



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Estudo de variantes genéticas associadas a comportamentos agressivos numa amostra populacional portuguesa

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Evolução e Biologia Humanas, realizada sob a orientação científica do Professora Doutora Rosa Sofia da Conceição Neto Wasterlain (Universidade de Coimbra) e do Doutor Licínio Manuel Mendes Manco (Universidade de Coimbra)

Ana Catarina de Almeida Soares

2015



“A mind needs books as a sword needs a whetstone, if it is to keep its edge.”

George R.R. Martin



## **Agradecimentos**

Este trabalho não teria sido realizado sem o infinito apoio e incentivo de todos aqueles que nele participaram das mais variadas formas. Este trabalho também vos pertence.

À Professora Doutora Rosa Sofia da Conceição Neto Wasterlain, por prontamente aceitar embarcar neste projeto, pela sua orientação, por todo o apoio e ajuda.

Ao Doutor Licínio Manuel Mendes Manco pela sua ajuda em todos os momentos e pelo seu apoio. Agradeço igualmente todos os desafios e estímulos ao longo deste trabalho e principalmente todos os ensinamentos que me passou.

À Professora Doutora Maria Manuela Pratas Alvarez, que muitas vezes se juntou a nós no laboratório e prontamente fez todos os possíveis para dar a sua ajuda.

Aos meus amigos de sempre e aos novos, Alexandre, Daniel, David, Ricardo, Miguel e Paulo que fizeram tanto parte deste projeto como eu própria e que sempre tiveram uma palavra amiga pronta para os momentos de mais aflição.

À Sílvia Figueiredo, Patrícia Henriques e Jessica Batista por me acompanharem desde a licenciatura e terem crescido e conquistado este mundo e o próximo ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Aos meus queridos do sótão e fora dele, à Maria João Coelho, à Marta Cabaça, à Vitória Duarte, à Carina Nogueira e ao Álvaro Monge Calleja, por todos aqueles momentos de loucura pura seguidos de conversa séria com chá, scones e uma mantinha. A vossa força de vontade inspirou-me verdadeiramente.

À Vanessa Cardoso por toda a sua ajuda e disponibilidade, que segurou a minha mão enquanto olhava para o computador e desesperava. Foste um ombro amigo no bom, no mau e no pior.

À Minha Família, em especial aos Meus Pais, ao Pedro, Melanie e Avós, um muito obrigado por acreditarem em mim, por todo o amor que me deram ao longo da vida e por todos os ensinamentos, em especial de que na vida não é nada possível sem esforço, dedicação e amor. Não conseguiria ter feito este trabalho sem vocês que sempre me incentivaram e que me deram um abraço nos momentos menos bons. A vocês dedico este trabalho.

## Resumo

Este estudo tem o objetivo de investigar a associação entre dois polimorfismos do gene *5-HTT* (ins/del 5-HTTLPR e SNP rs25531 A>G) e o polimorfismo VNTR do gene *MAOA* e a sua possível associação com comportamento antissocial na presença ou ausência de maus tratos infantis numa amostra portuguesa de jovens adultos.

Uma amostra com 205 indivíduos (102 homens; 103 mulheres), com idades compreendidas entre os 18 e 37 anos, participou neste estudo. Um inquérito avaliador de vários comportamentos sociais problemáticos foi construído, adaptado de uma escala de delinquência previamente existente na literatura. Foi determinado um valor (*score*) para medir o comportamento agressivo de cada indivíduo estudado. O DNA foi extraído de células bucais com consentimento informado escrito. A genotipagem foi realizada por PCR seguida de eletroforese em gel de agarose para os polimorfismos 5-HTTLPR e VNTR-*MAOA*, e por PCR-RFLP usando *MspI* para o SNP rs25531, como descrito na literatura.

Foram encontradas diferenças significativas para a distribuição do *score* de comportamento agressivo auto reportado entre os sexos: 0,326 em homens *vs.* 0,100 em mulheres ( $P < 0,001$ ).

Quando estudada a possível associação entre os polimorfismos dos genes *5-HTT* e *MAOA* e maus tratos infantis, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos quer na população geral quer estratificada por sexos. No entanto, no sexo masculino, foi obtido um valor *P* próximo da significância ( $P = 0,08$ ) para o polimorfismo 5-HTTLPR quando se agruparam os genótipos LS e SS, levantando assim a hipótese de que os genótipos com o alelo S façam aumentar o risco e possam conferir alguma vulnerabilidade a maus tratos infantis.

Para testar a associação dos polimorfismos ao comportamento agressivo, a distribuição do *score* de agressividade foi comparada entre os diferentes genótipos, não sendo observado diferenças significativas para os polimorfismos 5-HTTLPR, rs25531 e respetivos haplótipos, quer na amostra total quer na amostra estratificada por sexos ( $P > 0,05$ ). Verifica-se no entanto que, para o polimorfismo 5-HTTLPR e haplótipos 5-HTTLPR/rs25531 agrupados por eficiência de transcrição (*cluster*), existem níveis mais elevados de agressividade nos genótipos LS/SS e L1S1/S1S1 no sexo masculino. Estes dados estão de

acordo com estudos prévios que mostram que existe uma associação entre o alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR e o comportamento agressivo.

Na presença ou ausência de maus tratos infantis não se verificaram resultados significativos quando comparada a distribuição de *scores* de agressividade entre os diferentes genótipos com exceção da amostra total na ausência de maus tratos infantis para os polimorfismos 5-HTTLPR e haplótipos 5-HTTLPR/rs25531 agrupados por eficácia de transcrição, com os genótipos LL e L1L1, respectivamente, a mostrarem os valores de *score* de agressividade mais elevados. Foi no entanto observável que na presença de maus tratos infantis, existe uma tendência para *scores* de agressividade superiores nos portadores do alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR, e nas classes haplotípicas LG e S (genótipos L1S1 e S1S1), ao contrário do que se verifica na ausência de maus tratos infantis. Esta diferença na tendência de *scores* de agressividade entre genótipos 5-HTT em função da presença ou ausência de maus tratos infantis está de acordo com estudos prévios que têm vindo a mostrar que os portadores do alelo S são mais suscetíveis a ambientes negativos.

Para o polimorfismo VNTR do gene *MAOA* encontraram-se valores próximos da significância estatística ( $P=0,08$ ) nas mulheres quando se comparou a distribuição do *score* de agressividade nos genótipos de baixa atividade (3R-3R) e de alta atividade (3R-4R; 3.5R-4R e 4R-4R), com os últimos a mostrarem os valores mais elevados de *score*. Não se observaram diferenças no *score* de agressividade entre os diferentes genótipos considerando a presença ou ausência de maus tratos infantis. Na amostra masculina a distribuição do *score* de agressividade pelos dois genótipos (3R e 4R) não apresenta diferenças com significância estatística, quer para a amostra total ( $P=0,90$ ) quer na presença ( $P=0.85$ ) ou ausência ( $P=0.97$ ) de maus tratos infantis.

**Palavras-chave:** Monoamina Oxidase A; 5-HTTLPR; Violência; Maus tratos infantis; Interação Gene-Ambiente.

## Abstract

This study aims to investigate the association between two promoter *5-HTT* polymorphisms (ins/del 5HTTLPR and SNP rs25531 A>G) and the VNTR polymorphism of the *MAOA* gene and antisocial behaviour in a Portuguese sample of young adults.

A sample of 205 individuals (102 males; 103 females), aged 18-37 years, were enrolled in the study. A questionnaire assessing a variety of problematic behaviours was constructed based on a previously reported delinquency scale. A mean *score* value to measure aggressive behaviour was determined for each individual. DNA was extracted from buccal cells collected with written informed consent. Genotyping was performed by PCR followed by agarose gel electrophoresis for 5-HTTLPR and VNTR-*MAOA* by PCR-RFLP using MspI for rs25531, as described elsewhere.

Significant differences for the *score* distribution of self-reported aggressive behaviour between the two sexes were observed: 0.326 for men vs. 0.100 for women ( $P < 0.001$ ).

Polymorphisms *5-HTT* and *MAOA* did not show significant association with child maltreatment. However, in males, a near significant value was obtained ( $P = 0.08$ ) for 5-HTTLPR when genotypes LS and SS were grouped, suggesting that genotypes with the S allele increase the risk to children and make them more vulnerable to abuse.

To test the association between polymorphisms and the aggressive behaviour, the aggression *score* distribution was compared among the different genotypes, showing no significant differences for 5-HTTLPR, rs25531 and respective haplotypes, neither in the total sample nor when stratified by sex ( $P > 0.05$ ). However, in males it was observed a tendency towards greater scores of aggression among the S-allele carriers for 5-HTTLPR (LS and SS genotypes) and among LG and S classes for 5-HTTLPR/rs25531 haplotypes (L1S1 and S1S1 genotypes), favouring the previous studies that describe an association between the S allele of 5-HTTLPR and aggressive behaviour.

When considering the presence or absence of child maltreatment, significant results were not obtained, with the exception of the total sample without child maltreatment for 5-HTTLPR and 5-HTTLPR/rs25531 haplotypes grouped by functional efficiency with the LL and L1L1 genotypes showing the higher scores of aggression. It was however observed that

in the presence of child abuse, there is a tendency for higher aggressive scores in patients with the allele S for 5-HTTLPR and haplotype classes LG and S (L1S1 and S1S1 genotypes), which is not the case in the absence of child abuse. This difference in the tendency of aggression scores among 5-HTT genotypes according to the presence or absence of child abuse is in agreement with previous studies showing that the S allele carriers are more susceptible to adverse environments.

Regarding the Polymorphism VNTR-MAOA, a P value near significance ( $P=0.08$ ) was found for the females' *score* distribution when comparing genotypes with low activity (3R3R) to genotypes with high activity (3R-4R; 3.5R-4R and 4R-4R), corresponding the later to higher *score* values. No differences among different genotypes were observed for scores of aggression in the presence or absence of child abuse, opposing previous studies. In the male sample it was not found significance for the distribution of the *score* of aggressive behaviour among the genotypes (3R and 4R) for the whole sample ( $P=0.90$ ) as also in the presence ( $P=0.85$ ) or absence ( $P=0.97$ ) of child maltreatment.

**Key words:** Monoamine Oxidase A; 5-HTTLPR; Violence; Childhood Maltreatment; Gene x Environment Interaction.

## Abreviaturas

**5 – HT:** Serotonina;

**5 – HTT:** Proteína transportadora da serotonina;

**DNA:** Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico);

**HWE:** Equilíbrio de Hardy-Weinberg;

**MAOA:** Monoamina Oxidase A;

**MAOB:** Monoamina Oxidase B;

**pb:** Pares de Base;

**PCR:** Polymerase Chain Reaction;

**SNP(s):** *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo (s) de Nucleótido Único);

**VNTR:** *Variable Number of Tandem Repeats*.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Abreviaturas .....	vii
Índice .....	viii
Índice de Figuras .....	x
Índice de Tabelas .....	xii
Introdução.....	1
1.Contexto evolutivo da agressão.....	3
2.Diferenças entre os sexos na agressão .....	6
3.Gene da <i>Monoamina Oxidase A (MAOA)</i> .....	7
4.Gene transportador da Serotonina ( <i>SLC6A4</i> ) .....	9
5.SNP rs25531 .....	11
6.Objetivos .....	11
Material e Métodos .....	13
1. Amostra.....	15
2. Genotipagem.....	15
2.1 Extração de DNA.....	15
2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	16
2.3Estudo do SNP rs25531 por digestão por enzimas de restrição.....	17
3.Tratamento estatístico .....	18
Resultados .....	21
1. Identificação dos Genótipos / Alelos.....	23
1.1 Polimorfismo 5-HTTLPR.....	23
1.2 SNP rs25531.....	24
1.3 Polimorfismo VNTR do gene <i>MAOA</i> .....	24
1.4 Sequenciação da região com o polimorfismo VNTR <i>MAOA</i> .....	25
2. <i>Scores</i> de agressividade e maus tratos infantis na amostra estudada ..	26
3. Polimorfismos do gene <i>5-HTT</i> .....	28

3.1	Frequências alélicas e genótípicas .....	28
3.2	Associação entre polimorfismos do gene <i>5-HTT</i> e maus tratos infantis...	30
3.3	Associação dos polimorfismos do gene <i>5-HTT</i> com o comportamento agressivo.....	32
4.	Polimorfismo VNTR do gene <i>MAOA</i> .....	38
4.1	Frequências alélicas e genótípicas .....	38
4.2	Associação do genótipo com maus tratos infantis .....	38
4.3	Associação do genótipo com <i>score</i> de agressividade.....	39
	Discussão.....	43
1.	Associação dos polimorfismos nos genes <i>5-HTT</i> e <i>MAOA</i> com maus tratos infantis.....	45
2.	Associação dos polimorfismos nos genes <i>5-HTT</i> e <i>MAOA</i> com comportamento agressivo.....	46
	Conclusão.....	51
	Bibliografia: .....	55
	APÊNDICE I.....	67
	APÊNDICE II.....	70
	APÊNDICE III.....	71
	APÊNDICE IV.....	72

## Índice de Figuras

**Figura 1:** Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando os 3 diferentes genótipos (LL, LS e SS), relativos ao polimorfismo localizado na região promotora do gene transportador da serotonina (5-HTT). Tamanho dos alelos L: alelo longo 419 pb; S: alelo curto 376 pb;.....23

**Figura 2:** Eletroforese em gel de Poliacrilamida para o estudo do SNP rs25531 estudado por RFLP com a enzima de restrição MspI, e mostrando a fase haplotípica identificada em cada indivíduo. 1:LALA; 2:SASA; 3:Produto de PCR (419 pb); 4:LALG; 5:LASA; 6:SASA. Tamanho dos fragmentos para cada haplótipo de acordo com Bonvicini *et al.* (2010): SA: 381 + 62+ 33 pb ; LG: 174 + 150 + 62 + 33; LA: 324 + 62 + 33pb ; SG: 150 + 131 + 62 pb; MW: marcador de peso molecular (100 pb): banda forte=500pb.....24

**Figura 3:** Eletroforese em gel de poliacrilamida para o estudo do polimorfismo VNTR do gene *MAOA* mostrando os diferentes genótipos encontrados neste trabalho em amostras do sexo feminino. 1: 3R-3R; 2: 3.5R-4R; 3, 5, 6: 3R-4R; 4, 7: 4R-4R; 8: 3R-5R. Tamanho dos alelos: 3R: 321 pb; 3.5R: 336 pb; 4R: 351 pb; 5R: 381 pb; MW: marcador de peso molecular (100 pb). ..... 25

**Figura 4:** Sequenciação da região promotora do gene *MAOA* que inclui o polimorfismo VNTR. L-M90-MD: indivíduo do sexo masculino com um genótipo de 4 repetições (4R); L-H130-MD: indivíduo do sexo masculino com um genótipo de 3 repetições (3R). ..... 25

**Figura 5:** Média do *score* de agressividade distribuída por sexos (M= masculino; F= feminino) e valor de P de comparação dos *scores* de agressividade entre sexos pelo teste de Mann-Whitney. Para cada sexo estão indicadas as medias de *score* e erro-padrão.....26

**Figura 6:** Média do *score* de agressividade distribuída pelos diferentes genótipos 5-HTTPLR. A comparação da distribuição do *score* de agressividade pelos genótipos 5-HTTLPR e *cluster* foi feita com o teste de Kruskal-Wallis e para o SNP rs25531 pelo teste de Mann-Whitney.....32

**Figura 7:** Média do *score* de agressão distribuída pelos diferentes genótipos 5-HTTPLR, rs25531 e *cluster* em indivíduos masculinos (M) e femininos (F). A comparação da distribuição do *score* de agressividade pelos genótipos 5-HTTLPR e *cluster* foi feita com o teste de Kruskal-Wallis e para o SNP rs25531 pelo teste de Mann-Whitney.....33

**Figura 8: Médias do *score* de agressividade e valores P de comparação da distribuição dos *scores* pelos diferentes genótipos do 5-HTTPLR na amostra total e estratificada por sexo, na presença (1) e ausência (0) de maus tratos infantis. A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**..... 34

**Figura 9: Médias do *score* de agressividade e valores P de comparação da distribuição dos *scores* pelos diferentes genótipos rs25531 na amostra total e estratificada por sexo (M: homens; F: mulheres), na presença (1) e ausência (0) de maus tratos infantis. A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita com o teste de Mann-Whitney.**.....34

**Figura 10: Médias do *score* de agressividade e valores P de comparação da distribuição dos *scores* pelos diferentes genótipos do cluster 5-HTTPLR/rs25531 na amostra total e estratificada por sexo, na presença (1) e ausência (0) de maus tratos infantis. A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**.....35

**Figura 11: Médias do *score* de agressividade nos diferentes grupos de genótipos do polimorfismo VNTR do gene *MAOA* agrupados em função da sua atividade transcricional nos indivíduos do sexo masculino (M) e feminino (F). A comparação dos genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**.....39

**Figura 12: Média do *score* de agressividade nos diferentes genótipos do polimorfismo VNTR do gene da *MAOA* nos indivíduos do sexo masculino, estratificada pela presença ou ausência de maus tratos infantis. 0: ausência de maus tratos infantis; 1: presença de maus tratos infantis.**

**A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**.....41

**Figura 13: Média do *score* de agressividade nos diferentes genótipos do polimorfismo VNTR do gene da *MAOA* agrupados em função da sua atividade transcricional em indivíduos do sexo feminino, estratificado pela presença ou ausência de maus tratos infantis. 0: ausência de maus tratos infantis; 1: presença de maus tratos infantis.**

**A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**.....42

## Índice de Tabelas

Tabela I: Reação para a amplificação de amostras para a técnica de PCR.....	16
Tabela II: Reação para digestão enzimática por MSP1.....	18
Tabela III: Distribuição de frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25331.....	28
Tabela IV: Haplótipos 5-HTTLPR/rs25531 e fase haplotípica determinada para os indivíduos estudados, incluindo grupos considerados de acordo com níveis de expressão génica.....	29
Tabela V: Tabulação cruzada com a frequência de indivíduos masculinos genotipados para o polimorfismo 5-HTTLPR por maus tratos infantis.....	30
Tabela VI: Tabulação cruzada com a frequência de indivíduos masculinos genotipados para os genótipos 5-HTTLPR/rs25531 por maus tratos infantis.....	31
Tabela VII: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do <i>score</i> de agressividade para os polimorfismos estudados.....	36
Tabela VIII: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do <i>score</i> de agressividade para os polimorfismos estudados na amostra sem maus tratos infantis (MTI=0).....	36
Tabela IX: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do <i>score</i> de agressividade para os polimorfismos estudados na amostra com maus tratos infantis (MTI=1).....	37
Tabela X: Frequências genóticas e alélicas na população estudada para o polimorfismo no gene <i>MAOA</i> .....	38
Tabela XI: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do <i>score</i> de agressividade para o polimorfismo VNTR <i>MAOA</i> e associação entre os genótipos e <i>score</i> de agressividade.....	40

# Introdução



Nos últimos trinta anos, a genética comportamental tem vindo a examinar o papel que os genes representam na formação e no desenvolvimento do homem e dos outros animais, sendo o ramo da Biologia que investiga a relação entre os genes e o ambiente para determinar as diferenças individuais no comportamento. Tradicionalmente estuda as diferenças comportamentais considerando três fontes principais: influências atribuíveis a efeitos genéticos, influências ambientais partilhadas entre irmãos (como o ambiente familiar) e influências que surgem de experiências ambientais não partilhadas (Rose e Dick, 2004).

Como apontado por Raine (2008), a genética do comportamento procura responder a questões como por exemplo: "Que genes predis põem a certos tipos de comportamento antissocial?"

### **1. Contexto evolutivo da agressão:**

Existiram diversas tentativas para definir agressão, não havendo ainda um consenso geral, o que não é, no entanto, surpreendente quando temos em conta a diversidade de vertebrados e a enorme variedade de contextos em que a agressão é expressa (Wingfield *et al.*, 2006 *in* Nelson, 2006).

Para Moyer (1968), o termo agressão é definido como aquilo que leva (ou aparenta ao observador levar) ao dano ou destruição de um alvo. Moyer (1968) identificou sete tipos de agressão, escala modificada por Wingfield e colaboradores (2006), em relação a um organismo no seu ambiente: 1) Agressão espacial (territorial); 2) Agressão sobre recursos ingeridos ou alimentos; 3) Agressão por estatuto dominante; 4) Agressão sexual; 5) Agressão parental; 6) Agressão anti predador [inclui a agressão induzida por medo (Moyer, 1968)]; e 7) Agressão irritável (Wingfield *et al.*, 2006 *in* Nelson, 2006).

Segundo o Dicionário de Língua Portuguesa Contemporânea da Academia das Ciências de Lisboa, violência define-se como: "força física ou moral que se emprega abusivamente contra alguém ou contra um direito natural de outrem" (pp. 3757) e "carácter de que se denota a recurso à força física ou moral" (pp. 3757). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o termo violência deve ser utilizado para referir a violência intencional (homicídio, maus tratos, violência interpessoal, violência sexual, entre outros), e a violência não-intencional (para designar acidentes). A violência pode manifestar-se de diferentes

formas, sendo as mais frequentes a violência física, a psicológica/emocional e a violência sexual. É a violência física que assume maior visibilidade, podendo ser definida como o uso material de força contra um indivíduo, de forma voluntária, causando um dano mais ou menos grave (Magalhães, 2010).

A agressividade designa uma tendência ou conjunto de tendências, marcadas pelo caráter ou vontade de cometer um ato violento contra outro, que se constituem por condutas concretas ou potenciais tendo como intenção a coação, a causa de dano ou de destruição. Por sua vez, o termo agressão designa um comportamento através do qual um indivíduo ataca outro com o intuito de causar dano (Magalhães, 2010). Foram classificados dois tipos de comportamento agressivo, um resultante da falta e outro do excesso de sensibilidade emocional. O primeiro é denominado de agressão instrumental ou proativa sendo premeditado e com um objetivo. É caracterizado como um traço de psicopatia não existindo empatia ou remorso. O seu contraste é a agressão reativa, sendo esta geralmente ativada por experiências negativas e emoções como a raiva e a ansiedade (Tremblay *et al.*, 2005). Em relação à agressão reativa e à resposta perante ameaça, parece existir uma relação complexa entre a ansiedade e a agressão (Craig e Halton, 2009).

A agressão faz parte do comportamento dos mamíferos visto que lutam para defender territórios, adquirir recursos, competir por parceiros e proteger as crias e os infantis (Huntingford e Turner, 1987). No entanto, lutar é inato, um simples reflexo na resposta a um estímulo provocativo do ambiente. Por sua vez, o comportamento agressivo é adaptativo, modificado por alterações ambientais e experiências de vida anteriores. De facto, ganhar ou perder um encontro agonístico tem um impacto dramático em comportamentos agressivos futuros: os vencedores são mais prováveis de iniciar ataques contra oponentes desconhecidos, enquanto os perdedores tendem a retirar-se de confrontos com desconhecidos, adotando uma estratégia oportunista ou escolhendo as suas lutas (Ferris, 2006 *in* Nelson, 2006).

Em espécies socialmente organizadas como os invertebrados e vertebrados (aves, peixes e mamíferos), a formação de uma hierarquia de dominância e a manutenção do estatuto social dentro do grupo são chaves determinantes para a demonstração de comportamento agressivo. O repertório comportamental possui sequências de atos agressivos e defensivos, posturas e demonstrações que são frequentemente referidas como comportamentos agonísticos. Pensa-se que estas demonstrações de dominância ritualizada reduzam a probabilidade de ataques que causem danos físicos (Lorenz, 1966). Possivelmente

a forma mais séria de comportamento agressivo dentro de espécies sociais são os grupos de matança descritos no livro *Demonic Males: Apes and the origin of human violence* (1996), no qual é reportado o primeiro encontro violento registrado em chimpanzés (*Pan troglodytes*), em que um grupo ataca um elemento da sua espécie no seu território. Até esse momento pensava-se que a violência intraespecífica era um traço exclusivo dos humanos, uma vez que, apesar de muitas outras espécies animais matarem, fazem-no geralmente no decorrer da caça. Outro tipo de violência bem conhecida é a competição entre machos, no entanto, na maioria das vezes, o confronto termina quando um dos machos desiste. Apesar dos eventos de violência intraespecífica mortais serem raros, não podem ser descartados como acidentais ou anormais. São associados com várias expressões psicológicas e comportamentais de excitação, e a morte em si faz com que os “assassinos” apresentem vários sinais, tais como vocalizações prazerosas, e demonstrações de postura paralelas às psicopatologias humanas (Farrington, 1993; McElroy *et al.*, 1998).

Nos anos iniciais da pesquisa de campo com chimpanzés, começaram a ser relatados casos de violência sexual. Jane Goodall, no livro *Chimpanzees of Gombe: Patterns of Behavior*, de 1986, descreve uma situação na qual uma fêmea é persuadida a acasalar por um macho. Apesar da relutância da fêmea, o macho consegue copular, mas apenas após a perseguir e a atacar de forma violenta.

Talvez o melhor exemplo para comparação entre a violência relatada nos chimpanzés e a violência humana seja a tribo Yanomamö, habitante do sul da Venezuela e Norte do Brasil. Aqui, os conflitos entre aldeias não surgem devido a recursos, mas devido a competição por mulheres. Apesar da existência de condutas tradicionais para lidar com os conflitos, quando estas são ultrapassadas inicia-se a guerra. Os Yanomamö possuem dois estilos de combate: um que é caracteristicamente humano no qual existe um convite para um festim que termina com a morte dos homens e a captura das mulheres; o segundo é a formação de raides de dez a vinte indivíduos com o objetivo de eliminar um inimigo (Wrangham e Peterson, 1996).

Pensa-se que os grupos de caçadores-recoletores também praticariam raides a comunidades vizinhas, levantando a hipótese de as motivações que levaram à evolução da violência letal inter-grupo terem sido selecionadas no contexto de competição territorial, uma vez que a reprodução se encontra limitada pela quantidade de recursos, e estes dependem da área territorial (Wilson e Wrangham, 2003).

Antes do registo de agressão inter-grupo nos chimpanzés, era pensado pelos antropólogos que a guerra humana resultava de um fator único na nossa linhagem, como a estratificação social, a alta densidade populacional ou o uso de ferramentas como armas. No entanto, a observação de agressão para com vizinhos em chimpanzés demonstrou que nenhum destes fatores era necessário (Wilson e Wrangham, 2003).

A comparação entre chimpanzés e humanos é útil ao sugerir princípios comuns geradores da evolução de tendências psicológicas (Wilson e Wrangham, 2003).

Historicamente muitos cientistas defendem que os traços de personalidade são objeto de pressões evolutivas e assim terão muito provavelmente uma etiologia genética (Buss, 1995). Outros mantêm na sua linha de pensamento que os traços de personalidade são fortemente influenciados pelo ambiente (Eagly, 1987). Hoje é largamente aceite que o desenvolvimento da personalidade e dos seus traços é guiado tanto pela natureza como pelo ambiente, existindo uma interação gene-ambiente (Barr *et al.*, 2003).

Os estudos que investigam a relação entre variantes genéticas e o comportamento antissocial no ser humano, como a agressividade ou a delinquência, são raros. Os principais genes que têm sido foco na investigação da agressão nos animais e do comportamento violento no Homem são o gene Monoamina Oxidase A (MAOA) (Guo *et al.*, 2008; Shih e Thompson, 1999; Cases *et al.*, 1995) e o gene transportador da serotonina (SLC6A4).

## **2. Diferenças entre os sexos na agressão**

As mesmas pressões evolutivas que atuaram na conservação dos comportamentos agressivos na linhagem evolutiva do Homem também criaram estratégias evolutivas diferentes para a agressão em homens e mulheres (Buss, 1995).

As estatísticas criminais indicam que os homens têm mais probabilidade de ser implicados em crimes que envolvam agressão. O estudo longitudinal de Moffitt *et al.* (2001), envolvendo cerca de 1000 indivíduos ao longo de um período dos 3 aos 21 anos, demonstrou que os homens tinham 2,4 vezes mais probabilidade de se envolver em comportamentos antissociais do que as mulheres (Craig e Halton, 2009).

Muitas investigações têm-se concentrado no comportamento agressivo dos adolescentes e jovens adultos, denominado por Wilson e Daly (1985) por “Síndrome de Jovens Adultos”. De facto, os homens com idades compreendidas entre os 12 e os 25 anos

são os principais perpetradores e vítimas de violência, aparentemente devido ao aumento dos níveis de testosterona no início da adolescência. Apesar de a relação entre a testosterona e a agressão em homens ser muito menos robusta do que a demonstrada noutras espécies de mamíferos, os dados são inequívocos. Por exemplo, a concentração de testosterona plasmática em prisioneiros com comportamento agressivo crónico é significativamente mais elevada do que aquela encontrada em prisioneiros não agressivos (Ehrenkranz *et al.*, 1974). Homens jovens normais demonstram uma relação significativa entre a concentração da testosterona circulante e índices de autoavaliação de hostilidade e agressão. Inversamente, existem estudos que não demonstram qualquer tipo de correlação entre a testosterona e o comportamento agressivo, tanto na população masculina criminosa, como na população masculina não criminosa (Kreuz e Rose, 1972; Meyer- Bahlurg *et al.*, 1974).

### 3. Gene da Monoamina Oxidase A (MAOA)

O gene *MAOA*, localizado no cromossoma Xp11, codifica a enzima Monoamina Oxidase A. Esta é uma enzima que catalisa a degradação de várias aminas diferentes incluindo neurotransmissores como a dopamina, serotonina e norepinefrina, impedindo assim que excessos de neurotransmissores interfiram com a comunicação de neurónios (Gibbons, 2004). Tanto os humanos como outros mamíferos produzem dois tipos de enzimas com substratos específicos: a isoenzima MAOA que metaboliza preferencialmente a serotonina e a norepinefrina e a isoenzima MAOB que atuam na feniletilamina e benzilamina (Hotamisligil e Breakefield, 1991; Cases *et al.*, 1995; Sabol *et al.*, 1998; Caspi *et al.*, 2002; Raine, 2008; McDermott *et al.* 2009; Larson *et al.*, 2010; Hunter, 2010). As isoenzimas MAO A e MAO B são codificadas por genes separados ligados ao cromossoma X (Xp 11.23 - 11.4) e partilham 70% de semelhanças na sequência de aminoácidos (Cases *et al.*, 1995; Sabol *et al.*, 1998; Caspi *et al.*, 2002; Meyer-Lindenberg *et al.*, 2006; Beaver *et al.*, 2010).

Sabol *et al.* (1998) descreveram na região promotora do gene *MAOA* um polimorfismo do tipo VNTR (*variable number of tandem repeats*) que consiste numa sequência repetitiva de 30 pares de bases (pb) com influência na atividade transcricional do gene. Neste trabalho foram descritos alelos com 2, 3, 3.5, 4 e 5 sequências repetitivas (designados por 2R, 3R, 3.5R, 4R e 5R) tendo sido ainda demonstrado que os alelos 3.5R ou 4R mostram uma atividade transcricional aumentada em relação aos alelos 3R ou 2R (Sabol *et al.*, 1998). Guo *et al.* (2008) conduziram um estudo que mostrou que o alelo 2R do gene *MAOA* se encontra

associado a comportamentos violentos numa amostra de adolescentes e jovens adultos independentemente de fatores ambientais. Por outro lado, a análise funcional dos alelos mostrou que o alelo 2R, em comparação aos alelos de repetição 3 e 4, possuía um nível mais baixo de atividade promotora (Guo *et al.*, 2008). A transcrição dos alelos de mais baixa atividade (2R e 3R) resulta na redução de atividade da enzima MAOA fazendo aumentar o nível de 5-HT nas sinapses e aumentando o risco para agressão e comportamento antissocial (Ficks *et al.*, 2014).

A noção de que os genes possuem um papel importante em várias doenças é largamente aceite, porém, a mesma aceitação não é atribuída à possível ligação genética a comportamentos humanos como a agressão e violência. Contudo, estudos anteriores, como aquele realizado por Brunner *et al.* (1993), apontam para uma componente genética distinta. Uma mutação no gene *MAOA* leva à sua deficiência causando o excesso de transmissores de monoaminas, conduzindo a um comportamento excessivamente impulsivo, incluindo hipersexualidade, perturbações de sono e alterações extremas de humor, bem como tendência para comportamentos violentos. Este conjunto de características é denominado Síndrome de Brunner (Hunter, 2010; Meyer-Lindenberg *et al.*, 2006). No entanto, o Síndrome de Brunner é classificado como raro. No seu estudo, apenas cinco indivíduos ao longo de seis gerações o manifestaram (Brunner *et al.*, 1993).

A baixa atividade do gene *MAOA* pode ser particularmente problemática no início de vida, devido à insuficiência de MAOB para compensar a deficiência de MAOA (Caspi *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2007; Ducci *et al.*, 2008; Hunter, 2010). A baixa expressão do gene *MAOA* (*MAOA* - L) foi associada a comportamentos agressivos e violentos tendo sido relacionada por Caspi *et al.* (2002) com maus tratos infantis, através do estudo de um grupo de indivíduos Neozelandeses cujos dados se encontravam no *Dunedin Multidisciplinary Health and Development Study*. Neste estudo, 1037 indivíduos foram submetidos a testes de dois em dois anos. Através de quatro medidas de estudo de comportamento antissocial para o teste da interação entre os genes e o ambiente, os resultados forneceram provas de que homens com o genótipo de baixa atividade de *MAOA* e vítimas de maus tratos na infância demonstravam comportamentos significativamente mais agressivos e desordeiros do que homens com o mesmo genótipo de baixa atividade que não foram mal tratados, ou do que as vítimas de maus tratos com o genótipo de alta atividade *MAOA* (Caspi *et al.*, 2002). Um estudo de Fergusson *et al.* (2010) providenciou apoio e replicação ao estudo de Caspi e colaboradores (2002) tendo

sido possível demonstrar uma interação significativa de genes-ambiente entre os genótipos *MAOA* e maus tratos infantis.

Desta forma, parece importante referenciar que os maus tratos infantis poderão ser de facto o gatilho para comportamentos violentos na idade adulta. Estas descobertas fornecem provas iniciais sobre a moderação do impacto de maus tratos na infância e um polimorfismo funcional no gene *MAOA*, fundamentado pela interação gene-ambiente (G x E).

Meyer-Lindenberg e a sua equipa conduziram um estudo, publicado em 2006, no qual, através do uso de ressonâncias magnéticas, identificaram uma ligação entre o tamanho do sistema límbico e a variante alélica de baixa atividade *MAOA*. Portadores do polimorfismo de baixa atividade *MAOA* (2R, 3R e 5R repetições) demonstraram uma redução de 8% no volume de massa cinzenta do sistema límbico quando comparados com portadores de alta atividade *MAOA* (repetições 3.5R e 4R) (Meyer-Lindenberg *et al.*, 2006; Beaver *et al.*, 2010). Nestas condições, acredita-se que os portadores da variante de baixa atividade possuem uma menor capacidade de inibição de impulsos emocionais (Hunter, 2010; Sjöberg *et al.*, 2008).

#### **4. Gene transportador da Serotonina (*SLC6A4*)**

Outro gene que poderá estar associado ao comportamento agressivo é o gene *SLC6A4* (também designado 5-HTT), localizado no cromossoma 17q11, que codifica a proteína transportadora da serotonina (5-HTT). A proteína 5-HTT é uma proteína membrana presente nos terminais sinápticos e responsável pela regulação da concentração de serotonina (5-HT) nas fendas sinápticas, mediante a recaptação pré-sináptica: transporte da serotonina do espaço sináptico para o interior dos neurónios pré-sinápticos (Gelernter *et al.*, 1997; Barr *et al.*, 2003). É uma das várias estruturas transportadoras de proteínas dependentes de sódio que contém doze regiões membranares abrangentes e desloca substratos específicos do espaço extracelular para o citoplasma (Gelernter *et al.*, 1997). A serotonina atua em múltiplos subtipos de recetores e regula funções fisiológicas tão diversas como a emoção, o humor, a cognição e funções motoras, bem como os ritmos circadianos e neuroendócrinos, incluindo o consumo de alimentos, o sono e a atividade reprodutiva (Lesch *et al.*, 1997).

A diminuição (ou desregulação) da função serontogénica é ligada à desinibição de comportamentos normalmente contidos, promovendo agressão impulsiva, suicídio, abuso de

substâncias e outras psicopatologias ligadas à impulsividade. As manifestações destes comportamentos provavelmente derivam das circunstâncias ou outras vulnerabilidades, incluindo a presença de motivações agonísticas no caso da agressão e depressões ligadas ao suicídio (Manuck *et al.*, 2006).

Foi descrito um polimorfismo comum na região promotora do gene SLC6A4, conhecido por 5-HTTLPR, que consiste numa inserção/deleção de 44 pares de bases (pb) resultando respetivamente num alelo longo (long, L) e num alelo curto (short, S) (Lesch *et al.*, 1997). O genótipo homozigótico longo (L/L) foi associado à eficiência transcricional do gene 5-HTT quando comparado com os genótipos heterozigóticos (S/L) e homozigóticos (S/S) (Heils *et al.*, 1996). O aumento na eficiência transcricional do genótipo L/L aparenta resultar em altas taxas de reuptake de serotonina nas células serotónicas (Lesch *et al.*, 1996), reduzindo a serotonina sináptica disponível e consequentemente reduzindo o risco de comportamento antissocial (Ficks *et al.*, 2014).

A variação alélica do polimorfismo 5-HTTLPR é extensamente usada para análises de associação e ligação de traços de personalidade (Lesch *et al.*, 1996), bem como para desordens afetivas (Collier *et al.*, 1996), dependência de álcool (Sander *et al.*, 1998), autismo (Cook *et al.*, 1997; Klauck *et al.*, 1997) e demência (Li *et al.*, 1997; Lesch *et al.*, 1997).

Num estudo realizado por Pombo e colaboradores (2008), com a participação de 97 indivíduos dependentes de álcool (78 homens e 19 mulheres), com o objetivo de avaliar a relação entre o polimorfismo promotor 5-HTTLPR, o comportamento agressivo e o consumo de álcool, obtiveram-se resultados que apontam para a influência do polimorfismo 5-HTTLPR na modulação da agressividade, em especial durante a fase de consumo de álcool. No período de consumo de bebidas alcoólicas, a presença do alelo L (longo) afigura-se como um fator protetor do desenvolvimento de comportamentos agressivos, enquanto a tendência dos resultados aponta o alelo S (curto) como um fator de predisposição para comportamentos violentos (Pombo *et al.*, 2008).

Num estudo de Reif e colaboradores (2007) em 184 homens adultos avaliados por um exame forense, os investigadores demonstraram uma interação entre o ambiente na infância e os genótipos 5-HTT no comportamento violento, em que a existência de adversidades na infância mostrou ter impacto no comportamento violento na idade adulta apenas quando os alelos S do polimorfismo 5-HTTLPR de baixa atividade se encontravam presentes.

## 5. SNP rs25531

O polimorfismo de nucleótido simples (SNP) rs25531 A/G, localizado na região imediatamente anterior à inserção/deleção 5-HTTLPR (Bonvicini *et al.*, 2010) contribui para diferenças transcricionais do gene 5-*HTT* já que a ocorrência do alelo G associado ao alelo L resulta numa redução da eficiência transcricional do alelo longo L semelhante à do alelo curto S (Hu *et al.*, 2006; Haberstick *et al.*, 2015).

Assim, a transição de rs25531 A>G resulta em duas formas do alelo L, LA e LG e em duas formas do alelo S, SA e SG, sendo este último muito pouco frequente (Haberstick *et al.*, 2006). Em termos funcionais, o haplótipo LA mostra os níveis mais elevados de atividade transcricional em relação às restantes formas LG, SA e SG, com níveis de atividade transcricional mais reduzidos (Haberstick *et al.*, 2006). Estudos prévios mostram que o haplótipo LG resulta em níveis de transcrição semelhantes aos níveis encontrados no alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR (Hu *et al.*, 2006; Wendland *et al.*, 2006; Odgerel *et al.*, 2013), contribuindo para as diferenças transcricionais do gene 5-*HTT* (Haberstick *et al.*, 2015).

## 6. Objetivos

O trabalho desenvolvido numa amostra populacional de jovens adultos de naturalidade portuguesa teve como objetivos principais: i) investigar a associação entre os polimorfismos VNTR-*MAOA* e 5-HTTLPR e maus tratos infantis (auto descritos); ii) investigar a associação entre os polimorfismos VNTR-*MAOA* e 5-HTTLPR e comportamentos violentos (auto descritos); iii) avaliar se a ocorrência de maus tratos infantis (auto descritos) tem influência na associação dos polimorfismos VNTR-*MAOA* e 5-HTTLPR com os comportamentos violentos na idade adulta.



## **Material e Métodos**



## **1. Amostra**

A amostra inclui 205 jovens de nacionalidade Portuguesa, 103 indivíduos do sexo feminino e 102 do sexo masculino, com média de idades de 22,17 anos (idade máxima: 37 anos; idade mínima: 18 anos), e naturais dos distritos de Aveiro (N=62), Santarém (N=6), Coimbra (N= 48), Leiria (N=11), Porto (N= 13), Vila Real (N=1), Viseu (N=5), Faro (N=3), Braga (N=10), Castelo Branco (N=1), Setúbal (N=3), Bragança (N=2), Guarda (N= 3), Viana do Castelo (N=2), Lisboa (N=10), Évora (N=1) e Ilhas (N=3).

Os voluntários foram avaliados através de um inquérito anónimo adaptado de Guo *et al.* (2008), que incluiu dez questões relativas a comportamentos agressivos/violentos nos últimos 12 meses e três questões relativas a maus tratos infantis (ver Apêndice I). Cada indivíduo classificou os seus comportamentos segundo a seguinte chave: 0= nunca; 1= uma ou duas vezes; 2= três ou quatro vezes e 3= cinco ou mais vezes, consoante a ocorrência do evento, obtendo-se um valor (*score*) para cada indivíduo em estudo pelo cálculo da média dos valores obtidos.

Foi previamente obtido o consentimento informado escrito de cada indivíduo, autorizando a realização de estudos genéticos e a utilização dos dados constantes no inquérito (ver Apêndice II).

## **2. Genotipagem**

### **2.1 Extração de DNA**

De cada indivíduo foi recolhida uma amostra de células bucais para extração de DNA. A colheita foi realizada de forma anónima e atribuído um código a cada indivíduo de forma a relacionar as suas respostas do inquérito com os seus dados genéticos.

A genotipagem dos polimorfismos estudados foi realizada no laboratório de Genética do Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS).

A extração do DNA foi realizada com *FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) seguindo o protocolo providenciado pelo fabricante (Apêndice III).

## 2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

O estudo dos polimorfismos do tipo *Variable Number of Tandem Polymorphisms* (VNTR) na região promotora dos genes *MAOA* e *SLC6A4 (5-HTT)* foi realizado por amplificação do DNA genômico com a técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) seguida de eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida.

As enzimas de restrição, descobertas nos anos 1960, reconhecem sequências curtas particulares de bases e cortam-nas de uma forma precisa com extremidades coesivas. Os diferentes fragmentos cortados pelas enzimas de restrição são separados através de uma eletroforese em gel, permitindo isolar fragmentos com diferentes tamanhos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR ou *polymerase chain reaction*) necessita da presença da sequência de DNA que se quer amplificar, de um par de *primers*, de nucleótidos e de uma enzima para a síntese de DNA, a *Taq* polimerase (Videira, 2011). Foi utilizada esta técnica para amplificar as regiões genômicas dos diferentes polimorfismos. Na tabela I encontra-se o protocolo usado para a amplificação.

**Tabela I: Reação para amplificação de amostras para a técnica de PCR**

Reagentes	Volume por amostra (µl)
Água bi – destilada	16,5
Tampão 10x	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3
dNTPs (10 mM)	0,5
<i>Primer direto</i> (100 ng/µl)	0,5
<i>Primer reverso</i> (100 ng/µl)	0,5
Taq Polimerase (5 U/ µl)	0,1
DNA	1,5

A genotipagem do polimorfismo VNTR na região promotora do gene *MAOA* foi realizada usando os *primers* 5'-ACA GCC TGA CCG TGG AGA AG - 3' (direto); e 5' - GAA CGT TGA CGC TCC CGG A - 3' (reverso), descritos em Guo *et al.* (2008). Após amplificação do DNA genômico de cada indivíduo por PCR, a separação dos fragmentos foi efetuada por eletroforese e a identificação dos alelos feita de acordo com a descrição em Guo

*et al.* (2008): fragmentos com 291, 321, 336, 351 e 381 pb correspondem, respectivamente, aos alelos 2R, 3R, 3.5R, 4R e 5R. A eletroforese foi realizada em gel horizontal de poliacrilamida a 6% em tampões 0,375 M Tris/HCl pH 8,8 (tampão do gel) e 0,125 M Tris/Glicina pH 8,8 (tampão das pontes), em placa de arrefecimento, com uma voltagem de 100 V durante cerca de 3 horas. Foi aplicado 1,5 µl de produto de PCR, e um marcador de peso molecular 100 pb. A visualização das bandas foi efetuada por coloração com nitrato de prata seguindo Budowle *et al.* (1991) (ver Apêndice IV).

O polimorfismo 5-HTTLPR localizado na região promotora do gene *SLC6A4* foi estudado recorrendo aos *primers* descritos em Bonvicini *et al.* (2010): JP 5' ATG CCA GCA CCT AAC CCC TAA TGT -3' (direto) e GR 5' GG ACC GCA AGG TGG GCG GGA - 3' (reverso). O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose (2%) para deteção dos alelos L (*long*) com 419 pb e S (*short*) com 375 pb. O produto PCR (5 µl) foi aplicado no gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5x, com brometo de etídeo (concentração final 0,5 µg/mL) e submetido a eletroforese (100V) durante cerca de 30 minutos, após o que foram visualizadas as bandas de DNA à luz ultravioleta para fazer a leitura do genótipo. Um controlo negativo foi usado para todas as amplificações de modo a excluir possíveis contaminações.

### **2.3 Estudo do SNP rs25531 por digestão por enzimas de restrição**

Foi estudado ainda um polimorfismo de nucleótido simples (SNP) que consiste na substituição A>G localizado próximo da inserção/deleção 5-HTTLPR (Bonvicini *et al.*, 2010). Este SNP (rs25531) foi estudado por PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) usando a enzima de restrição MspI.

O produto da amplificação para estudo do polimorfismo 5-HTTLPR foi digerido com MspI utilizando o protocolo descrito na Tabela II.

**Tabela II: Reação para digestão enzimática por MSP1**

<i>Reagentes</i>	<i>Volume por amostra (µl)</i>
Água bi – destilada	2,75
<i>Tampão</i>	0,5
<i>BSA</i>	0,05
<i>Enzima</i>	0,25
<i>Produto de PCR</i>	1,5

O produto da digestão foi incubado por 16 horas a uma temperatura de 37 ° Celsius.

Após a digestão, os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida a 6% em tampões 0,375 M Tris/HCl pH 8,8 (tampão do gel) e 0,125 M Tris/Glicina pH 8,8 (tampão das pontes), em placa de arrefecimento. Foi aplicado 1,5 µl de produto digerido e um marcador de peso molecular 100 pb. A eletroforese foi realizada durante cerca de 2 horas a 100 Volts. A visualização das bandas foi efetuada por coloração com nitrato de prata seguindo Budowle *et al.* (1991) (ver Apêndice IV).

Foram identificados os genótipos AA, AG e GG do polimorfismo rs25531 A/G sendo discriminado simultaneamente o haplótipo 5-HTTLPR/rs25531 de acordo com Bonvicini *et al.* (2010): LA (324+62+33) pb; LG (174+150+62+33) pb; SA (281+62+33) pb; e SG (150+131+62+33) pb. Esta genotipagem de haplótipos permitiu determinar de imediato a fase haplotípica para cada indivíduo.

### **3. Tratamento estatístico**

Foram estimadas as frequências genotípicas e alélicas para cada um dos polimorfismos por contagem direta. Os cálculos de frequências alélicas e a avaliação da concordância com a distribuição de Hardy-Weinberg foram realizados com o programa Arlequin versão 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

Para estudar a possível associação entre os polimorfismos 5-HTTLPR, rs25531 e VNTR-MAOA e maus tratos infantis na amostra total e por sexo recorreu-se ao teste do qui-quadrado. A distribuição da variável dependente, *score* de agressividade, nos grupos em estudo (população total e indivíduos agrupados por sexo) foi avaliada pelo teste de

Kolmogorov-Smirnov. A comparação do *score* de agressividade entre sexos e a análise da associação dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs25531 e VNTR-MAOA com maus tratos infantis e com o *score* de agressividade foram efetuadas recorrendo aos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney comparando a distribuição dos *scores* de agressividade entre grupos genotípicos. Os genótipos determinados para o conjunto dos polimorfismos 5-HTTLPR-rs25531 foram adicionalmente agrupados (*cluster*) segundo a sua eficácia de expressão génica considerando que o alelo LA mostra os níveis mais elevados de atividade transcricional e o alelo LG mostra níveis de atividade transcricional mais reduzidas, semelhantes ao alelo S (L1= LA; S1= LG, SA ou SG). Deste modo, a fase haplotípica 5-HTTLPR-rs25531 determinada para cada indivíduo foi transformada num modelo de três genótipos considerando os níveis de eficácia transcricional: L1L1=LALA; L1S1=LALG+LASA+LASG; S1S1= LGSA+SASA.

As associações estatísticas foram realizadas recorrendo ao programa Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics – V.20).



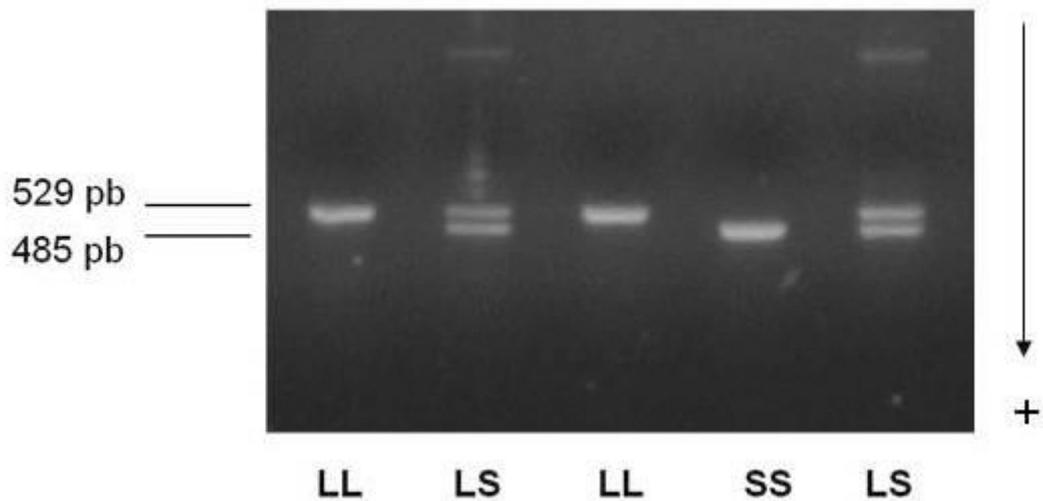
## **Resultados**



## 1. Identificação dos Genótipos / Alelos

### 1.1 Polimorfismo 5-HTTLPR

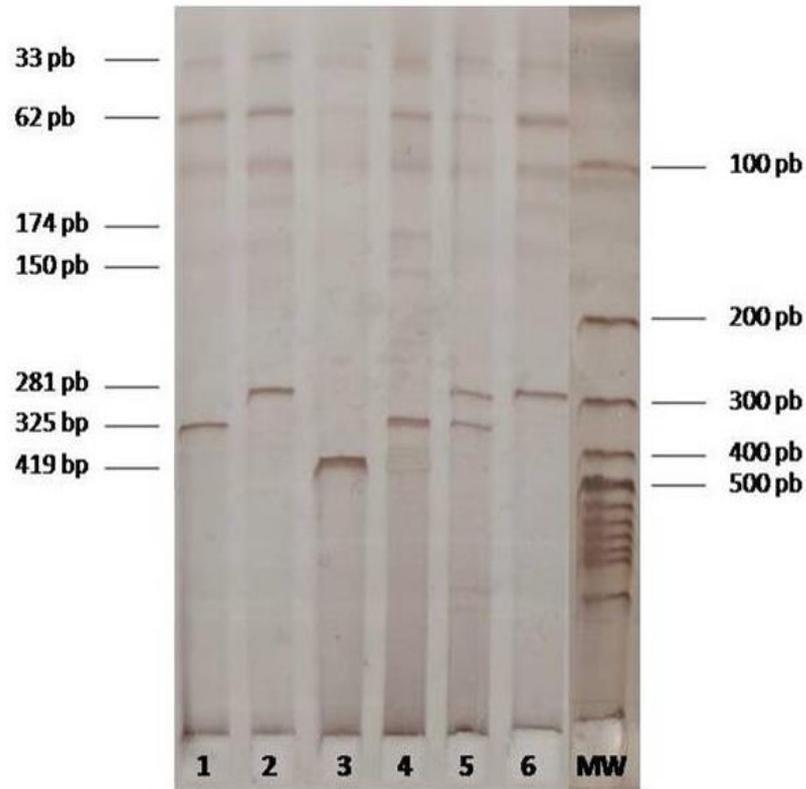
A figura 1 mostra o padrão eletroforético obtido para o polimorfismo 5-HTTLPR, tendo sido identificados os genótipos LL, LS e SS. Encontra-se indicado o tamanho da banda para cada alelo.



**Figura 1: Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando os 3 diferentes genótipos (LL, LS e SS) relativos ao polimorfismo localizado na região promotora do gene transportador da serotonina (5-HTT). Tamanho dos alelos L: alelo longo 419 pb; S: alelo curto 376 pb.**

### 1.2 SNP rs25531

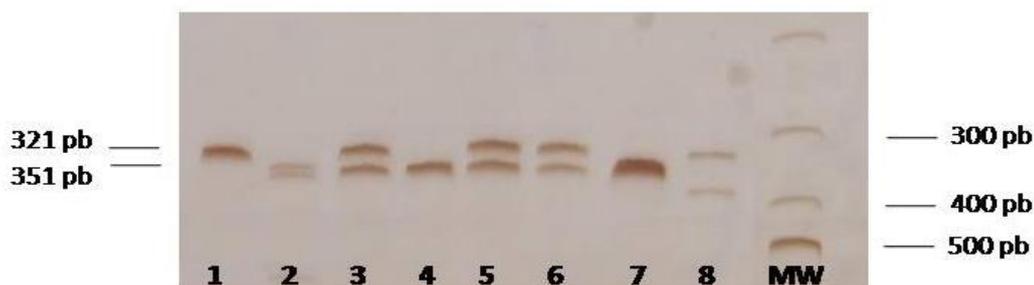
A figura 2 mostra o padrão eletroforético em gel de poliacrilamida do SNP rs25531, no qual é possível observar os diferentes haplótipos LA, SA e LG e a fase haplotípica para cada indivíduo analisado.



**Figura 2: Eletroforese em gel de Poliacrilamida para o estudo do SNP rs25531 estudado por RFLP com a enzima de restrição MspI, e mostrando a fase haplotípica identificada em cada indivíduo. 1:LALA; 2:SASA; 3:Produto de PCR (419 pb); 4:LALG; 5:LASA; 6:SASA. Tamanho dos fragmentos para cada haplótipo de acordo com Bonvicini *et al.* (2010): SA: 381+62+33 pb; LG: 174+150+62+33 pb; LA: 324+62+33 pb; SG: 150+131+62 pb; MW: marcador de peso molecular (100 pb): banda forte =500pb.**

### 1.3 Polimorfismo VNTR no gene MAOA

Na figura 3 é apresentada uma imagem da eletroforese em gel de poliacrilamida para os diferentes genótipos do polimorfismo VNTR localizado na região promotora do gene MAOA e que consiste na inserção/deleção de repetições de nucleótidos com 30 pb. Foram identificados os seguintes alelos: 3R com 321 pb, 3.5R com 336 pb, 4R com 351 pb e 5R com 381 pb, previamente descritos na literatura (Beaver *et al.*, 2010).



**Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida para o estudo do polimorfismo VNTR do gene *MAOA* mostrando os diferentes genótipos encontrados neste trabalho em amostras do sexo feminino. 1: 3R-3R; 2: 3.5R-4R; 3, 5, 6: 3R-4R; 4, 7: 4R-4R; 8: 3R-5R. Tamanho dos alelos: 3R: 321 pb; 3.5R: 336 pb; 4R: 351 pb; 5R: 381 pb; MW: marcador de peso molecular (100 pb).**

#### 1.4 Sequenciação da região com o polimorfismo VNTR-*MAOA*

A figura 4 mostra o resultado da sequenciação da região promotora do gene *MAOA* que inclui o polimorfismo em estudo em dois indivíduos com os genótipos 4R (L-H90) e 3R (L-H130). Note-se a ausência de uma sequência de 30 nucleótidos no indivíduo com o genótipo 3R.

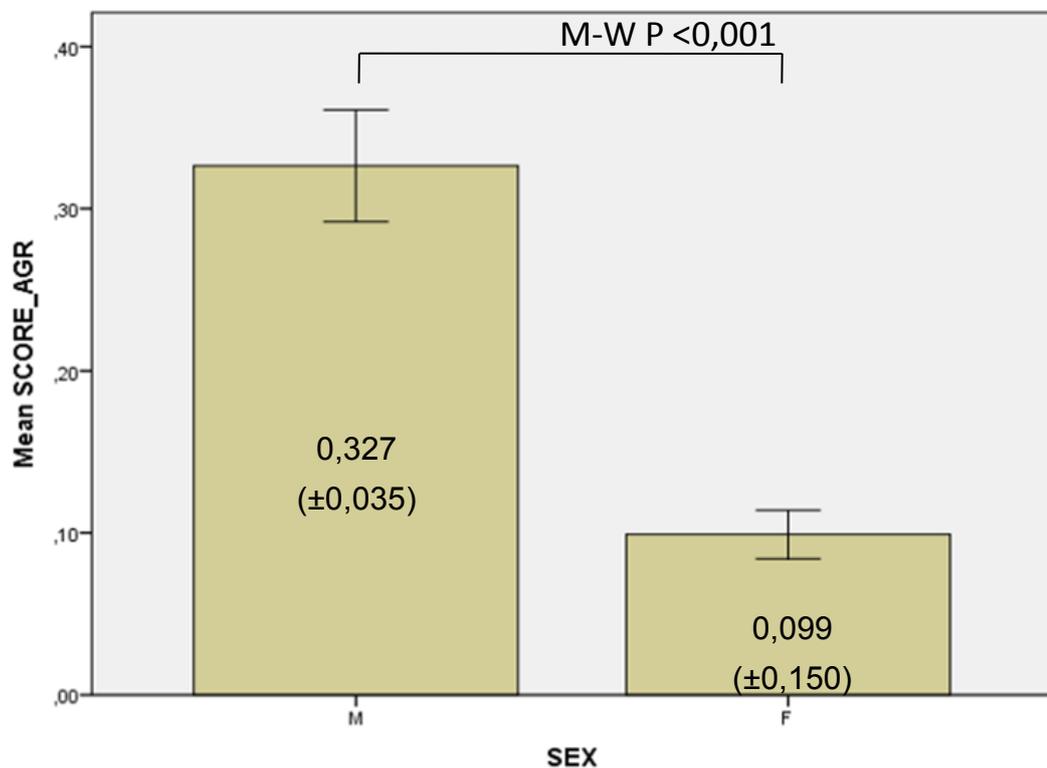
L-H90-MD	100	TACCCGCACCAGTACCCGGCACC	149
L-H130-MD	100	TACCCGCACCAGTACCCGGCACC-----	122
L-H90-MD	150	CCRGCACCAGTACCCGCACCAGTACCCGGCACC	199
L-H130-MD	123	---GCACCAGTACCCGCACCAGTACCCGGCACC	169
L-H90-MD	200	AGTACCCGGCACCGGCACCAGCGCAAGGGCGAGGGCCCGCCGAAGCCGG	249
L-H130-MD	170	AGTACCCGGCACCGGCACCAGCGCAAGGGCGAGGGCCCGCCGAAGCCGG	219
L-H90-MD	250	GGGCACAACCTGCCAGGTCCCGAACCCGGACTCCAGCTTGGACGACACCT	299
L-H130-MD	220	GGGCACAACCTGCCAGGTCCCGAACCCGGACTCCAGCTTGGACGACACCT	269

**Figura 4: Sequenciação da região promotora do gene *MAOA* que inclui o polimorfismo VNTR. L-M90-MD: indivíduo do sexo masculino com um genótipo de 4 repetições (4R); L-H130-MD: indivíduo do sexo masculino com um genótipo de 3 repetições (3R).**

## 2 Scores de agressividade e maus tratos infantis na amostra estudada

Os scores de agressividade foram obtidos através das respostas dos inquiridos quanto à frequência e tipo de comportamentos antissociais que estes consideraram ter realizado nos últimos 12 meses, com base num questionário adaptado de Guo *et al.* (2008).

Observou-se que os indivíduos do sexo masculino apresentam scores de agressividade mais elevados do que os indivíduos do sexo feminino (0,327 vs. 0,099, respetivamente) (Figura 5), com diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ) usando o teste de Mann - Whitney para comparação da distribuição do score de agressividade por sexo.



**Figura 5: Média do *score* de agressividade distribuída por sexos (M = masculino; F = feminino) e valor de P de comparação dos *scores* de agressividade entre sexos pelo teste de Mann-Whitney. Para cada sexo estão indicadas as médias do *score* e erro-padrão.**

Os maus tratos infantis (MTI) foram estudados quanto à sua presença (1) ou ausência (0) nos indivíduos inquiridos tendo em vista verificar i) a sua relação com os genótipos

estudados e ii) se influenciam a associação dos polimorfismos em estudo com os *scores* de agressividade.

Quarenta e sete por cento dos indivíduos relataram não ter sofrido quaisquer MTI enquanto 53% relataram ter sofrido MTI na infância. O sexo masculino apresenta um número superior de casos de maus tratos infantis com uma média de agressividade ligeiramente superior (1,26) em comparação a 1,12 nas mulheres. Na amostra total, 50% dos indivíduos (N=102) consideraram ter sofrido maus tratos verbais, 25% (N= 59) consideraram ter sofrido maus tratos físicos e apenas 3% (N=7) considerou ter sofrido abusos sexuais na infância. Na análise efetuada agruparam-se os indivíduos em apenas dois grupos, com e sem maus tratos infantis.

### 3 Polimorfismos do gene 5-HTT

#### 3.3 Frequências alélicas e genóticas

Foram calculadas as frequências genóticas e alélicas para os polimorfismos do gene 5-HTT que são apresentadas na Tabela III. Verifica-se que não existem desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada para os polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 ( $P > 0,05$ ).

**Tabela III: Distribuição de frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25331.**

Polimorfismo	N	Genótipos			Alelos		P
		N (%)			N (%)		
		LL	LS	SS	L	S	
5-HTTLPR	201	63 (31,05)	98 (49,35)	40 (39,41)	224 (55,72)	178 (44,28)	0,866
rs25531	198	177 (89,68)	21 (10,04)	-	375 (94,70)	21 (5,20)	0,431
<i>Cluster</i>	196	52 (26,03)	96 (49,98)	48 (23,99)	200 (51,02)	192 (48,98)	-

P, valor exato P do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P$  significativo  $< 0,05$ ).

Os genótipos 5-HTTLPR-rs25531 foram adicionalmente agrupados (*cluster*) segundo a sua eficácia transcricional, considerando que a variante LA tem maior nível de expressão gênica do que a variante LG, que mostra níveis de expressão semelhante ao alelo S (L1=LA e S1= LG, SA ou SG). A fase haplotípica foi determinada para cada indivíduo e transformada num modelo de três genótipos (L1L1: LALA; L1S1: LALG+LASA+LASG; S1S1: LGSA+SASA), esquematizados na Tabela IV.

**Tabela IV: Haplótipos 5-HTTLPR/rs25531 e fase haplotípica determinada para os indivíduos estudados, incluindo grupos considerados de acordo com níveis de expressão génica.**

<i>Haplótipos 5-HTTLPR/rs25531</i>	N (%)
<i>Haplótipos</i>	
LA	197 (51.0)
LG	20 (5.2)
SA	168 (43.5)
SG	1 (0.3)
<i>Haplótipos agrupados (Clustered)</i>	
LA	197 (51.0)
LG+SA+SG	189 (49.0)
<i>Fase haplotípica</i>	
LALA	51 (26.4)
LALG	11 (5.7)
LASA	83 (43.0)
LGSA	9 (4.7)
SASA	38 (19.7)
LASG	1 (0.5)
<i>Fase haplotípica agrupada</i>	
L1L1 (LALA)	51 (26.4)
L1S1 (LASA/LALG/LASG)	95 (49.2)
S1S1 (SASA/SASG/LGSA/LGLG)	47 (24.4)

### 3.2 Associação entre polimorfismos do gene 5-HTT e maus tratos infantis

Com o objetivo de testar uma possível associação entre genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR (LL, LS e SS), rs25331 e haplótipos agrupados por eficácia de transcrição (*cluster*) com maus tratos infantis (MTI), quanto à sua presença (1) ou ausência (0), foi aplicado o teste do qui - quadrado ( $\chi^2$ ) considerando a amostra total e estratificada por sexo. Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos ( $P>0,05$ ) para nenhum dos grupos considerados (amostra total, sexo masculino e sexo feminino).

Quando agrupados os genótipos LS e SS, também não foram encontrados resultados estatisticamente significativos, embora no sexo masculino o polimorfismo 5-HTTLPR tenha mostrado um resultado próximo da significância ( $P=0,08$ ). A tabulação cruzada pode ser observada na Tabela V, na qual é visível a percentagem da frequência dos genótipos LL e LS/SS por MTI. Nota-se que nos indivíduos que sofreram MTI (1) os genótipos LS e SS mostram uma frequência de 73% e nos indivíduos que não sofreram MTI (0) a frequência é de apenas 55,6%.

**Tabela V: Tabulação cruzada com a frequência de indivíduos masculinos genotipados para o polimorfismo 5-HTTLPR por maus tratos infantis.**

		Genótipos 5-HTTLPR		Total	
		LL	LS/SS		
MTI	0	N	28	35	63
		%	44,4	55,6	100
	1	N	10	27	37
		%	27,0	73,0	100
Total		N	38	62	100
		%	38,0	62,0	100

MTI (maus tratos infantis), 0: sem maus tratos infantis; 1: com maus tratos infantis.  
N, número de indivíduos.

Se considerarmos os haplótipos 5-HTTLPR-rs25331 agrupados segundo os níveis de expressão génica (*cluster*), ao agrupar o genótipo L1S1 com o genótipo S1S1 não foram encontrados resultados estatisticamente significativos na amostra total ou estratificada por sexo ( $P>0,05$ ). No entanto, nos indivíduos masculinos ( $P=0,31$ ), é possível observar a

tendência anterior de frequências superiores em indivíduos com MTI=1 em comparação a MTI=0 (Tabela VI): nos indivíduos que sofreram MTI os genótipos L1S1/S1S1 mostram uma frequência de 75% e nos indivíduos que não sofreram MTI a frequência é de 65%.

**Tabela VI: Tabulação cruzada com a frequência de indivíduos masculinos genotipados para os genótipos 5-HTTLPR/rs25531 por maus tratos infantis.**

			Genótipos Cluster		Total
			L1L1	L1S1/S1S1	
MTI	0	N	22	41	63
		%	34,9	65,1	100
	1	N	9	27	36
		%	25,0	75,0	100
Total		N	31	68	99
		%	31,3	68,7	100

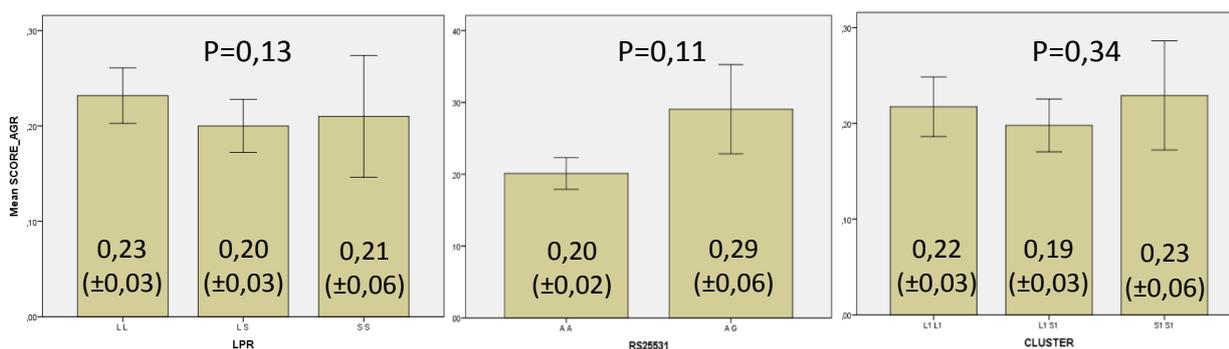
MTI (maus tratos infantis), 0: sem maus tratos infantis; 1: com maus tratos infantis.  
N, número de indivíduos.

### 3.3 Associação dos polimorfismos do gene 5-HTT com o comportamento agressivo

Foi analisada a associação entre os genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 e haplótipos agrupados por eficácia de transcrição (*cluster*) com o *score* de agressividade.

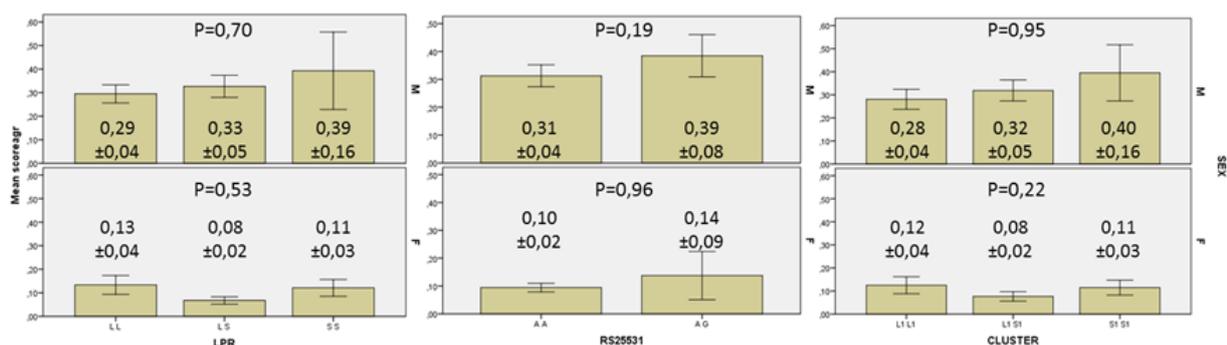
Considerando a amostra total, os testes realizados revelaram um valor de P não significativo ( $P > 0,05$ ), mostrando que a distribuição do *score* de agressividade pelos diferentes genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs25531 e *cluster* é semelhante na população total, como pode ser observado na Figura 6, com a média obtida para o *score* de agressividade por genótipo. No entanto, verificam-se para os genótipos AG e S1S1 *scores* de agressividade mais elevados.

Figura 6: Média do *score* de agressividade distribuída pelos diferentes genótipos 5-HTTLPR. A



comparação da distribuição do *score* de agressividade pelos genótipos 5-HTTLPR e *cluster* foi feita com o teste de Kruskal-Wallis e para o SNP rs25531 pelo teste de Mann-Whitney.

Foi também analisada por sexos a associação entre os genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs25531 e *cluster* com o *score* de agressividade, continuando a não se verificarem diferenças estatisticamente significativas para qualquer dos sexos ( $P > 0,05$ ) (Figura 7). No entanto, nota-se que nos homens existe uma tendência para um aumento dos *scores* de agressividade nos indivíduos com os genótipos LS e SS para o polimorfismo 5-HTTLPR, AG para o SNP rs25531 e L1S1 e S1S1 para o *cluster*.



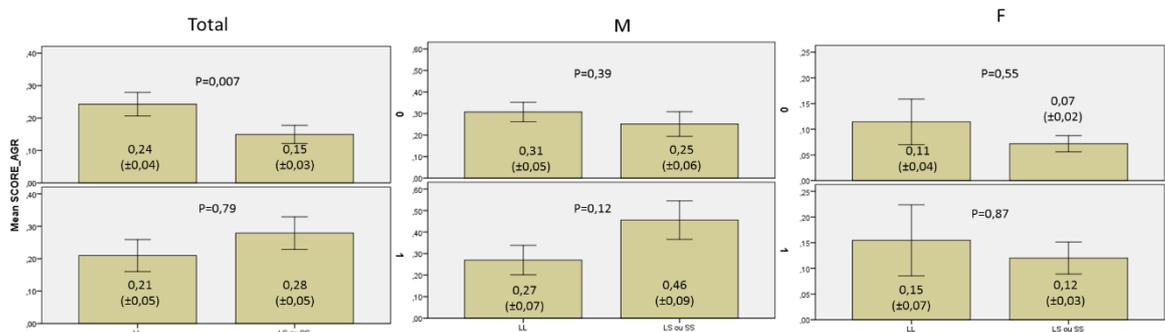
**Figura 7: Média do *score* de agressividade distribuída pelos diferentes genótipos 5-HTTLPR, rs25531 e *cluster* em indivíduos masculinos (M) e femininos (F). A comparação da distribuição do *score* de agressividade pelos genótipos 5-HTTLPR e *cluster* foi feita com o teste de Kruskal-Wallis e para o SNP rs25531 pelo teste de Mann-Whitney.**

Procurou-se também a existência de relação entre o *score* de agressividade e os genótipos estratificando a amostra em indivíduos com ou sem maus tratos infantis (MTI), para a amostra total e diferenciada por sexo. Considerando o reduzido número de indivíduos para a classe genotípica SS nos grupos estratificados por MTI, foram agrupados os indivíduos com os genótipos LS/SS para o polimorfismo 5-HTTLPR e L1S1/S1S1 para o *cluster*.

Para o polimorfismo 5-HTTLPR e na amostra total, verifica-se que, nos indivíduos que não sofreram maus tratos infantis (MTI=0), existe significância estatística (P=0,007) entre os genótipos 5-HTTLPR e o *score* de agressividade, com o genótipo LL a mostrar o *score* mais elevado (média=0,24) relativamente aos genótipos agrupados LS/SS (média=0,15). Por outro lado, nos indivíduos que reportam maus tratos infantis (MTI=1) não existe significância estatística na correlação entre o *score* de agressividade e o polimorfismo 5-HTTLPR (P=0,79), havendo no entanto *scores* de agressividade mais elevados para os genótipos LS/SS (média=0,28) relativamente ao genótipo LL (média=0,21) (Figura 8).

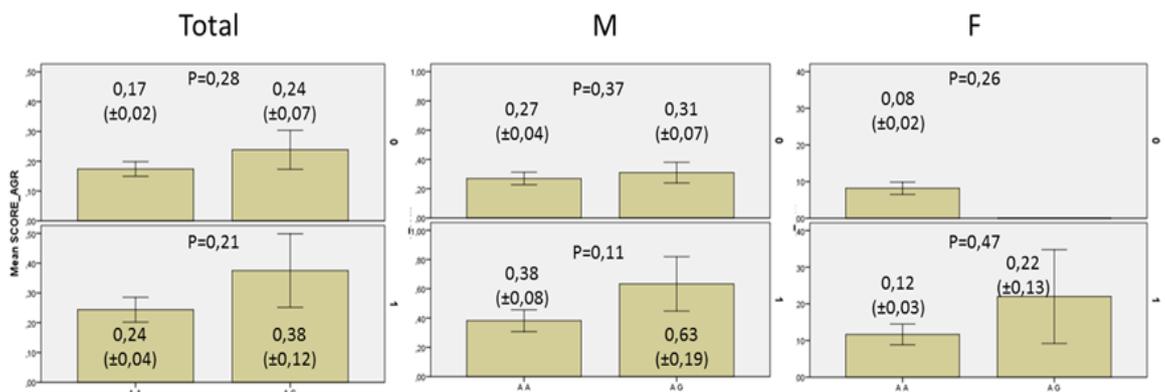
Para o sexo masculino não foi encontrada significância estatística entre o *score* de agressividade e o polimorfismo 5-HTTLPR sem (P= 0,12) e com (P=0,39) MTI. Verifica-se, no entanto, que no grupo com MTI o *score* de agressividade é superior para os genótipos LS/SS (média=0,46) em relação ao genótipo LL (média=0,27) (Figura 8).

Para os indivíduos do sexo feminino, também não foram encontrados resultados significativos para MTI=0 (P=0,55) e para MTI=1 (P=0,87) comparando os genótipos LL vs. LS/SS. Verifica-se, no entanto, que o genótipo LL mostra os *scores* mais elevados quer para MTI=0 quer para MTI=1.



**Figura 8:** Médias do *score* de agressividade e valores P de comparação da distribuição dos *scores* pelos diferentes genótipos do 5-HTTLPR na amostra total e estratificada por sexo (M = masculino; F = feminino), na presença (1) e ausência (0) de maus tratos infantis. A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

Para o SNP rs25531, a comparação da distribuição do *score* entre os genótipo AA versus AG, para a amostra total e estratificada por sexo revelou resultados não estatisticamente significativos ( $P > 0,05$ ) quando considerados os grupos de indivíduos com MTI=0 e MTI=1 (Figura 9).



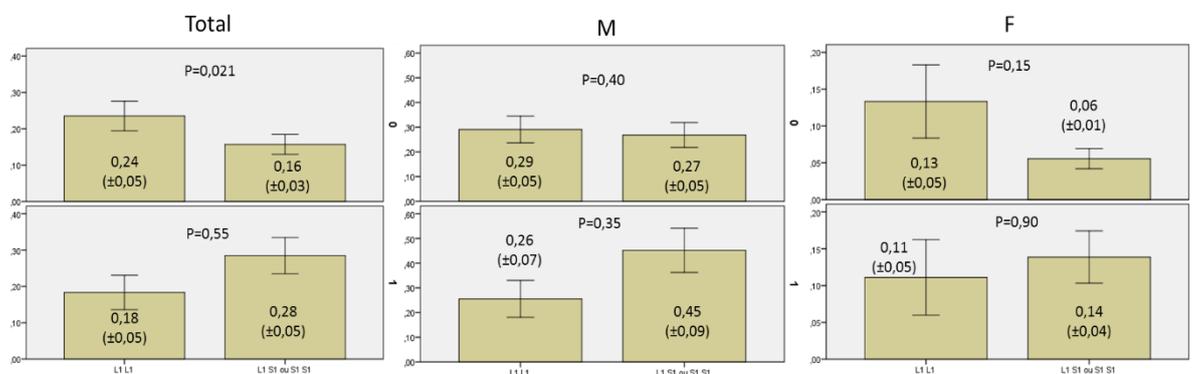
**Figura 9:** Médias do *score* de agressividade e valores P de comparação da distribuição dos *scores* pelos diferentes genótipos rs25531 na amostra total e estratificada por sexo (M = homens; F = mulheres), na presença (1) e ausência (0) de maus tratos infantis. A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita com o teste de Mann-Whitney.

Para o *cluster* (agrupando os haplótipos 5-HTTLPR-rs25531 por eficácia de transcrição) (Figura 10) e para a amostra total, verifica-se, nos indivíduos que não sofreram maus tratos infantis (MTI=0), que existe significância estatística ( $P=0,02$ ) entre os genótipos 5-HTTLPR/rs25531 e o *score* de agressividade, com o genótipo L1L1 a mostrar o *score* mais

elevado (média=0,24) relativamente ao grupo de genótipos L1S1/S1S1 (média=0,16). Por outro lado, nos indivíduos que reportam maus tratos infantis (MTI=1) não existe significância estatística na correlação entre o *score* de agressividade e os genótipos 5-HTTLPR/rs25531 (P=0,55), registando-se *scores* de agressividade mais elevados para os genótipos L1S1/S1S1 (média=0,28) relativamente ao genótipo L1L1 (média=0,18) (Figura 10).

Para o sexo masculino não foi encontrada significância estatística entre o *score* de agressividade e os genótipos 5-HTTLPR/rs25531: P=0,40 para MTI=0 e P=0,35 para MTI=1. Verifica-se, no entanto, que no grupo com MTI=1, o *score* de agressividade é superior para os genótipos L1S1/S1S1 (média=0,45) em relação ao genótipo L1L1 (média=0,26) (Figura 10).

Para os indivíduos do sexo feminino, também não foram encontrados resultados significativos quando a amostra foi estratificada por maus tratos infantis: para MTI=0 (P=0,15) e para MTI=1 (P=0,90). Continua a verificar-se que a média de *score* de agressividade é superior nos genótipos L1S1/S1S1 (média=0,14) em relação ao genótipo L1L1 (média=0,11) para MTI=1 (Figura 10).



**Figura 10: Médias do *score* de agressividade e valores P de comparação da distribuição dos *scores* pelos diferentes genótipos do cluster 5-HTTLPR/rs25531 na amostra total e estratificada por sexo (M = masculino; F = feminino), na presença (1) e ausência (0) de maus tratos infantis. A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**

A Tabela VII mostra a distribuição da média do *score* de agressividade e do número de indivíduos para os diferentes genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, SNP rs25531 e *cluster* na amostra total e estratificada por sexo.

**Tabela VII: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do score de agressividade para os polimorfismos estudados.**

Polimorfismos		N total	Genótipos					
			11		12		22	
			N	Média	N	Média	N	Média
5 – HTTLPR	Total	201	63	0,232	98	0,200	40	0,210
	Masculino	100	38	0,297	48	0,325	14	0,393
	Feminino	91	25	0,132	50	0,080	26	0,112
rs25531	Total	198	177	0,201	21	0,291		
	Masculino	102	89	0,313	13	0,385		-
	Feminino	99	91	0,096	8	0,138		
Cluster	Total	196	52	0,217	96	0,198	48	0,229
	Masculino	96	31	0,281	48	0,312	20	0,395
	Feminino	97	21	0,124	48	0,077	28	0,111

Alelos: 5- HTTLPR 11: LL; 12: LS; 22: SS; SNP rs25531 11: AA; 12: AG; 22: GG; *Cluster* 11: L1L1; 12:L1S1; 22: SS.

N, número de indivíduos.

A Tabela VIII mostra a distribuição da média do score de agressividade e do número de indivíduos para os diferentes genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, SNP rs25531 e cluster na amostra total e estratificada por sexos e na ausência de maus tratos infantis.

**Tabela VIII: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do score de agressividade para os polimorfismos estudados na amostra sem maus tratos infantis (MTI=0).**

Polimorfismos		N total	Genótipos					
			11		12		22	
			N	Média	N	Média	N	Média
5 – HTTLPR	Total	123	42	0,243	55	0,294	26	0,619
	Masculino	63	28	0,045	24	0,058	11	0,136
	Feminino	60	14	0,044	31	0,067	15	0,080
rs25531	Total	121	108	0,174	13	0,239		
	Masculino	63	53	0,270	10	0,310		-
	Feminino	58	55	0,818	3	0		
Cluster	Total	120	34	0,235	55	0,146	31	0,177
	Masculino	63	22	0,210	26	0,256	15	0,287
	Feminino	57	12	0,133	29	0,045	16	0,075

Alelos: 5- HTTLPR 11: LL; 12: LS; 22: SS; SNP rs25531 11: AA; 12: AG; 22: GG; *Cluster* 11: L1L1; 12:L1S1; 22: SS.

N, número de indivíduos.

A Tabela IX mostra a distribuição da média do score de agressividade e do número de indivíduos para os diferentes genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, SNP rs25531 e cluster na amostra total e estratificada por sexos e na presença de maus tratos infantis.

**Tabela IX: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do *score* de agressividade para os polimorfismos estudados na amostra com maus tratos infantis (MTI=1).**

Polimorfismos		N total	Genótipos					
			11		12		22	
			N	Média	N	Média	N	Média
5 - HTTLPR	Total	78	21	0,210	43	0,281	14	0,271
	Masculino	37	10	0,270	24	0,425	3	0,700
	Feminino	41	11	0,155	19	0,100	11	0,155
rs25531	Total	77	69	0,244	8	0,375		
	Masculino	36	33	0,382	3	0,633		-
	Feminino	41	36	0,117	5	0,200		
Cluster	Total	76	18	0,183	41	0,268	17	0,324
	Masculino	36	9	0,256	22	0,391	5	0,720
	Feminino	40	9	0,111	19	0,126	12	0,158

Alelos: 5- HTTLPR 11: LL; 12: LS; 22: SS; SNP rs25531 11: AA; 12: AG; 22: GG; *Cluster* 11: L1L1; 12:L1S1; 22: SS.

N, número de indivíduos;

#### 4. Polimorfismo VNTR do gene MAOA

##### 4.1 Frequências alélicas e genotípicas

Na tabela X encontram-se discriminados os diferentes genótipos do VNTR localizado na região promotora do gene MAOA que foram identificados na amostra populacional estudada. É possível observar as frequências genotípicas e alélicas em homens e mulheres. Não existe desvio significativo ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população feminina ( $P=0,20$ ).

Tabela X: Frequências genotípicas e alélicas na população estudada para o polimorfismo no gene MAOA.

Genótipo	N	Frequência (%)
Homens	97	
5R	1	1,33
4R	66	68,04
3R	30	30,93
Mulheres	103	
4R-4R	42	40,78
3R-4R	42	40,78
3R-3R	14	13,59
3.5R-4R	3	2,91
3R-R	2	1,94
P WHE = 0,20		
Alelos		
5R	2	0,97
4R	129	62,62
3.5R	3	1,45
3R	72	34,95

P HWE: Valor P exato do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

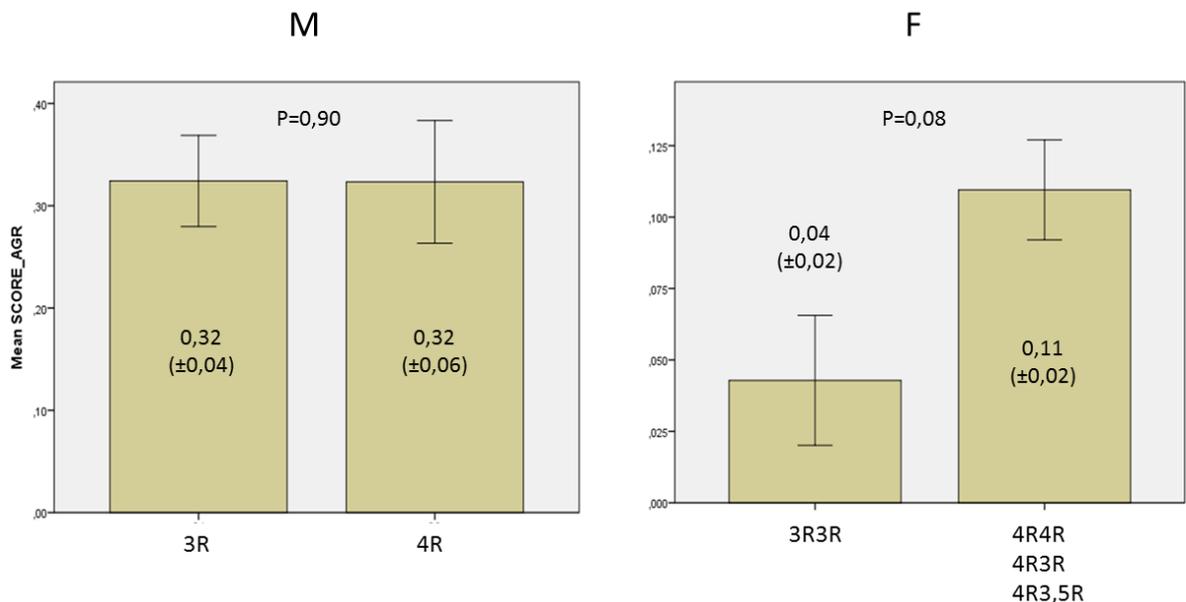
##### 4.2 Associação do genótipo com maus tratos infantis

Para avaliar a associação dos genótipos do polimorfismo VNTR do gene MAOA com presença de maus tratos infantis (MTI) não foram considerados os genótipos com um N reduzido. Assim, nos homens não foi considerado o genótipo 5R (N=1) e nas mulheres o genótipo 3R-5R (N=2). Ao realizar o teste do qui - quadrado para testar a associação aos maus tratos infantis obtiveram-se valores de P estatisticamente não significativos, quer nos homens ( $P= 0,396$ ) quer nas mulheres ( $P= 0,368$ ).

### 4.3 Associação do genótipo com *score* de agressividade

Para testar a associação dos genótipos *MAOA* com os *scores* de agressividade por sexo, os genótipos foram agrupados em função da sua atividade transcricional de acordo com o que está descrito na literatura: alelos 2R e 3R com menos atividade transcricional em relação aos alelos 3.5R e 4R. Assim, nos homens, foram comparados para a distribuição de *scores* de agressividade os genótipos 3R vs. 4R e nas mulheres o 3R-3R vs. conjunto 4R-4R / 3R-4R / 3.5R-4R.

Quando se comparou a distribuição do *score* de agressividade entre os dois grupos de genótipos, a análise estatística revelou nos homens um valor de  $P=0,90$  e nas mulheres um valor de  $P=0,08$ , próximo da significância, mostrando os genótipos de maior atividade transcricional níveis mais elevados de *score* de agressividade (0,11 vs. 0,04) (Figura 11).



**Figura 11: Médias do *score* de agressividade nos diferentes grupos de genótipos do polimorfismo VNTR do gene *MAOA* agrupados em função da sua atividade transcricional nos indivíduos do sexo masculino (M) e feminino (F). A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**

A Tabela XI mostra a distribuição dos diferentes genótipos e médias do *score* de agressividade para o genótipo do polimorfismo VNTR do gene *MAOA* na amostra estudada e a associação entre os genótipos e *score* de agressividade.

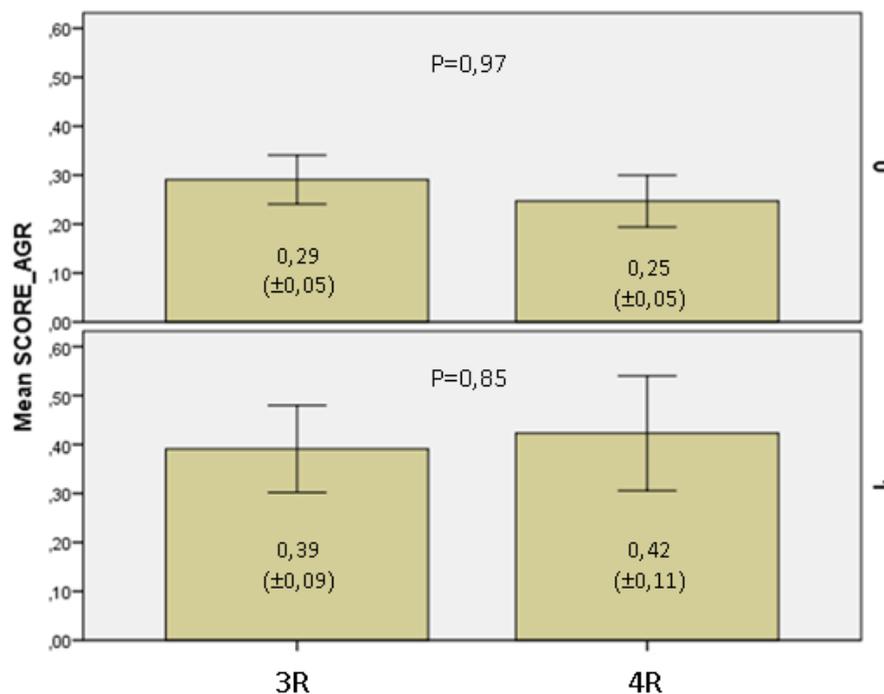
**Tabela XI: Distribuição dos diferentes genótipos e médias do *score* de agressividade para o polimorfismo VNTR do gene *MAOA* e associação entre os genótipos e *score* de agressividade.**

Sexo	Genótipos	N	Média	P
Homens	3R	30	0,323	0,90
	4R	66	0,324	
Mulheres	3R-3R	14	0,429	
	4R-4R / 3R-4R/ 4R-3.5R	84	0,110	

Valor de P de comparação de *scores* entre os genótipos obtidos pelo teste de Mann-Whitney.

O *score* de agressividade foi ainda comparado entre os grupos de genótipos para o polimorfismo VNTR-MAOA considerando a presença ou ausência de maus tratos infantis (MTI).

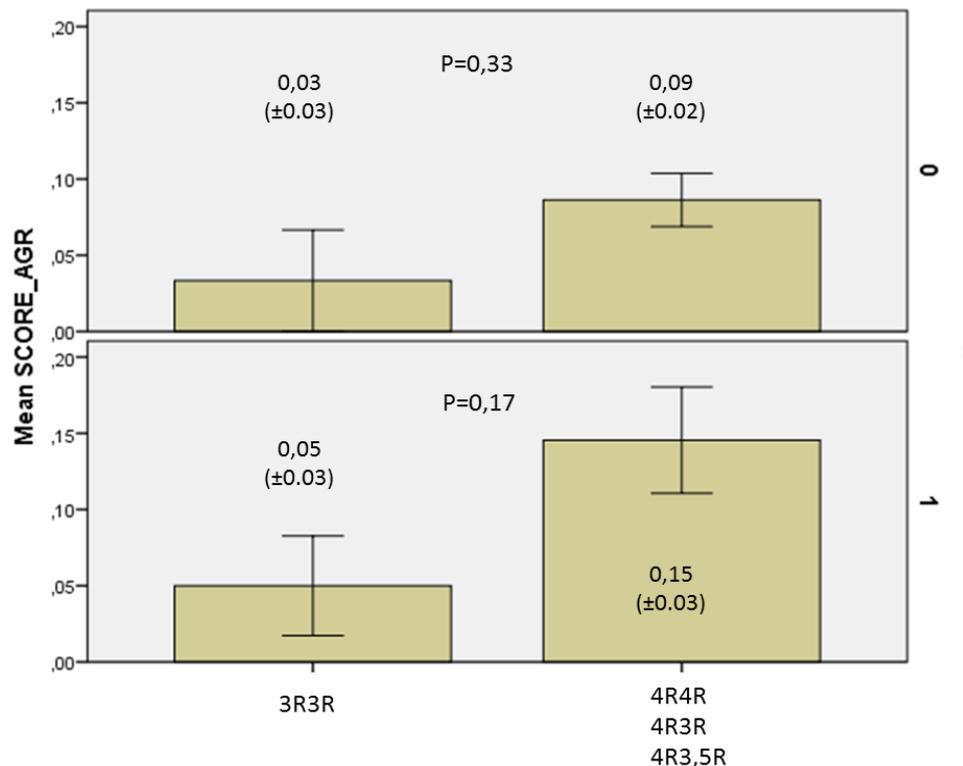
Para o grupo masculino, não se verificaram resultados estatisticamente significativos para MTI=0 ( $P=0,97$ ) e MTI=1 ( $P=0,85$ ) quando se comparou o genótipo 3R com 4R (Figura 12).



**Figura 12: Média do *score* de agressividade nos diferentes genótipos do polimorfismo VNTR do gene da MAOA nos indivíduos do sexo masculino, estratificada pela presença ou ausência de maus tratos infantis. 0: ausência de maus tratos infantis; 1: presença de maus tratos infantis.**

**A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.**

Nas mulheres também não foram encontrados resultados estatisticamente significativos quer no grupo MTI=0 (P=0,33) quer no grupo MTI=1 (P=0,17) quando comparados os grupos de genótipos 3R-3R *versus* o conjunto 4R-4R/4R-3R/4R-3.5R, notando-se no entanto maiores valores de *score* nas mulheres com o conjunto de genótipos de níveis mais elevados de atividade transcricional (Figura 13).



**Figura 13: Média do *score* de agressividade nos diferentes genótipos do polimorfismo VNTR do gene da MAOA agrupados em função da sua atividade transcricional em indivíduos do sexo feminino, estratificado pela presença ou ausência de maus tratos infantis.**

0: ausência de maus tratos infantis; 1: presença de maus tratos infantis.

A comparação de *scores* entre os genótipos foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

## **Discussão**



Este estudo examinou associação de polimorfismos localizados nos genes *5-HTT* e *MAOA* com maus tratos infantis bem como com níveis de agressividade, numa amostra de jovens adultos da população portuguesa.

Como previsto verificou-se que o *score* de agressividade em indivíduos do sexo masculino é superior ao obtido no sexo feminino, corroborando uma maior tendência por parte dos homens para manifestar comportamentos agressivos quando comparados às mulheres (Wilson e Daly, 1985; Craig e Halton, 2009). Este comportamento poderá ser explicado pelos diferentes níveis da hormona testosterona: no estudo de Ehrenkranz e colaboradores (1974) foi demonstrado que prisioneiros agressivos possuíam uma maior concentração de testosterona plasmática do que prisioneiros não agressivos. O comportamento antissocial é mais comum nos homens do que nas mulheres, existindo no entanto três exceções a esta regra: a) durante a puberdade feminina; b) ambos os sexos têm comportamentos antissociais semelhantes nas suas ofensas relacionadas com álcool ou drogas; e c) em relações íntimas, quando a violência feminina se compara à masculina (Moffitt *et al.*, 2001).

As diferenças entre os géneros podem ser explicadas por duas teorias. A primeira, a teoria biológica, considera as diferenças relacionadas com o género como produto das diferenças temperamentais inatas entre os sexos e que evoluíram por seleção natural. A psicologia evolutiva prevê que os sexos diferem em domínios que tenham encontrado diferentes problemas adaptativos ao longo da sua história evolutiva (Buss, 1995). Esta explicação aponta para diferenças hormonais e os seus efeitos na disposição e personalidade, e para as diferenças ligadas ao sexo na predisposição para a psicopatologia (Junior *et al.*, 2001). A segunda teoria, a teoria da psicologia social, aborda as diferenças entre géneros de uma forma mais direta e proximal. O modelo do papel social na diferença entre os sexos explica que a maioria das diferenças de género resulta da adoção de papéis dos géneros que definem as condutas apropriadas para homens e mulheres (Eagly, 1987).

### **1. Associação dos polimorfismos nos genes *5-HTT* e *MAOA* com maus tratos infantis**

Quando estudada a possível associação entre os genótipos dos polimorfismos *5-HTTLPR*, *rs25531* e haplótipos agrupados por eficácia de transcrição e a presença ou ausência de maus tratos infantis, não foram encontrados resultados estatisticamente

significativos quer na população geral quer estratificada por sexo, embora no sexo masculino seja obtido um valor P próximo da significância ( $P=0,08$ ) para o polimorfismo 5-HTTLPR quando se agrupou os genótipos LS e SS: a frequência do conjunto dos dois genótipos LS/SS em indivíduos que sofreram maus tratos infantis é superior (73,0%) à registada em indivíduos que não vivenciaram maus tratos (55,6%). O mesmo padrão é observado para os haplótipos 5-HTTLPR-rs25331 agrupados segundo os níveis de expressão génica (*cluster*): no sexo masculino é possível observar que nos indivíduos que sofreram maus tratos infantis os genótipos L1S1/S1S1 mostram uma frequência superior (75%) em relação aos indivíduos que não sofreram maus tratos infantis (65%).

Podemos levantar assim a hipótese de que os genótipos com o alelo S possam conferir alguma vulnerabilidade a maus tratos infantis. De facto, Landaas e colaboradores (2010) encontraram uma relação entre o alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR e a Perturbação de Hiperatividade e Défice de Atenção, verificando-se neste estudo uma sobre representação do alelo S na amostra estudada. Acredita-se que devido ao comportamento antissocial e desinibido das crianças portadoras deste transtorno, estas se encontrem sob um maior risco de sofrerem maus tratos infantis (De Sancti *et al.*, 2012).

Relativamente ao gene *MAOA* não foram encontrados valores significativos quando se analisou a associação com maus tratos infantis, quer nos homens quer nas mulheres, mostrando os genótipos de baixa e de alta atividade frequências semelhantes em indivíduos com e sem maus tratos infantis.

## **2. Associação dos polimorfismos nos genes *5-HTT* e *MAOA* com o comportamento agressivo.**

Para examinar a associação dos polimorfismos no gene *5-HTT* com níveis de agressividade, foram analisados os polimorfismos 5-HTTLPR, rs25531 e respetivos haplótipos agrupados por eficácia de transcrição quanto à distribuição do *score* de agressividade pelos diferentes genótipos, na amostra total e estratificada por sexo e, seguidamente, na presença ou ausência de maus tratos infantis também para a população total e estratificada por sexo.

Quando comparados os diferentes genótipos para os polimorfismos do gene *5-HTT* quanto à distribuição de *scores* de agressividade, não foram encontrados valores estatisticamente significativos quer na amostra total quer por sexo. Verifica-se, no entanto, que no sexo masculino para o polimorfismo 5-HTTLPR e *cluster* (genótipos 5-HTTLPR/rs25531 agrupados por eficiência de transcrição) existem níveis mais elevados de agressividade nos genótipos LS / SS relativamente ao genótipo LL, e L1S1 / S1S1 em comparação com o genótipo L1L1. Estes dados estão de acordo com estudos prévios que mostram existir uma associação entre o alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR e um elevado comportamento agressivo (Beitchman *et al.*, 2006; Haberstick *et al.*, 2006) ou conduta disruptiva (Sakai *et al.*, 2006).

A literatura mostra que o aumento da eficácia de transcrição do genótipo LL, ou mais especificamente LALA, aparenta resultar numa maior recaptação por parte das células serotoninérgicas reduzindo a quantidade de serotonina sináptica disponível e consequentemente reduzindo o risco de comportamento antissocial ou agressivo (Ficks *et al.*, 2014). No entanto, existem estudos que não replicam estes resultados (Sakai *et al.*, 2007; Vassos *et al.*, 2013) e outros que mostram uma associação da forma longa do polimorfismo 5-HTTLPR ao comportamento agressivo (Aslund *et al.*, 2013).

Quando se comparam os genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR, LL *vs.* conjunto LS/SS, na ausência de maus tratos infantis, verifica-se que existem níveis superiores de agressividade no genótipo LL, quer para a amostra total ( $P=0,007$ ) quer por sexos. O mesmo padrão de níveis de agressividade é observado quando os haplótipos 5-HTTLPR/rs25531 são agrupados segundo o nível de expressão génica (*cluster*) quer para a amostra total ( $P=0,02$ ) quer por sexos.

No entanto, na presença de maus tratos infantis, o oposto é verificado na amostra total e na amostra masculina, a verificarem-se os níveis elevados de agressividade nos genótipos LS/SS. E quando se agrupam os haplótipos 5-HTTLPR/rs25531 segundo o seu nível de expressão génica (*cluster*) é observável a mesma tendência de *scores* de agressividade mais elevados para o conjunto L1S1/S1S1 em comparação a L1L1, quer na amostra total quer nos sexos masculino e feminino, embora não se registem valores de associação estatisticamente significativos.

Assim, os resultados indicam que o alelo L parece ter uma característica protetora quando existem maus tratos infantis mas prejudicial quando estes maus tratos não existem.

Esta tendência de *scores* de agressividade diferentes entre os portadores do alelo S (ou S1) de acordo com a presença ou ausência de maus tratos infantis observada no presente estudo está de acordo com um número considerável de investigações que têm vindo a mostrar uma forte associação entre o alelo S do polimorfismo HTTLPR e uma suscetibilidade ao ambiente em adolescentes e crianças, mostrando que os portadores deste alelo são mais suscetíveis a ambientes negativos e beneficiam mais quando sujeitos a condições ambientais positivas (van Ijzendoorn *et al.*, 2012).

O polimorfismo VNTR do gene *MAOA* foi igualmente estudado, por géneros, quanto à sua relação com *scores* de agressividade, comparando genótipos com diferentes níveis de atividade transcricional para a amostra total e seguidamente quanto à presença ou ausência de maus tratos infantis.

Não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre os *scores* de agressividade e os genótipos VNTR-*MAOA*, quer no sexo masculino quer no sexo feminino. No entanto, nos indivíduos do sexo feminino é encontrado um valor P próximo da significância (P=0,08) com os genótipos de maior atividade transcricional (com os alelos 4R ou 3.5R) a apresentarem um *score* mais elevado de agressividade do que o genótipo de baixa atividade (3R-3R). Os dados da literatura referem que nas mulheres os resultados da associação dos genótipos *MAOA* com a agressão são heterogéneos e contraditórios (Sjober *et al.*, 2007; Aslund *et al.*, 2011). Assim o papel desempenhado pelo gene *MAOA* no comportamento antissocial em mulheres continua por esclarecer.

Considerando a presença de maus tratos infantis, a mesma tendência de um *score* de agressividade superior em genótipos de alta atividade foi verificado quer nos homens quer nas mulheres. Na amostra feminina a distribuição elevada do *score* de agressividade manteve-se nos genótipos de alta atividade também na ausência de maus tratos infantis.

Deste modo, os nossos dados não estão de acordo com o que está descrito na maioria da literatura que mostra que os alelos de baixa atividade transcricional do gene *MAOA*, na presença de maus tratos infantis, se encontram associados a níveis superiores de comportamentos agressivos (Caspi *et al.*, 2002; Widom e Brzustowics, 2006; Kim-Cohen *et*

*al.*, 2006). No entanto, outros estudos mostram que indivíduos masculinos com genótipos de alta atividade (3.5R, 4R e 5R) de transcrição do gene possuem um pequeno mas significativo risco de comportamentos antissociais em comparação com indivíduos portadores de genótipos de baixa atividade de transcrição (3R) (Sjöberg *et al.*, 2007; Beitchman *et al.*, 2004; Manuck *et al.*, 2000).

De uma forma geral, os resultados de estudos em genética comportamental na infância e adolescência sugerem que os fatores genéticos têm um papel na etiologia da agressão (DiLalla, 2002). Archenbach e Edelbrock (1984) criaram a *Childhood Behavior Checklist* para testar os níveis de agressividade parental. Consiste numa medida com várias escalas que abrange síndromes de infância como a depressão, a agressão e a delinquência. Usando esta medida Ghodsian - Carpey e Baker (1987) observaram o nível de agressividade maternal em gêmeos dos quatro aos sete anos de idade e descobriram que a vasta maioria da variância destes comportamentos (94%) poderia ser explicada por fatores genéticos. Uma contribuição genética substancial foi igualmente encontrada noutros dois estudos usando gêmeos (Edelbrock *et al.*, 1995; Eley *et al.*, 1999).

O efeito genético da agressão aparenta não operar em isolamento e pode ser moderado por diferenças de género, bem como pela interação com fatores ambientais adversos (Blonigen e Krueger, 2006 *in* Nelson, 2006). Assim, é da maior importância a realização de futuros estudos sobre agressividade que abordem a hereditariedade de traços agressivos ao estudar o ambiente em que os indivíduos cresceram, bem como os comportamentos e genética da sua família biológica.

No seguimento do estudo do polimorfismo VNTR do gene *MAOA* não foi identificado o alelo 2R na amostra, o que está de acordo com os dados da genética populacional, na medida em que é um alelo raro, mais frequente em indivíduos afro-americanos (5,5%) do que caucasianos (0,1%) (Beaver *et al.*, 2013). Também é o alelo deste polimorfismo que se encontra associado a maiores níveis de agressão e delinquência auto reportados. Na amostra estudada apenas foi identificado um indivíduo do sexo masculino com um genótipo 5R e dois indivíduos do sexo feminino heterozigóticos 3R-5R, pelo que não foram considerados nos testes de associação e portanto não foi possível realizar comparações com a literatura no sentido de considerar estes genótipos como de baixa atividade (Guo *et al.*, 2008) ou de alta atividade transcricional (Caspi *et al.*, 2002).



## **Conclusão**



No estudo da associação entre os genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR e haplótipos 5-HTTLPR/rs25531 agrupados por eficácia de transcrição com o *score* de agressividade, embora não se tenha obtido significância estatística, é observável na amostra masculina uma tendência para níveis de agressividade superiores nos genótipos LS e SS relativamente a LL, e L1S1 e S1S1 relativamente a L1L1. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que mostram que o alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR se encontra associado a agressividade, impulsividade e desordens comportamentais.

Este trabalho mostrou também os genótipos LS/SS e L1S1/S1S1 com *scores* mais elevados de agressividade na presença de maus tratos infantis. O inverso foi observado quando não existem maus tratos infantis, observando-se um *score* de agressividade mais elevado nos genótipos LL e L1L1. Esta tendência de *scores* de agressividade diferentes de acordo com a presença ou ausência de maus tratos infantis está de acordo com estudos anteriores que têm vindo a mostrar uma associação entre o alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR e uma suscetibilidade ao ambiente, mostrando que os portadores deste alelo são mais suscetíveis a ambientes negativos.

Considerando os dados obtidos, novos estudos para a compreensão da relação entre o polimorfismo 5-HTTLPR e o comportamento agressivo são da maior importância.

Os resultados do estudo do polimorfismo VNTR do gene *MAOA* apresentam uma tendência para um *score* de agressividade superior em genótipos de alta atividade de transcrição, tanto na presença como na ausência de maus tratos infantis no sexo feminino e na presença de maus tratos infantis no sexo masculino. Estes resultados são opostos aos obtidos na maioria dos estudos anteriores. Futuros estudos deverão ter como objetivo compreender o mecanismo de dosagem *MAOA* em indivíduos do sexo feminino.

O principal problema de uma amostra pequena é a falta de poder estatístico (*low statistical power*) o que pode explicar a ausência de resultados estatisticamente significativos no nosso estudo da associação entre os polimorfismos dos genes *5-HTT* e *MAOA* e os níveis de agressividade. De igual forma, o uso de um grupo controlo com indivíduos com comportamentos agressivos comprovados, como o caso de reclusos, seria uma mais-valia para o estudo da interação gene-ambiente e na compreensão da frequência alélica auxiliando futuros estudos de genética comportamental. Estudos longitudinais em diferentes populações

providenciariam dados sobre as influências genéticas e ambientais numa determinada amostra populacional e caso envolvam dados de pais e filhos providenciariam uma valiosa fonte de conhecimento sobre o caráter hereditário da agressividade e outras condutas antissociais.

Propõe-se a realização de estudos sobre a interação gene-ambiente na agressividade numa amostra de grande tamanho que inclua não só os indivíduos mas também os seus pais biológicos, de forma a testar a hereditariedade destes comportamentos. O estudo do seu ambiente e das pressões sociais que influenciam os indivíduos seria igualmente benéfico para aprofundar a relação entre os comportamentos e a influência das normas sociais para ambos os sexos.

## **Bibliografia**



Achenbach, T.M.; Edelbrock, C.S. 1984. Psychopathology of childhood. *Annual Review of Psychology*.**35**:227-256.

Aslund, C.; Nordquist, N.; Comasco, E.; Leppert, J.; Orelund, L.; Nilsson, K. W. 2011. Maltreatment, MAOA, and delinquency: sex differences in gene-environment interaction in a large population-based cohort of adolescents. *Behavior Genetics*.**41**:262 – 272.

Aslund, C.; Comasco, E.; Nordquist, N.; Leppert, J.; Orelund, L.; Nilsson, K. W. 2013. Self-reported family socioeconomic status, the 5-HTTLPR genotype, and delinquent behavior in a community-based adolescent population. *Aggressive Behavior*. **39**:52–63.

Barr, C.S.; Newman, T.K.; Becker, M.L.; Parker, C.C.; Champoux, M.; Lesch, K.P.; Goldman, D.; Soumi, S.; Higley, J.D. 2003. The utility of the non-human primates model for studying gene by environment interactions in behavioral research. *Genes, Brain and Behavior*.**2**:336-340.

Beaver, K.M.; DeLisi, M.; Vaughn, M.G.; Barnes J.C. 2010. Monoamine oxidase A genotype is associated with gang membership and weapon use. *Comprehensive Psychiatry*.**51** (2):130-134.

Beaver, K.M.; Wright, J.P.; Bontwell, B.B.; Barnes, J.C., DeLisi, M.; Vaughn, M.G. 2013. Exploring the association between the 2-repeat allele of the MAOA gene promoter polymorphism and psychopathic personality traits, arrests, incarceration, and life time antisocial behavior. *Personality and Individual Differences*. **54**: 164- 168.

Beitchman, J. H.; Mik, H. M.; Ehteshams, S.; Douglas, L; Kennedy, J. L. 2004. MAOA persistent, pervasive childhood aggression. *Molecular Psychiatry*.**9** (6): 546- 547.

Beitchman, J. H.; Baldassarra, L.; Mij, H.; De Luca, V.; King, N.; Bender, D.; Ehtesham, S.; Kennedy, J. L, 2006. Serotonin transporter polymorphisms and persistent, pervasive childhood aggression. *The American Journal of Psychiatry*.**163** (6): 1103 – 1005.

Blonigen, D.M.; Krueger, R.F. 2006. Human quantitative genetics of aggression *In*: Nelson, R.J. (ed.). *Biology of Aggression*, Oxford University Press, Inc. New York.

Bonvicini, C.; Minelli, A.; Scassellati, C.; Bortolomasi, M.; Segala, M.; Sartori, R.; Giacomuzzi, M.; Gennalli, M. 2010. Serotonin transporter gene polymorphisms and treatment-resistant depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. **34**: 934 - 939.

Brunner, H.G.; Nelen, M.R.; van Zandervoort, P.; Abeling, N.G.G.M.; van Gennip, A.H.; Wolters, E.C.; Kuiper, M.A.; Ropers, H.H.; van Oost, B.B. 1993. X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: Phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *American Journal of Human Genetics*. **52**: 1032 - 1039.

Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A.; Eisenberg, A.; Alle, R. 1991. Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics*. **48**: 137-144.

Buss, D.M. 1995. Psychological sex differences: origins through sexual selection. *American Psychologist*. **5**: 164 - 168.

Cases O.; Seif I.; Grimsby J.; Gaspar P.; Chen K.; Pourin S.; Müller U.; Agnet M.; Babinet C.; Shih J.C.; De Maeyer E. 1995. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*. **268**: 1763- 1766.

Caspi, A.; McClay, 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**: 851-854.

Collier, D.A.; Stöber, G.; Li, T.; Heils, A.; Catalano, M.; Di Bella, D.; Arranz, M.J.; Murray, R.M.; Vallada, H.P.; Bengel, D.; Müller, C.R.; Roberts, G.W.; Smeraldi, E.; Kirov, G.; Sham, P.; Lesch, K.P. 1996. Susceptibility to bipolar affective disorder and unipolar depression is influenced by allelic variation of functional serotonin transporter expression. *Molecular Psychiatry*. **1**: 153-460.

Cook, E.H.; Courchesne, R.; Lord, C.; Cox, N.J.; Yan, S.; Lincoln, A.; Haas, R.; Courchesne, E.; Leventhal, B.L. 1997. Evidence of the linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Molecular Psychiatry*. **2**: 247-250.

Craig, I.W.; Halton, K.E. 2009. Genetics of human aggressive behaviour. *Human Genetics*.**126**: 101 – 113.

De Sancti, V.A.; Nomura, Y.; Newcorn, J.H.; Halperin, J.M. 2012. Childhood maltreatment and conduct disorder: independent predictors of criminal outcomes *in* ADHD youth. *Child Abuse & Neglect*. **36**: 782-789.

Dicionário Língua Portuguesa Contemporânea da Academia das Ciências de Lisboa 2001, Lisboa, Academia das Ciências de Lisboa e Editorial Verbo.

DiLalla, L.F. 2002. Behavior genetics of aggression *in* children: review and future directions. *Developmental Review*.**22** (4): 593 - 622.

Ducci, F.; Enoch, M-A.; Hodgkinsos, C.; Xu, K.; Catena, M.; Robin, R.W.; Goldman, D. 2008. Interaction between a functional MAOA locus and childhood sexual abuse predicts alcoholism and antisocial personality disorder *in* adult women. *Molecular Psychiatry*.**13**: 334 - 347.

Eagly, A.H. 1987. Sex differences *in* social behavior: a social- role interpretation. Hillsdale, New Jersey: Eirlbaum.

Edelbrock, C.; Render, R.; Plomin, R.; Thompson, L.A. 1995. A twin study of competence and problem behavior *in* childhood and early adolescence. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*.**36**: 775 - 785.

Eley, T.C.; Lichtenstein, P.; Stevenson, J. 1999. Sex differences *in* the ethology of aggressive and non - aggressive antisocial behavior: results from two twin studies. *Child Delelopment*.**70**: 155 - 168.

Ehrenkranz, J.; Bliss, E.; Sheard, M. H. 1974. Plasma testosterone: Correlation with aggressive behavior and social dominance *in* man. *Psychosomatic Medicine*.**36**: 669-475.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*.**1**:47-50.

Farrington, D.P. 1993. Motivations for conduct disorder and delinquency. *Development and Psychopathology*.**5**: 225 – 241.

Fergusson, D.M.; Boden, J.M.; Horwood, L.J.; Miller, A.; Kennedy, M.A. 2010. MAOA, abuse exposure and antisocial behavior: 30-year longitudinal study. *The British Journal of Psychiatry*.**198**: 457-463.

Ferris, C.F. 2006. Neuroplasticity and Aggression: an interaction between vasopressin and serotonin. In: Nelson, R.J. (ed.). *Biology of Aggression*, Oxford University Press, Inc. New York.

Ficks, C.A.; Waldman, I.D. 2014. Candidate genes for aggression and antisocial behavior: A meta-analysis of association studies of the 5HTTLPR and MAOA – uVNTR. *Behavioral Genetics*.**44**: 417 – 444.

Gelernter, J.; Kranzler, H.; Cubells, J.P. 1997. Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibrium in African - and European - American and Japanese population and in alcohol - dependent subjects. *Human Genetics*.**101**: 243-246.

Ghodsian - Carpey, J.; Baker, L.A. 1987. Genetic and environmental influences on aggression in 4- to 7-year-old twins. *Aggressive behavior*.**13**: 173 - 186.

Gibbons, A. 2004. Tracking the Evolutionary History of a "Warrior" gene. *Science*.**304**: 818 - 819.

Goodall, J. 1986. *The Chimpanzees of Gombe: Patterns of Behavior*. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press.

Guo, G.; Ou, X-M.; Roettger, M.; Shih, J.C. 2008, The VNTR 2 repeat in MAOA and delinquent behavior in adolescence and young adulthood: associations and MAOA promoter activity. *European Journal of Human Genetics*.**16**: 626-634.

Haberstick, B.C.; Smolen, A.; Hewitt, J.K. 2006. Family-based association test of the 5HTTLPR and aggressive behaviour in a general population sample of children. *Biological Psychiatry*.**59** (9): 836- 843.

Haberstick, B. C.; Smolen, A.; Williams, R. B.; Bishop, G.D.; Foshee, V. A.; Thornberry, T.P.; Conger, R.; Siegler, I.C.; Zhang, X.; Boardman, J.D.; Frajzngier, Z.; Stallings, M.C.; Donnellan, M.B.; Halpern, C.T.; Harris, K.M. 2015. Population frequencies of the triallelic 5HTTLPR in six ethnically diverse samples from North America, Southeast Asia and Africa. *Behavior Genetics*.**45** (2): 255 – 261.

Heils, A.; Teufel, A.; Petri, S.; Stober, G.; Riederer P.; Bengel, D.; Lesch, K.P. 1996. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of Neurochemistry*.**66** (6): 2621 – 2624.

Hotamisligil, G.S.; Breakefield, X.O. 1991. Human monamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *American Journal of Human Genetics*.**49** (2): 383- 392.

Hu, X.; Lipsky, R.H.; Zhu, G.; Akhtar, L.A.; Taubman, J.; Greenberg, B.D.; Xu, K.; Arnold, P.D.; Ritcher, M.A.; Kennedy, J.L.; Murphy, D.L.; Goldman, D. 2006. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive- compulsive disorder. *American Journal of Human Genetics*.**75**: 815-826.

Hunter, P. 2010. The psycho gene. *European Molecular Biology Organization*.**11** (9): 667 - 669.

Huntingford, F.A.; Turner, A.K. 1987. *Animal Conflict*. New York: Chapman & Hall.

Junior, C.P.C.; Terracciano, A.; McCrae, R. 2001. Gender differences in personality traits across cultures: robust and surprising findings. *Journal of Personality and Social Psychology*.**81** (1): 322 - 331.

Kim – Cohen, J.; Caspi, A.; Taylor, A; Williams, B.; Newcombe, R; Craig, I. W.; Moffitt, T.E. 2006. MAOA, maltreatment, and gene – environment interaction predicting children’s mental health: new evidence and a meta – analysis. *Molecular Psychiatry*.**11**: 903 – 913.

Klauck, S.M.; Poustka, F.; Benner, A.; Lesch, K.P.; Poustka, A. 1997. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Human Molecular Genetics*.**6**: 2233-2238.

Kreuz, L.E.; Rose, R. M. 1972. Assessment of aggressive behavior and plasma testosterone *in* young criminal population. *Psychosomatic Medicine*.**34**: 331-332.

Landaas, E.T.; Johansson, S.; Jacobsson, K.K.; Ribasés, M.; Bosch, R.; Sánchez-Mora, C.; Jacob, C.P.; Boreatti-Hümmer, A.; Kreiker, S.; Lesch, K.P.; Kiemenev, L.A.; Kooij, J.J.S.; Kan, C.; Buitelaar, J.K.; Faraone, S.V.; Halmøy, A.; Ramos-Quiroga, J.A.; Cormand, B.; Reif, A.; Franke, B.; Mick, E.; Knappskog, P.M.; Haavik, J. 2010. An International multicentre association study of the serotonin transporter gene *in* persistent ADHD. *Genes, Brain and Behavior*.**9** (5): 449-458.

Larson, C.L.; Taubitz, L.E.; Robinson, J.S. 2010. MAOA T941G polymorphism and the time course of emotional recovery following unpleasant pictures. *Psychophysiology*.**47**: 857-862.

Lesch, K.P.; Bengel, D.; Heils, A.; Sabol, S.Z.; Greenberg, B.D.; Petri, S.; Benjamin, J.; Müller, C.R.; Hamer, D.; Murphy, D.L. 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism *in* the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*.**274**: 1527-1531.

Lesch, K.P.; Meyer, J.; Glatz, K.; Flügge, G.; Hinny, A.; Hebebrand, J.; Klauck, S.M.; Poustka, F.; Bengel, D.; Mössner, R.; Riederer, P.; Heiles, A. 1997. The 5-HT transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) *in* evolutionary perspective: alternative biallelic variation *in* rhesus monkeys. *Journal of Neural Transmission*.**104**: 1259-1266.

Li, T.; Holmes, C.; Sham, P.C.; Vallada, H.; Birkett, J.; Kirov, G.; Lesch, K.P.; Powell, J.; Lovestone, S.; Collier, D. 1997. Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor of a late-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*.**8**: 683-686.

Lorenz, K. 1966. *On aggression*. London: Methuen.

Magalhães, T. 2010. *Violência e Abuso, respostas simples para questões complexas*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.

Manuck, S. B.; Flory, J. D.; Ferrel, R. E.; Mann, J.J.; Muldoon, M. F. 2000. A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with

variability *in* aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity. *Psychiatry Research*.**95** (1): 9 – 23.

Manuck, S.B.; Kaplan, J.R.; Lotrich, F.E. 2006. Brain Serotonin and Aggressive Disposition *in* Humans and Nonhumans primates. *In*: Nelson, R.J. (ed.) *Biology of Aggression*, Oxford University Press, Inc. New York.

McDermott, R.; Tingley, D.; Cowden, J.; Frazzetto, G.; Johnson, D.D.P. 2009. Monoamine oxidase A gene (MAOA) predicts behavioral aggression following provocation. *PNAS*.**106** (7): 2118 - 2123.

McElroy, S.L.; Scutullo, C.A.; Beckman, D.A.; Taylor, P.; Keck, P.E. 1998. DSM-IV intermittent explosive disorder: A report of 27 cases. *Journal of Clinical Psychiatry*. **54**: 203 - 210.

Meyer – Bahlburg, H.F.; Boon, D.A.; Sharma, M.; Edwards, F.A. 1974. Aggressiveness and testosterone measures *in* man. *Psychosomatic Medicine*.**36**: 269 – 274.

Meyer - Lindenberg, A.; Buckholtz, J.W.; Kolachana. B.; Hariri, A.R.; Pezawas, L.; Blasi, G.; Wabnitz, A.; Honea, R.; Verchinsky, B.; Callicott, J.H.; Egan, M.; Mattay, V.; Weinberger, D.R. 2006. Neural mechanisms of genetic risk for impulsivity and violence *in* humans. *PNAS*.**103** (16): 6269 - 6274.

Moffitt, T.E.; Caspi, A.; Rutter, M.; Silva, P.A. 2001. *Sex differences in anti-social behavior: conduct disorder, delinquency and violence in the Dunedin Longitudinal Study*. Cambridge University Press, Cambridge.

Moyer, K.E. 1968. Kinds of aggression and their physiological basis. *Communications in Behavioral Biology*. Part A, **2**: 65-87.

Pombo, S.; De Quinhoses Levi, P.; Bicho, M.; Barbosa, A.; Ismail, F.; Cardoso, N. 2008. Associação entre o polimorfismo funcional do promotor ligado ao transportador de serotonina (5- HTTLPR) agressividade externalizada e internalizada e abuso de álcool. *Acta Médica Portuguesa*.**21**:539-546.

Raine, A. 2008. From genes to brain to antisocial behavior. *Current Directions in Psychological Science*.**17**: 232-328.

Reif, A.; Rösler, M.; Freitag, C.M.; Scheneider, M.; Eujen, A.; Kissling, C.; Wenzler, D.; Jacob, C.P.; Retz- Junginger, P.; Thome, J.; Lech, K.; Retz, W. 2007. Nature and nurture predispose to violent behavior: serotonergic genes and adverse childhood environment. *Neuropsychopharmacology*. **32**, 2375 - 2383.

Rose, R.J.; Dick, D.M. 2004. Gene-environment interplay in adolescent drinking behavior. *Alcohol Research & Health*.**28** (4): 222-229.

Sabol, S.Z.; Hu, S.; Hamer, D. 1998. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human Genetics*.**103**: 273-279.

Sakai, J. T.; Young, S. E.; Stallings, M.C.; Timberlake, D.; Smolen, A.; Stetler, G. L.; Crowley, T.J. 2006. Case – control and within-family test for an association between conduct disorder and 5HTTLPR. *American Journal of Medical Genetics Part B*. **141B**:825 – 832.

Sakai, J.T.; Lessem, J.M.; Haberstick, B.C.; Hopfer, C.J.; Smolen, A.; Ehringer, M.A.; Timberlake, D.; Hewitt, J.K. 2007. Case-control and within-family tests for association between 5HTTLPR and conduct problems in a longitudinal adolescent sample. *Psychiatric Genetics*.**17**:207–214.

Sander, T.; Harms, H.; Dufeu, P.; Kuhn, S.; Hoebe, M.; Lesch, K.P.; Schmidt, L.G. 1998. Serotonin transporter gene variants in alcohol-dependent subjects with dissocial personality disorder. *Biological Psychiatry*.**42** (12): 908-912.

Shih, J.C.; Thompson, R.F. 1999. Monoamine Oxidase in neuropsychiatry and behavior. *American Journal of Human Genetics*.**65** (3): 593-598.

Sjöberg, R. L.; Nilsson, K.W.; Wargelius, H.L; Leppert, J.; Lindström, L.; Oreland, L. 2007. Adolescent girls and criminal activity: role of MAOA-LPR genotype and psychosocial factors. *American Journal of Medical Genetics*. **144B** (2): 159 - 164.

Sjöberg R. L.; Ducci F.;Barr C.S.; Newman T.K.; Dell'Osso L.; Virkkunen M.; Goldman D. 2008. A non- additive interaction of a functional MAO- A VNTR and Testosterone predicts antisocial behavior. *Neuropsychopharmacology*.**33** (2): 425 - 430.

Tremblay, R.E.; Hartup, W.W.; Archer, J. 2005. *Developmental origins of aggression*. Guildford Press, New York.

van Ijzendoorn, M. H.; Belsky, J.; Bakermans-Kranenburg, M. J. 2012. Serotonin transporter genotype 5HTTLPR as a marker of differential susceptibility? A meta-analysis of child and adolescent gene-by-environment studies. *Translational Psychiatry*.**2**:e147.

Vassos, E.; Collier, D. A.; Fazel, S. 2013. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies of violence and aggression. *Molecular Psychiatry*.**19**: 471- 477.

Videira, A. (ed). 2011. *Engenharia Genética: princípios e aplicações*. 2ª Ed. Lidel. Lisboa.

Wendland, L.R.; Martin, B.J.; Kruse, M.R.; Lesch K.P.; Murphy, D.L. 2006. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Molecular Psychiatry*.**11** (3): 224 – 226.

Widom, C.S.; Brzustowics, L.M. 2006. MAOA and the “Cycle of Violence:” Childhood abuse and neglect, MAOA genotype and risk for violent and antisocial behavior. *Biological Psychiatry*.**60**: 684 – 689.

Wilson, M.; Daly, M. 1985. Competitiveness, risk-taking, and violence – the Young Male Syndrome. *Ethology and Sociobiology*.**65**: 59 – 73.

Wilson, M.L.; Wrangham, R.W. 2003. Intergroup relations in Chimpanzees. *Annual Review of Anthropology*.**32**: 363-392.

Wingfield, J.C.; Moore, I.T.; Goymann, W.; Wacker, D.W.; Sperry, T. 2006. Contexts and Ethology of Vertebrate Aggression: Implications for the evolution of hormone – behavior interactions. In: Nelson, R.J. (ed.), *Biology of Aggression*, Oxford University Press, Inc. New York.

Wrangham, R.W.; Peterson, D. 1996. *Demonic Males: Apes and the origins of human violence*. New York: Houghton Mifflins Company.



## APÊNDICE I



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Projeto de Investigação: Estudo de variantes genéticas associadas a comportamentos violentos.

Código: \_\_\_\_\_

### Inquérito

Este inquérito faz parte de um estudo científico realizado no âmbito de uma dissertação do Mestrado em Evolução e Biologia Humanas da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Pretende-se investigar a possível relação entre a expressão dos genes Monoamina Oxidase A (MAOA) e Transportador da Serotonina (SLC6A4) e comportamentos violentos, considerando também a influência de eventuais maus tratos infantis.

Relembra-se que o inquérito é ANÓNIMO e solicita-se o seu preenchimento de forma completa e verdadeira.

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Naturalidade (Concelho/Distrito): \_\_\_\_\_.

Por favor classifique as seguintes questões consoante a chave que mais se adequa quanto à sua frequência **nos últimos doze meses:**

0= nunca;

1= uma ou duas vezes;

2= três ou quatro vezes;

3= cinco ou mais vezes;

1) Pratica ou praticou algum tipo de desporto de contacto (boxe; karaté; etc)? \_\_\_\_.

2) Alguma vez entrou numa casa ou edifício para roubar algo? \_\_\_\_.

3) Vende ou vendeu marijuana ou outras drogas? \_\_\_\_.

3.1) Caso classifique a última questão com a cotação 3, indique aproximadamente quantas vezes?\_\_\_\_\_.

4) Após os seus 18 anos participou em algum tipo de luta física com alguma gravidade (que inclua danos físicos sérios)? \_\_\_\_.

5) Alguma vez magoou alguém de forma grave o suficiente para necessitar de cuidado médico? \_\_\_\_.

6) Usou ou ameaçou usar uma arma branca para retirar algo a alguém? \_\_\_\_.

7) Participou numa luta em que um grupo dos seus colegas se encontrava contra outro grupo? \_\_\_\_.

8) Roubou algo de valor superior a 50 euros? \_\_\_\_.

9) Tem ou teve interação com as autoridades relativamente a episódios de violência que o/a envolvessem diretamente? \_\_\_\_.

Responda às seguintes questões relativamente à sua infância, o esquema de classificação mantém-se, no entanto, **o período de doze meses não se aplica:**

10) Durante a sua infância foi vítima de abusos verbais pelos seus colegas e/ou familiares? \_\_\_\_.

11) Durante a sua infância sofreu algum tipo de maus tratos físicos pelos seus colegas e/ou pais? \_\_\_\_.

12) Durante a sua infância sofreu algum tipo de abuso sexual? \_\_\_\_.

13) Durante a sua adolescência (10 aos 18 anos) pintou grafitis ou sinais na propriedade de outrem ou num local público? \_\_\_\_.

14) Durante a sua adolescência danificou de forma deliberada a propriedade que não lhe pertencia? \_\_\_\_.

15) Durante a sua adolescência roubou algum objeto com o valor inferior a 50 euros? \_\_\_\_.

Obrigado pela sua participação!

## APÊNDICE II

### CONSENTIMENTO INFORMADO

O presente formulário de Consentimento Informado diz respeito ao trabalho de investigação “Relação entre o gene MAOA e comportamentos agressivos numa amostra populacional Portuguesa” realizado no âmbito de uma dissertação do Mestrado em Evolução e Biologia Humanas da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Neste estudo, pretende-se investigar a relação entre o gene Monoamina Oxidase A (MAOA) e o Transportador da Serotonina (SLC6A4) e comportamentos classificados como agressivos ou violentos.

Solicita-se a sua colaboração no referido estudo para:

- Resposta a um inquérito anónimo;
- Recolha de uma amostra de células bucais para extração de ADN.

A participação no estudo é voluntária, pelo que tem o direito de recusar colaborar e/ou interromper a sua participação no estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer consequência para si. Os dados obtidos serão utilizados exclusivamente no âmbito desta investigação, pelo que garantimos a sua confidencialidade e anonimato. Caso aceite colaborar no estudo, agradecemos que assine o presente termo de consentimento.

Colocamo-nos à sua inteira disposição para esclarecer qualquer dúvida ou informação mais detalhada pelo telefone nº 239854105 do Departamento de Ciências da Vida da FCTUC, ou por e-mail para [sofiawas@antrop.uc.pt](mailto:sofiawas@antrop.uc.pt).

Obrigada pela sua colaboração.



--

### CONSENTIMENTO INFORMADO

Aceito de livre vontade submeter-me a uma recolha de células do epitélio bucal destinada ao projeto de mestrado em Evolução e Biologia Humanas: "**Estudo de variantes genéticas associadas a comportamentos violentos**" da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Aceito igualmente responder a um inquérito anónimo.

Os resultados do estudo serão utilizados para fins estritamente científicos, divulgação em Congressos ou Conferências e publicação em revistas científicas, nacionais e/ou internacionais.

Em momento algum será divulgada a minha identidade no âmbito do projeto.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **APÊNDICE III**

### **EXTRACÇÃO DE ADN/DNA COM FavorPrep™ GENOMIC DNA MINI KIT (FAVORGEN)**

**- CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL-**

#### **PASSO 1 : LISE**

1. Colher células da mucosa bucal com zaragatoa/escova.
2. Suspender em 1ml de dH<sub>2</sub>O (num tubo de 1,5ml).
3. Centrifugar a 10.000 rpm (rotações por minuto) durante 3 minutos.
4. Eliminar sobrenadante.
5. Adicionar 200µl de *FABG Buffer*. Vortex (5 a 10 segundos).
6. Adicionar 20 µl de *Prorteinase K*; 56 °C, durante 1h.

#### **PASSO 2: BINDING**

1. Adicionar 200µl de Etanol (96-100%). Vortex 10 seg.
2. Colocar coluna FABG em tubo de 2 ml. Transferir a mistura para a coluna. Centrifugar 5 min a 12.000 rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna.

#### **PASSO 3 : LAVAGEM**

1. Adicionar à coluna 400 µl de *W1 Buffer*. Centrifugar 1 min a 12.000 rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna.
2. Adicionar à coluna 600 µl de *Wash Buffer*. Centrifugar 1 min a 12.000 rpm. Esvaziar o tubo e recolocar coluna.
3. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.

#### **PASSO 4 : ELUIÇÃO**

1. Transferir coluna *FABG* para o tubo colector de 1,5 ml.
2. Adicionar 50 µl de *Elution Buffer* à coluna (colocar cuidadosamente no centro da membrana) para recolha de DNA/ADN.
3. Centrifugar 1 min a 12.000 rpm.
4. Guardar DNA/ADN a 4°C ou -10°C.

## APÊNDICE IV

**Visualização das bandas em géis de poliacrilamida após digestão com enzimas de restrição. De acordo com Budowle al., 1991.**

- 1. Etanol 10%, em agitação durante 10 minutos;
- 2. Ácido nítrico 1%, em agitação durante 5 minutos;
- 3. Água destilada, duas vezes durante 30 segundos;
- 4. Nitrato de prata 0,2%, em agitação durante 20 minutos;
- 5. Água destilada, duas vezes durante 30 segundos;
- 6. Carbonato de sódio 3% (100ml) e formaldeído 37% (20µl), em agitação durante 2 a 5 minutos;
- 7. Repetir passo 6 duas vezes.
- 8. Ácido acético 10%, durante 30 segundos (paragem da reação);
- 9. Lavagem com água destilada.