutos (<i>Solute Carrier Family 6 Member 4</i>).....	14
1.3. <i>MAO-A</i> - Monoamina Oxidase A (<i>Monoamine oxidase A</i>).....	19
1.4. Objetivo.....	24
2.Materiais e Métodos	24
2.1Recolha das Amostras Biológicas	24
2.2 Extração de DNA	24
2.3. Genotipagem do polimorfismo VNTR 30pb do gene <i>MAO-A</i>	24
2.4 Genotipagem do polimorfismo 5-HTTLPR/rs25531 Análise por PCR-RFLP do gene <i>SLC64/SERT- 5-HTTLPR- rs25531</i>	24
2.5. Informações adicionais.....	24
3.Resultados	24
3.1 <i>MAO-A</i>	24
3.2 <i>SLC6A4</i>	24
4. Discussão.....	36
5.Conclusão e Perspetivas Futuras	39
Bibliografia	41

Índice de Figuras

Figura 1- Biogênese da serotonina, imagem adaptada de : (Pavlov et al., 2012).....	14
Figura 2- Sequência similar do transporte do SLC6, imagem adaptada: (Bröer & Gether, 2012).....	15
Figura 3- Representação de um esquema na regulação da expressão do gene SLC6A4. Imagem retirada de:(Iurescia et al., 2017).....	19
Figura 4- Sequência dos nucleotídeos do polimorfismo STin.2. Imagem adaptada (Iurescia et al., 2017).....	19
Figura 5. O papel da <i>MAO-A</i> imagem retirada : (Kolla & Bortolato, 2020b).....	20
Figura 6- Isoforma da MAO-A imagem retirada: (Manca et al., 2018).....	22
Figura 7- Fotografia do QiAamp® DNA Mini Kit retirado do site: https://www.qiagen.com/us/products	24
Figura 8- Imagem ilustrativa da purificação do DNA, retirada do site: https://www.qiagen.com/us/products	24
Figura 9. Marcador de peso molecular- NZYDNA Ladder VI NZYTECH.....	24
Figura 10-Gel de agarose a 2,5% (p/v) dos produtos de amplificação para genotipagem do polimorfismo VNTR 30pb da <i>MAO-A</i> . O marcador de massas moleculares utilizado foi o NZYDNA Ladder VI cujo tamanho das bandas vão desde 50pb – 1500pb com intervalos regulares de 50p.....	24
Figura 11- Representação gráfica dos genótipos da população em estudo para o polimorfismo VNTR 30pb do gene <i>MAO-A</i>	24
Figura 12- Gel de agarose a 3% (p/v) dos produtos de amplificação para genotipagem do polimorfismo 5-HTTLPR do gene <i>SLCA4</i> . O marcador das massas moleculares utilizado tratou-se do NZYDNA Ladder VI.....	24
Figura 13-Gel de agarose a 3% (p/v) dos produtos de amplificação para genotipagem do polimorfismo rs25531 do gene <i>SLCA4</i> . O marcador de massas moleculares utilizado tratou-se do NZYDNA Ladder VI.....	36

Índice de Tabelas

Tabela 1- Primers utilizados no processo de genotipagem dos polimorfismos em estudo: sequências e tamanhos dos produtos de amplificação e restrição	24
Tabela 2- Frequência Alélica dos alelos 3R e 4R	24
Tabela 3- Representação dos genótipos dos alelos 3R e 4R da amostra	24

Lista de Abreviaturas

CGAS - Estudos de associação de genes candidatos

COMT - Catecol-o-metiltransferase

DA – Dopamina

DAT – Transportador de dopamina

GWAS - Estudos de associação em todo o genoma

HTR2A - Recetor 5-hidroxitriptamina 2A

HVA - Ácido homovanílico

L-DOPA – L-3,4-dihidroxi-fenilalanina

MAO – Monoamina oxidase

NaOH - Hidróxido de sódio

Na⁺/ K⁺ ATPase – Bomba sódio-potássio

PCR - Reação em cadeia da polimerase

SERT – Transportador de serotonina

SLC6A3/DAT1 – Membro 3 da 6^a família de transportadores de soluto

SLC6A4 – Membro 4 da 6^a família de transportadores de soluto

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

TH - Tirosina hidroxilase

TSSs - Locais de início da transcrição

VNTR – Repetições em tandem de número variável

3'-UTR – Região 3' não traduzida

5-HIAA - Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT – Serotonina

5-HTP - 5-hidroxitriptofano

5'-UTR - Região 5' não traduzida)

1.Introdução

A origem da violência humana tem sido um tema bastante debatido, e tem causado uma grande discussão ao longo dos tempos, a violência antes era vista como um resultado da “natureza vs criação”, mas pesquisas feitas nestes dois últimos séculos demonstraram que o comportamento agressivo tem origens biológicas, genéticas e evolutivas. Vários estudos também apontam para que alguns polimorfismos genéticos aumentam o risco para o comportamento violento (Ferguson & Beaver, 2009).

A agressão pode ser explicada como um comportamento natural adaptativo em que o objetivo é provocar danos físicos ou psicológicos a outro indivíduo ou objeto como fim de sobreviver ou manter a espécie. Existem dois tipos de agressão: direta e indireta (Castillo-lópez et al., 2015). A agressão direta foi definida como qualquer ato cujo objetivo principal seja prejudicar diretamente outra pessoa, onde há um confronto entre o agressor e a vítima, este tipo de agressão inclui a agressão física e verbal (Andreu et al., 2006). A agressão indireta é definida como qualquer conduta cuja intenção seja causar dano a alguém, mas esse dano é causado por outra pessoa, objeto ou propriedade. Este tipo de agressão evita o contra-ataque, também é uma agressão que pode ser física ou verbal, mas sendo uma agressão indireta pode manifestar-se por meio de bens ou pertences ou, por ofender alguém (Andreu et al., 2006).

Segundo os autores Wranghama, et al 2017 a classificação da agressão tem de ser tratada como biomodal, isto é, sustentada por dados psicológicos e biológicos. Por outro lado, a espécie humana é vista como tendo uma baixa propensão à agressão reativa, mas uma alta propensão à agressão proativa. A distinção destes dois tipos de agressão está relacionada com a sua origem, em que a agressão proativa envolve um ataque planeado intencionalmente como uma forma de recompensa seja externa ou interna como objetivo. Esta é caracterizada pela atenção a um alvo consistente, muitas vezes relacionada com a falta de excitação emocional. A agressão reativa é uma resposta a uma ameaça ou evento frustrante, com o único objetivo apenas de remover o estímulo provocador, está associada à raiva. (Wranghama, 2017).

No século XX, concentraram-se mais exclusivamente a tentar compreender e explicar o comportamento agressivo numa perspetiva sociológica em detrimento das explicações

biológicas. Em 1996, numa brochura da revista APA (American Psychological Association) sobre a violência juvenil afirmou: “ Não existe um gene para a violência. A violência é um comportamento aprendido...” (APA,1996). Mais tarde a APA observou que fatores genéticos podem influenciar na dificuldade de aprendizagem e impulsividade, interagindo com a violência (Ferguson & Beaver, 2009).

No estudo do comportamento agressivo tem havido um grande debate se este pode ser ou não determinado pelo ambiente de um organismo ou pré-determinado antes da exposição a qualquer tipo de estímulo pela sua genética. Devido ao avanço tanto na genética, como na biologia molecular e neurobiologia veio a perceber-se que ambos são essenciais para a formação do comportamento agressivo. Segundo Reiss et. al, o genoma de um organismo serve como base que vai determinar como esse organismo se desenvolve e funciona. Durante esse desenvolvimento, as redes de genes codificam o crescimento e diferenciação do sistema nervoso. Desta forma os genes continuam a produzir moléculas que modulam o funcionamento do sistema nervoso, assim os genes influenciam significativamente no comportamento agressivo, mas ao mesmo tempo as condições ambientais, como experiências influenciam também para esse comportamento. Os fatores ambientais não influenciam apenas diretamente o sistema nervoso, como também o genoma do organismo (Reiss & Rankin, 2021).

Estudos genéticos moleculares têm vindo a revelar que muitos genes estão associados á agressão humana, como por exemplo : (1) genes relacionados com serotonina(5-HT); (2) genes relacionados com a dopamina (DA) e (3) genes relacionados com hormonas esteroides sexuais (Zhang et al., 2017). A serotonina é um neurotransmissor implicado na modulação do humor, cognição, recompensa, aprendizagem e memória. Este neurotransmissor está associado ao comportamento agressivo. Adicionalmente, a dopamina e a noradrenalina, envolvidas em funções de controlo motor, também estão envolvidas no comportamento agressivo. O aumento da função dopaminérgica ou noradrenérgica facilita o comportamento agressivo na maioria, mas não em todos os estudos realizados (Zhang et al., 2017).

A maioria dos genes que possam estar relacionados com a violência são genes envolvidos na deteção, transporte e degradação de neurotransmissores, nomeadamente da dopamina e serotonina. Os genes do sistema dopaminérgico e serotoninérgicos são fortes candidatos nestes estudos (Ferguson & Beaver, 2009).

Os primeiros estudos a serem feitos na genética comportamental prenderam-se em estudos com gémeos, para estimar a variação nos fenótipos antissociais com a influência genética. Os resultados desses estudos, baseados em milhares de pares de irmãos, apontaram que realmente os fatores genéticos estão implicados em pelo menos uma parte na etiologia da violência. É difícil saber exatamente o quão influentes são os fatores genéticos nestes estudos, porque as estimativas de herdabilidade aumentam e diminuem consoante as características da amostra e diferenças na metodologia, mas este tipo de pesquisa tem sido de extrema importância para estabelecer as bases genéticas para comportamentos antissociais (Ferguson & Beaver, 2009)

Estudos de associação genética do comportamento agressivo sugerem duas abordagens diferentes: Estudos de associação de genes candidatos (CGAS) ou estudos de associação genómica ampla (GWAS). Estes estudos examinam traços e fenótipos do comportamento agressivo em genes candidatos, que codificam proteínas envolvidas na neurotransmissão de dopamina ou serotonina, e também de enzimas ou recetores hormonais. Foram realizados poucos estudos GWAS onde estes avaliam diferentes fenótipos relacionados com comportamentos agressivos (Fernández-Castillo & Cormand, 2016).

Estudos têm demonstrado associação entre polimorfismos do gene *Monoamine oxidase A* (MAO-A) e agressão em humanos, ratos knock-out e macacos *rhesus*. O polimorfismo na região promotora do gene transportador de serotonina (*SLC6A4*) também sido associado à agressividade e a alguns distúrbios neuropsiquiátricos. Vários estudos também associam os alelos VNTR de baixa atividade do 5-HTTLPR com comportamentos agressivos, violência e transtorno de conduta. O comportamento agressivo também mostrou associações com SNP's nos genes que codificam a epinefrina e norepinefrina. Um estudo recente ligou dois SNP's da enzima feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT) à impulsividade cognitiva e agressiva em crianças e adolescentes (Anholt & MacKay, 2012)

Os genes candidatos associados ao comportamento agressivo (CGAS) foram replicados em estudos em animais, com estes estudos descobriu-se que os candidatos do sistema dopaminérgico nomeadamente o recetor de dopamina DRD4, está envolvido no transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), um polimorfismo no gene DRD3 está associado à impulsividade, esta associação foi significativa em indivíduos

violentos em comparação a indivíduos não violentos. O gene transportador de dopamina *DAT1* também foi associado ao TDAH, ao comportamento agressivo e a delinquência em adolescentes e adultos jovens. O gene catecolamina-O-metil transferase (*COMT*) foi associada a crianças e adultos com transtorno de conduta e agressão (AL-Eitan et al., 2020).

Estudos que relacionam a variação genética e comportamentos agressivos relacionados à neurodegeneração têm sido associados principalmente em doentes com Alzheimer. Os fatores genéticos que determinam a propensão para este tipo de comportamentos relacionados com a neurodegeneração em uma parte encontram-se desconhecidos, devido à dificuldade de conseguir obter um maior tamanho de amostras e também a heterogeneidade fenotípica impedem estudos de ligação em grande escala (Anholt & MacKay, 2012)

Segundo Pavlov et.al, deve ressaltar-se que o impacto da herdabilidade para comportamentos agressivos muda consoante o tempo, ou seja, na infância os fatores genéticos e os fatores ambientais são igualmente importantes, enquanto os fatores genéticos tornam-se predominantes na idade adulta. A diferença de sexo também influencia a herdabilidade de traços agressivos, o que vai proporcionar um maior papel dos fatores genéticos associados à agressão em homens em comparação com mulheres. Têm sido feitos estudos centrados na identificação de variantes genéticas que predisõem para comportamentos agressivos. A análise dos marcadores polimórficos nos genes candidatos funcionais que codificam enzimas e recetores que estão envolvidos em vias metabólicas e regulatórias associados à agressividade é uma estratégia para identificar essas variantes. O desenvolvimento da associação genómica ampla (GWAS) usa painéis de alta densidade de polimorfismo de nucleótidos únicos (SNP's) fornecem grandes avanços de novas variantes que estão relacionados com a agressividade em todo o genoma humano (Pavlov et al., 2012) A “interação gene-ambiente” (GxE) é definida como “um efeito diferente de uma exposição ambiental no risco de doença em indivíduos com diferentes genótipos” ou “um efeito diferente de um genótipo no risco de doença em indivíduos com diferentes exposições ambientais”. A identificação de interações GxE relacionadas com o tratamento genético pode ajudar a orientar escolhas relacionadas com saúde e intervenções médicas para doenças complexas (Ottman, 1996).

Vários estudos da genética comportamental têm investigado a relação entre a genética e o ambiente, estes estudos incluem meta-análises, onde tem sido demonstrado que cerca de 50% está relacionado com influências genéticas e os restantes 50% explicados por fatores ambientais não compartilhados com nenhum membro da família. A idade e as formas de agressão influenciam estes dados, pois embora pareça que o sexo dos indivíduos não influencie esse número, o sexo masculino é mais propenso a comportamentos agressivos do que o sexo feminino. Estudos em indivíduos adotados e em gêmeos demonstram que os efeitos genéticos no fenótipo agressivo dependem de fatores ambientais (GxE) (Fernández-Castillo & Cormand, 2016).

Avanços no campo da genética molecular vieram possibilitar aos investigadores para que estes identificassem as interações GxE de forma mais específica. Um dos estudos mais importantes nesta área, foi de Caspi et al. onde este demonstrou a relação entre um polimorfismo funcional no gene *MAO-A* e maus-tratos na infância em relação ao desenvolvimento de comportamentos antissociais em homens. Este estudo consistiu em que os rapazes maltratados com um genótipo de baixa atividade da *MAO-A* foram mais propensos a desenvolver posteriormente problemas antissociais, nomeadamente crimes violentos em adultos, transtorno de personalidade antissocial, em comparação aos rapazes maltratados que tinham um genótipo de alta atividade da *MAO-A* (Caspi et al., 2002). Após este estudo iniciou-se uma série de descobertas em relação a interação da genética e de fatores ambientais (GxE). No entanto, uma série de dúvidas e críticas foram levantadas, onde ainda existem algumas dúvidas e dificuldades, o que dificulta uma criação de uma teoria consistente sobre este tema, também a falta de amplitude de estudos de outros genes tem sido vista como outra dificuldade. Cohen et.al (2006) descobriram que o polimorfismo VNTR 30pb do gene *MAO-A* moderou o desenvolvimento de psicopatologia após sofrerem abuso físico numa amostra de 975 rapazes que sofreram de maus-tratos. Vários estudos têm demonstrado que a interação de certos genótipos e maus-tratos na infância estão ligados à vulnerabilidade para comportamentos agressivos ou antissociais (Palumbo et al., 2018; Pavlov et al., 2012).

Segundo Pavlov et. al, a agressão em humanos pode ser considerada como uma característica evolutiva positiva que vai proporcionar sucesso na competição em comparação ao ponto de vista social, o comportamento agressivo dificulta ou até impede a consolidação social, levando assim em conta as consequências positivas e negativas deste comportamento, deve ser tratada como uma característica evolutiva

significativa e geneticamente modulada (Pavlov et al., 2012) A identificação de marcadores genéticos específicos e experiências específicas pode oferecer a oportunidade de avaliar fatores de risco genéticos e ambientais a nível individual, isto vai aumentar as oportunidades para o desenvolvimento de tratamentos e prevenções eficazes para comportamentos antissociais e agressivos (Pavlov et al., 2012).

Este trabalho está envolvido num projeto que visa a estudar a ‘Influência dos genes no comportamento agressivo numa população universitária, sendo que neste trabalho dado à literatura e estudos feitos em que associam o gene *MAO-A* e *SLC6A4*, estes foram apenas os dois genes que queríamos caracterizar genotipicamente.

1.1.Sistema Serotoninérgico

Na análise do mecanismo de indução de agressão reativa em mamíferos, evidências têm demonstrado que a relação entre a agressão e a ansiedade é regulada por regiões cerebrais altamente conservadas. Na parte da região reguladora que envolve a amígdala, que é a parte que controla os circuitos neurais desencadeia comportamentos defensivos e agressivos. Os circuitos também envolvem o córtex cingulado anterior e regiões do córtex pré-frontal. Algumas alterações de desenvolvimento no circuito pré-frontal subcortical, e anormalidades na região neuromoduladora, podem desempenhar um papel importante no comportamento agressivo (Pavlov et al., 2012).

A serotonina facilita a inibição pré-frontal, assim uma atividade serotoninérgica baixa pode aumentar a agressividade. A atividade gabaminérgica nos receptores GABA pode aumentar também a agressão (Pavlov et al., 2012).

Níveis reduzidos de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que se trata de um metabólito terminal da serotonina, no líquido cefalorraquidiano (LCR) está fortemente correlacionado com comportamentos agressivos. Os efeitos biológicos da serotonina são mediados por recetores de serotonina. Os recetores de serotonina (5-HTRs) medeiam os efeitos dependentes de serotonina no sistema nervoso central (SNC) e periférico. Foram encontrados cerca de sete tipos de 5-HTRs, dos quais os tipos 1-2 e 4-7 representam um grupo de recetores acoplados a proteínas G e o tipo 3 liga-se aos iões Na^+ e K^+ na membrana externa (Barnes NM, Sharp T, 1999).

Os genes *5-HTR1A* e *5-HTR1B* que codificam os recetores 1A e 1B são considerados os principais genes candidatos para a associação com a agressividade, pois estes têm

efeitos inibitórios sobre a neurotransmissão da serotonina (Antypa et al., 2013) O transportador de serotonina (SERT) é uma proteína transmembranar responsável pelo transporte reverso da serotonina da fenda sináptica para os neurónios pré-sinápticos. A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é produzida por células enterocromafins no intestino e no cérebro nos neurónios serotoninérgicos. O mecanismo desta biossíntese tem duas etapas: Oxidação do aminoácido triptofano em 5-hidroxi-L-triptofano (catalisado por uma enzima triptofano hidroxilase (TPH)) e por uma descarboxilação do 5-hidroxi-L-triptofano na serotonina (catalisado pelo L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC)) (Barnes NM, Sharp T, 1999)

A acumulação da serotonina nas vesículas pré-sinápticas é mediada pelo transportador de aminas vasculares, que após essa despolarização da membrana externa dos neurónios pré-sinápticos é realizada na fenda sináptica, onde o neuromediador interage com os recetores de serotonina que estão localizados na superfície pós-sináptica levando a neurotransmissão. O SERT localizado na membrana pré-sináptica é responsável para transferência da serotonina para a parte terminal do sistema pré-sináptico no qual o neurotransmissor acumula e armazena até a próxima libertação (Barnes NM, Sharp T, 1999).

A serotonina circulante é principalmente derivada de tecidos periféricos e metabolizada pelo fígado 5-hidroxiindolacetaldeído através da desaminação oxidativa pela monoaminoxidase A (*MAO-A*). O aldeído desidrogenase mitocondrial oxida o 5-hidroxiindolacetaldeído em ácido 5-hidroxiindolacético, que é um produto terminal do metabolismo da serotonina, e é excretado pela urina. Variantes polimórficas que influenciam a expressão e/ou a atividade dos recetores 5-HT, SERT e *MAO-A* afetam os níveis de serotonina cujo desequilíbrio está associado com a agressão. Podemos ver na figura(1) a síntese da biogénese da serotonina (Pavlov et al., 2012)

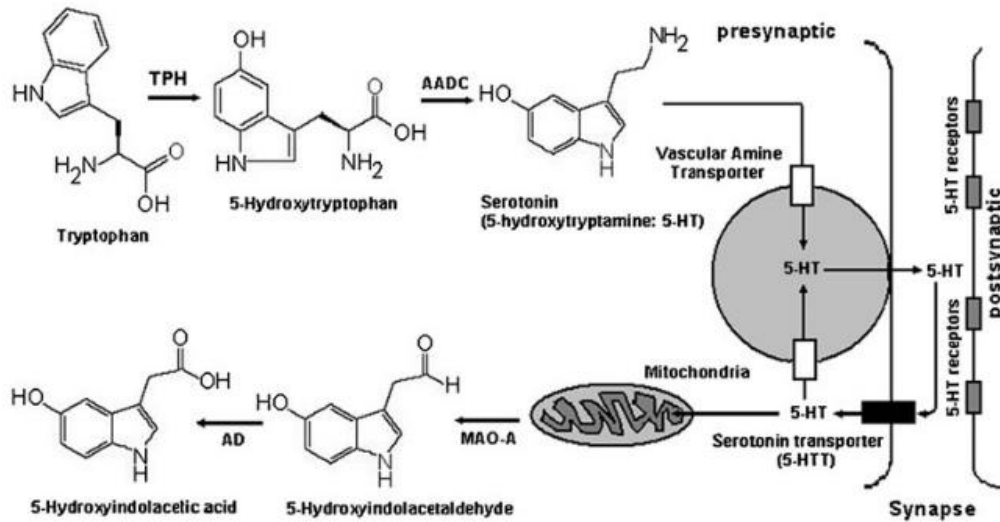


Figura 1- Biogênese da serotonina, imagem adaptada de : (Pavlov et al., 2012)

1.2. SLC6A4/ SERT - Membro 4 da 6ª família de transportadores de solutos (*Solute Carrier Family 6 Member 4*)

A família de transportadores de soluto (SLC6) tem 20 membros codificados no genoma humano. São compostos por transportadores de neurotransmissores, aminoácidos proteinogénicos, betaína, taurina e creatina. Os transportadores de neurotransmissores foram os primeiros membros a ser identificados, ficando assim conhecidos como a família de neurotransmissores sodium symporters (NSS) ou família de transportadores dependentes de Na^+/Cl^- . Subdivide-se a família SLC6 em quatro ramos, ramo transportador de GABA, ramo transportador de monoaminas e ramo de transportadores de aminoácidos (I e II) (Bröer & Gether, 2012).

O ramo transportador de GABA, contém transportadores para GABA, betaína, taurina e creatina. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro, a inibição do GABA vai resultar numa redução após libertação sináptica, o que leva a um aumento de ação das sinapses inibitórias (Bröer & Gether, 2012).

Os ramos transportadores das monoaminas estão incluídos os transportadores de neurotransmissores para dopamina, 5-HT e noradrenalina. Estes neurotransmissores desempenham um papel importante na modulação no SNC. Estes neurotransmissores estão envolvidos na modulação do humor, agressividade, ansiedade, depressão, etc.

O ramo transportador de aminoácidos (I) contém transportadores para glicina, prolina e o transportador geral de aminoácidos $ATB^{0,+}$, que é amplamente específico para neutro(0) e para aminoácidos catiónicos (+). O ramo transportador de aminoácidos (II) contém transportadores de aminoácidos envolvidos no transporte epitelial e cerebral (Bröer & Gether, 2012).

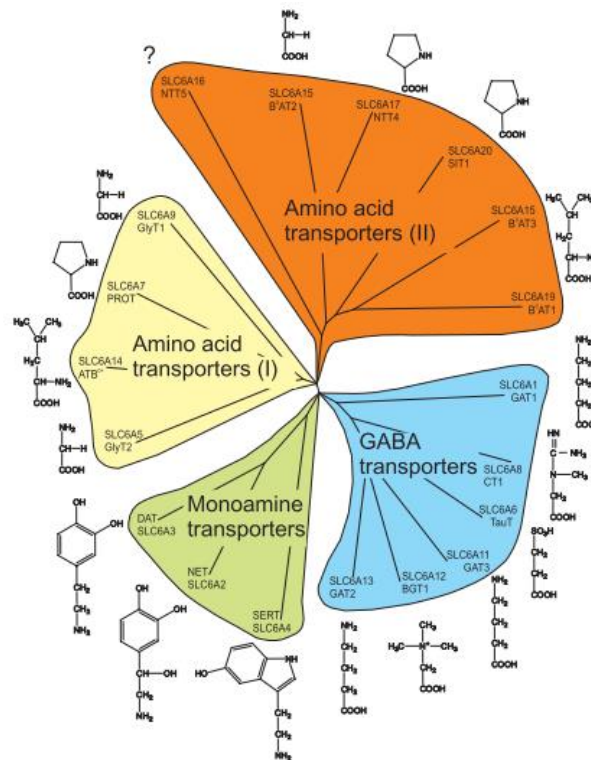


Figura 2- Sequência similar do transporte do SLC6, imagem adaptada: (Bröer & Gether, 2012)

A função do transportador de serotonina (SERT) é terminar a neurotransmissão pela recaptação de serotonina (5-HT) na sinapse para a terminação nervosa pré-sináptica (Bröer & Gether, 2012).

A estrutura do SERT foi resolvida na conformação aberta para fora, fechada para fora e aberta para dentro. As ligações de sódio foram identificadas pela primeira vez no transportador de pequenos aminoácidos bacterianos homólogos LeuT. O local de ligação do substrato(S1) é no centro do transportador, na metade da membrana. O transporte que leva à absorção de 5-HT inicia-se pela ligação do substrato e aos iões co-transportados para a conformação aberta para fora, o transporte dos iões ligados a 5-HT leva a uma oclusão de 5-HT no local de ligação do substrato S1, segue-se uma transição para a conformação introvertida no qual o substrato e os iões são libertados

no citosol. O retorno ao estado aberto é facilitado pela ligação de um íão potássio ou um protão. Uma fonte de energia é necessária para facilitar o transporte e garantir a direccionalidade que vai permitir a depuração eficiente de neurotransmissores por recaptação (Szöllösi & Stockner, 2021)

O SERT é uma proteína transportadora de monoaminas, codificadas por um único gene SLC6A4 (Membro 4 da 6ª família de transportadores de solutos), localizado no braço longo do cromossoma 17 (17q11.2), constituído por 13-14 exões e tem 35kb de tamanho. A sequência de transcrição permite a tradução de uma proteína composta por 630 aminoácidos com 12 domínios transmembranares (Al-Eitan et al., 2014; Zuccarello et al., 2012).

O transportador é responsável pela recaptação seletiva de 5-HT nas terminações nervosas, regulando assim a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica. Tem um papel importante no equilíbrio dos níveis de 5-HT, uma vez que armazena as moléculas de 5-HT nos neurónios pré-sinápticos. As variações deste transportador podem estar relacionadas com alterações estruturais na sequência dos aminoácidos, variações na expressão causados por promotores defeituosos, metilação alterada e outros fatores epigenéticos (Calabrò et al., 2020).

No locus SLC6A4, as variações de DNA em elementos reguladores localizados na extremidade 5' do gene, o número variável de repetições em tandem (VNTR) no intrão 2 e polimorfismo nas regiões 3' não traduzidas (UTR's) influenciam as etapas transcricionais e pós-transcricionais (Iurescia et al., 2017).

O polimorfismo do promotor ligado a SERT (5-HTTLPR) contém uma inserção/deleção de repetição de 44 pares de base (pb), o alelo curto (S) e o alelo longo (L), com 14 e 16 repetições respetivamente, alteram e regulam a expressão do transportador de serotonina. O alelo curto(S) do polimorfismo 5-HTTLPR, apresenta uma atividade transcricional reduzida, tal como uma expressão reduzida no transportador de serotonina e captação de serotonina. O alelo L(L) com uma adenosina no polimorfismo do nucleotídeo único (SNP) rs25531 é mais ativo que o alelo L (L) com uma guanina em rs25531 (L_G) (Liu et al., 2013; T. Y. Wang et al., 2016; Zuccarello et al., 2012).

O polimorfismo STin2 é um VNTR que contém nove (STin 2.9), dez (STin2.10) ou doze (STin 2.12) repetições de 16-17pb (ver tabela 1) . Dados têm demonstrado que os alelos STin2.10 e STin212 suportam níveis diferenciais de expressão do gene repórter quando transformadas em células-tronco embrionárias (ES). O VNTR dentro do intrão 2 do SLC6A4 atua como regulador transcricional, uma característica que está relacionada com a suscetibilidade a transtornos psiquiátricos (Iurescia et al., 2017).

Hranilovic et al. analisaram o efeito do polimorfismo STin2 VNTR nos níveis de mRNA de SLC6A4 na expressão nativa de células em pacientes com esquizofrenia, neste caso ao alelo STin.10 atuava como. Em estudos de meta-análise que associam esquizofrenia e os polimorfismos de 5-HTTLPR, sugere-se que o alelo STin2.12 é um fator de risco para suscetibilidade à esquizofrenia (Iurescia et al., 2017).

Tem sido sugerido que a homozigotia do alelo 12/12 (STin 2.12/STin 2.12) tem uma atividade transcricional maior do que a homozigotia do alelo 10/10 (STin 2.10/STin 2.10). O polimorfismo STin2 permite identificar os genótipos ditos ‘‘mais rápidos’’ (L’L’ 12/12) e mais lentos (S’S’ 10/10), relativamente à velocidade de depuração ativa de 5-HT sináptica (maior expressão da proteína correspondente a um aumento da recaptação de 5-HT com o bloqueio do sinal serotoninérgico) (Zuccarello et al., 2012) .

O SNP A-> G, o rs25531, que resulta de uma substituição de Adenina (A) para Guanina (G), foi descrito dentro do alelo L, estando assim subdividido em variantes La e Lg. Foi relatado que os níveis de expressão de mRNA de SERT do gene que contém o alelo S ou L_G são equivalentes. Zalsman et al. propuseram uma abordagem trialélica para dividirem os alelo La, Lg e S em três classes funcionais: L’L’ (LaLa) ; L’S’ (LaLg e LaS) e S’S’ (LgLg, LgS e genótipos SS).A classe L’L’ apresentou uma maior expressão funcional do que os S’S’(Zuccarello et al., 2012) .

Evidências recentes sugerem que os polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 podem ser controlados pela mesma via regulatória. Lesch et al. relataram uma associação entre o 5-HTTLPR e traços de personalidade relacionados com ansiedade e neuroticismo (Megan et al., 2018; Middeldorp et al., 2007). Na figura (4) encontra-se uma representação dos nucleótidos do polimorfismo STin.2 onde negrito e o que está sublinhado indica nucleótidos que diferem da sequência de consenso,

GGCTGYGACCY(R)GRRTG, onde Y = T/C e R = G/A, com perda do 12º par de bases em um (repetição D) dos elementos repetidos.

Estudos comportamentais genéticos sugerem que o 5-HTTLPR está relacionado com uma maior propensão à impulsividade e agressão em animais e humanos, estimaram que a presença do genótipo SS podem explicar 5% da variância inter-individual no comportamento agressivo. O 5-HTTLPR tem sido associado à obesidade tanto em adultos como em crianças (Lillycrop et al., 2019; Zhang et al., 2017).

A epigenética refere-se a doenças potencialmente hereditárias e alterações ambientais que possam modificar a expressão genética que são mediadas por mecanismos não codificados por DNA. Dois exemplos mais comuns de modificações genéticas são a metilação de DNA(DNA_m) e acetilação de histonas. A metilação do DNA é um processo onde os grupos metil são adicionados à molécula de DNA, que vai alterar a atividade transcricional do segmento de DNA sem alterar a sequência, quando está localizado num promotor de gene, o DNA_m atua para reprimir a transcrição do gene. A acetilação de histonas é o processo no qual os grupos de acetil são adicionados aos resíduos de lisina dentro da cauda N-terminal que está no núcleo de histonas do nucleossomo. Alterações na metilação do DNA do gene SLC6A4 tem estado associado à depressão e obesidade (Manchia et al., 2019; Park et al., 2019).

Num estudo em indivíduos adotados demonstraram que indivíduos do sexo masculino com a variante S eram mais propenso a serem agressivos (Manchia et al., 2019).

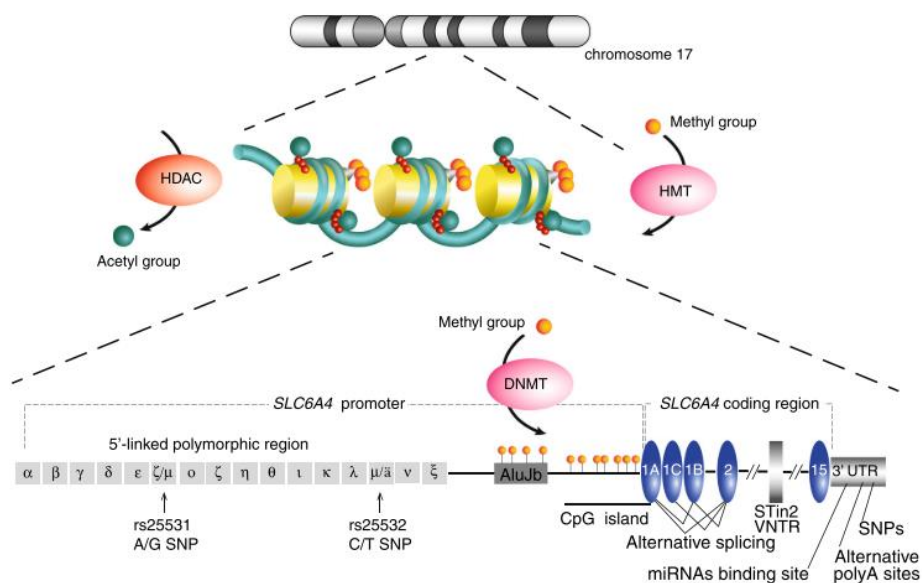


Figura 3- Representação de um esquema na regulação da expressão do gene SLC6A4. Imagem retirada de:(Iurescia et al., 2017)

Variant ID	Length	Nucleotide sequence																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
A	17	G	G	C	T	G	T	G	A	C	C	C	<u>A</u>	G	G	G	T	G
B	17	G	G	C	T	G	T	G	A	C	C	C	G	G	<u>A</u>	G	T	G
C	17	G	G	C	T	G	T	G	A	C	C	C	G	G	G	G	T	G
D	16	G	G	C	T	G	T	G	A	C	C	C	-	G	G	G	T	G
E	17	G	G	C	T	G	<u>C</u>	G	A	C	C	<u>T</u>	G	G	G	G	T	G
F	17	G	G	C	T	G	T	G	A	C	C	<u>T</u>	G	G	G	<u>A</u>	T	G
G	17	G	G	C	T	G	T	G	A	C	C	<u>T</u>	G	G	G	G	T	G

Figura 4- Sequência dos nucleotídeos do polimorfismo STin.2. Imagem adaptada (Iurescia et al., 2017)

1.3.MAO-A - Monoamina Oxidase A (*Monoamine oxidase A*)

A enzima MAO-A (EC:1.4.3.4) está ligada à membrana mitocondrial externa através de um segmento transmembranar de 22 aminoácidos (aa) na região C-terminal e possui um dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) ligado a um resíduo de cisteína por uma ligação 8 α -(S cisteinil-riboflavina, como podemos ver na figura (1) a representação da MAO-A. A MAO-A catalisa a desaminação oxidativa de vários neurotransmissores de monoaminas, incluído o 5-HT e as catecolaminas da norepinefrina e dopamina- em aldeídos, com a síntese de amoníaco e peróxido de hidrogénio como subprodutos. Tantos os animais como os seres humanos produzem duas monoaminas oxidases, isoenzimas com diferentes substratos específicos (Kolla & Bortolato, 2020a; Nishioka et al., 2011).

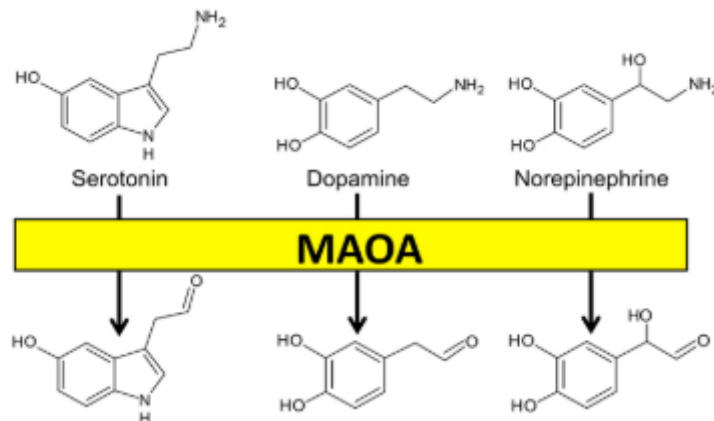


Figura 5. O papel da *MAO-A* imagem retirada : (Kolla & Bortolato, 2020b)

A *MAO-A* partilha um elevado grau de semelhança proteica com a sua isoenzima Monoamina oxidase B (*MAO-B*). A *MAO-A* tem uma maior afinidade para 5-HT e norepinefrina, em comparação a *MAO-B* que é seletiva para substratos de aminas como, β -feniletilamina (PEA). Em humanos, estas duas isoenzimas têm afinidades semelhantes para dopamina e tiramina. A *MAO-A*, age preferencialmente sobre a serotonina e noradrenalina desaminases e a *MAO-B* atua sobre a feniletilaminas e benzilamina. A dopamina é um substrato transformado por ambas as formas da MAO. A *MAO-A* está localizada no cromossoma X em posição adjacente à *MAO-B* (Kolla & Bortolato, 2020a; Nishioka et al., 2011).

A oxidação das monoaminas pode ocorrer em três etapas fundamentais: i) a oxidação da amina em uma imina que é acompanhada pela redução de FAD em FADH₂, ii) uma etapa hidrolítica, na qual a imina é convertida em um aldeído com formação de amoníaco e iii) uma reação oxidativa, onde o FADH₂ é reoxidado a FAD com formação de peróxido de hidrogénio. A ordem destas etapas pode variar dependendo da ligação específica do substrato, á forma oxidada e reduzida da enzima. No SNC, o produto do aldeído da reação *MAO-A* é convertida em ácido carboxílico que corresponde a um aldeído desidrogenase dependente de NAD⁺ (ALDH) (Kolla & Bortolato, 2020a).

A *MAO-A* degrada o 5-HT em 5-hidroxi-3-indol acetaldeído (5-HIAL), depois é convertido em ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA). Os dois principais neurotransmissores metabolizados pela *MAO-A*, a norepinefrina e dopamina, são oxidados em 3,4-diidroxifenilacetaldeído (DOPAL) e 3,4-diidroxifenilglicolaldeído

(DOPGAL). Os aldeídos posteriormente são convertidos em ácido 3,4-diidroxi mandélico (DOMA) e ácido 3,4-diidroxi fenilacético (DOPAC) pelo ALDH (Kolla & Bortolato, 2020a).

O gene *MAO-A* (Xp11.4-Xp11.3) codifica para uma enzima mitocondrial que catalisa várias catecolaminas dos neurotransmissores, nomeadamente a serotonina(S), noradrenalina (NE) e dopamina (DA) apresenta um VNTR na região promotora, tem dois elementos comuns que vão influenciar eletivamente a transcrição da proteína, por conseguinte a sua atividade enzimática (Cerasa et al., 2010).

Um mecanismo de regulação da *MAO-A* é por mecanismos epigenéticos, onde a atividade cerebral da MAO-A em humanos está fortemente associada a metilação da ilha CpG, dentro da região promotora da mesma, que inclui 14 locais de CpG (Manca et al., 2018)

Foram encontrados dois transcritos, do gene da *MAO-A*, com locais de iniciação de transcrição (TSSs) separados aproximadamente por 1,3kb, que resulta em duas isoformas com regiões 5' não traduzidas distintas (5'UTRs). A regulação destes dois TSSs, pode estar a ser promovida por dois domínios *variable number tandem repeat* (VNTR) identificados na região do promotor da *MAO-A* (Manca et al., 2018).

O primeiro domínio, denominado uVNTR, está localizado 1.2 kb a montante da sequência codificante da *MAO-A* e consiste num motivo de 30 pb que pode ser repetido duas, três, três e meia, quatro e cinco vezes, esta isoforma foi chamada de *MAO-A* primária. A sequência de 30pb ('ACCGGCACCG GCACCAGTAC CCGCACCAGT') apresenta cinco repetições do motivo de 6 nucleotídeos ('ACCVGY') (as letras V e Y são símbolos de nucleótidos que representam G/C/A e C/T respetivamente). Cada uma destas sequências é constantemente seguida por um motivo de repetição de 15 pb ('ACCGGCACCG GCACC'), correspondente à primeira metade da repetição, inicialmente esta sequência não foi incluída na nomenclatura dos alelos (Kolla & Bortolato, 2020a; Manca et al., 2018).

O segundo VNTR, denominado dVNTR, está localizado aproximadamente 500 pb a montante do uVNTR e é composto por duas repetições diferentes: CCCCTCCCCG (repetição A) e CTCCTCCCCG (repetição B). Genótipos de sete, oito, nove, dez, onze e doze repetições foram documentados, sendo os mais comuns aqueles que apresentam

nove (9R) e dez (10R) repetições. Os alelos 9R e o 10R diferem na eficiência transcricional, onde o 9R é mais eficiente do que o 10R (Kolla & Bortolato, 2020a; Manca et al., 2018).

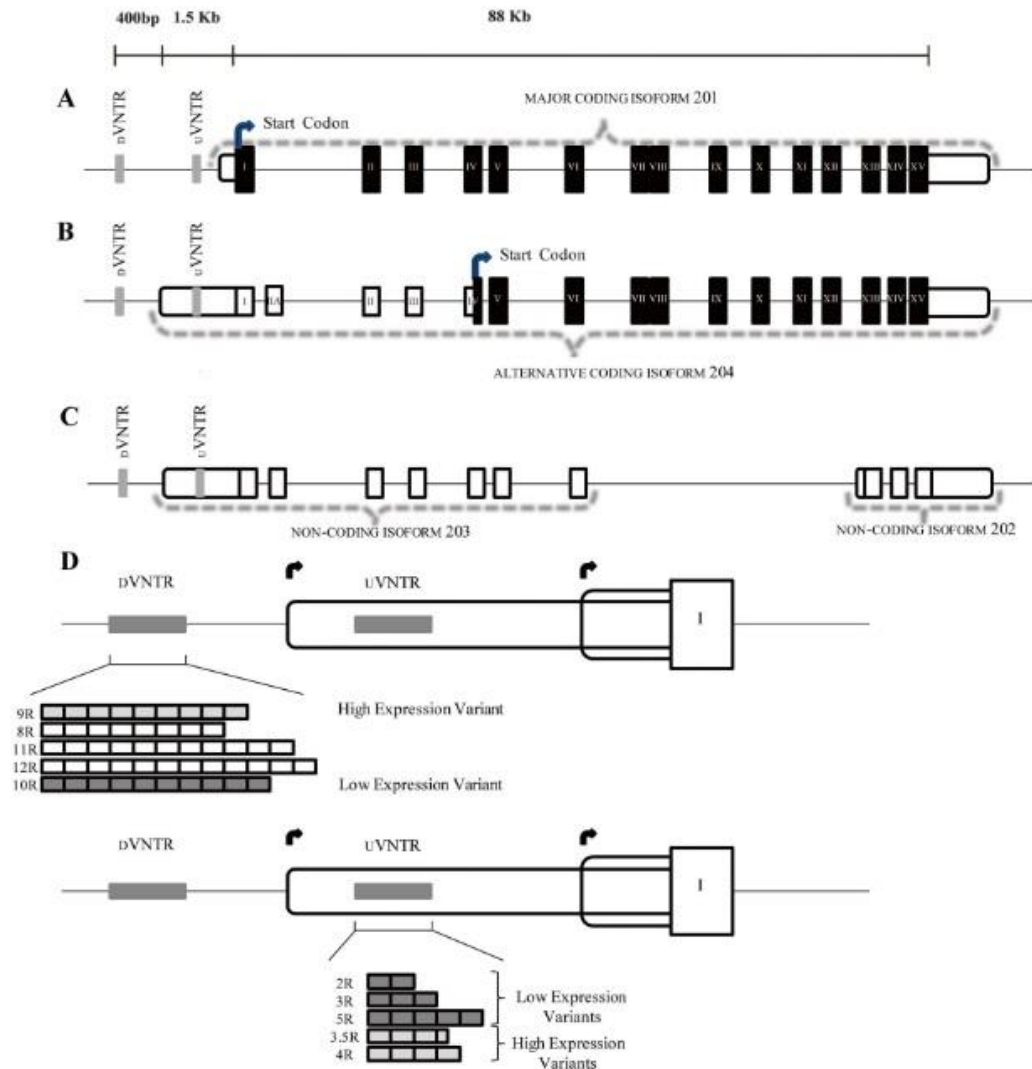


Figura 6- Isoforma da MAO-A imagem retirada: (Manca et al., 2018)

Os alelos de 3(3R) e 4(4R) repetições são os mais comuns. Os alelos 2(2R) e 3(3R) e 5 (5R) estão associados a menor eficiência transcricional, sendo chamados de alelos MAO-A-L, por outro lado os alelos 3.5(3.5R) e 4R(4R) estão associados a uma maior atividade transcricional, chamados assim de MAO-A-H. Os alelos MAO-A-H têm uma maior relação com concentrações no LCR dos metabólitos 5-HT e catecolaminas 5-HIAA e ácido homovanílico (HVA). Uma variante rara de 1 repetição (1R) também foi recentemente descrita numa população iraquiana

A primeira situação a ser relatada em relação ao envolvimento da *MAO-A* no comportamento antissocial e agressivo, foi a síndrome de Brunner, uma síndrome recessiva ligada ao cromossoma X caracterizada por uma mutação nonsense do gene *MAO-A* (rs72554632). Foram investigadas quatro gerações de uma família holandesa, onde quatorze dos homens são afetados por uma síndrome comportamental complexa que se manifesta num atraso mental limítrofe e comportamento antissocial e agressivo. Esta síndrome afetou apenas homens, mas aparentemente o gene foi transmitido através de portadoras normais do sexo feminino. Isto sugeriu que o defeito genético estava localizado no cromossoma X. O gene defeituoso estaria mascarado em mulheres (XX), mas o efeito só se manifesta nos homens (XY), uma vez que possuem apenas um cromossoma X. Essa hipótese foi apoiada pelo uso de marcadores genéticos do cromossoma X, que indicaram que o gene anormal estaria localizado muito próximo do gene *MAO-A* e *MAO-B*. Análises bioquímicas indicaram que os homens afetados tinham um grave comprometimento do metabolismo dos neurotransmissores, que afetava a quebra de 5-HT, noradrenalina e dopamina. A *MAO-B* estava normal nos homens afetados, mas a atividade do gene *MAO-A* estava completamente ausente. A sequenciação do gene *MAO-A* nestes indivíduos demonstrou que havia uma substituição de base única que convertia o código para glicina num codão de terminação na posição 296 da sequência de aminoácidos. Esta mutação leva a uma produção de uma enzima *MAO-A* incompleta, que não tem atividade funcional. Estudos recentes sobre esta síndrome demonstraram que existe um aumento acentuado na subunidade de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), NR2A e NR2B, semelhante a alterações identificadas em estudos de ratinhos knock-out na *MAO-A* (Brunner, 1996; Kolla & Bortolato, 2020a)

A *MAO-A-L* tem sido relatada como a variante para maior suscetibilidade para comportamentos agressivos e antissociais em humanos (Cerasa et al., 2010; Hohmann et al., 2016 ;Castillo-lópez et al., 2015).

Os alelos de baixa atividade (*MAO-A-L*) estão associados a um menor funcionamento nas regiões límbicas. Segundo Huang em casos de abuso infantil indivíduos com estes alelos demonstraram impulsividade e maior agressividade, assim os indivíduos com estes alelos têm sido frequentemente associados a comportamentos agressivos (Harro & Orelund, 2016).

Uma variante da *MAO-A* foi associada à dependência sexual, a qual parece ser mais significativa nos homens. O gene da *MAO-A* encontra-se no cromossoma X. Assim, os homens são portadores hemizigóticos de um alelo L ou H, em relação às mulheres. Estas carregam dois alelos, sendo heterozigotas, apesar um dos dois alelos seja quase totalmente silenciado pela inativação aleatória do cromossoma X (Berletch et al., 2011). Os mecanismos que regulam a transmissão do cromossoma X são bastante complexos, mas processos como a inativação do cromossoma X estão relacionados a uma grande variabilidade entre sujeitos, espécies, tecidos, entre outros. Uma fuga da inativação do cromossoma X permanente ou durante um certo período de desenvolvimento poderia levar a uma expressão mais elevada de *MAO-A* e, por conseguinte, diferenças no que diz respeito ao metabolismo dos transmissores monoaminérgicos nas mulheres (Hohmann et al., 2016).

A *MAO-A-H* está associada a uma concentração mais baixa de serotonina e a *MAO-A-L* com uma maior concentração de serotonina (Castillo-lópez et al., 2015). *MAO-A-L* foi associada ao aumento das reações agressivas. Por exemplo, os portadores de *MAO-A-L* apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de uma personalidade agressiva (Stetler et al., 2014; Fowler et al., 2007). No contexto de abuso físico ou emocional, jovens do sexo masculino com *MAO-A-L* têm maior tendência à agressão (Zhang et al., 2016a). Os mecanismos neurobiológicos que têm impacto no *MAO-A-L* não se encontram completamente estudados. As evidências mais consistentes são nas regiões cortico-límbica, em particular a reatividade da amígdala aumenta a estímulos emocionais negativos, redução das ativações no frontal medial e córtex cingulado anterior durante o controlo da inibição e redução da massa cinzenta do cortico-límbico foram detetadas repetidamente. A conectividade funcional, é vista como uma variável independente, que tem efeitos sobre os processos ecológicos e as populações, ou como uma variável dependente da interação entre estrutura e comportamento analisa um aumento do acoplamento entre a amígdala e as áreas de ordem superior na região pré-frontal ventromedial e o córtex anterior cingulado. Estes dados juntos sugerem que o alelo de baixa atividade da *MAO-A* facilita alterações no sistema cortico-límbico que regula as emoções negativas e controlo inibitório devido ao sistema serotoninérgico durante períodos vulneráveis do desenvolvimento do cérebro (Forero-Medina & Vieira, 2007; Harneit et al., 2019)

A *MAO-A* e *MAO-B* são encontradas tanto no cérebro, como no resto do corpo, têm é diferentes distribuições celulares, no caso da *MAO-A* está presente nos trofoblastos e nos trombócitos somente a *MAOB*, apesar de os dois estarem presentes nos fibroblastos. O polimorfismo comum na região promotora 1,2kb na região codificante do gene da *MAO-A* foi relatado para moderar os efeitos do precoce dos efeitos das experiências do comportamento agressivo (Hohmann et al., 2016). Um outro estudo, por Caspi et al., não reportou nenhum efeito direto de variantes do gene *MAO-A*, mas um efeito interativo com maus-tratos precoces e o comportamento agressivo (Pingault, 2013).

Os inibidores da MAO são utilizados para o tratamento de doenças como depressão e pressão arterial elevada, também há uma relação entre uma mutação no gene *MAO-A* associada à deficiência mental leve e também de comportamento agressivo impulsivo em homens num estudo feito a uma família na Holanda (Brunner et al. 1993a,). Alguns estudos com os ratinhos knockout, neste caso transgênico que continham o gene *MAO-A* tiveram alterações de comportamentos, como tremores e dificuldade de equilíbrio enquanto rato knockout bebês e aumentaram a sua agressividade quando os machos se tornaram adultos (Cases et al. 1995).

Muitos estudos feitos posteriormente têm demonstrado resultados mistos em relação ao comportamento agressivo e maus-tratos precoces, houve dois estudos principais que se basearam em avaliações de um ou dois acontecimentos que ocorrem na adolescência ou na idade adulta, mas ainda não houve estudos que se focassem nos acontecimentos ocorridos na infância (Pingault, 2013). No estudo feito pelo Departamento de Psiquiatria da Universidade de Montreal, foram selecionadas 436 crianças, de um jardim de infância do Quebec, de sexo masculino para um estudo longitudinal tendo-se avaliado a frequência com que praticavam a agressão física. A avaliação foi realizada anualmente entre os 6 e os 12 anos, por professores com o ‘*Social Behavior Questionnaire*’. Neste estudo as crianças com o alelo *MAO-A* de alta atividade apresentaram níveis mais altos de comportamento antissocial, mas os investigadores alertam para a questão de as contribuições genéticas estarem interligadas ao comportamento e com isto sugeriram que o gene *MAO-A* pode não influenciar a agressão física de forma constante, mas sim afetar ao logo do tempo, ou seja com a aprendizagem desse comportamento (Pingault, 2013)

1.4. Objetivo

O objetivo desta dissertação foi genotipar uma população universitária em relação aos polimorfismos VNTR 30 pb do gene *MAO-A* e 5-HTTLPR/rs25531 do gene *SLC6A4*, do sistema serotoninérgico que mais influenciam para o comportamento agressivo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Recolha das Amostras Biológicas

A amostra inclui trinta jovens estudantes do Instituto Universitário Egas Moniz, com idades compreendidas entre os dezassete e trinta e um anos. Os indivíduos do sexo masculino são dois e do sexo feminino vinte e oito.

A recolha da amostra da mucosa oral foi realizada por zaragatoa, e posteriormente foi extraído o DNA genómico dos trinta e três jovens estudantes. Foi utilizado QiAamp® DNA Mini Kit. A recolha foi feita de forma anónima e foi gerado um código aleatório para cada um dos voluntários.

Todos os voluntários preencheram um consentimento informado (Anexo I), onde autorizam a realização de estudos genéticos.

2.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se o método QiAamp® DNA Mini Kit (na figura (8) temos uma representação do mesmo) e segundo as instruções do fabricante. Os dentes de cada zaragatoa foram transferidos para tubos de 2mL, onde foram adicionados 20µl de proteinase K é uma protéase do tipo subtilisina isolada do fungo saprofítico *Tritirachium album* e 600µl de ATL Buffer que é um tampão de lise para a purificação dos ácidos nucleicos, os tubos foram vortexados por 10s. Os tubos foram colocados num thermomixer a 56°C com agitação a 900rpm com duração de 1h. Adicionou-se 600µl de AL Buffer, que é um tampão lise para isolar o DNA e vortexados por 15s. Os tubos foram colocados num banho a 70°C com agitação a 900rpm com duração de 10min. Adicionou-se 300µl de etanol (96-100%), o etanol serve para precipitar o DNA extraído, os tubos foram vortexados por 15s, foram novamente centrifugados.

Foram transferidos 700µl para uma coluna QIAamp MinElute, centrifugou-se a 6000x g por 1 minuto, voltou a repetir-se o mesmo passo. Adicionou-se 500µl AW1 Buffer um tampão de lavagem para remover as impurezas, centrifugou-se a 6000 x g por 1 min Colocou-se numa nova coluna QIAamp MinElute. Posteriormente adicionou-se 700µl AW2 Buffer um tampão de lavagem para remover as impurezas e centrifugou-se a 6000 x g por 1 minuto. Adicionou-se 700µl de etanol (96-100%) e centrifugou-se a 6000 x g por 1 minuto. Centrifugou-se a 14000rpm por 3 minutos para secar completamente a membrana. Descartou-se a coluna anterior, para um tubo de 1,5ml. Adicionou-se 100µl de ATE Buffer, um tampão de eluição. Incubou a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se por 14000 rpm por 1 minuto. Adicionou-se 30µl de ATE Buffer, incubou por 5 minutos a temperatura ambiente centrifugou-se, adicionou-se novamente 30µl de ATE Buffer, incubou-se por 3 minutos e centrifugou-se novamente.

O DNA foi armazenado a -20°C até à sua utilização.



Figura 7- Fotografia do QIAamp® DNA Mini Kit retirado do site: <https://www.qiagen.com/us/products>

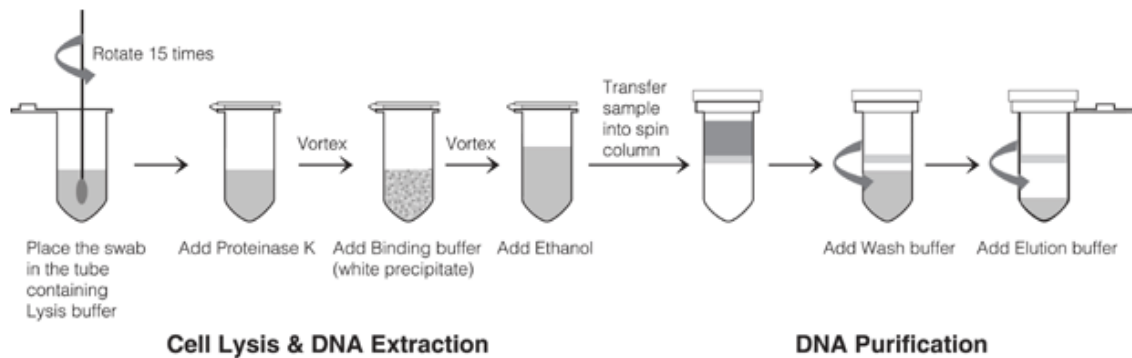


Figura 8- Imagem ilustrativa da purificação do DNA, retirada do site: <https://www.qiagen.com/us/products>

2.3. Genotipagem do polimorfismo VNTR 30pb do gene *MAO-A*

Para a genotipagem do polimorfismo, o programa de amplificação utilizado foi com base no artigo de Mota et al.2017 (Mota et al., 2017) : Início com desnaturação a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 40 segundos, *annealing* 58°C por 1 minuto e como passo final a 72°C durante 1 minuto. Os primers utilizados encontra-se na tabela 1.

A mistura de amplificação, com volume final de 25µl continha os seguintes componentes: 12,5 µl de NZYTaQ II 2x Green Master Mix®, 7,5 µl de H₂O *DNase free*, 1 µl de cada primer (10 µM) e 3 µl de DNA extraído.

A detecção dos produtos da análise da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), utilizando-se o tampão TAE 1x (Constituição :TAE 50x: 121 g de Tris Base + 28,5 ml de ácido acético glacial + 50 ml de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,5M pH 8,0 + H₂O destilada até perfazer 500 ml) e corado com *Gel Red*®. A eletroforese foi efetuada a 100mA.

Os genótipos dos indivíduos foram calculados por reta de calibração, pela equação da reta.

2.4 Genotipagem do polimorfismo 5-HTTLPR/rs25531 Análise por PCR-RFLP do gene SLC6A4/SERT- 5-HTTLPR- rs25531

Realizou-se o processo de otimização da genotipagem dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 do gene SLC6A4 por pela técnica PCR-RFLP. Para a amplificação por PCR-RFLP, primeiramente somente utilizou-se a Taq NZYTaQ II 2x Green Master Mix®. Mas devido a região deste polimorfismo possuir um alto conteúdo em Guanina-Citosina (GC), foi necessário também a utilização de NZYTaQ 2x GC-Enhancer Solution, pois regiões com elevados resíduos de GC podem formar estruturas secundárias complexas, que podem não ser desfeitas na fase *annealing* de primers do PCR. A solução da NZYTaQ 2x GC-Enhancer Solution foi desenvolvida para superar as dificuldades com a amplificação por PCR em modelos de DNA ricos em GC e também aumentando a especificidade, reduzindo a amplificação de produtos não específicos, utiliza-se em conjunto a TaqDNA polimerase. Assim de forma a potenciar a mistura utilizou-se as duas Taq, a Taq NZYTaQ II 2x Green Master Mix® e NZYTaQ 2x GC-Enhancer Solution.

A mistura de amplificação, com volume final de 27µl, continha os seguintes componentes: 12,5 µl de NZYTaQ II 2x Green Master Mix®, 10 µl de NZYTaQ 2x GC-Enhancer Solution , 1 µl de cada primer (10 µM) e 3 µl de DNA extraído Os primers utilizados encontra-se na tabela 1.

O programa de amplificação utilizado foi adaptado do artigo de Miranda et al.,2017 (Miranda et al., 2017): Início com desnaturação a 94°C por 5 minutos, 34 ciclos com desnaturação a 94°C por 40 segundos, *annealing* a 58°C por 40 segundos e como passo final a 72°C durante 5 minutos.

Posteriormente foi feita restrição com a enzima MSPI, em overnight a 37°C nos produtos amplificados. A mistura de restrição com volume final de 30µl, foi realizada partir de 20µl do produto de PCR anterior, ao qual se adicionou 1µl de enzima, 5µl de Buffer e 4µl H₂O *DNase free*.

A detecção dos produtos da análise da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v), utilizando-se o tampão TAE 1x e corado com *Gel Red*®. A eletroforese foi efetuada a 100mA.

2.5. Informações adicionais

Tabela 1- Primers utilizados no processo de genotipagem dos polimorfismos em estudo: sequências e tamanhos dos produtos de amplificação e restrição

Polimorfismos	Sequência dos primers	Tamanho dos produtos de amplificação e restrição
MAO-A – 30 pb VNTR	<p><i>Forward</i> 5'-ACA GCC TGA CGC TGG AGA AG-3'</p> <p><i>Reverse</i> 5'-GAA CGG ACG CTC CAT TCG GA-3'</p>	30pb VNTR Amplificação :291 pb, 321 pb, 336 pb, 351 pb e 381 pb
SLC6A4- 5-HTTLPR Rs25531	<p><i>Forward</i> 5'-CGC TCC TGC ATC CCC CAT TA-3'</p> <p><i>Reverse</i> 5'-GGG ATG CGG GGG AAT ACT GGT-3'</p>	INDEL Amplificação: 5-HTTLPR- Alelo Curto(S)- 253 pb e Alelo Longo (L) -297 pb Restrição Rs25531- LaLa- 233 pb e 63 pb LaLg- 233 pb, 174 pb, 63 pb e 59 pb LgLg- 174 pb, 63 pb e 59 pb LaS- 233 pb, 189 pb, 64 pb e 63 pb LgS- 189 pb, 174 pb, 64 pb, 63 pb e 59 pb SS- 189 pb e 64 pb.

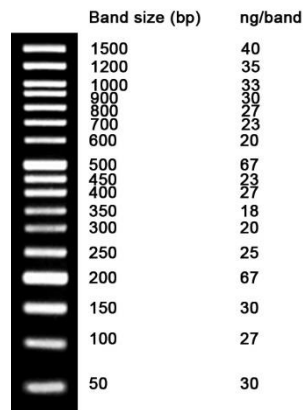


Figura 9. Marcador de peso molecular- NZYDNA Ladder VI NZYTECH

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do Software Estatístico R versão 4.0.3 (R package based on χ^2 test, Statistical Computing and Graphics, Inc.), baseado no teste do qui-quadrado (χ^2), com um intervalo de confiança (IC) de 95%. O resultado observado para cada um dos polimorfismos, foi comparado com o resultado que seria esperado, para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) ($p > 0,05$), sendo que os valores de $*p < 0,05$ foram considerados significativos para a distribuição alélica e genotípica, na amostra em estudo.

3.Resultados

3.1 *MAO-A*

Os indivíduos a quem foram recolhidas amostras de DNA para posterior genotipagem foram associados aos respetivos genótipos. Na genotipagem do polimorfismo VNTR 30pb do gene *MAO-A* utilizou-se o método descrito (ver secção Materiais). Na figura (10) encontra-se representado um exemplo de um gel de agarose a 2,5% (p/v). Na figura (11) temos a representação gráfica dos genótipos da população em estudo.

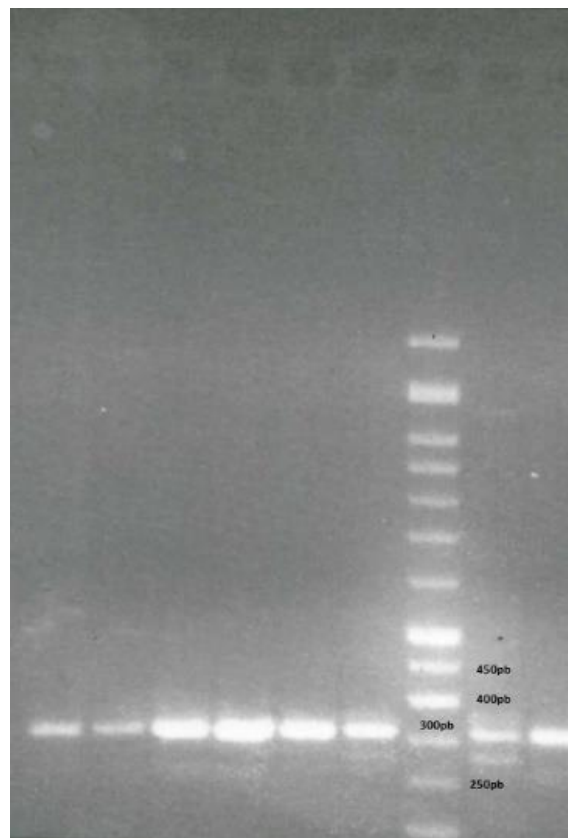


Figura 10-Gel de agarose a 2,5% (p/v) dos produtos de amplificação para genotipagem do polimorfismo VNTR 30pb da *MAO-A*. O marcador de massas moleculares utilizado foi o NZYDNA Ladder VI cujo tamanho das bandas vão desde 50pb – 1500pb com intervalos regulares de 50p

Foram feitas para cada experiência duas confirmações de resultados. Os genótipos dos indivíduos foram calculados por reta de calibração, pela equação da reta. A amostra de trinta estudantes universitários (N=30), com idades compreendidas entre 17 e 31 anos, em que dois estudantes eram do sexo masculino e os restantes 28 estudantes do sexo feminino. Para a análise do Teste Hardy-Weinberg foram apenas considerados os indivíduos de sexo feminino para os genótipos dos alelos 4 (4R) e 3 (3R) (N=23/30), que são os alelos mais comuns encontrados. Não foram encontradas diferenças significativas P-Value. As amostras estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg, pois o valor P-value >0,05.

A frequência alélica encontra-se na tabela (1) A frequência alélica para o alelo 3 (3R) foi de 37%, com intervalo de confiança 95% (23,6; 52,47) e para o alelo 4 (4R) foi de 63%, com intervalo de confiança 95% (47,53; 76,4). Para o sexo masculino o alelo 4 (4R) foi o mais predominante.

Tabela 2- Frequência Alélica dos alelos 3R e 4R

Frequência Alélica	N	Frequência (%)	95% CI
3R	17	36,96	(23,6;52,47)
4R	29	63,04	(47,53;76,4)

A frequência genótipica encontra-se na tabela (2). A frequência genótipica para os indivíduos homocigóticos do alelo 3 foi de 9%, homocigóticos do alelo 4 foi de 35% e para indivíduos heterocigóticos para os alelos 3 e 4 é de 57%.

Tabela 3- Representação dos genótipos dos alelos 3R e 4R da amostra

Genótipos	N	Frequência (%)	95% CI
3R/3R	2	8,7	(1,52; 29,51)
3R/4R	13	56,52	(34,87; 76,12)
4R/4R	8	34,78	(17,19; 57,18)

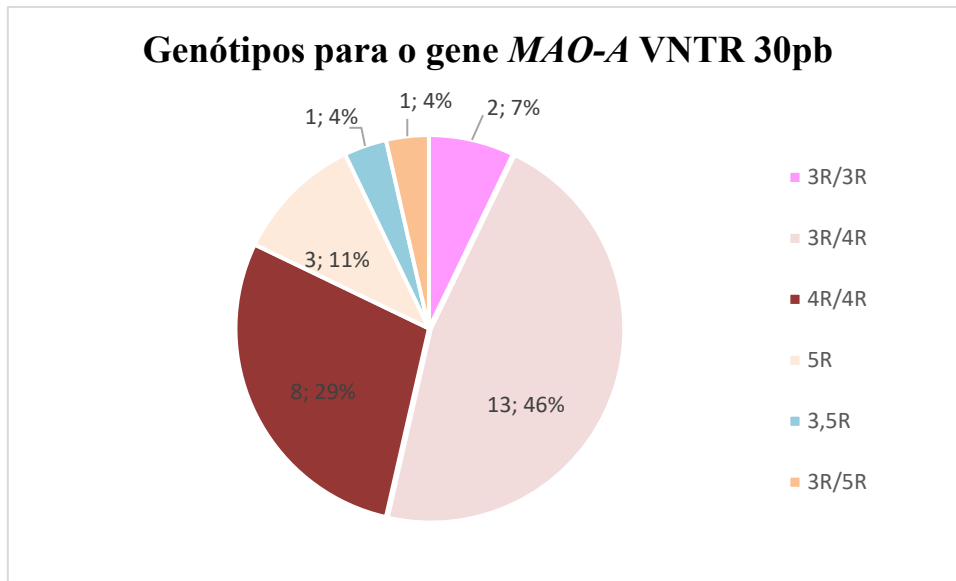


Figura 11- Representação gráfica dos genótipos da população em estudo para o polimorfismo VNTR 30pb do gene *MAO-A*

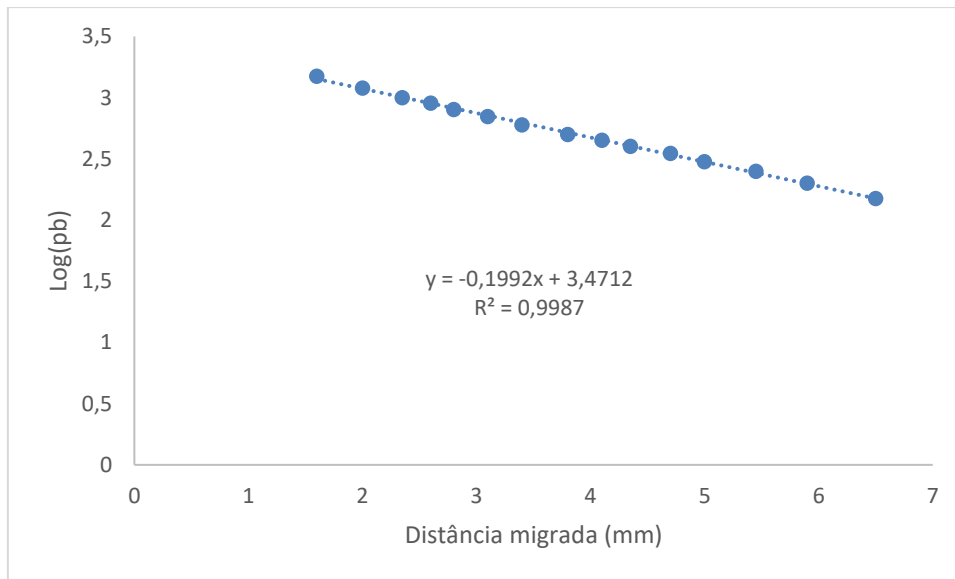


Gráfico 1- Reta de calibração entre o logaritmo (pb) e distância migrada (mm)

3.2 *SLC6A4*

Os indivíduos a quem foram recolhidas amostras de DNA para posterior genotipagem foram associados aos respetivos genótipos. Na genotipagem do polimorfismo 5-HTTLPR/rs25531 do gene *SLC6A4* utilizou-se o método descrito (ver secção Materiais). Na figura (11) encontra-se representado um exemplo de um gel de agarose a 3% (p/v) para o polimorfismo 5-HTTLPR e encontra-se na figura (12) uma representação de um gel de agarose a 3%(p/v) para o polimorfismo rs25531. Na figura (13) temos a representação gráfica dos genótipos da população em estudo. Foram feitas para cada experiência duas confirmações de resultados.

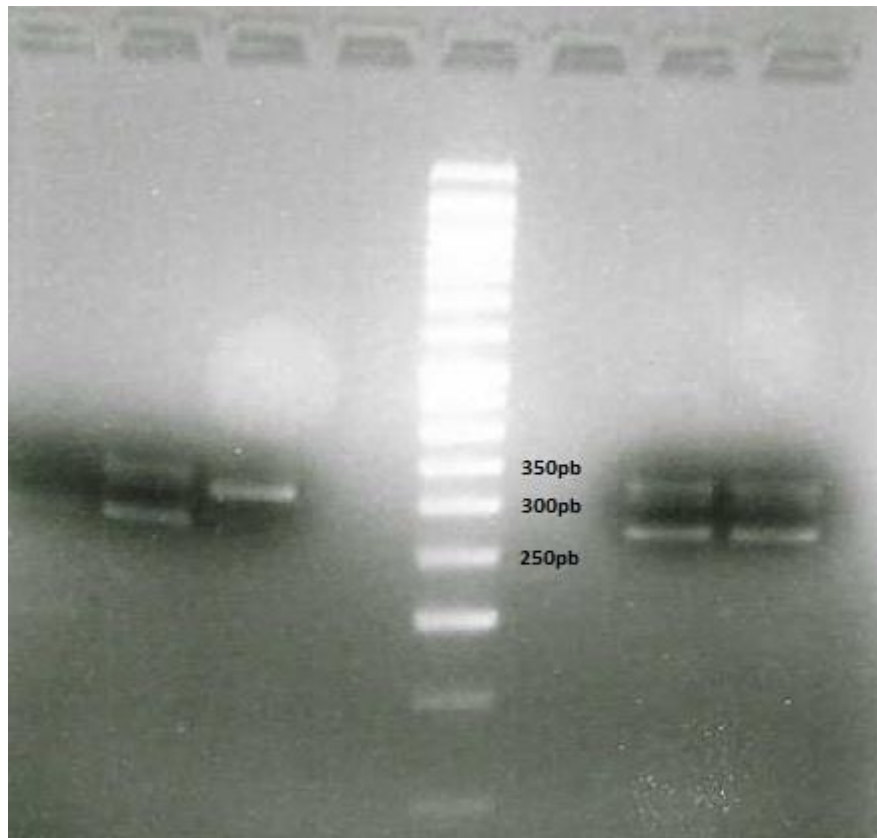


Figura 12- Gel de agarose a 3% (p/v) dos produtos de amplificação para genotipagem do polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4*. O marcador das massas moleculares utilizado tratou-se do NZYDNA Ladder VI

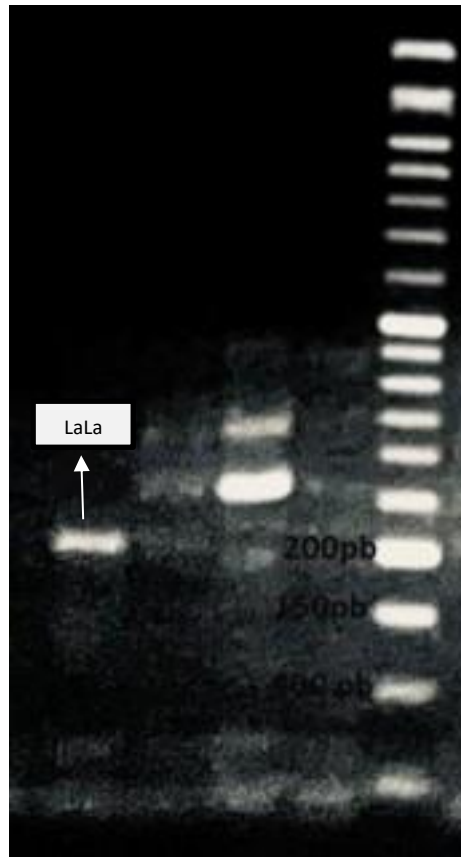


Figura 13-Gel de agarose a 3% (p/v) dos produtos de amplificação para genotipagem do polimorfismo rs25531 do gene *SLCA4*. O marcador de massas moleculares utilizado tratou-se do NZYDNA Ladder VI

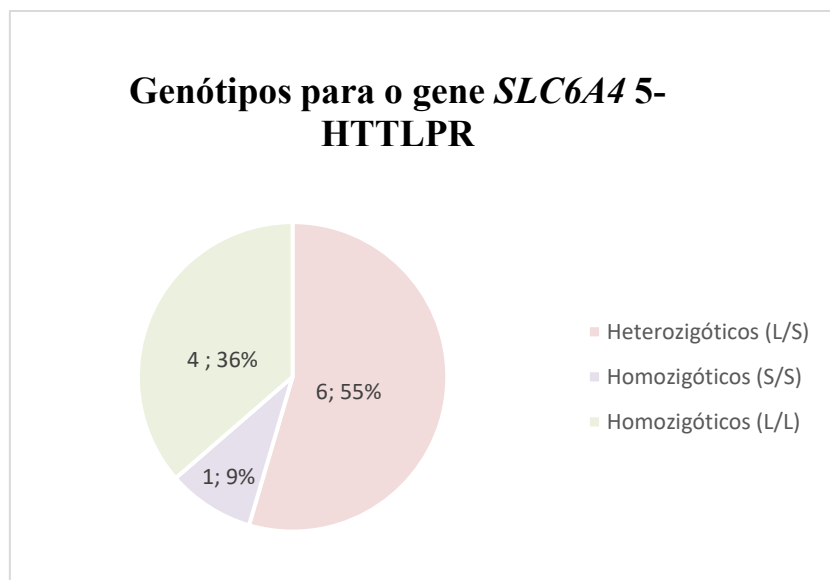


Gráfico 2- Representação gráfica dos genótipos da população em estudo para o polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4*

A genotipagem do polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4*, conseguiu-se apenas genotipar onze estudantes universitários (N=11/30), dos trinta indivíduos em estudo com idades compreendidas entre 17 e 31 anos, em que um indivíduo é do sexo masculino e os restantes 10 indivíduos são do sexo feminino. Revelou-se a presença de seis indivíduos heterozigóticos (L/S), um indivíduo homozigótico (S/S) e quatro indivíduos homozigóticos (L/L). Sendo que a frequência alélica para o alelo curto é de 28% e para o alelo longo (L) de 72%. Para a Genotipagem do polimorfismo rs25531 do gene *SLC6A4* apenas conseguiu-se genotipar apenas 4 indivíduos dos trinta indivíduos em estudo (N=4/33). Revelou-se a presença de um indivíduo homozigótico para o alelo SS, dois indivíduos heterozigóticos para o alelo LaS e um indivíduo homozigótico LaLa.

4. Discussão

A genotipagem do polimorfismo VNTR 30 pb do gene *MAO-A* na amostra trinta estudantes universitários, com idades compreendidas entre 17 e 31 anos, e onde foram feitas para cada experiência três confirmações de resultados, revelou-se a presença de nove indivíduos homocigóticos para o alelo 4 (4R), treze indivíduos heterocigóticos para os alelos 4 (4R) e 3 (3R), dois indivíduos heterocigóticos para os alelos 3 (3R) e 5 (5R), três indivíduos homocigóticos para o alelo 3 (3R) e três indivíduos homocigóticos para o alelo 5 (5R).

Nesta amostra observamos mais indivíduos com alelos *MAO-A-H*, do que para os alelos *MAO-A-L*, isso pode ser explicado pois segundo Kolla et. al., os alelos com 3(3R) e 4(4R) repetições são os mais comuns na espécie humana. Sendo que os alelos 3 (3R) e 5 (5R) estão associados a menor eficiência transcricional (*MAO-A-L*), por outro lado os alelos 3.5(3.5R) e 4R(4R) estão associados a uma maior atividade transcricional (*MAO-A-H*). Nesta amostra temos uma quantidade pouco significativa no que diz respeito ao genótipo dos alelos 3 (3R) e alelos 5(5).

A *MAO-A-L* tem sido bastante relatada como a variante para maior suscetibilidade para comportamentos agressivos e antissociais em humanos, tal como uma maior predisposição para o desenvolvimento de uma personalidade agressiva, sendo que esta mais envolvida com uma maior concentração de serotonina em comparação a *MAO-A-H* que tem uma menor concentração de serotonina.

Dado que esta amostra em estudo tem maior prevalência de mulheres, tendo apenas um homem em estudo, pode estar explicado os indivíduos terem o genótipo para a *MAO-A-H* que está menos ligada à agressividade. É importante ressaltar que segundo Zhang et al., os jovens do sexo masculino com a *MAO-A-L* tem maior tendência para a agressão.

Para melhores resultados é necessário aumentar o tamanho da amostra, e também heterogeneidade em relação ao sexo dos indivíduos em estudo, pois esta diferença é importante nestes estudos. Deve-se estudar os sexos em separado para uma maior compreensão desta temática. Também é necessário ver as diferenças étnicas em relação às populações em estudo e também a diferença entre idades.

Devido à dificuldade no processo de Genotipagem dos indivíduos para o polimorfismo 5-HTTLPR e rs25531, não se conseguiu obter resultados significativos para obtenção de dados estatísticos. A técnica PCR-RFLP foi tentada várias vezes, com introdução de diferentes alterações na metodologia, mas sem muito sucesso na obtenção de bons resultados. Pelo que para estes polimorfismos pressupõe-se que tem de ser melhorada a técnica PCR-RFLP.

Nesta pequena amostra de onze indivíduos revelou-se que o alelo L foi o mais predominante tal como é confirmado pela literatura. Em geral, o alelo S está presente em 42% dos caucasianos e 79% dos asiáticos, enquanto o alelo L é muito mais frequente nas populações ocidentais do que em populações asiáticas. Estudos revelam que a frequência alélica dos alelos SS está presente em 22% dos caucasianos e 60% em asiáticos, em comparação ao alelo LL que está presente em 29-43% nos caucasianos e apenas 1-13% em asiáticos (Y. Wang et al., 2018).

Num estudo em indivíduos adotados demonstraram que indivíduos do sexo masculino com a variante S eram mais propenso a serem agressivos (Manchia et al., 2019).

Os genótipos SS e SLG estão associados a um maior risco para o neurocitismo e também para depressão e ansiedade. Segundo o estudo Y. Wang et al., indicam que o genótipos SS SL_G ou L_G L_G têm maior fatores de risco que contribuem para problemas no desenvolvimento comportamental em crianças da Mongólia em idade escolar (Y. Wang et al., 2018)

As mulheres que possuem o alelo curto (S) em comparação com os homens, podem estar mais suscetíveis a depressão quando está relacionado com o stress, segundo alguns estudos estes relatam que o 5-HTTLPR relacionado com o GxE em indivíduos com depressão , é mais específico para as mulheres (Conway et al., 2012).

O polimorfismo rs25531 G e o 5-HTTLPR demonstraram uma redução na função da alta expressão relacionada com o alelo L. Os indivíduos que possuem o alelo L no polimorfismo rs25531 A (LA) expressam o gene em níveis mais altos, em comparação com os portadores dos alelos LG que possuem níveis semelhantes aos que são portadores do alelo S. Num estudo em crianças chinesas sobre a relação do polimorfismo 5-HTTLPR e problemas comportamentais demonstraram que crianças com o genótipo com baixa expressão do SLC6A4 (LG/LG, S/LG, S/S) demonstraram

uma alta taxa de inibição comportamental em comparação a crianças com genótipos de alta expressão (LA/LA , S/LA e L/L)(Sah et al., 2021).

A frequência alélica destes polimorfismos varia significativamente entre populações, com alta frequência alélica na Europa e baixa frequência alélica na Ásia.

Estudos têm demonstrado uma associação entre o 5-HTTLPR com o comportamento agressivo e o controle da intensidade da desregulação emocional pela exposição a condições de stress, o alelo S está indicado como o associado à desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na presença de condições de stress. Estão relatados que o alelo S diminui a transcrição e recaptção de serotonina in vitro. O alelo L está associado a uma predisposição para o alcoolismo. Estudos em italianos caucasianos, indivíduos com o genótipo SS foram associados à dependência de heroína e agressão. Foi observado que os alelos S e L do 5-HTTLPR na presença do alelo A ou G do polimorfismo rs25531 (SA/SG) e (LA/LG), têm uma redução na expressão do gene *SLC6A4*, em comparação ao LA/LG que tem maior expressão no gene. Segundo Hu et.al estes sugerem que os testes de associação com os alelos LG devem ser analisados em conjuntos com os alelos S (Al-Eitan et al., 2014; Conway et al., 2012).

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

O objetivo desta dis5-HTTação foi genotipar uma população universitária em relação aos polimorfismos VNTR 30pb do gene *MAO-A* e 5-HTTLPR/rs25531 do gene *SLC6A4*, do sistema serotoninérgico que mais influenciam para o comportamento agressivo

Relativamente á associação da agressividade e o polimorfismo VNTR 30pb do gene *MAO-A* tem sido demonstrado que os alelos 3(3R) e 5(5R) são os que estão associados a menor eficiência transcricional (*MAO-A-L*), e trata-se da variante mais associada a maior suscetibilidade para comportamentos agressivos e antissociais em humanos. Nesta amostra em estudo temos uma quantidade pouco significativa no que diz respeito ao genótipo dos alelos 3 (3R) e alelos 5(5R), pelo que era necessário o aumento dos indivíduos em estudo para uma maior significância dos resultados. Identificou-se neste estudo um número superior de indivíduos do sexo feminino com os alelos 3(3R) e 4(4R), o que está de acordo com a literatura pois trata-se dos alelos mais comuns na espécie humana.

Apesar dos resultados promissores, para compreendermos melhor este gene que se encontra no cromossoma X, é necessário aumentar o tamanho da amostra em relação em relação ao sexo dos indivíduos em estudo. No entanto, deve-se estudar os sexos em separado para uma maior compreensão sobre as diferenças entre homens e mulheres e o que afeta no funcionamento do gene da *MAO-A*.

Relativamente à agressão e ao polimorfismo 5-HTTLPR e rs25531 do gene *SLC6A4* estudos têm demonstrado que tanto o alelo curto (S), como o genótipo SS, SL_G são os que têm mais propensão para comportamentos agressivos, depressão e neurocitismo. Devido à dificuldade no processo de Genotipagem dos indivíduos em estudo não obtivemos resultados significativos para fazer uma correlação destes polimorfismos e a agressividade, nem conseguir obter significância estatística. Na amostra em estudo o alelo mais predominante foi o alelo longo (L) e na literatura este é o que está mais descrito e mais frequente nas populações ocidentais.

É importante ressaltar que este trabalho está inserido num projeto que visa a estudar a “Influência dos genes no comportamento agressivo numa população universitária, daí ter sido realizado com o objetivo da caracterização genotípica de apenas dois genes

(*MAO-A* e *SLC6A4*) de entre outros genes todos eles descritos na literatura como associados à agressão humana. É fundamental perceber-se os polimorfismos em estudo possam ser correlacionados em conjunto ou não. A dificuldade na genotipagem realizada e o número reduzido de amostras impede que os resultados obtidos possam atingir uma significância estatística, mas irão aumentar e contribuir para os resultados do projeto em causa. Futuros estudos com um maior número de amostras são necessários para se tecerem conclusões acerca destas correlações e para se averiguar-se mesmas estão em conformidade com a literatura.

Bibliografía

American Psychological Association. (1996). An APA brochure on youth violence. Retrieved February 2, 2007, <https://www.apa.org/pi/prevent-violence/resources/violence-youth.pdf>

AL-Eitan, L. N., Alshudaifat, K. M., & Anani, J. Y. (2020). Association of the DRD4 exon III and 5-HTTLPR VNTR polymorphisms with substance abuse in Jordanian Arab population. *Gene*, 733, 144267. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144267>

Al-Eitan, L. N., Jaradat, S. A., Qin, W., Wildenauer, D. M. B., Wildenauer, D. D., Hulse, G. K., & Tay, G. K. (2014). Characterization of serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphisms and its association with drug dependence in a Jordanian Arab population. *Toxicology and Industrial Health*, 30(7), 598–610. <https://doi.org/10.1177/0748233712462446>

Andreu, J. M., Ramírez, J. M., & Raine, A. (2006). *UN MODELO DICOTÓMICO DE LA AGRESIÓN: VALORACIÓN MEDIANTE DOS AUTO-INFORMES (CAMA Y RPQ)*. 5, 25–42.

Anholt, R. R. H., & MacKay, T. F. C. (2012). Genetics of aggression. *Annual Review of Genetics*, 46(August), 145–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155514>

Antypa, N., Serretti, A., & Rujescu, D. (2013). Serotonergic genes and suicide: A systematic review. *European Neuropsychopharmacology*, 23(10), 1125–1142. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.03.013>

Barnes NM, Sharp T. (1999). 5-HTR_review_Neurophar.pdf. *Neuropharmacology*, 38, 1083–1152. www.elsevier.com/locate/neuropharm

Berletch, J. B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L., & Disteche, C. M. (2011). *Genes that escape from X inactivation*. 12, 237–245. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1011-z>

- Bröer, S., & Gether, U. (2012). The solute carrier 6 family of transporters. *British Journal of Pharmacology*, *167*(2), 256–278. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01975.x>
- Brunner, H. G. (1996). MAOA deficiency and abnormal behaviour: perspectives on an association. *Ciba Foundation Symposium*, *194*. <https://doi.org/10.1002/9780470514825.ch9>
- Calabrò, M., Mandelli, L., Crisafulli, C., Porcelli, S., Albani, D., Politis, A., Papadimitriou, G. N., Di Nicola, M., Janiri, L., Colombo, R., Martinotti, G., Bellomo, A., Vieta, E., Bonassi, S., Frustaci, A., Ducci, G., Landi, S., Boccia, S., & Serretti, A. (2020). Psychiatric disorders and SLC6A4 gene variants: possible effects on alcohol dependence and alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, *47*(1), 191–200. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05119-5>
- Caspi, A., McCray, J., Moffitt, T. E., Mill, J., Martin, J., Craig, I. W., Taylor, A., & Poulton, R. (2002). Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*, *297*(5582), 851–854. <https://doi.org/10.1126/science.1072290>
- Castillo-lópez, G., Ostrosky-shejet, F., Camarena-medellín, B., & Vélez-garcía, A. E. (2015). Moderating effect of gender and MAOA genotype on. *Revista Médica Del Hospital General de México*, *78*(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.03.002>
- Conway, C. C., Keenan-Miller, D., Hammen, C., Lind, P. A., Najman, J. M., & Brennan, P. A. (2012). Coaction of stress and serotonin transporter genotype in predicting aggression at the transition to adulthood. *Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology*, *41*(1), 53–63. <https://doi.org/10.1080/15374416.2012.63235>

- Ferguson, C. J., & Beaver, K. M. (2009). Natural born killers: The genetic origins of extreme violence. *Aggression and Violent Behavior, 14*(5), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.avb.2009.03.005>
- Fernández-Castillo, N., & Cormand, B. (2016). Aggressive behavior in humans: Genes and pathways identified through association studies. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics, 171*(5), 676–696. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32419>
- Forero-Medina, G., & Vieira, M. V. (2007). Conectividade funcional e a importância da interação organismo-paisagem. *Oecologia Brasiliensis, 11*(04), 493–502. <https://doi.org/10.4257/oeco.2007.1104.03>
- Harneit, A., Braun, U., Geiger, L. S., Zang, Z., Hakobjan, M., Donkelaar, M. M. J. Van, Schweiger, J. I., Schwarz, K., Gan, G., Erk, S., Heinz, A., Stephanie, N. R., Marcella, W., Henrik, R., Franke, B., & Tost, A. M. H. (2019). *MAOA-VNTR genotype affects structural and functional connectivity in distributed brain networks. July, 5202–5212.* <https://doi.org/10.1002/hbm.24766>
- Harro, J., & Oreland, L. (2016). The role of MAO in personality and drug use. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 69*, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.02.013>
- Hohmann, S., Zohsel, K., Buchmann, A. F., Blomeyer, D., Holz, N., Christine, R. B., & Rietschel, J. M. (2016). *Interacting effect of MAOA genotype and maternal prenatal smoking on aggressive behavior in young adulthood.* 885–894. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1582->

- Iurescia, S., Seripa, D., & Rinaldi, M. (2017). *Looking Beyond the 5-HTTLPR Polymorphism: Genetic and Epigenetic Layers of Regulation Affecting the Serotonin Transporter Gene Expression*. 8386–8403. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0304-6>
- Kolla, N. J., & Bortolato, M. (2020a). Progress in Neurobiology The role of monoamine oxidase A in the neurobiology of aggressive , antisocial , and violent behavior : A tale of mice and men. *Progress in Neurobiology*, *April*, 101875. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101875>
- Kolla, N. J., & Bortolato, M. (2020b). The role of monoamine oxidase A in the neurobiology of aggressive, antisocial, and violent behavior: A tale of mice and men. *Progress in Neurobiology*, *194*, 101875. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101875>
- Lillicrop, K. A., Garratt, E. S., Titcombe, P., Melton, P. E., Murray, R. J. S., Barton, S. J., Clarke-Harris, R., Costello, P. M., Holbrook, J. D., Hopkins, J. C., Childs, C. E., Paras-Chavez, C., Calder, P. C., Mori, T. A., Beilin, L., Burdge, G. C., Gluckman, P. D., Inskip, H. M., Harvey, N. C., ... Godfrey, K. M. (2019). Differential SLC6A4 methylation: a predictive epigenetic marker of adiposity from birth to adulthood. *International Journal of Obesity*, *43*(5), 974–988. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0254-3>
- Liu, S., Yin, Y., Wang, Z., Zhang, X., & Ma, X. (2013). Association study between MAO-A gene promoter VNTR polymorphisms and obsessive-compulsive disorder. *Journal of Anxiety Disorders*. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.173>
- Manca, M., Pessoa, V., Lopez, A. I., Harrison, P. T., Miyajima, F., Sharp, H., Pickles, A., Hill, J., Murgatroyd, C., Bubb, V. J., & Quinn, J. P. (2018). The Regulation of Monoamine Oxidase A Gene Expression by Distinct Variable Number Tandem

- Repeats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 64(3), 459–470.
<https://doi.org/10.1007/s12031-018-1044-z>
- Manchia, M., Comai, S., Pinna, M., Pinna, F., Fanos, V., Denovan-Wright, E., & Carpiniello, B. (2019). Biomarkers in aggression. In *Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 93). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.07.004>
- Megan, S., Hemmings, J., Xulu, K., Sommer, J., Hinsberger, M., Malan-muller, S., Tr, G., Elbert, T., & Weierstall, R. (2018). *Appetitive and reactive aggression are differentially associated with the STin2 genetic variant in the serotonin transporter gene. October 2017*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25066-8>
- Middeldorp, C. M., De Geus, E. J. C., Beem, A. L., Lakenberg, N., Hottenga, J. J., Slagboom, P. E., & Boomsma, D. I. (2007). Family based association analyses between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and neuroticism, anxiety and depression. *Behavior Genetics*, 37(2), 294–301. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9139-7>
- Miranda, R. C. K., Genro, J. P., Campagnolo, P. D. B., Mattevi, V. S., Vitolo, M. R., & Almeida, S. (2017). Biallelic and triallelic approaches of 5-HTTLPR polymorphism are associated with food intake and nutritional status in childhood. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 43, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.01.015>
- Mota, C. D. L., Nogueira, S. M., Barata-silva, C., Pavesi, T., & Moreira, J. C. (2017). *The MAOA VNTR polymorphism and smoking behavior in Brazilian males. 2(2)*, 1–5. <https://doi.org/10.15761/BGG.1000135>
- Nishioka, S. A., Perin, E. A., Sampaio, A. S., Cordeiro, Q., Cappi, C., Mastroso, R. S., Morais, I. A., Reis, V. N. de S., Rosário, M. C. do, & Hounie, A. G. (2011). O papel do polimorfismo funcional VNTR da região promotora do gene MAOA nos

transtornos psiquiátricos. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, 38(1), 34–42.
<https://doi.org/10.1590/S0101-60832011000100008>

Palumbo, S., Mariotti, V., Iofrida, C., & Pellegrini, S. (2018). Genes and aggressive behavior: Epigenetic mechanisms underlying individual susceptibility to aversive environments. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(June), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00117>

Park, C., Rosenblat, J. D., Brietzke, E., Pan, Z., Lee, Y., Cao, B., Zuckerman, H., Kalantarova, A., & McIntyre, R. S. (2019). Stress, epigenetics and depression: A systematic review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 102(December 2018), 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.010>

Pavlov, K. A., Chistiakov, D. A., & Chekhonin, V. P. (2012). Genetic determinants of aggression and impulsivity in humans. *Journal of Applied Genetics*, 53(1), 61–82.
<https://doi.org/10.1007/s13353-011-0069-6>

Pingault, J. B. (2013). *Age-dependent effect of the MAOA gene on childhood physical aggression*. 1151–1153. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.173>

Reiss, A. P., & Rankin, C. H. (2021). Gaining an understanding of behavioral genetics through studies of foraging in *Drosophila* and learning in *C. elegans*. *Journal of Neurogenetics*, 35(3), 119–131. <https://doi.org/10.1080/01677063.2021.1928113>

Sah, I., Yukseloglu, E. H., Kocabasoglu, N., Bayoglu, B., Cirakoglu, E., & Cengiz, M. (2021). The effects of 5-HTTLPR/rs25531 serotonin transporter gene polymorphisms on antisocial personality disorder among criminals in a sample of the Turkish population. *Molecular Biology Reports*, 48(1), 77–84.
<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06137-y>

Szöllósi, D., & Stockner, T. (2021). Investigating the Mechanism of Sodium Binding to

- 5-HTT Using Direct Simulations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15(May), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.673782>
- Wang, T. Y., Lee, S. Y., Chung, Y. L., Chen, S. L., Li, C. L., Chang, Y. H., Wang, L. J., Chen, P. S., Chen, S. H., Chu, C. H., Huang, S. Y., Tzeng, N. S., Hsieh, T. H., Lee, I. H., Chen, K. C., Yang, Y. K., Hong, J. S., & Lu, R. B. (2016). TPH1 and 5-HTTLPR genes specifically interact in opiate dependence but not in alcohol dependence. *European Addiction Research*, 22(4), 201–209.
<https://doi.org/10.1159/000444676>
- Wang, Y., Li, Y., & Guan, H. (2018). *polymorphisms and behavior problems in Mongolian children*. 11(7), 6863–6874.
- Wranghama, R. W. (2017). Two types of aggression in human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), 245–253.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1713611115>
- Zhang, Y., Ming, Q., Yi, J., Wang, X., & Chai, Q. (2017). *Gene-Gene-Environment Interactions of Serotonin Transporter , Monoamine Oxidase A and Childhood Maltreatment Predict Aggressive Behavior in Chinese Adolescents*. 11(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00017>
- Zuccarello, D., Ghezzi, M., Pengo, M., Forzan, M., Frigo, A. C., Ferlin, A., & Foresta, C. (2012). No difference in 5-HTTLpr and stin2 polymorphisms frequency between premature ejaculation patients and controls. *Journal of Sexual Medicine*, 9(6), 1659–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2012.02715.x>