

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

CLARISSA RIBEIRO BASTOS

**EFEITO DE VARIAÇÕES NOS CANAIS DE CÁLCIO NA SUSCEPTIBILIDADE AO
TRANSTORNO BIPOLAR:**

um estudo baseado em diferentes abordagens da genética psiquiátrica

PELOTAS,
2021.

CLARISSA RIBEIRO BASTOS

**EFEITO DE VARIAÇÕES NOS CANAIS DE CÁLCIO NA SUSCEPTIBILIDADE AO
TRANSTORNO BIPOLAR:
um estudo baseado em diferentes abordagens da genética psiquiátrica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde e Comportamento.

Orientador: Prof. Dra. Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Coorientador: Prof. Dra. Luciana Tovo Rodrigues

PELOTAS,

2021

Catalogação da Publicação

Ficha elaborada a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da UCPEL: Cristiane de Freitas Chim CRB 10/1233

Bastos, Clarissa Ribeiro

Efeito de variações nos canais de cálcio na susceptibilidade ao transtorno bipolar: um estudo baseado em diferentes abordagens da genética psiquiátrica / Clarissa Ribeiro Bastos. - Pelotas: UCPEL, 2021.

154 f.

Orientadora: Gabriele Cordenonzi Ghisleni
Tese (doutorado) - Universidade Católica de Pelotas,
Programa de Pós-Graduação em Saúde e comportamento. -
Pelotas, BR-RS, 2021.

1. transtorno bipolar. 2. CACNAIC. 3. interação gene x ambiente.4. endofenótipos. 5. BDNF. I. Ghisleni, Gabriele Cordenonzi, orient. II.Título.

**EFEITO DE VARIAÇÕES NOS CANAIS DE CÁLCIO NA
SUSCEPTIBILIDADE AO TRANSTORNO BIPOLAR:
UM ESTUDO BASEADO EM DIFERENTES ABORDAGENS DA
GENÉTICA PSIQUIÁTRICA**

Conceito final: _____

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Manuella Pinto Kaster

Prof. Dr. Hudson Wander de Carvalho

Prof.^a Dr.^a Karen Jansen

Prof.^a Dr.^a Luciana Tovo Rodrigues

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

DEDICATÓRIA:

*Aos meus pais Alexandre Bastos e Clarice Bastos,
a minha irmã Flúvia Bastos e ao meu noivo Lucas
Kiesow pelo apoio e amor incondicional durante
essa trajetória. Ao meu sobrinho Nicolas por toda
luz que trouxe com a sua chegada.*

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são uma das partes mais bonitas e talvez uma das mais difíceis. Isso porque a vida foi generosa e tive a honra de compartilhar esse caminho com inúmeras pessoas maravilhosas, e qualquer coisa escrita aqui não fará jus a gratidão que tenho por elas. Primeiramente, quero agradecer a Deus, por permitir que eu chegassem até aqui e por todos os anjos que colocou no meu caminho para alegrar essa jornada e tornar tudo isso possível!

Agradeço a minha base! Mãe, Pai e Mana, vocês são os meus maiores incentivadores, nunca mediram esforços para me ajudar! Obrigado por sempre estarem ao meu lado, por todo amor, carinho e dedicação, vocês com certeza são o motivo de eu chegar até aqui! Agradeço ao novo integrante da família, meu sobrinho Nicolas, que chegou a poucos dias, na fase turbulenta de finalização da tese, e fez uma diferença enorme, deixando tudo mais leve e bonito. Agradeço ao meu noivo, por toda fé que deposita em mim, por ser um grande incentivador, e não medir esforços para tornar tudo mais leve, obrigado por toda atenção, carinho e cuidado. Tu és uma parte essencial dessa conquista. Te amo! Agradeço ao meu cunhado, por todos os momentos divertidos e por todas as boas risadas.

Agradeço a minha sogra, por ser uma pessoa incrível, e me tratar como uma princesa! Obrigado pelos melhores cafés, cheios de carinho e cuidado. Agradeço ao meu sogro, que infelizmente não está mais conosco, mas que sempre me tratou com todo carinho do mundo, obrigado pelos chocolates que sempre adoçavam os domingos e por todas as risadas gostosas.

A minha família que está sempre torcendo por mim, aqui faço uma menção especial as minhas tias Maria Cristina e Marta, que sempre foram amantes da educação e sempre vibraram muito as minhas conquistas como se fossem delas, obrigado tias! Eu amo muito vocês! Aos meus pequenos por toda a luz que trazem para minha vida! Aos meus amigos, responsáveis por manter a minha sanidade e tornar minha vida muito mais feliz! Aos meus bichinhos que sempre me acompanharam na hora da escrita, me dando todo amor.

Ao Laboratório de Neurociências, que tive a honra de fazer parte por 8 anos. Aos professores e alunos que me ensinaram tanto. As amizades, que vou guardar para o resto da vida. Pam, Jana, Bertha, Lala, Ana, Fer, vocês são incríveis e só tenho gratidão pela vida nos ter apresentado! Obrigado por todos os ensinamentos, por toda a ajuda, por todas as risadas e momentos que vão ficar guardados sempre. Agradeço a minha orientadora por todos os excelentes anos de convívio, por todos os ensinamentos e por sempre topar as minhas invenções! Obrigado Bibi pela orientação, amizade e parceria incrível nesses anos! Te admiro muito e tenho muita honra em ter sido tua orientanda. A minha coorientadora, Luciana Tovo

Rodrigues, por todo apoio e ensinamentos! Lu, tu és uma mulher incrível, e sem dúvida essencial para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado!

Por fim, gostaria de agradecer a Universidade Católica de Pelotas, ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

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

Albert Einstein

RESUMO

O transtorno bipolar (TB) é uma doença crônica que afeta cerca de 60 milhões de pessoas no mundo, sendo considerada uma das principais causas de incapacidade global. A etiologia do TB é incerta, mas fortes evidências apoiam a hipótese de que ele pode ocorrer pelo menos em parte devido a disfunções nos canais de cálcio. Essas disfunções podem provocar variações na homeostase de cálcio intracelular, levando a uma gama de alterações fisiológicas. De fato, polimorfismos no gene que codifica a subunidade alfa 1C dos canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L (*CACNA1C*) são um dos achados mais consistentes na genética psiquiátrica. A proteína codificada por esse gene é responsável por formar os poros dos canais de cálcio conhecidos como $\text{Ca}_v1.2$, através dos quais ocorre o influxo de cálcio na célula e ativação de um complexo programa de expressão gênica que resulta na transcrição do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) rs1006737 e rs4765913 localizados no ítron 3 do gene *CACNA1C* parecem provocar alterações na expressão dos $\text{Ca}_v1.2$ e dessa forma contribuir para vulnerabilidade ao TB. No entanto, os achados são díspares e maiores investigações sobre estes SNPs devem ser realizadas a fim de compreender seu efeito no transtorno e os fatores que podem influenciar sua ação. Por isso, o objetivo deste trabalho foi utilizar diferentes abordagens da genética psiquiátrica para verificar não só o efeito direto desses SNPs no TB, mas também seu efeito mediado por traços temperamentais e moderado pelo trauma na infância. Além disso, verificamos a capacidade dos SNPs em alterar os níveis séricos de BDNF, independente do diagnóstico. A fim de cumprir tais objetivos desenvolvemos três artigos científicos. Os dados para suas execuções foram obtidos de um estudo transversal de base populacional que avaliou jovens adultos de 18 a 35 anos residentes da cidade de Pelotas/RS. O diagnóstico do TB foi realizado pela entrevista *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI 5.0), o trauma na infância avaliado pelo *Childhood Trauma Questionnaire* (CTQ) e o temperamento pela escala *Affective and Emotional Composite Temperament Scale* (AFFECTS). Para as análises biológicas, 15 ml de sangue foram coletados por punção venosa e processados para posterior dosagem dos níveis séricos de BDNF pelo método ELISA e genotipagem dos SNPs por PCR em tempo real. O programa Haplovview foi utilizado para avaliar o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos (D') e as frequências haplotípicas foram determinadas pelo programa UNPHASED 3.1.7. As análises estatísticas foram realizadas no SPSS 22.0. O primeiro artigo desenvolvido avaliou o impacto do trauma na infância na associação entre SNPs no gene *CACNA1C* e o TB, revelando que o trauma modificou o efeito do polimorfismo rs4765913 e do haplótipo AA (rs1006737 - rs4765913). Portadores do alelo A ou do haplótipo AA expostos ao trauma infantil tiveram maior probabilidade de desenvolver o transtorno em comparação com indivíduos sem risco genético. O segundo artigo verificou se os traços de temperamento emocionais mediavam a relação entre os SNPs descritos e o TB, e demonstrou que os escores de vontade, raiva e cautela explicavam uma importante porcentagem da relação entre o haplótipo AA e o transtorno em mulheres. O terceiro artigo buscou avaliar o papel desses SNPs nos níveis séricos de BDNF, e revelou que mulheres portadoras do alelo A do SNP rs4765913 e do haplótipo AA tiveram menores níveis de BDNF, enquanto nos homens esses níveis foram aumentados. Essas evidências foram fortalecidas por análises *in silico* que identificaram diferentes marcas epigenéticas para esses polimorfismos no cérebro fetal masculino e feminino. Tomados em conjunto esses achados fortalecem o corpo de evidências que vincula o gene *CACNA1C* ao TB e atenta para o papel diferencial dessas variações genéticas de acordo com o sexo.

Palavras-chave: Transtorno bipolar; *CACNA1C*; trauma na infância; temperamento; BDNF; SNPs.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a severe chronic disorder that affects about 60 million people worldwide and is considered one of the leading causes of global disability. The etiology of BD is uncertain, but strong evidence has supported the hypothesis that it may occur, at least in part, due to calcium channel dysfunction. These dysfunctions may cause changes in intracellular calcium homeostasis leading to several physiological changes. Indeed, polymorphisms in the gene that encodes voltage-dependent calcium channel L-type alpha-1C subunit (*CACNA1C*) are one of the most consistent findings in psychiatric genetics. The protein encoded by this gene is responsible for forming the pores of $\text{Ca}_v1.2$ calcium channels, through which calcium influx occurs in the cell and activates a gene expression complex program that results in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcription. The rs1006737 and rs4765913 polymorphisms located in intron 3 of the *CACNA1C* gene seem to cause changes in $\text{Ca}_v1.2$ expression and thus contribute to vulnerability to the disorder. However, the findings are disparate and further investigations on these polymorphisms should be performed in order to understand their effect on the disorder and the factors that may influence its action. Therefore, the aim of this study is to use different approaches of psychiatric genetics to verify not only the direct effect of these polymorphisms on the disorder but also their effect mediated by temperament traits and moderated by childhood trauma. Moreover, we will verify whether these polymorphisms can alter serum BDNF levels. In order to perform these objectives, we developed three scientific articles. Data for their executions were obtained from a cross-sectional population-based study that evaluated young adults aged 18 to 35 years living in the city of Pelotas/RS. The BD diagnosis was performed using the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI 5.0), childhood trauma was assessed by the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ), and temperament by the Affective and Emotional Composite Temperament Scale (AFFECTS). For biological analysis, 15 ml of blood were collected by venipuncture and processed for subsequent serum BDNF levels measurement by the ELISA method, and real-time PCR for polymorphisms genotyping. The Haploview program was used to evaluate the linkage disequilibrium between polymorphisms (D'), and haplotypic frequencies were determined by the UNPHASED 3.1.7 program. The study was approved by the ethics committee of the Catholic University of Pelotas (2010/15). Statistical analyses were performed using SPSS 22.0. The first article evaluated the impact of childhood trauma on the association between *CACNA1C* SNPs and BD, showing that trauma modified the effect of the rs4765913 SNP and the AA haplotype (rs1006737 - rs4765913). Carriers of A allele or the AA haplotype exposed to childhood trauma were more likely to develop the disorder compared to individuals without genetic risk. The second article examined whether emotional temperament traits mediated the relationship between the SNPs and BD, and identified that volition, anger, and caution scores explained an important percentage of the relationship between the AA haplotype and BD in women. The third article sought to assess the role of these SNPs in serum BDNF levels and revealed that women carrying the A allele of rs4765913 SNP and the AA haplotype had lower BDNF levels, while in men these levels were increased. This evidence was strengthened by *in silico* analyses that identified different epigenetic markers for these SNPs in the male and female fetal brain. Taken together, these findings strengthen the body of evidence that links the *CACNA1C* gene to BD and revealed the differential role of these genetic variations according to sex.

Keywords: Bipolar disorder; *CACNA1C*; childhood trauma; temperament; BDNF, SNPs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenil ciclase
ACh	Acetilcolina
AFECTS	Escala de Temperamento Composto Afetivo e Emocional
AMP cíclico	Monofosfato de Adenosina Cíclico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
Ca ²⁺	Íon cálcio
CACNA1C gene	Gene que codifica a subunidade alfa 1C dos canais de cálcio dependente de voltagem
CACNA1D gene	Gene que codifica a subunidade alfa 1D dos canais de cálcio dependente de voltagem
CACNA1F gene	Gene que codifica a subunidade alfa 1F dos canais de cálcio dependente de voltagem
CACNA1S gene	Gene que codifica a subunidade alfa1 S dos canais de cálcio dependente de voltagem
CaM	Calmodulina
CaMK II	Proteína quinase II dependente de Ca ²⁺ /calmodulina
CAMK IV	Proteína quinase IV dependente de Ca ²⁺ /calmodulina
Ca _v	Canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca _v 1	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CID-10	10 ^a revisão da Classificação Internacional de Doenças
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
QUESI	Questionário de Trauma na infância
DAG	Diacilglicerol
DGKH	DAG quinase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ELISA	Ensaio Imuno Adsorvente ligado à enzima
GSK-3β	Glicogênio sintase-cinase 3β
GWAS	Estudos de associação ampla do genoma
HVA	Canais ativados por alta voltagem
IMPase	Inositol monofosfatase
IP1	Inositol monofosfato
IP3	1,4,5-trifosfato de inositol
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kb	Kilobases

LVA	Canais ativados por baixa voltagem
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MINI	Mini Internacional Neuropsychiatric Interview
mRNA	RNA mensageiro
NE	Noradrenalina
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGC	Consórcio de Genômica Psiquiátrica
PIP2	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PyK2	Tirosina cinase 2
ROCs	Canais operados por receptor
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SOCs	Canais de cálcio operados por depósitos intracelulares
TB	Transtorno Bipolar
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
UCPel	Universidade Católica de Pelotas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Projeto

Figura 1.	Mecanismos de ação do lítio e valproato.....	26
Figura 2.	Estrutura dos canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem	29
Figura 3.	Distribuição de subtipos de Ca _v em diferentes tipos de células.....	30
Figura 4.	Cascatas de sinalização ativadas pela entrada de Ca ²⁺ nos Ca _v 1.2.....	32
Figura 5.	Abordagens da pesquisa em genética psiquiátrica.....	36
Figura 6.	Fluxograma com as etapas para definição do número amostral.....	42

Artigo 1

Figure 1.	How exposure to childhood trauma modifies the effect of <i>CACNA1C</i> genotypes/haplotype on BD.	66
-----------	--	----

Artigo 2

Figure 1.	Path diagram for a mediation model	98
Figure 2.	Temperament traits according to <i>CACNA1C</i> genotypes/haplotype in women.....	99
Figure 3.	Temperament traits mediate the relationship between <i>CACNA1C</i> SNPs and the BD.....	100
Figure S1.	Temperament traits according to <i>CACNA1C</i> genotypes/haplotype in men.	101

Artigo 3

Figure 1.	Violin plot analysis comparing the BDNF serum levels according to <i>CACNA1C</i> genotypes/haplotype stratified for sex.....	125
Figure S1	Linkage disequilibrium (LD) plot generated using Haplovie 4.2.....	135

Considerações Finais

Figure 1.	Compilado dos principais resultados discutidos nesse volume	137
-----------	---	-----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Projeto

Tabela 1.	Descritores utilizados para busca bibliográfica.....	23
Tabela 2.	Gene e SNPs selecionados através da busca na base de dados PGC	44
Quadro 1.	Cronograma.....	48
Quadro 2.	Orçamento.....	49

Artigo 1

Table 1.	Characteristics of participants according to the variables of interest.....	64
Table 2.	Interaction model between <i>CACNA1C</i> gene and childhood trauma in BD...	65
Table S1	Clinical characteristics of the sample according to the diagnosis of BD...	69
Table S2.	Binary logistic regression showing OR values for BD in each genotype/haplotype evaluated according to childhood trauma.....	70

Artigo 2

Table 1.	Characteristics of participants according to the Bipolar Disorder diagnosis.	97
----------	--	----

Artigo 3

Table 1.	Descriptive characteristics of participants.....	122
Table 2.	Linear regression analysis between polymorphisms in the <i>CACNA1C</i> gene and serum BDNF levels.....	123
Table 3.	Single nucleotide polymorphisms (SNPs) regulatory information available in Haploreg v4.1.....	124
Table S1.	Data obtained by the GWAS Catalog for the 92 SNPs identified in this study, significance threshold ($p < 2 \times 10^{-6}$).....	126
Table S2.	Regulatory sites available for the eighteen SNPs in <i>CACNA1C</i> locus in brain tissues using HaploReg v4.1.....	128

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	16
PROJETO	
1 IDENTIFICAÇÃO.....	18
1.1 TÍTULO	18
1.2 DOUTORANDA.....	18
1.3 ORIENTADOR	18
1.4 INSTITUIÇÃO	18
1.5 CURSO	18
1.6 LINHA DE PESQUISA	18
1.7 DATA	18
2 INTRODUÇÃO	19
3 OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESES.....	21
3.2.1 Artigo 1.....	21
3.2.2 Artigo 2.....	21
3.2.3 Artigo 3.....	22
4 REVISÃO DE LITERATURA	23
4.1 DESCRIPTORES.....	23
4.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
4.2.1 Transtorno Bipolar: Caracterização e epidemiologia.....	24
4.2.2 Cálcio e canais de cálcio	27
4.2.3 Canais de cálcio do tipo L.....	31
4.2.4 Genética do TB.....	33
4.2.5 Abordagens da genética psiquiátrica.....	36
5 MÉTODOS.....	41
5.1 DELINEAMENTO	41
5.2 PARTICIPANTES	41
5.2.1 Cálculo amostral.....	41
5.2.2 Critérios de inclusão.....	42
5.2.3 Critérios de exclusão.....	42

5.3 PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS.....	42
5.3.1 Caracterização da amostra.....	42
5.3.2 Critérios diagnósticos e medidas psicológicas.....	43
5.3.2.1 Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI).....	43
5.3.2.2 Childhood Trauma Questionnaire (CTQ).....	43
5.3.2.3 Affective and Emotional Composite Temperament Scale (AFECTS).....	43
5.3.3 Coleta de material biológico.....	44
5.3.4 Seleção dos polimorfismos.....	44
5.3.5 Análise dos polimorfismos.....	44
5.3.6 Dosagem do BDNF.....	45
5.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS.....	45
5.4.1 Artigo 1.....	45
5.4.2 Artigo 2.....	46
5.4.2 Artigo 3.....	46
5.5 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>.....	46
5.6 ASPECTOS ÉTICOS	47
5.6.1 Riscos.....	47
5.6.2 Benefícios.....	47
6 CRONOGRAMA	48
7 ORÇAMENTO	49
8 REFERÊNCIAS	50
9 ARTIGO 1.....	61
10 ARTIGO 2.....	71
11 ARTIGO 3.....	102
12. CONSIDERAÇÕES FNAIS.....	136
10. ANEXOS	138
Anexo A: Carta de aprovação no comitê de ética.....	139
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido	140
Anexo C: Indicador Econômico Nacional	141
Anexo D: Questionário de trauma na infância.....	147
Anexo E: Escala de Temperamento Composto Afetivo e Emocional.....	149

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento (PPGSC). O volume está dividido em cinco partes, sendo elas: o projeto intitulado: “Efeito de variações nos canais de cálcio na susceptibilidade ao transtorno bipolar: um estudo baseado em diferentes abordagens da genética psiquiátrica”, o primeiro artigo intitulado “*The role of CACNA1C gene and childhood trauma interaction on bipolar disorder*”, o segundo artigo intitulado “*Temperament traits mediate the relationship between CACNA1C polymorphisms and bipolar disorder in women*”, o terceiro artigo intitulado “*BDNF levels according to variations in the CACNA1C gene: sex-based disparity*”, e considerações finais. A tese está formatada segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e os artigos seguem a formatação indicada pelas revistas. A construção da tese segue o modelo indicado pelo PPGSC.

PROJETO

1 IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Efeito de variações nos canais de cálcio na susceptibilidade ao Transtorno Bipolar:
um estudo baseado em diferentes abordagens da genética psiquiátrica.

1.2 Doutoranda: Clarissa Ribeiro Bastos

1.3 Orientador: Gabriele Cordenonzi Ghisleni

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

1.5 Curso: Doutorado em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de pesquisa: Neurociência

1.7 Data da defesa: 29/06/2021

2 INTRODUÇÃO

O transtorno bipolar (TB) é uma doença crônica que afeta cerca de 60 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2018) e envolve episódios de perturbação do humor, somados a diversas alterações biológicas (GRANDE *et al.*, 2016). É marcado por exacerbações de humor, que podem ter polaridade oposta, variando de episódios (hipo)maníacos a episódios depressivos. A etiologia do TB ainda é incerta, mas sua alta carga genética é indiscutível, com herdabilidade estimada em até 85% (MCGUFFIN *et al.*, 2003). Portanto compreender a arquitetura genética é um passo fundamental para entender e futuramente prevenir o desenvolvimento do transtorno.

Os avanços na área da genética e o surgimento dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS, do inglês *Genome Wide Association Studies*) fortaleceram a hipótese de que esse transtorno é uma doença multifatorial atribuível principalmente a variantes comuns de pequeno efeito, além de influências ambientais, incluindo estressores crônicos e traumáticos. Resultados obtidos pelos GWAS identificaram vários genes de risco para o TB, e uma das associações mais robustas e replicáveis foi encontrada no gene que codifica a subunidade alfa 1C dos canais de cálcio dependente de voltagem (*CACNA1C*) (FERREIRA *et al.*, 2008; Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011; STAHL *et al.*, 2019). Essa subunidade forma o poro do Ca_v1.2, pelo qual ocorre o influxo de cálcio na célula e se iniciam cascatas de sinalização a jusante, resultando na ativação de um complexo programa de expressão gênica (GREER & GREENBERG, 2008).

A entrada de cálcio por esses canais é muito importante para transcrição do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina que promove a proliferação e sobrevivência neural e que se encontra diminuída em pacientes bipolares (CUNHA *et al.*, 2006). Assim, é possível que polimorfismos nesse gene possam afetar a vulnerabilidade ao TB através de alterações na expressão e níveis de BDNF (SMEDLER *et al.*, 2019). Notavelmente, dois polimorfismos no íntron 3 de *CACNA1C* foram associados ao distúrbio, o rs1006737 (G/A) e rs4765913 (A/T). No entanto, os achados são díspares e os cientistas ainda têm dúvidas sobre como eles podem contribuir para o transtorno.

Para tentar esclarecer essas questões, a genética psiquiátrica usa diferentes abordagens. Uma delas, conhecida como abordagem gene-transtorno, assume relações lineares diretas entre as variações genéticas e o TB, sendo importante para tentar replicar os dados dos GWAS em diferentes populações. A abordagem dos endofenótipos busca verificar se o efeito de um polimorfismo no transtorno é mediado por algum outro fator e a abordagem de interação gene

x ambiente pressupõe que os genes moderam o efeito de fatores ambientais no transtorno (CASPI & MOFFITT, 2006).

O uso dessas abordagens requer a identificação de potenciais alvos para o transtorno estudado. No caso do TB, o temperamento tem sido considerado um possível endofenótipo, uma vez que sofre influência do genótipo e está associado ao transtorno (VÁZQUEZ *et al.*, 2008). De forma que, desregulações nos traços temperamentais como aumento da instabilidade emocional, hostilidade e raiva são comuns em pacientes do espectro bipolar (FRANGOU, 2016; QUIU *et al.*, 2017; SAVITZ *et al.*, 2008). Já para o modelo de interação gene x ambiente, o trauma na infância ganha destaque, devido a sua forte associação com o transtorno e prejuízo que pode causar na vida adulta, provocando alterações na regulação do afeto, controle de impulsos e funcionamento cognitivo (AAS *et al.*, 2016). Com base nesses dados, o objetivo desse estudo foi utilizar diferentes abordagens da genética psiquiátrica para verificar como variações no gene *CACNA1C* podem afetar a susceptibilidade ao TB e identificar suas implicações nos níveis de BDNF em jovens adultos residentes da cidade de Pelotas/RS.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar diferentes abordagens da genética psiquiátrica para verificar como variações no gene *CACNA1C* podem afetar a susceptibilidade ao TB e identificar suas implicações nos níveis de BDNF em jovens adultos residentes da cidade de Pelotas/RS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESES

3.2.1 Artigo 1

OBJETIVO: Investigar se a exposição ao trauma durante a infância pode modificar o efeito de dois polimorfismos no gene *CACNA1C* (rs1006737 e rs4765913), bem como do haplótipo formado por eles na susceptibilidade ao TB;

HIPÓTESE: O alelo A dos polimorfismos estudados, assim como o haplótipo AA formado por eles interagem com o trauma na infância aumentando a susceptibilidade ao TB;

3.2.2 Artigo 2

OBJETIVO: Realizar uma análise de mediação baseada em endofenótipos, buscando identificar se o efeito de dois polimorfismos no gene *CACNA1C* (rs1006737 e rs4765913) na susceptibilidade ao TB é mediado por variações nos traços de temperamento emocional;

HIPÓTESE: Traços emocionais como aumento de raiva, medo, sensibilidade e diminuição do coping e controle são relacionados ao alelo A dos polimorfismos avaliados, e medeiam a relação entre eles e o TB.

3.2.3 Artigo 3

OBJETIVO: Verificar se polimorfismos no gene *CACNA1C* (rs1006737 e rs4765913), bem como o haplótipo AA formado por eles podem afetar os níveis séricos de BDNF, e investigar através de análises *in silico* a função regulatória desses SNPs e daqueles a eles vinculados.

HIPÓTESE: O alelo A dos polimorfismos estudados, assim como o haplótipo AA formado por eles leva a uma diminuição nos níveis de BDNF. As análises *in silico* evidenciam que esses polimorfismos estão associados a importantes marcas regulatórias no cérebro, indicando um possível efeito na expressão gênica.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 DESCRIPTORES

A busca bibliográfica do presente trabalho foi realizada na base de dados do PUBMED, onde foram utilizados os seguintes descritores: Bipolar disorder, polymorphisms, childhood trauma, *CACNA1C*, BDNF, BDNF levels, emotional temperament e gene-environment interaction. A busca nessa base de dados foi realizada sem a utilização de filtros.

O total da busca através dos descritores utilizados foi de 942 artigos (Tabela 1). Deste total, 60 foram incluídos no estudo após um refinamento na busca. Além disso, alguns artigos utilizados neste projeto foram advindos das referências dos artigos selecionados e através de pesquisadores importantes na área.

Tabela 1. Descritores utilizados para busca bibliográfica

Descritores	Total de artigos encontrados
Bipolar disorder AND CACNA1C	146
Bipolar disorder AND CACNA1C AND Polymorphisms	102
Bipolar disorder AND Childhood trauma	237
CACNA1C AND Childhood trauma	3
Bipolar disorder AND CACNA1C AND Childhood trauma	1
Bipolar disorder AND CACNA1C AND Gene-environment interaction	1
Bipolar disorder AND Emotional temperament	168
CACNA1C AND Emotional Temperament	0
Bipolar disorder AND BDNF levels	262
CACNA1C AND BDNF	16
CACNA1C AND BDNF AND Polymorphisms	6
Total	942

4.2 REFERENCIAL TEÓRICO

4.2.1 Transtorno Bipolar: Caracterização e epidemiologia

O TB é um transtorno crônico caracterizado por estados agudos de humor disfuncional, que se alternam entre episódios maníacos ou hipomaníacos e episódios depressivos, intercalados por período de eutimia (DSM-V, 2014). Ele afeta cerca de 1% da população mundial independentemente da nacionalidade, origem étnica ou condição socioeconômica (GRANDE *et al.*, 2016). Além disso, sua prevalência ao longo da vida é substancial, sendo estimada em aproximadamente 4% (KETTER, 2010; MERIKANGAS *et al.*, 2007). Esse transtorno normalmente tem início na adolescência ou começo da idade adulta e pode resultar em efeitos adversos ao longo da vida sobre a saúde mental e física do paciente, prejudicando seu funcionamento educacional, ocupacional e relações interpessoais (STANG *et al.*, 2007; VASCONCELOS-MORENO *et al.*, 2016).

Em pesquisa da Organização Mundial da Saúde (2011), o TB foi fortemente associado à perda de produtividade, sendo um dos principais responsáveis pela incapacidade de trabalhar. Como esse transtorno afeta a população economicamente ativa, acaba implicando em altos custos para a sociedade (ALONSO *et al.*, 2011; GARDNER *et al.*, 2006). Além disso, o TB está fortemente associado a comorbidades clínicas, como distúrbios metabólicos, cardiovasculares, endócrinos (FORTY *et al.*, 2014; KRISHNAN, 2005) e a comorbidades psiquiátricas como transtornos de ansiedade e transtorno por uso de substâncias (NABAVI *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2008).

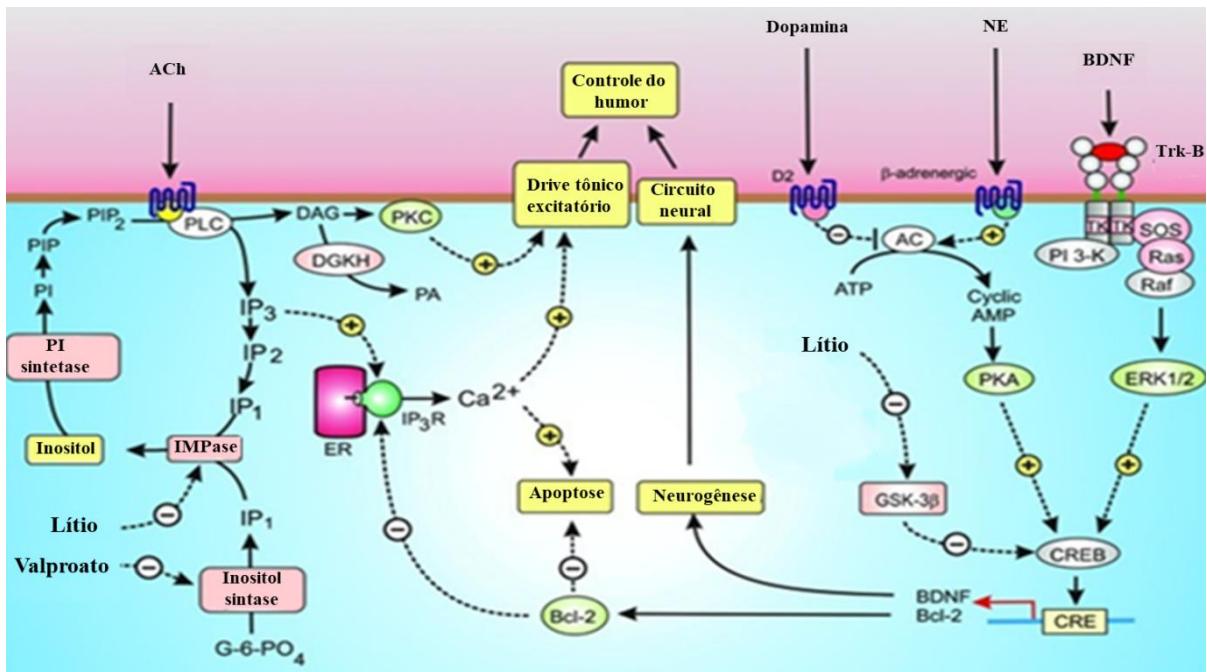
O diagnóstico de TB é definido de acordo com características clínicas e as classificações diagnósticas mais amplamente reconhecidas são a 10^a revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) e a 5^a edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5*). Segundo DSM, existem dois tipos principais de TB, o tipo I e o tipo II. O primeiro requer ocorrência de pelo menos um episódio maníaco, enquanto para o diagnóstico do segundo, o indivíduo deve experenciar um episódio hipomaníaco e um episódio depressivo maior. Os sintomas maníacos incluem elevação significativa do humor e mudanças de comportamento relacionadas, como necessidade reduzida de sono, aumento de energia, pensamentos e crenças grandiosas, fala rápida, aumento da libido e comportamento imprudente. Em episódios graves, sintomas psicóticos (delírios e alucinações) também podem estar presentes. A hipomania referente ao TB tipo II, refere-se a uma forma menos disfuncional e menos prolongada de mania.

Ainda se tem pouca compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TB, mas sabe-se que ele é uma condição multifatorial caracterizada por alterações em diversos circuitos encefálicos, múltiplos sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização (MANJI *et al.*, 2003). Não se sabe ao certo quais os principais fatores de risco para desregulação desses sistemas, mas as maiores influências parecem ser genéticas, uma vez que a herdabilidade deste transtorno é estimada em até 85% (MCGUFFIN *et al.*, 2003).

Com o objetivo de esclarecer a etiologia do TB e identificar seus possíveis causadores, hipóteses foram desenvolvidas com base nos mecanismos de ação do lítio e do valproato, fármacos estabilizadores de humor eficazes no tratamento do transtorno (FREEMAN *et al.*, 1992; KESSING *et al.*, 2011). O estudo sobre a ação desses medicamentos gerou diferentes hipóteses para ocorrência do TB. Uma delas sugere uma desregulação no equilíbrio excitatório-inibitório neuronal causado pela hiperativação na via de sinalização do fosfatidilinositol. A hiperativação dessa via pode gerar uma elevação na concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular com consequente aumento na excitabilidade da membrana (SUH *et al.*, 2013). Segundo Berridge (2014), esse seria um dos possíveis mecanismos para explicar os diferentes episódios da doença, com aumento da atividade dos neurônios excitatórios na fase maníaca, e dos neurônios inibitórios na fase depressiva.

A outra hipótese sugere que o TB poderia ocorrer por um declínio na neurogênese, resultado da hiperativação da enzima glicogênio sintase-cinase 3 β (GSK-3 β). Essa enzima inibe a proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclico (monofosfato de adenosina cíclico) (CREB), um importante fator de transcrição que controla a expressão de fatores neurogênicos, como o BDNF (BERRIDGE, 2013; JOPE & ROH, 2006). A inibição do CREB pela GSK-3 β , poderia explicar a redução da neurogênese, com o declínio de BDNF que é relatado em indivíduos com o transtorno (CUNHA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2009).

Figura 1. Mecanismos de ação do lítio e valproato.



Legenda: A figura ilustra a ligação de um agonista (acetilcolina-Ach) agindo através de receptores acoplados à proteína G (muscarínicos) e estimulando a hidrólise do 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2) para gerar 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 libera Ca^{2+} enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). Tanto o Ca^{2+} quanto a PKC podem influenciar o humor, modulando a excitabilidade da membrana, através do drive tônico excitatório. O DAG é inativado após sua fosforilação pela DAG quinase (DGKH), enquanto o IP3 é reciclado de volta à inositol por meio de uma série de reações de desfosforilação, com a etapa final sendo realizada por uma enzima chamada inositol monofosfatase (IMPaspe), que é sensível ao lítio. A mesma IMPase hidrolisa a inositol monofosfato (IP1) formada pela inositol sintase, que é inibida pelo valproato. Outros neurotransmissores, como dopamina e noradrenalina (NE), parecem atuar através da adenilil ciclase (AC) para formar AMP cíclico, que atua através da proteína cinase A (PKA) para fosforilar o fator de transcrição CREB e controlar a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que promove a neurogênese, e do Bcl-2 que inibi a apoptose. O Bcl-2 pode inibir a apoptose reduzindo a liberação de Ca^{2+} pelo receptor IP3. A glicogênio sintase-cinase 3β (GSK-3β) inibe a atividade transcritional do CREB, e esse processo é inibido pelo lítio, promovendo o aumento da transcrição de BDNF (Adaptada de BERRIGDE, 2013).

Os mecanismos de ação tanto do lítio como do valproato no neurônio pós-sináptico, resultam em uma diminuição no nível de Ca^{2+} intracelular, o que é importante, uma vez que, a elevação anormal do Ca^{2+} pode aumentar a excitabilidade da membrana e desregular os circuitos que controlam o humor. Esse aumento também pode afetar a transcrição gênica devido a ativação da CREB e da tirosina cinase 2 (Pyk2), proteína responsável por fosforilar e ativar a GSK-3β (SAYAS *et al.*, 2006).

Assim, o TB pode ocorrer devido a uma desregulação nos níveis de Ca^{2+} intracelular que leva a alterações sutis nos circuitos neuronais que controlam o comportamento. De fato, diversos estudos mostram níveis alterados de Ca^{2+} em células de pacientes bipolares (HAHN *et al.*, 2005; DUBOVSKY *et al.*, 2014) com aumentos na sua sinalização independente do estado

de humor (DUBOVSKY *et al.*, 1994). Essas evidências, juntamente com a gama de efeitos atrelados ao Ca²⁺ fazem dele um importante alvo de investigação.

4.2.2 Cálcio e canais de cálcio

Ca²⁺ é um cátion bivalente com múltiplos papéis, os quais podem ser divididos principalmente em estruturais e metabólicos. O seu papel estrutural está ligado à constituição de ossos e dentes, enquanto os seus papéis metabólicos são os mais diversos. Por isso, o íon Ca²⁺ é considerado um sinal intracelular onipresente e altamente versátil responsável pelo controle de uma ampla variedade de processos celulares, da fertilização à transcrição de genes, da contração muscular à morte celular (BOOTMAN *et al.*, 2002; BAGUR & HAJNÓCZKY, 2017).

Nas células em repouso, os níveis de Ca²⁺ intracelular livre são mantidos em baixa concentração no citoplasma (10–100 nM) pelas bombas e trocadores de Ca²⁺ da membrana, pelo retículo endoplasmático/sarcoplasmático e pela mitocôndria, mas quando essas células são ativadas esse nível aumenta para aproximadamente 1000 nM (BERRIDGE *et al.*, 2000). A nível de sistema nervoso central (SNC), a manutenção de baixos níveis de Ca²⁺ dentro da célula facilita a resposta rápida e efetiva do neurônio a aumentos na concentração de Ca²⁺ após estimulação neuronal.

Essa elevação regula diversos processos, tais como a liberação de neurotransmissores a partir de terminações pré-sinápticas (BERRIDGE, 2014), a regulação da excitabilidade neuronal e a estimulação de uma cascata de eventos de sinalização no neurônio pós-sináptico que resultam na ativação de um complexo programa de expressão gênica (como demonstrado no item anterior), o qual promove o crescimento dendrítico, o desenvolvimento de sinapses e a plasticidade neuronal (GREER & GREENBERG, 2008).

Apesar da sua importância, o Ca²⁺ exerce um efeito bifásico, isto porque, aumentos fisiológicos da sua concentração estimulam a atividade celular, enquanto elevações um pouco acima inibem as mesmas funções e níveis muito elevados acabam por desencadear excitotoxicidade e induzem a morte celular (DUBOVSKY & FRANKS, 1983). De fato, nos neurônios, o aumento do Ca²⁺ livre intracelular pode resultar em numerosos resultados catastróficos, como produção de radicais superóxido, com subsequente toxicidade celular, maior liberação de glutamato, ativação de endonucleases que fragmentam o DNA, produção de óxido nítrico sintase que inibe a respiração mitocondrial, entre outros eventos (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003; GLEICHMANN & MATTSON, 2011; ONOFRIO *et al.*, 2017). Portanto,

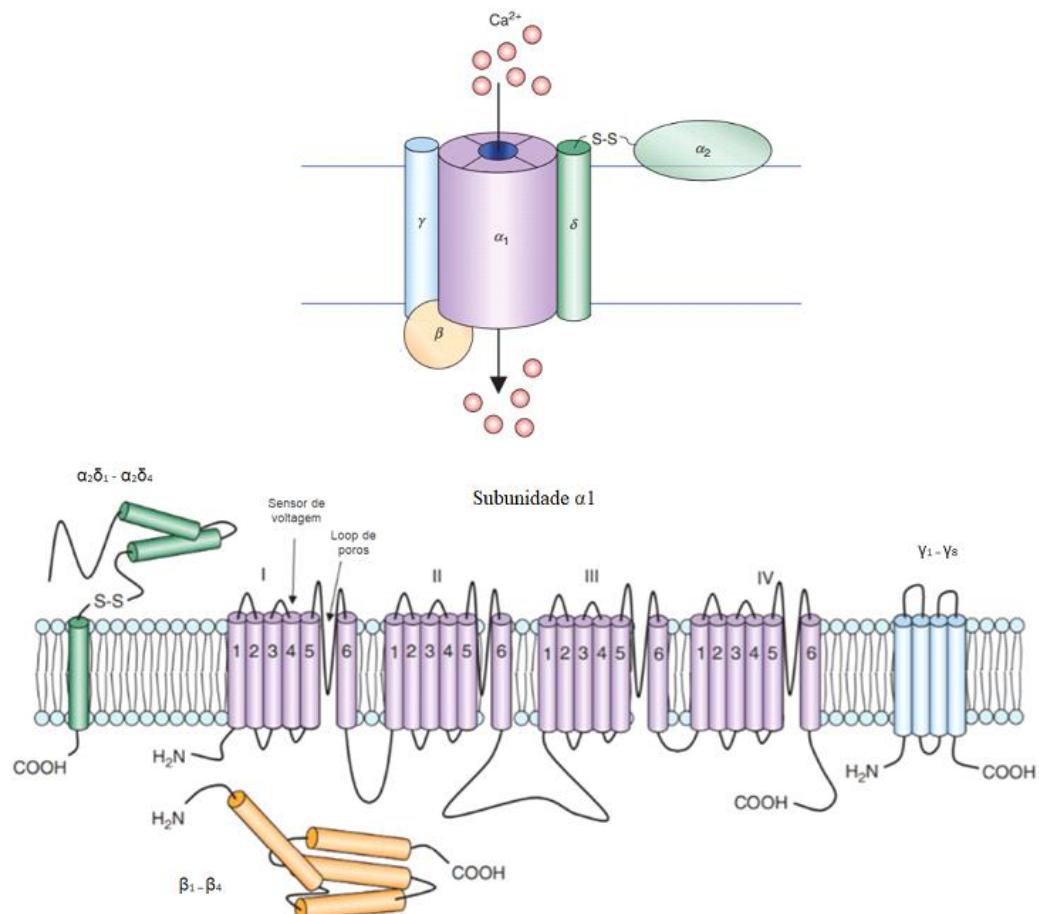
dado aos inúmeros sistemas que o Ca^{2+} afeta, interrupções nesta regulação, sejam locais ou globais, graves ou secundárias, transitórias ou agudas, todas podem levar à função neuronal alterada.

A entrada de Ca^{2+} na célula é realizada por diferentes tipos de canais que se classificam de acordo com suas propriedades de ativação em canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v), ativados em resposta a despolarização da membrana por estímulos químicos ou elétricos, e canais de Ca^{2+} independentes de voltagem, que incluem os canais operados por receptor (ROCs) que são ativados por mensageiros bioquímicos e canais de Ca^{2+} operados por depósitos intracelulares (SOCs) que são ativados em resposta a uma diminuição no nível de Ca^{2+} dos seus depósitos (BERRIDGE *et al.*, 2003).

Os Ca_v são os principais reguladores da entrada de Ca^{2+} na célula e combinam duas funções de sinalização distintas, atuando tanto na geração e formação de potenciais de ação, quanto na ativação das funções celulares mediadas por Ca^{2+} . Devido a esse duplo papel, eles estão em uma posição única para transformar a despolarização da membrana em funções celulares, como excitação acoplada de contração muscular, excitação acoplada de secreção em células nervosas e secretoras de hormônios, e excitação acoplada a transcrição gênica (CAMPIGLIO & FLUCHER, 2015).

As proteínas Ca_v são formadas por um complexo de diferentes subunidades: α_1 , $\alpha_2\delta$, β e γ . A subunidade α_1 é formada por uma grande proteína com 24 segmentos transmembranares divididos em quatro domínios homólogos. Ela é responsável por formar o poro condutor de íons e contém diversos locais moduladores, domínios de interação proteína-proteína, bem como os principais locais de ligação a medicamento. As outras subunidades ($\alpha_2\delta$, β e γ) são auxiliares e modulam as propriedades cinéticas do canal (CATTERALL, 2000; SNUTCH, 2009).

Figura 2. Estrutura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem

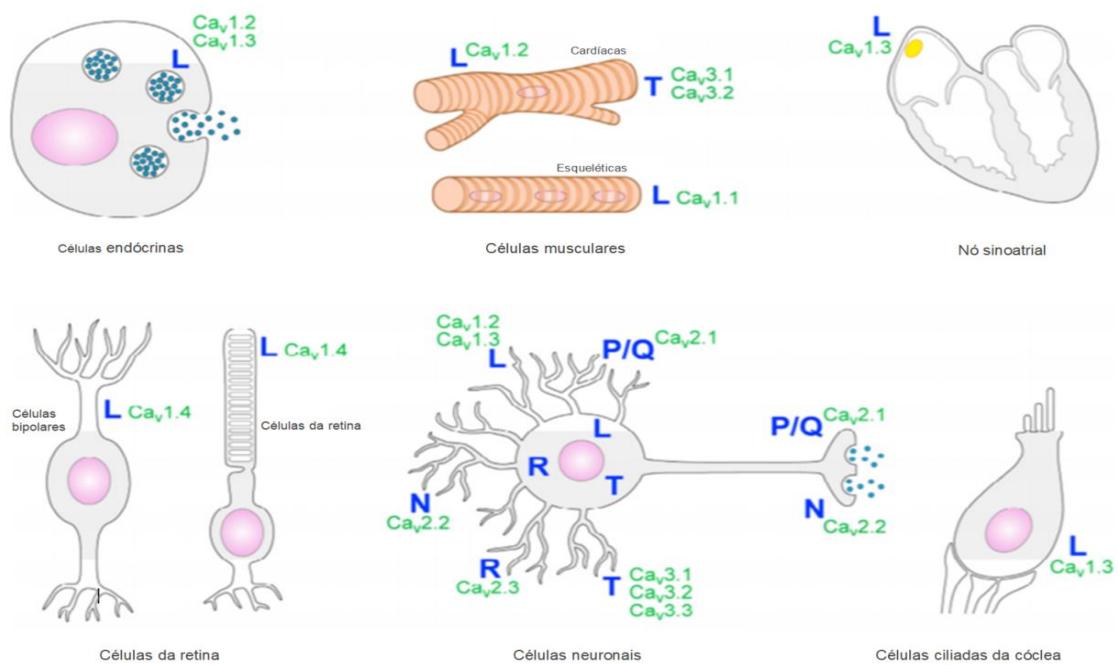


Legenda: Representação sistemática de um complexo de canal de cálcio dependente de voltagem (Ca_v). As subunidades α_1 , α_2 , δ , β e γ estão representadas. B) Segmentos transmembranares da subunidade α_1 (1–6) são mostrados dispostos nos quatro domínios (I–IV), o segmento S4 em cada domínio contém resíduos de lisina ou arginina carregados positivamente, formando uma parte crucial do mecanismo de detecção de voltagem do canal. O canal possui terminais N e C intracelulares, e os domínios são unidos por loops intracelulares. O terminal C, o ligante I-II e o ligante II-III são particularmente longos e contêm vários domínios de ligação identificáveis, permitindo muitas possibilidades de interação (Adaptada de SNUTCH, 2009).

Para ajustar os canais às necessidades individuais das células, dez diferentes isoformas da subunidade α_1 são codificadas por uma família de genes conhecida como *CACNA1*. As isoformas codificadas por esses genes dividem os Ca_v em cinco tipos principais: L ($\text{Ca}_v1.1\text{-}1.4$), P/Q ($\text{Ca}_v2.1$), N ($\text{Ca}_v2.2$), R ($\text{Ca}_v2.3$) e T ($\text{Ca}_v3.1\text{-}\text{Ca}_v3.3$), que diferem em relação a critérios bioquímicos, eletrofisiológicos, farmacológicos e de biologia molecular (CATTERALL *et al.*, 2000). Os Ca_v do tipo L, N, P/Q e R, pertencem ao grupo dos canais ativados por alta voltagem (HVA, do inglês *high voltage activated*), enquanto os canais do tipo T pertencem aos chamados canais ativados por baixa voltagem (LVA, do inglês *low voltage activated*) (SNUTCH *et al.*, 2005).

Dentro do sistema nervoso, vários tipos de Ca_v são expressos e diferem quanto a localização celular de acordo com suas funções. Os Ca_v pré-sinápticos dos tipos P/Q e N induzem a liberação de neurotransmissores e os do tipo T facilitam o disparo rítmico dos neurônios. Os Ca_v do tipo L estão mais localizados nos corpos celulares neuronais, bem como em dendritos e espinhos dendríticos, tendo um importante papel na regulação da expressão gênica e excitabilidade neuronal (CATTERALL *et al.*, 2005). Alguns tipos de células gliais, como astrócitos, oligodendrócitos e células precursoras da glia, também demonstraram expressar Ca_v . Fora do sistema nervoso, a presença desses canais foi relatada no coração, em células musculares esqueléticas, células da retina, células endócrinas, células ciliadas cocleares e em células do sistema imunológico (SCHAMPEL & KUERTEN, 2017).

Figura 3. Distribuição de subtipos de Ca_v em diferentes tipos de células



Legenda: Distribuição dos diferentes subtipos de canais ativados por voltagem (Ca_v) em diferentes tipos de células (Adaptada de SCHAMPEL E KUERTEN, 2017).

Devido a sua ampla distribuição e diversidade de funções, muitos estudos têm relatado o efeito de disfunções dos Ca_v em um amplo espectro de distúrbios, incluindo deficiências no desenvolvimento, doenças neurológicas e cardiovasculares (CAIN & SNUTCH, 2011). Os canais do tipo L representam uma das principais classes de Ca_v e vem ganhando destaque na associação com doenças psiquiátricas, principalmente com o TB (CASAMASSIMA *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2019). Interessantemente a exposição a antagonistas desses canais, como cloridrato de verapamil, amplamente utilizado no tratamento de arritmias cardíacas, tem sido

explorada no tratamento do TB, sendo associada a taxas reduzidas de hospitalização psiquiátrica e automutilação (HAYES *et al.*, 2019).

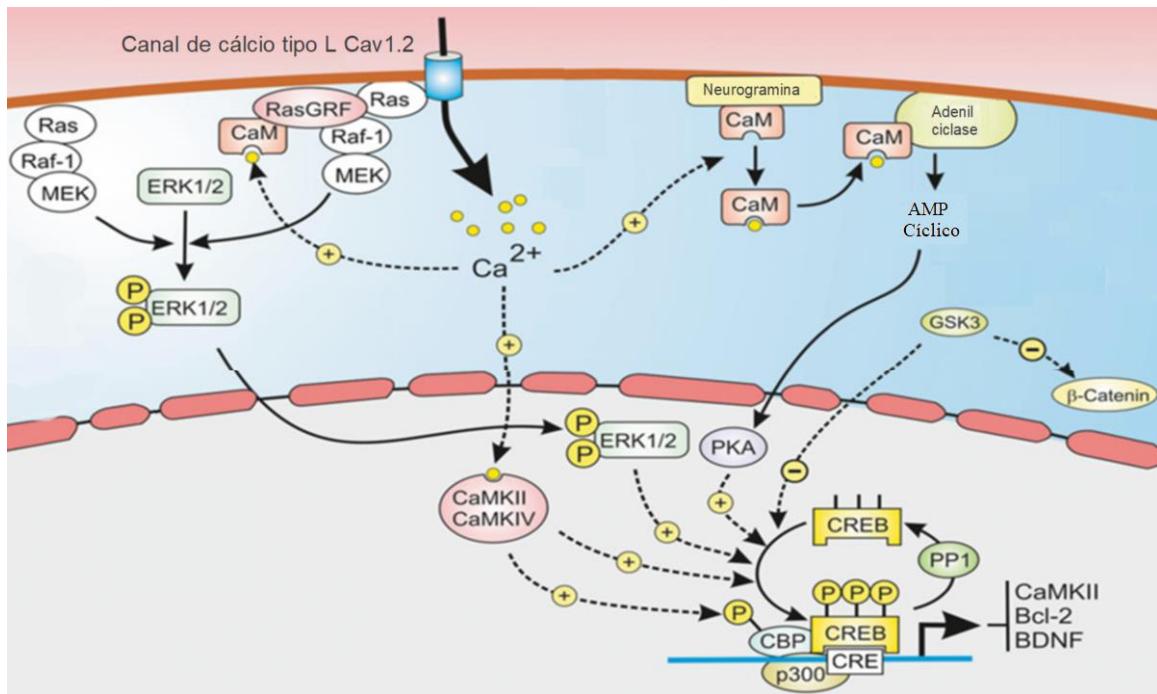
4.2.3 Canais de cálcio do tipo L

Os canais do tipo L (Ca_v1), receberam esse nome porque conduzem correntes de Ca^{2+} com longa duração, do inglês, *long-lasting*. Esses canais também são conhecidos como canal DHP, devido a sua sensibilidade a um composto orgânico chamado dihidropiridina (NOWYCKY *et al.* 1985). Os genes que codificam os Ca_v1 dão origem a 4 isoformas de α_1 distintas (como demonstrado anteriormente), conhecidas como $\text{Ca}_v1.1$ codificada pelo gene *CACNA1S*, $\text{Ca}_v1.2$ codificada pelo *CACNA1C*, $\text{Ca}_v1.3$ codificada pelo *CACNA1D* e $\text{Ca}_v1.4$ codificada pelo *CACNA1F* (LIPSCOMBE & TORO, 2014).

Os canais $\text{Ca}_v 1.2$ e $\text{Ca}_v 1.3$ são as isoformas de Ca_v1 mais proeminentes no encéfalo, sendo o $\text{Ca}_v 1.2$ expresso em níveis mais altos no prosencéfalo (HELL *et al.*, 1993) e o $\text{Ca}_v 1.3$ o principal no mesencéfalo (RAJADHYAKSHA *et al.*, 2004). Esses canais são responsáveis por moldar o disparo neuronal e estão presentes principalmente na membrana pós-sináptica (DI BIASE *et al.*, 2008; JENKINS *et al.*, 2010), onde estão preparados para o acoplamento excitação-transcrição (MA *et al.*, 2012). Ambas as isoformas parecem estar associadas a transtornos psiquiátricos, no entanto, no TB, fortes associações apontam para o papel dos $\text{Ca}_v 1.2$. (BHAT *et al.*, 2012; KHALID *et al.*, 2018).

A entrada de Ca^{2+} por esses canais pode influenciar a transcrição gênica através de seu acoplamento próximo a outras vias de sinalização, tais como as cascatas de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e da AMP cíclico (BERRIDGE, 2014). A ação do Ca^{2+} nessas vias, ocorre após ele ser acoplado a calmodulina (CaM), uma proteína adaptadora que amplifica o tamanho diminuto do Ca^{2+} na escala de proteínas. A calmodulina ativada inicia uma cascata de eventos que desencadeiam a fosforilação e a ativação de uma ampla gama de fatores de transcrição (BERRIDGE, 2014).

Figura 4. Cascatas de sinalização ativadas pela entrada de Ca^{2+} nos $\text{Ca}_v1.2$



Legenda: Transcrição gênica neuronal regulada pelos $\text{Ca}_v1.2$. A despolarização da membrana neuronal estimula esses canais para elevar o Ca^{2+} intracelular, podendo ativar a transcrição através de várias vias. Atua na neurogranina para liberar calmodulina (CaM) e o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ resultante, induz a transcrição de genes ao ativar as proteínas cinases dependentes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (CaMKII ou CaMKIV), também pode recrutar a proteína cinase ativada por Ras/mitogênio ou vias de sinalização dependentes de AMP cíclico (Adaptada de BERRIDGE, 2014).

Embora diferentes rotas levem a aumentos na concentração de Ca^{2+} intracelular, elas podem promover respostas bastante diferentes em termos de indução de genes (BADING *et al.*, 1993, GINTY, 1997), o que leva à especulação de que o canal específico através do qual o Ca^{2+} entra no neurônio é crítico para determinar o padrão de expressão gênica, e o subtipo $\text{Ca}_v1.2$ parece ser a principal rota para estímulo e transcrição do BDNF (GHOSH *et al.*, 1994). Portanto, uma redução na abertura desse canal poderia alterar os níveis dessa neurotrofina, diminuindo a neurogênese, o que já foi relatado em indivíduos bipolares que apresentam notável comprometimento cognitivo e menores níveis séricos de BDNF na fase depressiva e maníaca (LIN, 2009; FERNANDES *et al.*, 2011).

As principais características dos canais $\text{Ca}_v1.2$, como detecção de voltagem e seletividade iônica são codificadas pelo gene *CACNA1C*. Anormalidades nesse gene são responsáveis por causar a Síndrome de Timothy, uma doença autossômica caracterizada por anormalidades funcionais e de desenvolvimento graves que resultam em comprometimento cognitivo significativo e em alta prevalência de distúrbios do espectro autista, sugerindo um

papel crítico para esse gene no desenvolvimento cognitivo humano (SPLAWSKI *et al.*, 2004). Além disso, estudos pré-clínicos mostraram que a deleção embrionária de Cacna1c (homólogo de *CACNA1C* em humanos) em neurônios de camundongos leva a uma diminuição nos níveis de BDNF, plasticidade sináptica prejudicada, sociabilidade reduzida, hiperatividade e aumento da ansiedade (DEDIC *et al.*, 2018). Esse papel do gene *CACNA1C* somado a sua alta expressão em diversas áreas do sistema límbico, como hipocampo e amígdala (DEDIC *et al.*, 2018), torna fácil entender o papel tão pronunciado deste gene em diversos transtornos psiquiátricos (GREEN *et al.*, 2010). O gene *CACNA1C* está localizado no braço curto do cromossomo 12, na posição 13.33 e dá origem a um RNA mensageiro (mRNA) de pelo menos 50 exons e mais de 40 isoformas (decorrentes de mecanismos pós transcricionais).

Variações nesse gene foram um dos primeiros achados em psiquiatria e parecem exercer risco compartilhado entre transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), transtorno do espectro autista, TB, esquizofrenia e depressão maior (CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM, 2013). No TB, maiores evidências do efeito desse gene foram alcançadas pelo crescimento da genética, que permitiu o desenvolvimento de projetos que ampliaram o conhecimento a respeito da variabilidade do genoma humano e com as inovações tecnológicas que deram origem aos GWAS, os quais possibilitaram um importante avanço na genética psiquiátrica.

4.2.4 Genética do TB

Os GWAS são métodos livre de hipóteses que tem como objetivo medir e analisar variações na sequência de DNA de todo o genoma humano, em um esforço para identificar fatores de risco genéticos para doenças comuns na população (BUSH & MOORE, 2012). Por serem métodos livre de hipóteses os GWAS não testam uma região genética específica e sim o genoma inteiro, sendo poderosas ferramentas na identificação de vias envolvidas nos transtornos psiquiátricos (COLLINS & SULLIVAN, 2013). O uso desses métodos forneceu achados importantes sobre a etiologia do TB, isso porque, a maior parte desse transtorno é atribuído a causas genéticas. Então, mesmo a genética não sendo o único fator responsável pelo seu desenvolvimento ela é fator muito importante.

Nos GWAS uma das principais variações identificadas são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single-nucleotide polymorphisms*), esses polimorfismos são mudanças de um único par de base na sequência de DNA que ocorrem com alta frequência no genoma humano. Os SNPs são em sua maioria bialélicos e embora normalmente causem um

impacto mínimo nos sistemas biológicos, podem ter consequências funcionais, causando alterações de aminoácidos, alterações na expressão e/ou estabilidade do mRNA, entre outros (BUSH & MOORE, 2012).

Desde que surgiram esses estudos, diversos trabalhos foram executados buscando marcadores de regiões que pudessem alterar o risco para o TB (BAUM *et al.*, 2008; PSYCHIATRIC GWAS CONSORTIUM BIPOLAR DISORDER WORKING GROUP, 2011) e variações no gene *CACNA1C* têm sido um dos achados mais robustos e replicáveis (FERREIRA *et al.*, 2008; SKLAR *et al.*, 2011; STAHL *et al.*, 2019). Um dos primeiros GWAS realizados para o TB testou 1,8 milhões de variantes em 4,387 casos e 6,209 controles e identificou uma região de forte associação com o SNP rs1006737 no gene *CACNA1C* (FERREIRA *et al.*, 2008). Posteriormente uma meta-análise realizada pelo Consórcio de Genômica Psiquiátrica abrangendo 11,974 casos e 51,792 controles, identificou o SNP rs4765913, como a variante de risco mais significativa em *CACNA1C* (PSYCHIATRIC GWAS CONSORTIUM BIPOLAR DISORDER WORKING GROUP, 2011). Estes dois SNPs estão em desequilíbrio de ligação¹ e posicionados dentro do íntron 3, uma região que mede um tamanho de aproximadamente 328,5 kb e é considerada um importante loci de risco para o transtorno.

O SNP rs1006737 é o mais amplamente estudado e resulta na troca de uma base nitrogenada guanina por uma adenina (G/A). Seu papel no TB já foi demonstrado e indivíduos saudáveis homozigotos para o alelo A deste polimorfismo apresentam padrões de atividade cerebral associados à doença mental, como aumento do volume da amígdala (LANCASTER *et al.*, 2016), alteração na atividade hipocampal durante o processamento emocional e aumento da atividade pré-frontal durante a cognição executiva (BIGOS *et al.*, 2010).

Além disso, a presença de pelo menos uma cópia do alelo A deste SNP foi associada a maiores escores de depressão e ansiedade (ERK *et al.*, 2010). Em indivíduos com TB, o alelo A resultou em atividade reduzida do córtex pré-frontal ventrolateral direito, maior ativação da amígdala direita durante o reconhecimento facial (JOGIA *et al.*, 2011) e aumento nos níveis de Ca²⁺ intracelular (UEMURA *et al.*, 2016). Tomados em conjunto, esses dados mostram que essa variação genética em *CACNA1C* pode conferir risco ao TB por meio de desregulações nos níveis de Ca²⁺ e alterações no funcionamento das estruturas límbicas.

¹ Desequilíbrio de ligação (LD, do inglês, Linkage disequilibrium) é uma propriedade dos SNPs que descreve o grau em que o alelo de um SNP é herdado ou correlacionado com o alelo de outro SNP dentro de uma população. As medidas comumente usadas para expressar o LD são D' e r₂.

Já o SNP rs4765913 que promove a troca de uma adenina por uma timina (A/T) foi menos estudado, não existindo muitos estudos de associação referentes ao seu papel. No entanto, a presença de pelo menos uma cópia do alelo A deste SNP mostrou aumentar a latência de sono em bebês (KANTOJÄRVI *et al.*, 2017), característica encontrada no episódio maníaco de indivíduos com TB, (LINKOWSKI *et al.*, 1986) e que mostra o efeito deste polimorfismo desde o início da vida.

Em relação à funcionalidade, como esses SNPs estão em uma região não codificante, alterações regionais específicas na expressão geral dos Ca_v1.2 provavelmente são responsáveis por seu impacto comportamental. Nesta perspectiva, Eckart e colaboradores (2016) usaram cortes cerebrais do giro temporal superior de 185 doadores sem patologia cerebral visível e demonstraram que o polimorfismo rs1006737 e, portanto, todos os SNPs em alto desequilíbrio de ligação com ele influenciam a expressão de *CACNA1C*. Além disso, um estudo realizado por Starnawska *et al.* (2016) perfilou o cenário de metilação de cinco ilhas CpG em *CACNA1C* no DNA derivado de sangue e descobriu que uma das ilhas é significativamente hipermetilada em indivíduos com TB. O estudo também mostrou que SNPs em desequilíbrio de ligação com o rs4765913 podem alterar esse padrão de metilação. Assim, ambos os polimorfismos podem estar envolvidos na patologia do transtorno alterando a expressão gênica de *CACNA1C*.

De fato, o alelo A do polimorfismo rs1006737 em homozigose demonstrou aumentar a expressão de mRNA tanto em neurônios humanos quanto em amostras de córtex pré-frontal dorsolateral (YOSHIMIZU *et al.*, 2015; BIGOS *et al.*, 2010), e diminuir a expressão de mRNA no cerebelo humano (GERSHON *et al.*, 2014) e no giro temporal superior (ECKART *et al.*, 2016), sugerindo que mecanismos epigenéticos regionais podem impactar o efeito desse polimorfismo.

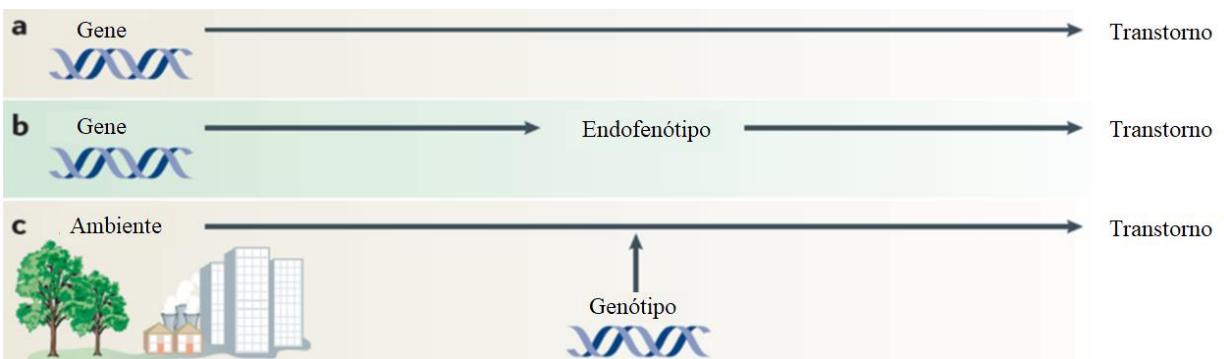
Ao alterar a expressão desses canais, os polimorfismos podem levar a uma desregulação na sinalização de Ca²⁺ intracelular, desencadeando diversas anormalidades nos sistemas fisiológicos. Entretanto, apesar da plausibilidade desses achados, os estudos ainda apresentam controvérsias, tornando essenciais trabalhos que visem replicar a associação entre esses polimorfismos e o TB em diferentes populações e que levem em conta diferentes abordagens da genética psiquiátrica, as quais consideram fatores ambientais e psicosociais que também podem influenciar ou sofrer influência do genótipo.

4.2.5 Abordagens da genética psiquiátrica

A relação de variações genéticas com a susceptibilidade aos transtornos psiquiátricos pode ser dividida em diferentes abordagens (CASPI & MOFFITT, 2006), aqui discutiremos três delas, a primeira abordagem assume relações lineares diretas entre essas variações e o comportamento de interesse (Figura 5a), buscando correlacionar o diagnóstico com variações na sequência do DNA. A segunda abordagem busca fenótipos intermediários relacionados ao transtorno, os quais são chamados de endofenótipos (Figura 5b). A busca de associação com endofenótipos baseia-se na ideia de que eles têm bases genéticas um pouco mais simples, portanto seria mais fácil identificar genes associados a endofenótipos do que genes associados a seus distúrbios correlacionados. Ao falarmos de *CACNA1C*, os endofenótipos ganham destaque, uma vez que esse gene parece oferecer risco compartilhado para diversos transtornos psiquiátricos (CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM, 2013).

A terceira abordagem procura incorporar informações sobre o meio ambiente (Figura 5c). Essa abordagem de interação gene-ambiente difere das outras porque não é baseada fundamentalmente na abordagem de efeito principal. Ela assume que os fatores ambientais causam o transtorno e que os genes influenciam a suscetibilidade a esses fatores. A abordagem de interação gene-ambiente surgiu de duas observações: primeiro, que os transtornos mentais têm causas ambientais; segundo, que as pessoas mostram heterogeneidade em resposta a essas causas. Apesar de focar em alvos diferentes, ambas abordagens contribuem para compreensão da etiologia dos transtornos psiquiátricos.

Figura 5. Abordagens da pesquisa em genética psiquiátrica.



Legenda: A abordagem gene-transtorno assume relações lineares diretas entre genes e transtorno (a). A abordagem do endofenótipo substitui os resultados do distúrbio por fenótipos intermediários (b). A abordagem de interação gene-ambiente pressupõe que os genes moderam o efeito de fatores ambientais no distúrbio (c). Adaptada de CASPI & MOFFITT, 2006.

Os endofenótipos referentes a segunda abordagem discutida, são características mensuráveis e herdáveis que tem como objetivo completar uma lacuna na cadeia causal entre genes e doenças distais (GOTTESMAN & GOULD, 2003). Em outras palavras, se o TB é o fenótipo, o resultado complexo de múltiplos fatores genéticos e ambientais em interação, o endofenótipo é uma característica mais elementar que está associada a ele. Endofenótipos podem se referir a medidas neurofisiológicas, bioquímicas, endocrinológicas, neuroanatômicas ou neuropsicológicas, que por possuírem uma arquitetura genética um pouco mais simples que o fenótipo, permitem que o pesquisador ganhe um ponto de apoio na ascensão ao entendimento da etiologia da doença (GOTTESMAN & GOULD, 2003).

No TB, traços de temperamento e personalidade têm sido sugeridos como possíveis endofenótipos (SAVITZ & RAMESAR, 2006; VÁZQUEZ *et al.*, 2008), uma vez que preenchem critérios importantes para essa característica, como, ser parcialmente hereditário (ZWIR *et al.* 2018), estar associado a doença na população (KOCHMAN *et al.*, 2005) e manifestar-se no indivíduo durante os períodos de saúde e doença (COSTA *et al.*, 2018). Em sentido amplo, o temperamento refere-se a um fator de personalidade que estabelece o nível básico de reatividade, humor e energia de uma pessoa (GOLDSMITH *et al.*, 1987). Segundo Cloninger e colaboradores (2019), ele é a disposição de uma pessoa para aprender a se comportar, reagir emocionalmente e formar apegos automaticamente por condicionamento associativo (isto é, rápida e espontaneamente, sem atenção consciente ou reflexão em resposta a mudanças nas condições internas e externas). Variações nos traços temperamentais são comuns na população, no entanto, acredita-se que desregulações extremas no temperamento estejam associadas a um risco aumentado de distúrbios do espectro bipolar (AKISKAL *et al.*, 1977; AKISKAL *et al.*, 1992; JOHNSON *et al.*, 2016; FICO *et al.*, 2019). Nessa perspectiva, traços elevados de instabilidade emocional, hostilidade, irritabilidade e ansiedade têm sido relatadas por esses pacientes mesmo na eutimia (EVANS *et al.*, 2005; FRANGOU, 2016; QUIU *et al.*, 2017; SAVITZ *et al.*, 2008). Além disso, essas desregulações no temperamento podem exercer efeitos negativos no cotidiano dos indivíduos. Walsh e colegas (2013), por exemplo, demonstraram que o temperamento ciclotímico/irritável parece ter consequências mais desadaptativas, como alta reatividade ao estresse e envolvimento em comportamentos de risco (WALSH *et al.*, 2013). O que indica que essa desregulação pode sim estar associada a uma maior chance de desencadeamento do transtorno posteriormente.

Em 2012, foi desenvolvida uma escala com modelo de temperamento integrativo combinando traços emocionais específicos e temperamentos afetivos globais, denominada Escala de Temperamento Composto Afetivo e Emocional (AFECTS, do inglês *Affective and*

Emotional Composite Temperament Scale) (LARA *et al.*, 2012). O modelo AFECTS propõe que a base emocional humana funcione como um sistema composto pelas seguintes dimensões: Ativação, Inibição, Sensibilidade, Coping e Controle. Esse sistema é baseado no princípio de que a Ativação (Vontade e Raiva) e a Inibição (Medo e Cautela) são os vetores emocionais básicos. A Sensibilidade e o Coping são a forma como esse sistema reage ao ambiente e o Controle é quem faz o monitoramento e os ajustes necessários à ativação e inibição. A escala apresenta boas propriedades psicométricas, sendo uma boa opção para avaliar esses traços na nossa população (CARVALHO *et al.*, 2020).

Dessa forma, o temperamento pode ser avaliado em várias dimensões, as quais podem ser influenciadas por conjuntos diferentes de genes. Estudos que avaliem o papel de *CACNA1C* nos traços temperamentais são escassos na literatura, no entanto, um GWAS que avaliou possíveis genes envolvidos na propensão à raiva, encontrou uma associação nominal com um SNP no gene *CACNA1C* e sugeriu que vias de sinalização que regulam a homeostase intracelular do Ca²⁺ poderiam estar subjacentes à expressão do temperamento irritado (MICK *et al.*, 2014). Além disso, em modelos pré-clínicos, o nocaute de Cacna1c parece interromper o comportamento de coping e afetar a memória de medo (JEON *et al.*, 2010; EHLINGER & KATHRYN, 2019). Uma vez que esses traços são amplamente regulados pelo sistema límbico, e considerando que os polimorfismos em *CACNA1C* podem afetar o circuito córtex pré-frontal-amígdala-hipocampo, é plausível pensar que eles aumentem a susceptibilidade ao transtorno por desregulação nos traços temperamentais.

A terceira abordagem da genética psiquiátrica trata de interações entre o gene e o ambiente. Essas interações ocorrem quando o efeito da exposição a um fator ambiental sobre a saúde de uma pessoa depende de seu genótipo (CASPI & MOFFITT, 2006). Como o TB é uma doença complexa, estudos de interação gene x ambiente (GxE, do inglês *gene x environment*) são uma estratégia promissora para fornecer pistas sobre seus mecanismos fisiopatológicos. Dentre os múltiplos fatores ambientais, a carga do trauma na infância e o efeito que pode causar na vida adulta justifica sua inclusão como um dos fatores prioritários na pesquisa em saúde mental e um relevante alvo de investigação.

O trauma na infância pode acarretar alterações na regulação do afeto, controle de impulsos e funcionamento cognitivo, diminuindo a capacidade do indivíduo em lidar com estressores posteriores (AAS *et al.*, 2016). Além disso, ele exerce grande influência no TB, estando associado a um início mais precoce, piores resultados clínicos, episódios de humor mais graves, mais frequentes e aumento do risco de suicídio (GARNO *et al.*; 2005; DARUY-FILHO *et al.*, 2011; de CODT *et al.*, 2016). Diferentes tipos de trauma podem ser relatados na infância,

sendo divididos principalmente em abuso físico, emocional, sexual, negligência física e emocional. Embora o papel específico de cada subtipo de trauma continue sendo objeto de debate, todos os seus subcomponentes parecem estar altamente associados ao TB (AAS *et al.*, 2016).

Além disso, pensa-se que a exposição ao trauma na infância interaja com vários genes de suscetibilidade para aumentar o risco de TB ou levar a uma expressão clínica mais severa do distúrbio. Assim, o trauma é considerado uma das experiências mais importantes para interagir com predisposição genética no desenvolvimento de transtornos de humor (JAWORSKA-ANDRYSZEWSKA & RYBAKOWSKI, 2019). O que já foi relatado em estudos de interação com o gene do BDNF (BILC *et al.*, 2018), o gene que codifica o transportador de serotonina (ROY *et al.*, 2007) e o gene da catecol-O-metil-transferase (van ROOIJ *et al.*, 2016).

A influência do trauma na infância sobre o gene *CACNA1C* foi pouco explorada, no entanto, evidências pré-clínicas demonstraram que os Ca_v1.2 são necessários para os efeitos duradouros do estresse crônico sobre o comportamento depressivo e ansioso (BAVLEY *et al.*, 2017). Além disso, o estresse crônico já demonstrou aumentar a expressão de mRNA de Ca_v1.2 nas áreas de giro denteadoo, amígdala e hipocampo de ratos (MAIGAARD *et al.*, 2012) e aumentar a expressão da proteína Ca_v1.2 no córtex pré-frontal de camundongos (BAVLEY *et al.*, 2017). Tomados em conjunto, esses dados mostram tanto que variações nos Ca_v1.2 estão associadas a susceptibilidade ao estresse, como a influência do estresse no funcionamento e expressão desses canais.

Evidências clínicas também já foram relatadas, um estudo com voluntários alemães saudáveis portadores do alelo A do polimorfismo rs1006737 revelou déficits de ativação do córtex cingulado anterior subgenual, uma região associada à mediação de respostas adaptativas relacionadas ao estresse (ERK *et al.*, 2010). Além disso, outro estudo que avaliou 4.023 indivíduos predominantemente afro-americanos mostrou que SNPs em *CACNA1C* (rs73248708 e rs116625684) interagem significativamente com eventos adversos da vida para alterar o risco de desenvolver sintomas de transtornos psiquiátricos (avaliado pelo Inventário de Depressão de Beck) (DEDIC *et al.*, 2018).

A nível celular o trauma na infância pode causar diferentes alterações epigenéticas, incluindo mudanças na metilação do DNA (VINKERS *et al.*, 2015). Como a metilação é um poderoso regulador da expressão gênica e é influenciada tanto por variantes genéticas próximas quanto por fatores ambientais, a soma desses fatores podem fornecer um mecanismo funcional pelo qual a interação entre o trauma na infância e a presença de variantes de risco em *CACNA1C* poderiam aumentar a susceptibilidade de desenvolver TB.

Assim, o uso dessas abordagens pode ajudar no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na etiologia do TB e permitir futuramente que fatores de risco genéticos sejam usados para fazer previsões sobre quem está em risco e identificar os fundamentos biológicos da suscetibilidade à doença para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento.

5 MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

O estudo seguiu um delineamento do tipo transversal de base populacional como parte de um estudo intitulado “Estudo do temperamento e transtornos psiquiátricos na interface entre psiquiatria, psicologia e neurociências”, o qual foi realizado na zona urbana da cidade de Pelotas/RS entre junho de 2011 e maio de 2013. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Pelotas, protocolo 2010/15 [Anexo A] e todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido [Anexo B].

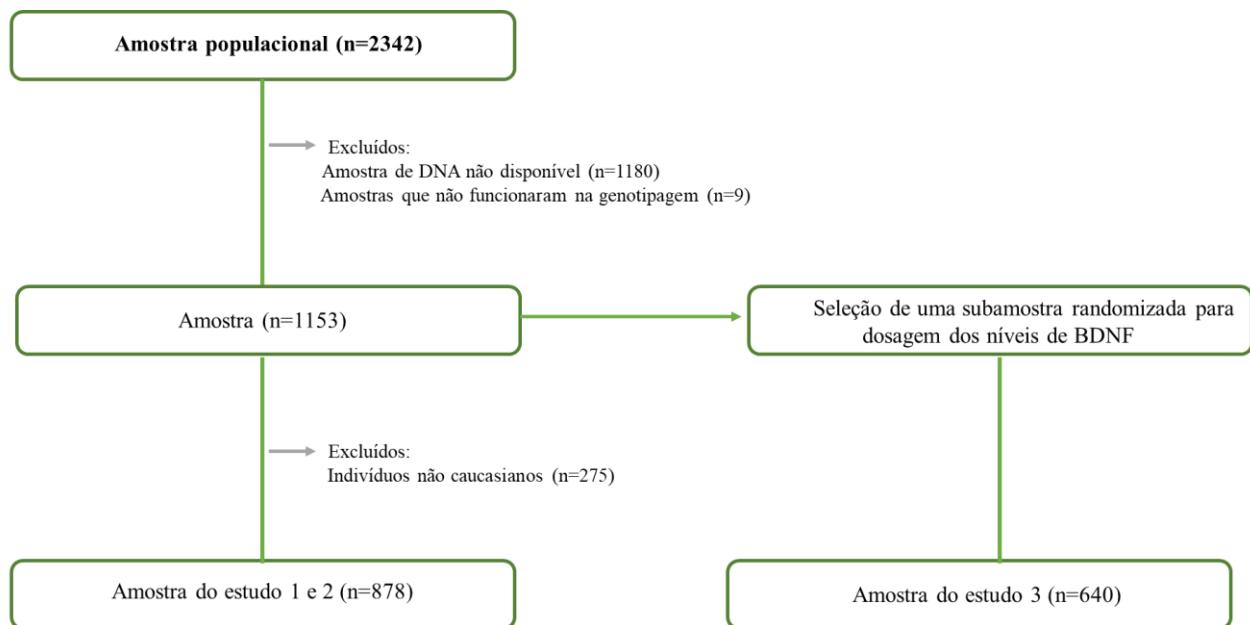
5.2 PARTICIPANTES

A seleção amostral foi realizada por conglomerados, considerando a população de aproximadamente 97 mil adultos de 18 a 35 anos de idade e a divisão censitária de 495 setores na cidade de Pelotas, ambos fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Para garantir uma amostra ampla e representativa, 83 setores baseados no censo foram selecionados de forma sistemática e aleatória com um salto de seis setores. A seleção dos domicílios foi realizada segundo procedimento sistemático de amostragem: o primeiro domicílio selecionado foi na esquina pré-estabelecida pelo IBGE como início do setor, sendo pulados os próximos quatro domicílios; assim, uma a cada cinco residências foi selecionada.

5.2.1 Cálculo Amostral

O cálculo do tamanho amostral do estudo original foi realizado com base em parâmetros de confiabilidade de 95%, poder de 80%, prevalência do desfecho de 10% e menor prevalência esperada de 8% e estimou um número de 1714 jovens adultos, a serem avaliados. Os artigos elaborados neste trabalho, no entanto, apresentam um número amostral menor. Isso ocorreu porque embora o estudo original conte com um número amostral maior do que estimado, amostras de DNA foram obtidas apenas para 1162 indivíduos. Além disso, devido a uma interação significativa entre os SNPs e a etnia no TB, o primeiro e segundo artigo foram realizados apenas com indivíduos caucasianos. Já a dosagem de BDNF foi realizada em uma subamostra representativa da amostra original. Como não observamos interação significativa entre os SNPs e a etnia nos níveis de BDNF, o artigo é composto por indivíduos caucasianos e não caucasianos (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma com as etapas para definição do número amostral



Legenda: Fluxograma com as etapas realizadas para definição do número amostral dos três artigos que compõe esse volume. Fonte: O autor.

5.2.2 Critérios de inclusão

- Ter entre 18 e 35 anos de idade;
- Residir na zona urbana de Pelotas-RS, bem como no domicílio sorteado;

5.2.3 Critérios de exclusão

- Ser incapaz de responder à entrevista por problemas físicos ou cognitivos. Esse critério foi identificado pelo avaliador.

5.3 PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS

5.3.1 Caracterização da amostra

As características da amostra foram determinadas através de um questionário sociodemográfico, incluindo avaliação econômica realizada pelo Indicador Econômico Nacional [Anexo C].

5.3.2 Critérios diagnósticos e medidas psicológicas

5.3.2.1 Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI)

A entrevista diagnóstica MINI, foi utilizada para o diagnóstico de TB. A Mini é uma entrevista clínica estruturada, que dura de 15 a 30 minutos, baseada nos critérios do DSM. Esta entrevista explora os principais Transtornos Psiquiátricos do Eixo I, através de módulos. A versão utilizada nesse trabalho é a 5.0, baseada nos critérios diagnósticos do DSM-IV. O módulo D desta versão detecta a presença de episódios maníacos ou hipomaníacos e o módulo A avalia a presença de episódio depressivo. Consideramos indivíduos bipolares aqueles que tiveram história pregressa ou atual de episódios de mania ou pelo menos um episódio hipomaníaco e um episódio depressivo. A entrevista MINI é amplamente utilizada em pesquisas, por ser de aplicação rápida e ter bons índices de sensibilidade e especificidade.

5.3.2.2 Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)

O trauma na infância foi avaliado pelo CTQ, um inventário de auto-relato composto por 28 itens de autoria de Bernstein *et al.* (2003) traduzido e validado para o Brasil (Grassi-Oliveira *et al.* 2006; Grassi-Oliveira et al. 2014). O CTQ investiga retrospectivamente a ocorrência e intensidade de trauma em cinco domínios: abuso físico, abuso emocional, abuso sexual, negligência física e negligência emocional [Anexo D]. A versão original do CTQ fornece pontos de corte para cada subescala sendo dividido em nenhum/baixo, baixo/moderado, moderado/grave e grave/extremo. Em nosso estudo, indivíduos com trauma moderado/grave e grave/extremo em pelo menos um dos domínios avaliados pela escala foram considerados expostos ao trauma (pontuação de corte ≥ 10 abuso físico, ≥ 13 abuso emocional, ≥ 8 abuso sexual, ≥ 10 negligência física e ≥ 15 por negligência emocional), enquanto indivíduos que pontuaram nenhum/baixo e baixo/mínimo em todos os domínios foram considerados como não expostos ao trauma.

5.3.2.3 Affective and Emotional Composite Temperament Scale (AFECTS)

A escala AFECTS foi utilizada para avaliar os traços de temperamento. Ela é composta por duas seções, uma que avalia as dimensões emocionais e a outra que avalia as dimensões afetivas. No desenvolvimento deste estudo utilizamos os traços emocionais. O instrumento avalia esses traços de maneira quantitativa, em uma escala bipolar de sete pontos com 48 itens, dividida em 7 dimensões, das quais 5 são compostas por 8 questões e duas por 4. As dimensões são nomeadas vontade, raiva, medo, cautela, sensibilidade, coping e controle. A pontuação total

de cada dimensão é a soma das pontuações de 1 a 7 para cada questão, portanto, os escores das dimensões variam de 8 a 56 ou de 4 a 16 (Anexo E).

5.3.3 Coleta e processamento do material biológico

A coleta de sangue foi realizada por uma equipe de bioquímicos e enfermeiros através de punção venosa de 15 ml de sangue no momento da aplicação dos questionários. O sangue coletado foi centrifugado a 3500g por 15 min e o soro extraído foi armazenado em um freezer -80°C, para posteriores dosagens bioquímicas. O DNA total foi extraído a partir de leucócitos utilizando-se o método descrito por Lahiri e Nurnberger (1987). Posteriormente o DNA total foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a -20°C até a análise molecular.

5.3.4 Seleção dos polimorfismos

A busca dos SNPs alvos para o estudo foi realizada através da base de dados do Consórcio de Genômica Psiquiátrica (PGC, do inglês *Psychiatric Genomics Consortium*), sendo selecionados os SNPs que mostraram significância com o TB e que apresentam boa prevalência na população europeia. Abaixo segue a tabela com o gene e os SNPs selecionados.

Tabela 2. Gene e SNPs selecionados através da busca na base de dados PGC.

Gene	SNPs	Variação	Localização	Consequência funcional	Patologia
<i>CACNA1C</i>	rs1006737	G/A	Cromossomo 12p13.3	Intrônica	Transtorno Bipolar
	rs4765913	A/T			

5.3.5 Análise dos polimorfismos

Os polimorfismos apresentados na tabela 2 foram genotipados através de ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real no termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram utilizados *primers* e sondas contidos no ensaio de genotipagem personalizado TaqMan 40x (Life Technologies, Foster City, CA, EUA). As reações foram conduzidas em uma placa de 96 poços, em um total de 5 µl de volume de reação usando 2 ng de DNA genômico, TaqMan Genotyping Master Mix 1x (Applied Biosystems) e Custom TaqMan Genotyping Assay 1x. Em seguida, as placas foram posicionadas em um termociclador de PCR em tempo real (sistema 7500 Fast Real PCR; Applied Biosystems) e aquecidas por 10 minutos a 95°C, seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15

se 60°C por 1 min. Os arquivos de dados de fluorescência de cada placa foram analisados usando o software *System Sequence Detection* v.1.4 (Applied Biosystems).

5.3.6 Dosagem do BDNF

Os níveis séricos de BDNF foram dosados através do ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), utilizando os kits comerciais disponíveis (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., USA) em um leitor de microplacas (Molecular Devices, Espectra Max 190).

5.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

Os questionários foram digitados diretamente no programa Epi Info 6,04d no momento da entrevista. As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos selecionados foram estimadas por contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado pelo teste qui-quadrado (χ^2). O programa Haplovview 4.2 foi utilizado para estimar e visualizar o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos rs1006737 e rs4765913 e determinar os blocos de haplótipos formados por eles. Após análise do desequilíbrio de ligação na nossa amostra os haplótipos foram estimados utilizando UNPHASED 3.1.7. As outras análises foram realizadas no programa SPSS 22.0 e os gráficos gerados no programa GraphPad Prism 6.0. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.4.1 Artigo 1

As características sociodemográficas foram descritas de acordo com o diagnóstico, com os polimorfismos e com o trauma na infância. As variáveis categóricas foram testadas pelo teste χ^2 seguido do *post-hoc* de Bonferroni e as variáveis contínuas por teste *t de Student*. A regressão logística binária foi utilizada para testar a associação entre os SNPs/haplótipo no gene *CACNA1C* e o TB, bem como a interação entre esses SNPs e o trauma infantil. A estimativa do efeito foi apresentada como *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC).

5.4.2 Artigo 2

As características sociodemográficas e clínicas foram comparadas de acordo com o diagnóstico utilizando teste χ^2 seguido do *post-hoc* de *Bonferroni* ou teste *t* de *Student*, conforme apropriado. Análises de regressão linear foram utilizadas para testar o impacto do TB e dos SNPs nos traços de temperamento, estimando o coeficiente β não padronizado. Regressão logística foi utilizada para avaliar o efeito dos traços de temperamento no TB, tendo a métrica *log-odds* como medida de efeito. Os traços temperamentais associados tanto aos SNPs em *CACNA1C*, como ao TB foram incluídos na análise de mediação. Os modelos de mediação foram testados por meio da ferramenta de modelagem PROCESS (versão 3.3) para SPSS (HAYES, 2017).

5.4.3 Artigo 3

As características sociodemográficas, clínicas e biológicas foram descritas através de frequência simples ou média \pm desvio padrão (DP). Os níveis séricos de BDNF apresentaram distribuição não normal e foram logaritmicamente transformados e representados como média e DP. Análise de regressão linear foi realizada para verificar a associação dos níveis de BDNF com os SNPs/haplótipos ajustados para sexo, idade, cor da pele e tabagismo. Os resultados foram expressos como valor de β e IC de 95%.

5.5 ANÁLISES *IN SILICO*

Para elaboração do terceiro artigo, foi realizada uma análise de bioinformática a fim de fornecer informações sobre os SNPs avaliados (rs1006737 e rs4765913) e suas sequências flankeadoras. Foram utilizados dados obtidos da fase 3 do Projeto 1000 Genomas para avaliação de uma região de 116 kb dentro do ítron 3 (2.324.000 a 2.440.000), esses dados foram extraídos usando a ferramenta *Ferret*. Os arquivos gerados foram então inseridos no programa Haploview 4.2 originando o gráfico de LD. Todos os SNPs identificados na região avaliada foram pesquisados no Catálogo GWAS para verificar possíveis associações com psicopatologias. O Catálogo GWAS pertence a um projeto colaborativo entre o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI, do inglês *National Human Genome Research Institute*) e o instituto Europeu de Bioinformática (EMBL-EBI, do inglês *The European Bioinformatics Institute*) e fornece um banco de dados consistente de associações entre SNPs e diferentes traços (BUNIELLO *et al.*, 2019). A partir dos dados fornecidos pelo catálogo GWAS foram identificados os principais blocos de haplótipos da região de 116kb

associados a transtornos psiquiátricos. A função regulatória putativa dos SNPs inseridos nesses blocos foi avaliada pelo HaploReg v4.1 (WARD & KELLIS, 2012). O HaploReg é uma ferramenta para explorar anotações do genoma não codificante, projetada para pesquisadores que desenvolvem hipóteses mecanicistas do impacto dessas variantes em fenótipos clínicos. Informações sobre o estado da cromatina, anotação de ligação de proteínas, efeito dos SNPs em motivos regulatórios são evidências funcionais integradas neste conjunto de dados. Avaliamos 10 regiões diferentes do cérebro (hipocampo médio, substância negra, caudado anterior, giro cingulado, lobo temporal inferior, giro angular, córtex pré-frontal dorsolateral, matriz germinativa e cérebro fetal masculino e feminino) e células primárias de astrócitos.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

Foram respeitados todos os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012. Sendo assegurado o direito à confidencialidade dos dados e o cuidado na utilização das informações nos trabalhos escritos, de modo que os participantes não possam ser identificados. As pessoas que apresentaram transtornos psiquiátricos receberam encaminhamento para atendimento psicológico/psiquiátrico no Campus da Saúde da UCPel.

5.6.1 Riscos

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

5.6.2 Benefícios

Além de gerar informações que vem a contribuir com a comunidade científica, os participantes identificados com transtornos psiquiátricos receberam atendimento.

6 CRONOGRAMA

7 ORÇAMENTO

<i>Produto</i>	<i>Valor unitário (R\$)</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Valor total</i>
<i>Material de Consumo</i>			
Master Mix	3.763,00	1	3.763,00
SNP Genotyping Assay	1.300,00	2	2.600,00
Microamp Fast Optical 96 WELL-20 placas	380,00	2	760,00
Kits Elisa (BDNF)	3.500,00	1	3.500,00
		Total	10.623,00

REFERÊNCIAS

- AAS, M.; HENRY, C.; ANDREASSEN, O.A.; BELLIVIER, F.; MELLE, I.; ETAIN, B. The role of childhood trauma in bipolar disorders. **Int. J. Bipolar Disord.** 4: 2, 2016.
- AKISKAL, H.S. The temperamental foundations of affective disorders. In: MUNDT, C.; HAHLWEG, K.; FIEDLER, P. (editors). **Interpersonal Factors in the Origin and Course of Affective Disorders**. London: Gaskell, p. 3–30, 1996.
- AKISKAL, H.S.; AKISKAL, K. Cyclothymic, hyperthymic and depressive temperaments as subaffective variants of mood disorders. **Annual Review**. Washington, DC: American Psychiatric Press, p. 43–62, 1992.
- AKISKAL, H.S.; DJENDEREDJIAN, A.M.; ROSENTHAL, R.H.; KHANI, M.K. Cyclothymic disorder: validating criteria for inclusion in the bipolar affective group. **Am J Psychiatry**. 134(11), p. 1227-33, 1977.
- ALONSO, J.; PETUKHOVA, M.; VILAGUT, G.; CHATTERJI, S.; HEERINGA, S.; ÜSTÜN, T.B.; ALHAMZAWI, A.O.; VIANA, M.C.; ANGERMEYER, M.; BROMET, E.; BRUFFAERTS, R.; DE GIROLAMO, G.; FLORESCU, S.; GUREJE, O.; HARO, J.M.; HINKOV, H.; HU, C.Y.; KARAM, E.G.; KOVESS, V.; LEVINSON, D.; MEDINA-MORA, M.E.; NAKAMURA, Y.; ORMEL, J.; POSADA-VILLA, J.; SAGAR, R.; SCOTT, K.M.; TSANG, A.; WILLIAMS, D.R.; KESSLER, R.C. Days out of role due to common physical and mental conditions: results from the WHO World Mental Health surveys. **Mol Psychiatry**. 16(12), p. 1234-46, 2011.
- ARUNDINE, M.L.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**. 34(4-5), p. 325-37, 2003.
- BADING, H.; GINTY, D.D.; GREENBERG, M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. **Science**, 260, p. 181-186, 1993.
- BAGUR, R.; HAJNÓCZKY, G. Intracellular Ca^{2+} sensing: role in calcium homeostasis and signaling. **Mol Cell**. 66(6), p. 780–788, 2017.
- BHAT, S.; DAO, D.T.; TERRILLION, C.E.; ARAD, M.; SMITH, R.J.; SOLDATOV, N.M.; GOULD, T.D. **CACNA1C** ($\text{Ca}_v1.2$) in the pathophysiology of psychiatric disease. **Prog Neurobiol**. 99(1), p. 1–14, 2012.
- BAUM, A.E.; AKULA, N.; CABANERO, M.; CARDONA, I.; CORONA, W.; KLEMENS, B.; SCHULZE, T.G.; CICHON, S.; RIETSCHEL, M.; NÖTHEN, M.M.; GEORGI, A.; SCHUMACHER, J.; SCHWARZ, M.; ABOU JAMRA, R.; HÖFELS, S.; PROPPING, P.; SATAGOPAN, J.; DETERA-WADLEIGH, S.D.; HARDY, J.; MCMAHON, F.J. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. **Mol Psychiatry**. 13(2), p.197-207, 2008.
- BAVLEY, C.C.; FISCHER, D.K.; RIZZO, B.K.; RAJADHYAKSHA, A.M. $\text{Ca}_v1.2$ channels mediate persistent chronic stress induced behavioral deficits that are associated with prefrontal cortex activation of the p25/Cdk5-glucocorticoid receptor pathway. **Neurobiol Stress**, 7, p. 27-37, 2017.

- BERNSTEIN, D.P.; STEIN, J.A.; NEWCOMB, M.D.; WALKER, E.; POGGE, D.; AHLUVALIA, T.; STOKES, J.; HANDELSMAN, L.; MEDRANO, M.; DESMOND, D.; ZULE, W. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. **Child Abuse Negl.** 27, p. 169-190, 2003.
- BERRIDGE, M.J. Calcium signalling and psychiatric disease: bipolar disorder and schizophrenia. **Cell Tissue Res.** 357(2), p. 477-92, 2014.
- BERRIDGE, M.J. Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia. **Prion.** 7(1), p. 2–13, Jan. 1, 2013.
- BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 1(1), p. 11-21, 2000.
- BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 4(7), p. 517-29, 2003.
- BIGOS, K.L.; MATTAY, V.S.; CALLICOTT, J.H.; STRAUB, R.E.; VAKKALANKA, R.; KOLACHANA, B.; HYDE, T.M.; LIPSKA, B.K.; KLEINMAN, J.E.; WEINBERGER, D.R. Genetic variation in CACNA1C affects brain circuitries related to mental illness. **Arch Gen Psychiatry** 67, p. 939–945, 2010.
- BÎLC, M.I.; VULTURAR, R.; CHIŞ, A.; BUCIUMAN, M.; NUTU, D.; BUNEA, I.; SZENTÁGOTAI-TATAR, A.; MIU, A.C. Childhood trauma and emotion regulation: The moderator role of BDNF Val66Met. **Neurosci Lett.** 685, p. 7-11, 2018.
- BOOTMAN, M.D.; BERRIDGE, M.J.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. **Curr Biol.** 12(16), p. 563-5, 2002.
- BUNIELLO, A.; MACARTHUR, J.A.L.; CEREZO, M.; HARRIS, L.W.; HAYHURST, J.; MALANGONE, C.; MCMAHON, A.; MORALES, J.; MOUNTJOY, E.; SOLLIS, E.; SUVEGES, D.; VROUSGOU, O. ... et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics. **Nucleic Acids Research.** 47, p. D1005-D1012, 2019.
- BUSH, W.S.; MOORE, J.H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **PLoS Comput Biol.** 8(12): e1002822, 2012.
- CAMPIGLIO, M.; FLUCHER, B.E. The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. **J Cell Physiol.** 230(9), p. 2019-31, 2015.
- CAIN, S.M.; SNUTCH, T.P. Voltage-gated calcium channels and disease. **Biofactors.** 37(3), p. 197-205, 2011.
- CARDOSO, B.M.; KAUER SANT'ANNA, M.; DIAS, V.V.; ANDREAZZA, A.C.; CERESÉR, K.M.; KAPCZINSKI, F. The impact of co-morbid alcohol use disorder in bipolar patients. **Alcohol.** 42(6), p. 451-7, 2008.

CASAMASSIMA, F.; HAY, A.C.; BENEDETTI, A.; LATTANZI, L.; CASSANO, G.B.; PERLIS, R.H. L-type calcium channels and psychiatric disorders: A brief review. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 153B(8), p. 1373-90, 2010.

CASPI, A.; MOFFITT, T.E. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. **Nat Rev Neurosci.** 7(7), p. 583-90, 2006.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annu Rev Cell Dev Biol** 16, p. 521–555, 2000.

CATTERALL, W.A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T.P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacol Rev.**, n. 57, p. 411–425, 2005.

CARVALHO, H.W.; COGO-MOREIRA, H.; JANSEN, K.; SOUZA, L.; BRANCO, J.; SILVA, R., LARA, D. The latente structure and reliability of the emotional trait section of Affective and Emotional Composite Temperament Scale (AFECTS). **Arch. Clin. Psychiatry (São Paulo)**, 47(1), 2020.

CLONINGER, C.R.; CLONINGER, K.M.; ZWIR I.; KELTIKANGAS-JÄRVINEN, L. The complex genetics and biology of human temperament: a review of traditional concepts in relation to new molecular findings. **Translational Psychiatry**. 9, n. 290, 2019.

COLLINS, A.L.; SULLIVAN, P.F. Genome-wide association studies in psychiatry: what have we learned? **Br J Psychiatry**. 202(1), p. 1-4, 2013.

COSTA, J.; GARCÍA-BLANCO, A.; CAÑADA, Y.; GARCÍA-PORTILLA, M.P.; SAFONT, G.; ARRANZ, B.; SANCHEZ-AUTET, M.; LIVIANOS, L.; FORNÉS-FERRER, V.; SIERRA, P. Are affective temperaments determinants of quality of life in euthymic patients with bipolar disorder? **J Affect Disord.** 230, p. 101-107, 2018.

CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. **Lancet** 381, p. 1371–1379, 2013.

CUNHA, A.B.; FREY, B.N.; ANDREAZZA, A.C.; GOI, J.D.; ROSA, A.R.; GONÇALVES, C.A.; SANTIN, A.; KAPCZINSKI, F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. **Neurosci Lett.** 398 (3), p. 215-9, 2006.

DARUY-FILHO, L.; BRIETZKE, E.; LAFER, B.; GRASSI-OLIVEIRA, R. Childhood maltreatment and clinical outcomes of bipolar disorder. **Acta Psychiatr Scand.** 124(6), p. 427-34, 2011.

DE CODT, A.; MONHONVAL, P.; BONGAERTS, X.; BELKACEMI, I.; TECCO, J.M. Bipolar Disorder and Early Affective Trauma. **Psychiatr Danub.** 28, p. 4-8, 2016.

DEDIC, N.; PÖHLMANN, M.L.; RICHTER, J.S.; MEHTA, D.; CZAMARA, D.; METZGER, M.W.; DINE, J.; BEDENK, B.T.; HARTMANN, J.; WAGNER, K.V.; JURIK, A.; ALMLI, L.M.; LORI, A.; MOOSMANG, S.; HOFMANN, F.; WOTJAK, C.T.;

RAMMES, G.; EDER, M.; CHEN, A.; RESSLER, K.J.; WURST, W.; SCHMIDT, M.V.; BINDER, E.B.; DEUSSING, J.M. Cross-disorder risk gene CACNA1C differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood. **Mol Psychiatry**, 23, p. 533-543, 2018.

DI BIASE, V.; OBERMAIR, G.J.; SZABO, Z.; ALTIER, C.; SANGUESA, J.; BOURINET, E.; FLUCHER, B.E. Stable membrane expression of postsynaptic CaV1.2 calcium channel clusters is independent of interactions with AKAP79/150 and PDZ proteins. **J Neurosci**. 28(51), p. 13845-55, 2008.

DUBOVSKY, S.L.; DAURIGNAC, E.; LEONARD, K.E. Increased platelet intracellular calcium ion concentration is specific to bipolar disorder. **J Affect Disord**, n.164, p. 38-42, 2014.

DUBOVSKY, S.L.; FRANKS, R.D. Intracellular calcium ions in affective disorders: a review and an hypothesis. **Biol Psychiatry**. 18, p. 781-97, 1983.

DUBOVSKY, S.L.; THOMAS, M.; HIJAZI, A.; MURPHY, J. Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**. 243(5), p. 229-34, 1994.

ECKART, N.; SONG, Q.; YANG, R.; WANG, R.; ZHU, H.; MCCALLION, A.S.; AVRAMOPOULOS, D. Functional Characterization of Schizophrenia-Associated Variation in CACNA1C. **PLoS One**. 11, e0157086, 2016.

EHLINGER, D.G.; COMMONS, K.G. Cav1.2 L-type calcium channels regulate stress coping behavior via serotonin neurons. **Neuropharmacology**.144, p. 282-290, 2019.

ERK, S.; MEYER-LINDENBERG, A.; SCHNELL, K.; OPITZ VON BOBERFELD, C.; ESSLINGER, C.; KIRSCH, P.; GRIMM, O.; ARNOLD, C.; HADDAD, L.; WITT, S.H.; CICHON. S.; NÖTHEN, M.M.; RIETSCHEL, M.; WALTER, H. Brain function in carriers of a genome-wide supported bipolar disorder variant. **Arch Gen Psychiatry** 67(8), p. 803-11, 2010.

EVANS, L.; AKISKAL, H.S.; KECK, P. E. J.R.; MCELROY, S.L.; SADOVNICK, A.D.; REMICK, R.A.; KELSOE, J.R. Familiality of temperament in bipolar disorder: support for a genetic spectrum. **J Affect Disord**. 85(1-2), p. 153-68, 2005.

FARMER A, MCGUFFIN P, LEWIS CM, HOSANG G, RIVERA M, CRADDOCK N. Comorbid medical illness in bipolar disorder. **Br J Psychiatry**. 205(6), p. 465–472, 2014.

FERNANDES, B.S.; GAMA, C.S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; LOBATO, M.I.; BELMONTE-DE-ABREU, P.; KAPCZINSKI, F. Serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar and unipolar depression: a potential adjunctive tool for differential diagnosis. **J Psychiatr Res**. 43(15), p. 1200-4, 2009.

FERREIRA, M.A.; O'DONOVAN, M.C.; MENG, Y.A.; JONES, I.R.; RUDERFER, D.M.; JONES, L.; FAN, J.; *et al.* Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. **Nat Genet**, 40, p. 1056-1058, 2008.

FICO, G.; CAIVANO, V.; ZINNO, F., CARFAGNO, M.; STEARDO, L. J.; SAMPOGNA, G.; LUCIANO, M.; FIORILLO, A. Affective Temperaments and Clinical Course of Bipolar Disorder: An Exploratory Study of Differences among Patients with and without a History of Violent Suicide Attempts. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, 55, p. 390, 2019.

FORTY L, ULANOVA A, JONES L, JONES I, GORDON-SMITH K, FRASER C, FERNANDES, B.S.; GAMA, C.S.; CERESÉR, K.M.; YATHAM, L.N., FRIES, G.R.; COLPO, G.; DE LUCENA, D.; KUNZ, M.; GOMES, F.A.; KAPCZINSKI, F. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. **J Psychiatr Res.** 45(8), p. 995-1004, 2011.

FRANGOU, S. Emotional instability and bipolar disorder. **European Psychiatry**. v.33, 2016.

FREEMAN, T.W.; CLOTHIER, J.L.; PAZZAGLIA, P.; LESEM, M.D.; SWANN, A.C. A double-blind comparison of valproate and lithium in the treatment of acute mania. **Am J Psychiatry**. 149(1), p.108-11, Jan. 1992.

GARDNER, H.H.; KLEINMAN, N.L.; BROOK, R.A.; RAJAGOPALAN, K.; BRIZEE, T.J.; SMEEDING, J.E. The economic impact of bipolar disorder in an employed population from an employer perspective. **J Clin Psychiatry**. 67(8), p. 1209-18, 2006.

GARNO, J.L.; GOLDBERG, J.F.; RAMIREZ, P.M.; RITZLER, B.A. Impact of childhood abuse on the clinical course of bipolar disorder. **Br J Psychiatry**. 186, p. 121-125, 2005.

GERSHON, E.S.; GRENNAN, K.; BUSNELLO, J.; BADNER, J.A.; OVSIEW, F.; MEMON, S.; ALLIEY-RODRIGUEZ, N.; COOPER, J.; ROMANOS, B.; LIU, C. A rare mutation of CACNA1C in a patient with Bipolar disorder, and decreased gene expression associated with a Bipolar-associated common SNP of CACNA1C in brain. **Mol Psychiatry**. 19(8), p. 890–894, 2014.

GHOSH, A.; CARNAHAN, J.; GREENBERG, M.E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. **Science**. 263, p. 1618-1623, 1994.

GINTY, D.D. Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial? **Neuron**. 18, p. 183-186, 1997.

GLEICHMANN, M.; MATTSON, M.P. Neuronal Calcium Homeostasis and Dysregulation. **Antioxid. Redox Signal.** 14(7), p. 1261–1273, 2011.

GOLDSMITH, H.H.; BUSS, A.H.; PLOMIN, R.; ROTHBART, M.K.; THOMAS, S.; CHESS, S.; HINDE, R.A.; MCCALL, R.B. Roundtable: what is temperament? Four approaches. **Child. Dev.** 58, p. 505 – 529, 1987.

GOTTESMAN II; GOULD, T.D. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. **Am. J. Psychiatry**. 160(4), p. 636-45, 2003.

GRANDE, I.; BERK, M.; BIRMAHER, B.; VIETA, E. Bipolar disorder. **Lancet**. 387, p. 1561-1572, 2016.

GRASSI-OLIVEIRA, R.; STEIN, L.M.; PEZZI, J.C. Translation and content validation of the Childhood Trauma Questionnaire into Portuguese language. **Rev. Saude Publica**, 40, p. 249-255, 2006.

GRASSI-OLIVEIRA, R.; COGO-MOREIRA, H.; SALUM, G.A.; BRIETZKE, E.; VIOLA, T.W.; MANFRO, G.G.; KRISTENSEN, C.H.; ARTECHE, A.X. Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) in Brazilian Samples of Different Age Groups: Findings from Confirmatory Factor Analysis. **PLoS One**. 9(1): e87118, 2014.

GREER, P.L.; GREENBERG, M.E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. **Neuron**, 59, p. 846-860, 2008.

GREEN, E.K.; GROZEV, D.; JONES, I.; JONES, L.; KIROV, G.; CAESAR, S.; GORDON-SMITH, K.; FRASER, C.; FORTY, L...et al. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. **Mol. Psychiatry**. 15, p. 1016-1022, 2010.

GUO, X.; LIU, D.; WANG, T.; LUO, X. Aetiology of bipolar disorder: contribution of the L-type voltage-gated calcium channels. **Gen. Psychiatr.** 32(2), e100009, 2019.

HAHN, C.G.; GOMEZ, G.; RESTREPO, D.; FRIEDMAN, E.; JOSIASSEN, R.; PRIBITKIN, E.A.; LOWRY, L.D.; GALLOP, R.J.; RAWSON, N.E. Aberrant intracellular calcium signaling in olfactory neurons from patients with bipolar disorder. **Am. J. Psychiatry**. 162(3), p. 616-8, 2005.

HARRISON, P.J.; GEDDES J.R.; TUNBRIDGE, E.M. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. **Trends Neurosci.** 41(1), p. 18-30, 2018.

HAYES, A. F. **Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach.** 2^aed. Guilford Press, 2017.

HAYES, J.F.; LUNDIN, A.; WICKS, S.; LEWIS, G.; WONG, I.C.K.; OSBORN, D.P.J.; DALMAN, C. Association of Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors, L-Type Calcium Channel Antagonists, and Biguanides With Rates of Psychiatric Hospitalization and Self-Harm in Individuals With Serious Mental Illness. **JAMA Psychiatry**. 76(4), p. 382-390, 2019.

HELL, J.W.; WESTENBROEK, R.E.; WARNER, C.; AHLIJANIAN, M.K.; PRYSTAY, W.; GILBERT, M.M.; SNUTCH, T.P. & CATTERALL, W.A. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel $\alpha 1$ subunits. **J Cell Biol** 123, p. 949-962, 1993.

JAWORSKA-ANDRYSZEWSKA, P.; RYBAKOWSKI, J.K. Childhood trauma in mood disorders: Neurobiological mechanisms and implications for treatment. **Pharmacol. Rep.**, 71, p. 112-120, 2019.

JENKINS, M.A.; CHRISTEL, C.J.; JIAO, Y. ABIRIA, S.; KIM, K.Y.; USACHEV, Y.M.; OBERMAIR, G.J.; COLBRAN, R.J.; LEE, A. Ca $^{2+}$ -dependent facilitation of Cav1.3 Ca $^{2+}$

channels by densin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **J Neurosci.** 30(15), p. 5125-5135, 2010.

JEON, D.; KIM, S.; CHETANA, M.; JO, D.; RULEY, H.E.; LIN, S.Y.; RABAH, D.; KINET, J.P.; SHIN, H.S. Observational fear learning involves affective pain system and Ca_v1.2 Ca²⁺ channels in ACC. **Nature Neuroscience.** 13, p. 482-488, 2010.

JOGIA, J.; RUBERTO, G.; LELLI-CHIESA, G.; MAIERÚ, M.; TATARELLI, R.; GIRARDI, P.; COLLIER, D.; FRANGOU, S. The impact of the CACNA1C gene polymorphism on frontolimbic function in bipolar disorder. **Mol Psychiatry.** 16, p. 1070-1071, 2011.

JOHNSON, S. L.; THARP, J.A.; PECKHAM, A. D.; MCMASTER, K. J. Emotion in bipolar I disorder: Implications for functional and symptom outcomes. **J. Abnorm. Psychol.**, 125(1), p. 40-52, 2016.

JOPE, R.; ROH, M. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. **Curr. Drug Targets.** 7(11), p. 1421-1434, 2006.

KANTOJÄRVI, K.; LIUHANEN, J.; SAARENPAÄ-HEIKKILÄ, O.; SATOMAA, A.L.; KYLLIÄINEN, A.; PÖLKKI, P.; JAATELA, J.; TOIVOLA, A.; MILANI, L.; HIMANEN, S.L.; PORKKA-HEISKANEN, T.; PAAVONEN, J.; PAUNIO, T. Variants in calcium voltage-gated channel subunit Alpha1 C-gene (CACNA1C) are associated with sleep latency in infants. **PLoS One.** 12: e0180652, 2017.

KESSING, L.V.; HELLMUND, G.; GEDDES, J.R.; GOODWIN, G.M.; ANDERSEN, P.K. Valproate v. lithium in the treatment of bipolar disorder in clinical practice: observational nationwide register-based cohort study. **Br J Psychiatry.** 199 (1), p. 57-63, 2011.

KETTER, T.A. Diagnostic features, prevalence and impact of bipolar disorder. **J Clin Psychiatry.** 71(6), e14, 2010.

KHALID, M.; DRIESSEN, T.M.; LEE, J.S.; TEJWANI, L.; RASOOL, A.; SAQLAIN, M.; SHIAQ, P.A.; HANIF, M.; NAWAZ, A.; DEWAN, A.T.; RAJA, G.K.; LIM, J. Association of CACNA1C with bipolar disorder among the Pakistani population. **Gene.** 664, p. 119-126, 2018.

KRISHNAN, K. R. Psychiatric and medical comorbidities of bipolar disorder. **Psychosom Med.** 67(1), p. 1-8, 2005.

KOCHMAN, F.J.; HANTOUCHE, E.G.; FERRARI, P.; LANCRENON, S.; BAYART, D.; AKISKAL, H.S. Cyclothymic temperament as a prospective predictor of bipolarity and suicidality in children and adolescents with major depressive disorder. **J Affect Disord.** 85(1-2), p. 181-9, 2005.

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

- LANCASTER, T.M.; FOLEY, S.; TANSEY, K.E.; LINDEN, D.E.; CASERAS, X. CACNA1C risk variant is associated with increased amygdala volume. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.** 266, p. 269-275, 2016.
- LARA, D.R.; BISOL, L.W.; BRUNSTEIN, M.G.; REPPOLD, C.T.; DE CARVALHO, H.W.; OTTONI, G.L. The Affective and Emotional Composite Temperament (AFECT) model and scale: a system-based integrative approach. **J Affect Disord.** 140(1), p. 14-37, 2012.
- LIN, P.Y. State-dependent decrease in levels of brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: a meta-analytic study. **Neurosci Lett.** 466(3), p. 139-43, 2009.
- LINKOWSKI, P.; KERKHOFS, M.; RIELAERT, C.; MENDLEWICZ, J. Sleep during mania in manic-depressive males. **Eur Arch Psychiatry Neurol Sci,** 235, p. 339-341, 1986.
- LIPSCOMBE, D.; TORO, C.P. Biophysics of voltage-gated ion channels. In: Byrne, J.H.; Heidelberger, R.; Waxham, M.N. (editors). **From Molecules to Networks:** An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. Ed. Academic Press, cap. 13, p. 377-403, 2014.
- MA H.; COHEN, S.; LI, B., TSIEN, RW. Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus. **Biosci Rep.** 33(1), p. 97-101, 2012.
- MAIGAARD, K.; HAGEMAN, I.; JØRGENSEN, A.; JØRGENSEN, M.B.; WÖRTWEIN, G. Electroconvulsive stimulations prevent chronic stress-induced increases in L-type calcium channel mRNAs in the hippocampus and basolateral amygdala. **Neurosci. Lett.** 516, p. 24-28, 2012.
- MCGUFFIN, P.; RIJSDIJK, F.; ANDREW, M.; SHAM, P.; KATZ, R.; CARDNO, A. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. **Arch. Gen. Psychiatry.** 60, p. 497-502, 2003.
- MERIKANGAS, K.R.; AKISKAL, H.S.; ANGST, J.; GREENBERG, P.E.; HIRSCHFELD, R.M.; PETUKHOVA, M.; KESSLER, R.C. Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. **Arch Gen Psychiatry.** 64(5), p. 543-52, 2007.
- MICK, E.; MCGOUGH, J.; DEUTSCH, C.K.; FRAZIER, J.A.; KENNEDY, D.; GOLDBERG, R.J. Genome-wide association study of proneness to anger. **PLoS One.** 9(1):e87257, 2014.
- MIN, J.A.; LEE, H.J.; LEE, S.H.; PARK, Y.M.; KANG, S.G.; PARK, Y.G.; CHAE, J.H. RORA Polymorphism Interacts with Childhood Maltreatment in Determining Anxiety Sensitivity by Sex: A Preliminary Study in Healthy Young Adults. **Clin Psychopharmacol Neurosci.** 15, p. 402-406, 2017.
- NABAVI, B.; MITCHELL, A.; NUTT, D. A Lifetime Prevalence of Comorbidity Between Bipolar Affective Disorder and Anxiety Disorders: A Meta-analysis of 52 Interview-based Studies of Psychiatric Population. **EBioMedicine.** 2(10), p. 1405–1419 2015.

- NOWYCKY, M.C.; FOX, A.P.; TSIEN, R.W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. **Nature** 316 (6027), p. 440–443, 1985.
- ONOFRIO, S.; MAHAFFEY, S.; GARCIA-RILL, E. Role of calcium channels in bipolar disorder. **Curr Psychopharmacol.** 6(2), p. 122–135, 2017.
- PSYCHIATRIC GWAS CONSORTIUM BIPOLAR DISORDER WORKING GROUP. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. **Nature Genetics.** 43, p. 977-983, 2011.
- QIU, F.; AKISKAL, H.S.; KELSOE, J.R.; GREENWOOD, T.A. Factor Analysis of Temperament and Personality Traits in Bipolar Patients: Correlates with Comorbidity and Disorder Severity. **J Affect Disord.** 207, p. 282–290, 2017.
- RAJADHYAKSHA, A.; HUSSON, I.; SATPUTE, S.S.; KUPPENBENDER, K.D.; REN, J.Q.; GUERRIERO, R.M.; STANDAERT, D.G.; KOSOFSKY, B.E. L-type Ca²⁺ channels mediate adaptation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in the ventral tegmental area after chronic amphetamine treatment. **J Neurosci** n. 24, p.7464–7476, 2004.
- ROY, A.; HU, X.Z.; JANAL, M.N.; GOLDMAN, D. Interaction between childhood trauma and serotonin transporter gene variation in suicide. **Neuropsychopharmacology.** 32(9), p. 2046-52, 2007.
- SAVITZ, J.B.; RAMESAR, R.S. Personality: is it a viable endophenotype for genetic studies of bipolar affective disorder? **Bipolar disord.** 8(4), p. 322-37, 2006.
- SAVITZ, J.; VAN DER MERWE, L.; RAMESAR, R. Hypomanic, cyclothymic and hostile personality traits in bipolar spectrum illness: a family-based study. **J Psychiatr Res.** 42(11), p. 920-9, 2008.
- SAYAS, C.L.; ARIAENS, A.; PONSIOEN, B.; MOOLENAAR, W.H. GSK-3 Is Activated by the Tyrosine Kinase Pyk2 during LPA1-mediated Neurite Retraction. **Mol Biol Cell.** 17(4), p. 1834–1844, 2006.
- SCHAMPEL, A.; KUERTEN, S. Danger: High Voltage-The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Central Nervous System Pathology. **Cells.** 6 (4), E43, 2017.
- SMEDLER, E.; PÅLSSON, E.; HASHIMOTO, K.; LANDÉN, M. Association of CACNA1C polymorphisms with serum BDNF levels in bipolar disorder. **Br J Psychiatry.** p. 1-3, 2019.
- SNUTCH, T.; PELOQUIN, J.; MATHEWS, E.; MCRORY, J.E. Molecular Properties of Voltage-Gated Calcium Channels. **Landes Bioscience**, p. 2000-2013, 2005.
- SNUTCH, T.P. Voltage-Gated Calcium Channels. **Encyclopedia of Neuroscience.** p. 427-441, 2009.
- SPLAWSKI, I.; TIMOTHY, K.W.; SHARPE, L.M.; DECHER, N.; KUMAR, P.; BLOISE, R.; NAPOLITANO, C.; SCHWARTZ, P.J.; JOSEPH, R.M.; CONDOURIS, K.; TAGER-FLUSBERG, H.; PRIORI, S.G.; SANGUINETTI, M.C.; KEATING, M.T. Ca(V)1.2 calcium

channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. **Cell.** 119(1), p. 19-31, 2004.

STAHL, E.A.. Bipolar Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium.Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder. **Nat Genet.** 51(5), p. 793-803, 2019.

STANG, P.; FRANK, C.; YOOD, M.U.; WELLS, K.; BURCH, S. Impact of Bipolar Disorder: Results From a Screening Study. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry.** 9(1), p. 42–47, 2007.

STARNAWSKA, A.; DEMONTIS, D.; PEN, A.; HEDEMAND, A.; NIELSEN, A.L.; STAUNSTRUP, N.H.; GROVE, J.; ALS, T.D.; JARRAM, A.; O'BRIEN, N.L.; MORS, O.; MCQUILLIN, A.; BORGLUM, A.D.; NYEGAARD, M. CACNA1C hypermethylation is associated with bipolar disorder. **Transl Psychiatry.** 6: e831, 2016.

SUH, B.C.; LEAL, K.; HILLE, B. Modulation of high-voltage activated Ca²⁺ channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **Neuron.** 67, p. 224–238, 2013.

UEMURA, T.; GREEN, M.; WARSH, J.J. CACNA1C SNP rs1006737 associates with bipolar I disorder independent of the Bcl-2 SNP rs956572 variant and its associated effect on intracellular calcium homeostasis. **World J Biol Psychiatry.** 17(7), p. 525-34, 2016.

VALENTE, S.M.; KENNEDY, B.L. End the bipolar tug-of-war. **Nurse Practitioner.** 35, p. 36–45, 2010.

VAN ROOIJ, S.J.; STEVENS, J.S.; ELY, T.D.; FANI, N.; SMITH, A.K.; KERLEY, K.A.; LORI, A.; RESSLER, K.J.; JOVANOVIC, T. Childhood Trauma and COMT Genotype Interact to Increase Hippocampal Activation in Resilient Individuals. **Front Psychiatry.** 7:156, 2016.

VASCONCELOS-MORENO, M.P.; BÜCKER, J.; BÜRKE, K.P.; CZEPIELEWSKI, L.; SANTOS, B.T.; FIJTMAN, A.; PASSOS, I.C.; KUNZ, M.; BONNÍN, C.D.; VIETA, E.; KAPCZINSKI, F.; ROSA, A.R.; KAUER-SANT'ANNA, M. Cognitive performance and psychosocial functioning in patients with bipolar disorder, unaffected siblings, and healthy controls. **Braz J Psychiatry.** 38(4), p. 275-280, 2016.

VÁZQUEZ, G.H.; KAHN, C.; SCHIAVO, C.E.; GOLDCHLUK, A.; HERBST, L.; PICCIONE, M.; SAIDMAN, N.; RUGGERI, H.; SILVA, A.; LEAL, J.; BONETTO, G.G.; ZARATIEGUI, R.; PADILLA, E.; VILAPRÍNO, J.J.; CALVÓ, M.; GUERRERO, G.; STREJILEVICH, S.A.; CETKOVICH-BAKMAS, M.G.; AKISKAL, K.K.; AKISKAL, H.S. Bipolar disorders and affective temperaments: a national family study testing the "endophenotype" and "subaffective" theses using the TEMPS-A Buenos Aires. **J Affect Disord.** 108(1-2), p. 25-32, 2008.

VINKERS, C.H.; KALAFATELI, A.L.; RUTTEN, B.P.; KAS, M.J.; KAMINSKY, Z.; TURNER, J.D.; BOKS, M.P. Traumatic stress and human DNA methylation: a critical review. **Epigenomics.** 7, p. 593-608, 2015.

WALSH, M.A.; BROWN, L.H.; BARRANTES-VIDAL, N.; KWAPIL, T.R. The expression of affective temperaments in daily life. **J Affect Disord.** 145(2), p. 179-86, 2013.

WARD, L.D.; KELLIS, M. Haploreg: A Resource for Exploring Chromatin States, Conservation, and Regulatory Motif Alterations within Sets of Genetically Linked Variants. **Nucleic Acids Res.** 40, p. D930–D9344, 2012.

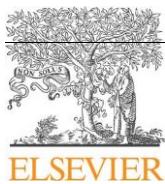
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mental disorders.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>>. Acesso em 19 jan. de 2019.

YOSHIMIZU, T.; PAN, J.Q.; MUNGENAST, A.E.; MADISON, J.M.; SU, S.; KETTERMAN, J.; ONGUR, D.; MCPHIE, D.; COHEN, B.; PERLIS, R.; TSAI, L. Functional implications of a psychiatric risk variant within *CACNA1* in induced human neurons. **Mol Psychiatry.** 20(2), p. 162–169, 2015.

ZWIR, I.; ARNEDO, J.; DEL-VAL, C.; PULKKI-RÅBACK, L.; KONTE, B.; YANG, S.S.; *et al.* Uncovering the complex genetics of human temperament. **Mol Psychiatry.** 2018.

ARTIGO 1:

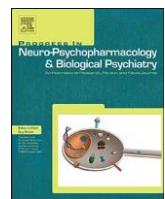
The role of CACNA1C gene and childhood trauma interaction on bipolar disorder



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp



The role of *CACNA1C* gene and childhood trauma interaction on bipolar disorder

Clarissa Ribeiro Bastos^a, Luciana Tovo-Rodrigues^b, Ana Paula Ardais^a, Janaina Xavier^a, Pamela Silva Vitória Salerno^a, Laísa Camerini^a, Karen Jansen^a, Luciano Dias de Mattos Souza^a, Ricardo Azevedo da Silva^a, Diogo Rizzato Lara^c, Gabriele Ghisleni^{a,*}

^a Laboratory of Clinical Neuroscience, Post-graduation Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Calcium channels L-type
Childhood trauma Bipolar
disorder
Gene-environment interaction

ABSTRACT

Studies on gene x environment interaction (GxE) have provided vital information for uncovering the origins of complex diseases. When considering the etiology of bipolar disorder (BD), the role of such interactions is un-known. Here, we tested whether trauma during childhood could modify the effect of two polymorphisms in the *CACNA1C* gene (rs1006737 and rs4765913) in terms of susceptibility to BD. The study enrolled 878 Caucasian young adults in a cross-sectional population-based survey. BD diagnosis was performed using a clinical interview MINI 5.0, and trauma was assessed with the childhood trauma questionnaire (CTQ). Binary logistic regression models were employed to test the main effects of polymorphisms, haplotypes, and GxE interactions using sex as a confounder. We did not observe an association between the polymorphisms and diagnosis of BD. However, we noted that childhood trauma modified the effect of the rs4765913 polymorphism ($p = .018$) and the AA hap-lotype (rs1006737 - rs4765913) ($p = .018$) on BD susceptibility. A allele carriers of the rs4765913 polymorphism or the AA haplotype exposed to childhood trauma are more likely to develop BD compared to the individuals without a genetic risk. Thus, this study showed that the risk of developing BD in individuals exposed to childhood trauma was influenced by the individual's genetic background, varying according to the *CACNA1C* genotypes.

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is an incapacitating condition that affects roughly 60 million people worldwide (WHO, 2018). It involves episodes of severe mood disturbance coupled with several biological changes (Grande et al., 2016). BD is one of the mental disorders that has the highest heritability, with genetic influences explaining up to 85% of the etiology (McGuffin et al., 2003). Despite this, BD is a complex disease, and common variants do not explain the heritability suggested by classical genetic studies (Stahl et al., 2019). In this sense, studies on the gene \times environment interactions (GxE) may provide major clues about its missing heritability as well as the underlying pathophysiological mechanisms (De Pradier et al., 2010; Zeni et al., 2016).

Although BD has an uncertain etiology, recent genomic investigations have supported the hypothesis that it may occur, at least in part, owing to dysfunctions in ionic channels (Ferreira et al., 2008), mostly

the calcium channels. These dysfunctions may lead to variations in intracellular calcium levels (Uemura et al., 2016) and, subsequently, a range of physiological changes. Indeed, genetic variations in calcium channels have been proposed to modify the calcium-sensitive neural processes, and have been associated with several psychiatric disorders, such as schizophrenia, major depression, and BD (Green et al., 2010; Khalid et al., 2018; Wray et al., 2012). The *CACNA1C* gene encodes the pore-forming alpha-1c subunit of the Ca_v1.2 voltage-gated L-type calcium channels (LTCCs), and polymorphisms in this gene have been consistently associated with BD (Ferreira et al., 2008; Zhang et al., 2013). Notably, intron 3 of this gene has exhibited several single nucleotide polymorphisms (SNPs) linked to the disorder, such as rs1006737 (G/A) and rs4765913 (A/T), both of which revealed as risk variants in genome-wide association studies (GWAS) (Ferreira et al., 2008; Green et al., 2013; Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011). While rs1006737 has been extensively

* Corresponding author at: Laboratory of Clinical Neuroscience, Post-Graduation Program of Health and Behavior, Center of Health Science, Catholic University of Pelotas, 373, 324C Gonçalves Chaves Street, CEP 96015-560, Pelotas, RS, Brazil.

E-mail address: gabriele.ghisleni@ucpel.edu.br (G. Ghisleni).

studied, exhibiting an association of minor frequency allele with alterations of brain function (Bigos et al., 2010; Lancaster et al., 2016) and psychiatric disorders, rs4765913 is scarce with respect to data in the literature. However, both SNPs seem to regulate the CACNA1C gene expression (Eckart et al., 2016; Starnawska et al., 2016).

Recently, SNPs in CACNA1C have been demonstrated to significantly interact with adverse life events to alter the risk of developing depressive symptoms (Dedic et al., 2018). These data indicate a moderator role of the CACNA1C variants regarding the association between environmental stressors and psychiatric disorders. Among environmental stressors, childhood trauma is considered one of the most influential experiences that interacts with a genetic predisposition in mood disorders (Jaworska-Andryszewska and Rybakowski, 2019), and is a priority determinant in mental health research given its burden and effects on adulthood. Childhood trauma can lead to changes in affect regulation, impulse control, and cognitive functioning, reducing the individual's ability to deal with later stressors (Aas et al., 2016). In addition, it is connected with an earlier onset and worse prognosis of BD (de Codd et al., 2016; Gorno et al., 2005). However, just a few studies have examined whether variants in CACNA1C may differentially increase susceptibility to BD according to environmental adversities (Dedic et al., 2018).

The current study sought to investigate the association of the CACNA1C rs1006737 and rs4765913 polymorphisms and their haplotypes with BD and its interaction with childhood trauma exposure in a cross-sectional population-based study of Caucasian young adults from the city of Pelotas, Brazil.

2. Methods

2.1. Sample description

Data from this study were obtained from a cross-sectional population-based study conducted in the urban area of the city of Pelotas, southern Brazil, between June 2011 and May 2013, which evaluated 878 individuals aged between 18 years and 35 years. The sample selection was performed according to multistage clusters considering a population of 97,000 young adults and the current census of 495 sectors in the city, both sources of data provided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). To ensure a representative sample, data were systematically drawn from 82 census-based sectors. Individuals unable to participate in the interviews owing to physical or cognitive problems were excluded. Home visits were performed in the morning, where the participants answered questionnaires with socio-demographic, lifestyle, and comorbid information. The skin color of the participants was self-reported, and only white individuals were included in this study as varying ethnic groups can present differences with respect to their susceptibility to genetic variations. In this context, specifically, CACNA1C rs1006737 has been found to exhibit highly variable minor allelic frequencies among ethnic groups (Zheng et al., 2014). Therefore, conducting this study with white participants allowed for a reduction of genetic variability in the findings. The study was approved by the Ethical Committee of the Catholic University of Pelotas, Brazil (Protocol number 2010/15). All participants signed to indicate informed consent, and the individuals diagnosed with BD were referred to psychological/psychiatric care.

2.2. Diagnosis

The BD diagnosis was performed by trained psychologists using a structured clinical interview, the Mini International Neuropsychiatric Interview, according to the DSM-IV criteria (M.I.N.I. 5.0., Brazilian version/DSM IV, Medical Outcome Systems Inc., Jacksonville, USA). The bipolar group was characterized by the presence of past or current history of episodes of mania or at least one hypomanic episode and one major depressive episode. The Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)

assessed childhood trauma. The CTQ is a self-reported inventory of 28 items authored by Bernstein et al. (2003) and validated for Brazil (Grassi-Oliveira et al., 2006), which is intended to retrospectively investigate the occurrence and intensity of trauma in five domains: physical abuse, emotional abuse, sexual abuse, physical neglect, and emotional neglect. The CTQ features cut-off scores for each subscale, being divided into none/low, low/moderate, moderate/severe, and severe/extreme. In our study, individuals with moderate/severe and severe/extreme trauma in at least one domain evaluated by the scale were classified as having trauma (cut-off scores ≥ 10 physical abuse, ≥ 13 emotional abuse, ≥ 8 sexual abuse, ≥ 10 physical neglect, and ≥ 15 for emotional neglect). Individuals who scored none/low and low/minimum across all domains were classified as having no trauma (Min et al., 2017).

2.3. Molecular analysis

Ten milliliters of blood was obtained in the morning by venipuncture after the clinical interview. Blood was immediately centrifuged at 3500g for 15 min, and total DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes using a standard salting-out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). The SNPs, rs1006737 (G/A), and rs4765913 (T/A), were genotyped using primers and probes contained in the 40 \times Human Custom TaqMan Genotyping Assay (Life Technologies, Foster City, USA). The reactions were conducted on a 96-well plate with a total 5- μ L reaction volume using 2 ng of genomic DNA, 1 \times TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), and 1 \times Custom TaqMan Genotyping Assay. The plates were then positioned in a real-time PCR thermal cycler (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems), then heated for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Fluorescence data files from each plate were analyzed using an automated allele-calling software (SDS 2.0.1; Applied Biosystems).

2.4. Data analysis

The Hardy-Weinberg equilibrium deviation was tested using the Chi-squared (χ^2) test. Haploview 4.2 (Barrett et al., 2005) was applied to estimate and visualize the linkage disequilibrium (LD) (expressed as D') between rs1006737 and rs4765913. The haplotypes were estimated using the UNPHASED 3.1.7 (Dudbridge, 2008). CACNA1C rs1006737 and rs4765913 SNPs were grouped by the presence of the minor frequency allele (A), and haplotype analysis was performed based on the presence or absence of the AA haplotype. Sociodemographic characteristics were described according to diagnosis, genotypes, haplotypes, and childhood trauma, and tested using the χ^2 test followed by the Bonferroni's post-hoc test or the Student's t-test, as appropriate. Binary logistic regression was utilized to test the association between the SNPs and BD as well as the interaction between the SNPs/haplotype of the CACNA1C gene and childhood trauma. As suggested by Keller (2014) for properly controlling for confounders, we inserted the covariate-by-environment and the covariate-by-gene interaction terms in the same model that tested the GxE (Keller, 2014). To adjust for multiple testing, the interaction p-values were corrected using a false discovery rate correction (FDR, the Benjamini-Hochberg method).

To interpret the statistically significant interactions, additional logistic regression analysis was performed, thereby expressing the genotype effect according to the presence of trauma on BD. Therefore, participants were classified into four groups based on the presence/absence of the minor frequency allele, and the presence/absence of childhood trauma as follows: 1) individuals carrying the minor frequency allele with trauma; 2) individuals carrying the minor frequency allele not exposed to childhood trauma; 3) individuals without the minor frequency allele exposed to childhood trauma; and 4) individuals without the minor alleles not exposed to childhood trauma (reference group in statistical analysis). All statistical models were adjusted for sex

Table 1 Characteristics of participants according to the variables of interest.

Characteristic	rs1006737		rs4765913		Haplotype		Childhood trauma		Bipolar disorder	
	GG (435)	AG/AA (443)	TT (588)	AT/AA (290)	0 AA copies (606)	AA copies (272)	No (635)	Yes (243)	No (779)	Yes (99)
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N (%)	N (%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Sex										
Woman	239 (54.9)	269 (60.7)	328 (55.8)	180 (62.1)	343 (56.6)	165 (60.7)	358 (56.4)	150 (61.7)	452 (58.0)	56 (56.6)
Men	196 (45.1)	174 (39.3)	260 (44.2)	110 (37.9)	263 (43.4)	107 (39.3)	277 (43.6)	93 (38.3)	327 (42.0)	43 (43.4)
Age	25.92 ± 5.25	26.07 ± 5.36	25.84 ± 5.26	26.22 ± 5.38	25.83 ± 5.29	26.24 ± 5.29	25.69 ± 5.34	26.67 ± 5.10*	26.03 ± 5.30	25.37 ± 5.22
Socioeconomic class										
Lower	78 (17.9)	68 (15.3)	98 (16.7)	48 (16.6)	101 (16.7)	45 (16.5)	85 (13.4)	61 (25.1)***	126 (16.2)	20 (20.2)
Intermediate	196 (45.1)	225 (50.8)	274 (46.6)	147 (50.7)	280 (46.2)	141 (51.8)	297 (46.8)	124 (51.0)	346 (48.3)	45 (45.5)
High	161 (37.0)	150 (33.9)	216 (36.7)	95 (32.8)	225 (37.1)	86 (31.6)	253 (39.8)	58 (23.9)	277 (35.6)	34 (34.3)
rs1006737										
GG	-	-	-	-	-	-	320 (50.4)	115 (47.3)	383 (49.2)	52 (52.5)
AG/AA	-	-	-	-	-	-	315 (49.6)	128 (52.7)	396 (50.8)	47 (47.5)
rs4765913										
TT	-	-	-	-	-	-	442 (69.6)	146 (60.1)**	524 (67.3)	64 (64.6)
AT/AA	-	-	-	-	-	-	193 (30.4)	97 (39.9)	255 (32.7)	35 (35.4)
Haplotype										
0 AA copies	-	-	-	-	-	-	459 (72.3)	147 (60.5)***	541 (69.4)	65 (65.7)
AA copies	-	-	-	-	-	-	176 (27.7)	96 (39.5)	238 (30.6)	34 (34.3)
Childhood trauma										
No	320 (73.6)	315 (71.1)	442 (75.2)	193 (66.6)**	459 (75.7)	176 (64.7)***	-	-	590 (75.7)	45 (45.5)***
Yes	115 (26.4)	128 (28.9)	146 (24.8)	97 (33.4)	147 (24.3)	96 (35.3)	-	-	189 (24.3)	54 (54.5)
Bipolar disorder										
No	383 (88.0)	396 (89.4)	524 (89.1)	255 (87.9)	541 (89.3)	238 (87.5)	590 (92.9)	189 (77.8)***	-	-
Yes	52 (12.0)	47 (10.6)	64 (10.9)	35 (12.1)	65 (10.7)	34 (12.5)	45 (7.1)	54 (22.2)	-	-

Values were obtained by the χ^2 -test or t-test, as appropriate and presented as n (%) or mean ± standard deviation. The genotypes were grouped according to the presence of the A allele and the haplotypes were grouped by the presence of the AA haplotype. * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p \leq .001$.

of the individual. The effect estimate was calculated by logistic regression and presented as an odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). Values of $p \leq .05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, v22.0, software and graphs were analyzed in the GraphPad Prism.

3. Results

3.1. Sample characteristics

A total of 878 young adults were included in this study. Of these, 11.3% were diagnosed with BD (70.7% type 1 and 29.3% type 2), 27.7% reported childhood trauma, 50.5% carried the minor frequency allele for the rs1006737 SNP, and 33.0% carried the minor frequency allele for the rs4765913 SNP. Individuals with BD presented higher comorbidity with anxiety disorders (including agoraphobia, generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder) ($p < .001$), reported more use of psychiatric medication ($p < .001$), tobacco ($p < .001$), and other drugs of abuse, such as alcohol, marijuana, and cocaine ($p < .001$) (Supplementary Material Table 1).

The SNPs evaluated were in strong LD, $D' = 0.87$. The genotype distributions of the rs1006737 and rs4765913 SNPs were 49.5% GG, 42.4% AG, 8.1% AA, and 67.0% TT, 30.0% AT, 3.0% AA, respectively. The frequency of haplotypes in our sample was 69.1% GT, 16.0% AA, 13.3% AT, and 1.6% GA. The genotypic distributions of SNPs did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium for rs1006737 ($\chi^2 = 0.054$, $p = .814$) and rs4765913 ($\chi^2 = 0.029$, $p = .863$).

The characteristics of the sample for each study interest group have been summarized in Table 1. Among the variables studied, we observed that BD was associated with childhood trauma ($\chi^2 = 38.74$, $df = 1$, $p < .001$). A higher prevalence of this disorder was observed in individuals with childhood trauma. Moreover, childhood trauma was associated with a low socioeconomic status ($\chi^2 = 27.83$, $df = 2$, $p < .001$), and the A allele of the rs4765913 SNP ($\chi^2 = 6.78$, $df = 1$, $p = .009$), and at least one copy of the risk haplotype (AA) ($\chi^2 = 10.88$, $df = 1$, $p = .001$).

3.2. GxE interaction

We first tested the association between SNPs and BD adjusted for sex of the individual. No association of BD with the rs1006737 SNP [OR: 0.87 (95% CI: 0.57–1.33; $p = .539$)], rs4765913 SNP [OR: 1.12 (95% CI: 0.72–1.75; $p = .590$)] or with the risk haplotype [OR: 1.19 (95% CI: 0.76–1.85; $p = .436$)] was observed. We then tested the GxE interaction effect using the logistic regression model, showing a significant impact of the interaction term for childhood trauma with rs4765913 SNP ($p = .012$; $p_{adjFDR} = .018$), and rs4765913 - rs1006737 haplotype ($p = .012$; $p_{adjFDR} = .018$) (Table 2). For the rs1006737 SNP, the interaction effect was not significant ($p = .130$; $p_{adjFDR} = .130$).

Fig. 1 demonstrates how exposure to childhood trauma modifies the effect of CACNA1C genotypes on BD. In the absence of trauma, the minor frequency allele, as well as the haplotype formed by them, did not alter the risk of BD. However, carriers of the A allele have greater susceptibility to BD when exposed to trauma. Individuals with the A allele of rs4765913 SNP were 1.72-fold more likely to develop BD when compared to those with the TT genotype. This effect was also observed in the AA haplotype, which was 1.76-fold more likely to develop the disorder. A lower effect was observed for rs1006737 polymorphism (full data presented as Supplementary Material, Table 2).

4. Discussion

The etiology of BD involves complex interactions between genetic and environmental risk factors. In this study, we observed an interaction effect between the gene, CACNA1C, and childhood trauma with

Table 2
Interaction model between CACNA1C gene and childhood trauma in BD.

Bipolar disorder	OR	95% CI	p-value
Sex	1.15	0.53–2.31	0.692
rs1006737	0.66	0.16–2.77	0.578
Childhood trauma	2.56	0.61–10.68	0.195
Sex x childhood trauma	1.05	0.43–2.53	0.195
Sex x rs1006737	0.92	0.38–2.24	0.867
rs1006737 x childhood trauma	1.96	0.81–4.71	0.130 ^a
Sex	1.18	0.62–2.23	0.604
rs4765913	0.82	0.17–3.98	0.809
Childhood trauma	1.95	0.45–8.33	0.367
Sex x childhood trauma	1.19	0.47–2.98	0.711
Sex x rs4765913	0.67	0.25–1.83	0.441
rs4765913 x childhood trauma	3.60	1.32–9.78	0.012 ^b
Sex	1.19	0.63–2.23	0.588
Risk haplotype	0.77	0.15–3.93	0.755
Childhood trauma	2.01	0.57–8.61	0.344
Sex x childhood trauma	1.16	0.46–2.93	0.745
Sex x risk haplotype	0.69	0.25–1.90	0.480
Risk haplotype x childhood trauma	3.77	1.34–10.59	0.012 ^c

Results obtained from binary logistic regression with interaction term. Bold denotes statistically significant results. FDR adjusted p-values: a = 0.130; b = 0.018; c = 0.018.

respect to BD susceptibility. Individuals exposed to a trauma and carrying the A allele of the rs4765913 SNP as well as the AA risk haplotype (rs4765913 and rs1006737) were more likely to develop the disorder than the individuals presenting only one risk factor.

The CACNA1C gene encodes the pore-forming subunit of CaV1.2, through which calcium influx occurs in the cell and initiates downstream signaling cascades (Berridge, 2014). CaV1.2 is activated after cellular depolarization and underlies key neuronal functions, such as dendritic information integration cell survival, and gene transcription (Greer and Greenberg, 2008). It is highly expressed in several areas of the limbic system, such as the hippocampus, the prefrontal cortex, and the amygdala (Dedic et al., 2018), making the pronounced role of this gene evident in several psychiatric disorders (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013; Green et al., 2010). Along these lines, a GWAS study revealed an association between variant rs1006737 located in intron 3 of CACNA1C with BD (Ferreira et al., 2008). Subsequently, a meta-analysis identified the CACNA1C rs4765913 SNP as the most significant variant of risk (Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011). Both SNPs are in LD and positioned within what is now considered a narrow locus of the CACNA1C intronic risk.

One of the most widely studied SNPs in the CACNA1C gene, rs1006737, reveals that healthy individuals homozygous for the A allele have an increased amygdala volume (Lancaster et al., 2016), an altered hippocampal activity during emotional processing, and an increased prefrontal activity during executive cognition, a specific pattern of the brain activity associated with mental illness (Bigos et al., 2010). Moreover, the presence of the A allele resulted in a reduced activity of the right ventrolateral prefrontal cortex and an increased activation of the right amygdala during face recognition in individuals with BD (Jogia et al., 2011). These data show that genetic variation in CACNA1C may confer a risk for BD through modifications to the functioning of limbic structures. Noteworthy, our results show no individual effect of SNP rs1006737, not even in the interaction with childhood trauma, and its combined effect in the interaction was minimal. In turn, a more pronounced impact was observed in relation to rs4765913. While this SNP exhibited the most significant risk in one of the largest meta-analyses of BD to date (Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011), association and replication studies are scarce in the literature. The presence of the A allele of the rs4765913 SNP has been shown to increase sleep latency in infants (Kantová et al., 2017), a characteristic observed during manic episodes of individuals with BD

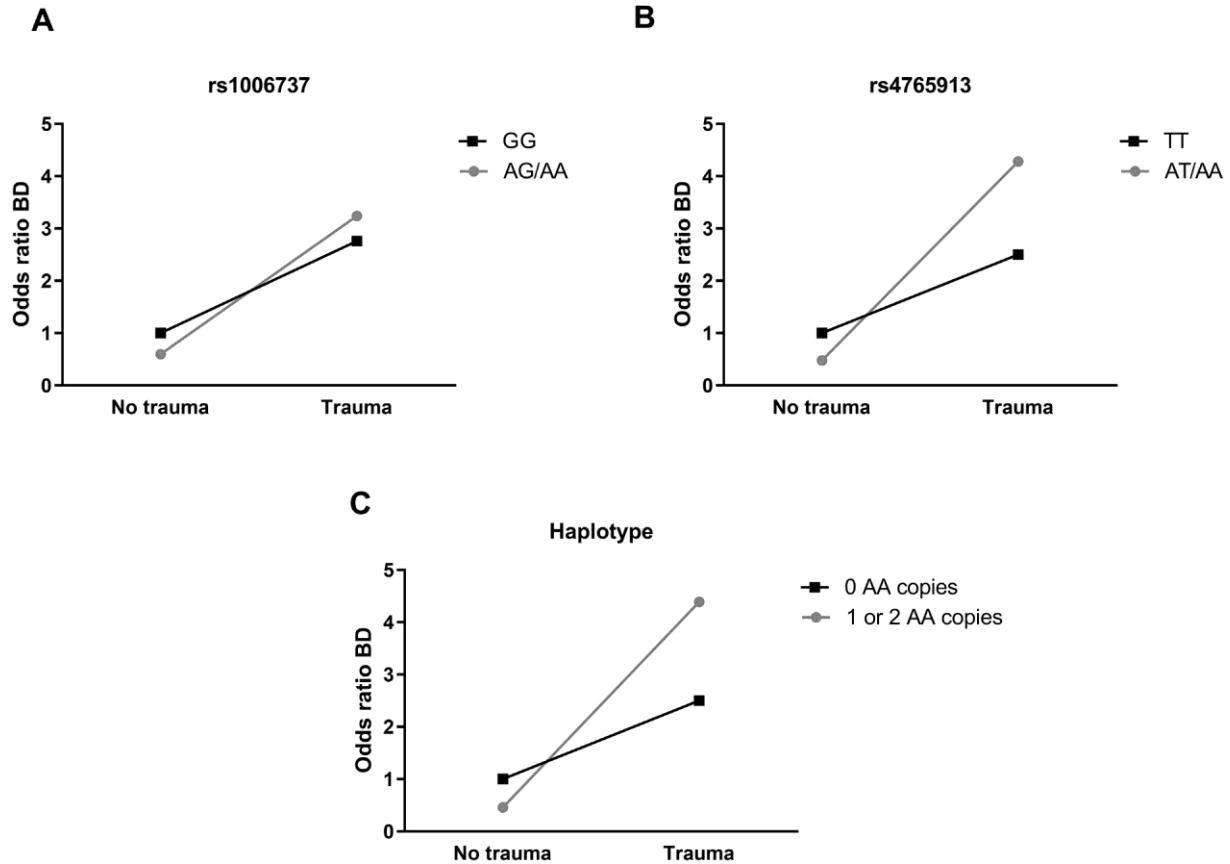


Fig. 1. Represents how exposure to childhood trauma modifies the effect of *CACNA1C* genotypes/haplotype on BD. Individuals without minor allele not exposed to childhood trauma were considered as reference (Odds = 1). The values were obtained by binary logistic regression adjusted for sex. The numbers of individuals for childhood trauma groups (yes or no), by genotype, are as follows: rs1006737 (GG: 115, 320; GA/AA: 128, 315), rs4765913 (TT: 146, 442; TA/AA: 97, 193). Haplotype (0 AA copies: 147, 459; 1 or 2 AA copies: 96, 176). Higher OR was observed in A-allele of rs4765913 (Fig. 1B) and 1 or 2 AA copies of haplotype (Fig. 1C) of those individuals with childhood trauma.

(Linkowski et al., 1986), thereby indicating the action of this SNP from the beginning of life.

Regarding functionality, as these SNPs are in a non-coding region, specific regional alterations in the overall expression of Ca_v1.2 are likely responsible for a behavioral impact. From this perspective, the rs1006737 SNP, and therefore all SNPs in high LD with it, were demonstrated as quantitative trait expression loci (eQTL) for *CACNA1C* in the upper temporal gyrus (Eckart et al., 2016). In addition, a study performed by Starnawska et al. (2016) profiled the DNA methylation landscape of five CpG islands in *CACNA1C* of blood-derived DNA, found that the CpG island 3 was hypermethylated in BD individuals compared to that in the controls. This methylation was influenced primarily by SNPs within intron 3. Moreover, this study showed that SNPs identified as methylation quantitative trait loci (mQTL) were in moderate LD with the rs4765913 SNP, suggesting these SNPs may play a role in DNA methylation status and are involved in BD pathology by altering gene expression.

Considering the environmental factors associated with BD, childhood trauma may also cause subtle changes in gene expression, primarily through epigenetic mechanisms, leading to changes in DNA methylation (Vinkers et al., 2015). In this way, trauma can influence the action of several genes exerting detrimental effects on the biological stress system as well as the cognitive and the cerebral development (De Bellis and Zisk, 2014). Individuals who experience childhood trauma develop BD earlier (Gorno et al., 2005) and are at an increased risk for suicide (Alvarez et al., 2011). In addition, childhood trauma has been connected with an enhanced amygdala activation in response to emotional facial expressions (van Harmelen et al., 2013), lower BDNF levels

(Aas et al., 2019), and modification of inflammatory processes (Baumeister et al., 2016), being considered a key factor in vulnerability to BD.

Noteworthy, our study showed that individuals carrying the AT/AA genotype of the rs4765913 SNP or the risk haplotype (AA) reported a more traumatic experience in childhood, suggesting a differential response to stressors. This hypothesis is strengthened by preclinical evidence demonstrating the role of Ca_v1.2 in stress susceptibility. The embryonic deletion of *Cacna1c* in the forebrain glutamatergic neurons of mice led to an elevated susceptibility to chronic stress (Dedic et al., 2018), and a heterozygote model of Ca_v1.2 (+/-) demonstrated that Ca_v1.2 was necessary for long-lasting effects of chronic stress on depressive-like behavior, anxiety-like behavior, and working memory deficits (Bavley et al., 2017).

Furthermore, chronic stress has been shown to enhance the calcium current amplitude, increase the Ca_v1.2 mRNA expression in the dentate gyrus, the amygdala, and the CA3 of rats (Maigaard et al., 2012) as well as increase the Ca_v1.2 protein expression in the prefrontal cortex of mice (Bavley et al., 2017). Taken together, these data reinforce the plausibility of our findings, showing that variations in Ca_v1.2 are associated with susceptibility to stress, and stress can influence the functioning and expression of these channels. Clinical evidence of other polymorphisms in *CACNA1C* also matches our outcomes. A study evaluating 4023 predominantly African-American individuals showed that SNPs in *CACNA1C* (rs73248708 and rs116625684) significantly interacted with adverse life events, altering the risk of developing symptoms of psychiatric disorders (Dedic et al., 2018).

The data compiled herein highlight the importance of GxE

interaction studies of BD, and suggest that the sum of the changes caused in gene methylation by childhood trauma and CACNA1C genetic variations may serve as an evidence of a functional mechanism whereby the interaction increases susceptibility to this disorder. However, our results should be interpreted in the context of some limitations. The first limitation is regarding the sample size, which may have impacted the precision of our findings. Further studies with larger sample sizes will be noteworthy to replicate our results and assess childhood traumatises separately, verifying how each domain can influence vulner-ability and severity of BD, and its effect in terms of interaction with the CACNA1C gene. The second limitation is the retrospective and self-re-ported evaluation of childhood trauma, which may be biased by a subjective perception. A third limitation is the use of only one diag-nostic instrument, which can generate a proportion of false positives. Furthermore, although we have only selected white individuals in terms of population stratification, though we cannot rule out this bias, the city of Pelotas does not indicate population stratification (Lima-Costa et al., 2015).

5. Conclusion

Our findings bolster the body of evidence surrounding how individuals exposed to childhood trauma have an increased risk of developing BD and show that this risk is influenced by the individual's genetic background, varying according to the CACNA1C genotype. In conclusion, we suggest that calcium channel dysfunction associated with childhood trauma may contribute in part to the etiology of BD.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109915>.

Ethical statement

The protocol study was approved by the Ethics Committee of Catholic University of Pelotas, Pelotas, Brazil (Protocol number 2010/15), and carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants signed the written informed consent.

Declaration of Competing Interest

All authors disclose no conflict of interest.

Acknowledgements

The assistance of our research team is greatly acknowledged. The authors are grateful to *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)* and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)* for their research fellowships. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

References

- Aas, M., Henry, C., Andreassen, O.A., Bellivier, F., Melle, I., Etain, B., 2016. The role of childhood trauma in bipolar disorders. *Int. J. Bipolar Disord.* 4, 2. <https://doi.org/10.1186/s40345-015-0042-0>.
- Aas, M., Dieset, I., Mørch, R., Steen, N.E., Hope, S., Reponen, E.J., Laskemoen, J.F., Ueland, T., Aukrust, P., Melle, I., Agartz, I., Andreassen, O.A., 2019. Reduced brain-derived neurotrophic factor is associated with childhood trauma experiences and number of depressive episodes in severe mental disorders. *Schizophr. Res.* 205, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.08.007>.
- Alvarez, M.J., Roura, P., Osés, A., Foguet, Q., Sola, J., Arrufat, F.X., 2011. Prevalence and clinical impact of childhood trauma in patients with severe mental disorders. *J. Nerv. Ment. Dis.* 199, 156–161. <https://doi.org/10.1097/NMD.0b013e31820c751c>.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haplovew: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>.
- Baumeister, D., Akhtar, R., Ciufolini, S., Pariante, C.M., Mondelli, V., 2016. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α . *Mol. Psychiatry* 21, 642–649. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.67>.
- Bavley, C.C., Fischer, D.K., Rizzo, B.K., Rajadhyaksha, A.M., 2017. CaV1.2 channels mediate persistent chronic stress induced behavioral deficits that are associated with prefrontal cortex activation of the p25/Cdk5-glucocorticoid receptor pathway. *Neurobiol. Stress* 7, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jnstr.2017.02.004>.
- Bernstein, D.P., Stein, J.A., Newcomb, M.D., Walker, E., Pogge, D., Ahluvalia, T., Stokes, J., Handelman, L., Medrano, M., Desmond, D., Zule, W., 2003. Development and validation of a brief screening version of the childhood trauma questionnaire. *Child Abuse Negl.* 27, 169–190. [https://doi.org/10.1016/s0145-2134\(02\)00541-0](https://doi.org/10.1016/s0145-2134(02)00541-0).
- Berridge, M.J., 2014. Calcium signalling and psychiatric disease: bipolar disorder and schizophrenia. *Cell Tissue Res.* 357, 477–492. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1806-z>.
- Bigos, K.L., Mattay, V.S., Callicott, J.H., Straub, R.E., Vakkalanka, R., Kolachana, B., Hyde, T.M., Lipska, B.K., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2010. Genetic variation in CACNA1C affects brain circuitries related to mental illness. *Arch. Gen. Psychiatry* 67, 939–945. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.96>.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* 381, 1371–1379. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)62129-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)62129-1).
- De Bellis, M.D., Zisk, A., 2014. The biological effects of childhood trauma. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 23, 85–222. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2014.01.002>.
- de Codd, A., Monhonval, P., Bongaerts, X., Belkacemi, I., Tecco, J.M., 2016. Bipolar disorder and early affective trauma. *Psychiatr. Danub.* 28, 4–8.
- De Pradier, M., Gorwood, P., Beaufils, B., Adès, J., Dubertret, C., 2010. Influence of the serotonin transporter gene polymorphism, cannabis and childhood sexual abuse on phenotype of bipolar disorder: a preliminary study. *Eur. Psychiatry* 25, 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2009.10.002>.
- Dedic, N., Pöhlmann, M.L., Richter, J.S., Mehta, D., Czamara, D., Metzger, M.W., Dine, J., Bedenk, B.T., Hartmann, J., Wagner, K.V., Jurik, A., Almli, L.M., Lori, A., Moosmang, S., Hofmann, F., Wojtak, C.T., Rammes, G., Eder, M., Chen, A., Ressler, K.J., Wurst, W., Schmidt, M.V., Binder, E.B., Deussing, J.M., 2018. Cross-disorder risk gene CACNA1C differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood. *Mol. Psychiatry* 23, 533–543. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.133>.
- Dudbridge, F., 2008. Likelihood-based association analysis for nuclear families and un-related subjects with missing genotype data. *Hum. Hered.* 66, 87–98. <https://doi.org/10.1159/000119108>.
- Eckart, N., Song, Q., Yang, R., Wang, R., Zhu, H., McCallion, A.S., Avramopoulos, D., 2016. Functional characterization of schizophrenia-associated variation in CACNA1C. *PLoS One* 11, e0157086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157086>.
- Ferreira, M.A., O'Donovan, M.C., Meng, Y.A., Jones, I.R., Ruderfer, D.M., Jones, L., Fan, J., et al., 2008. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat. Genet.* 40, 1056–1058. <https://doi.org/10.1038/ng.209>.
- Garno, J.L., Goldberg, J.F., Ramirez, P.M., Ritzler, B.A., 2005. Impact of childhood abuse on the clinical course of bipolar disorder. *Br. J. Psychiatry* 186, 121–125. <https://doi.org/10.1192/bj.p.186.2.121>.
- Grande, I., Berk, M., Birnbaum, B., Vieta, E., 2016. Bipolar disorder. *Lancet* 387, 1561–1572. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00241-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00241-X).
- Grassi-Oliveira, R., Stein, L.M., Pezzi, J.C., 2006. Translation and content validation of the childhood trauma questionnaire into Portuguese language. *Rev. Saude Publica* 40, 249–255. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102006000200010>.
- Green, E.K., Grozeva, D., Jones, I., Jones, L., Kirov, G., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Forty, L., Russell, E., Hamshere, M.L., Moskina, V., Nikолов, I., Farmer, A., McGuffin, P., Wellcome Trust Case Control Consortium, Holmans, P.A., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., Craddock, N., 2010. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 15, 1016–1022. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.49>.
- Green, E.K., Hamshere, M., Forty, L., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Russell, E., Grozeva, D., Kirov, G., Holmans, P., Moran, J., Purcell, S., Sklar, P., Owen, M., O'Donovan, M., Jones, L., WTCCC, Jones, I.R., Craddock, N., 2013. Replication of bipolar disorder susceptibility alleles and identification of 2 novel genome-wide significant associations in a new bipolar disorder case-control sample. *Mol. Psychiatry* 18, 1302–1307. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.142>.
- Greer, P.L., Greenberg, M.E., 2008. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* 59, 846–860. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.002>.
- Jaworska-Andryszewska, P., Rybakowski, J.K., 2019. Childhood trauma in mood disorders: neurobiological mechanisms and implications for treatment. *Pharmacol. Rep.* 71, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.10.004>.
- Jogia, J., Roberto, G., Lelli-Chiesa, G., Maierú, M., Tatarelli, R., Girardi, P., Collier, D., Frangou, S., 2011. The impact of the CACNA1C gene polymorphism on frontolimbic function in bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 16, 1070–1071. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.49>.
- Kantojärvi, K., Liuhannen, J., Saarenpää-Heikkilä, O., Satomaa, A.L., Kylliäinen, A., Pölkki, P., Jaatela, J., Toivola, A., Milani, L., Himanen, S.L., Porkka-Heiskanen, T., Paavonen, J., Paunio, T., 2017. Variants in calcium voltage-gated channel subunit Alpha1C gene (CACNA1C) are associated with sleep latency in infants. *PLoS One* 12, e0180652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180652>.
- Keller, M.C., 2014. Gene \times environment interaction studies have not properly controlled for potential confounders: the problem and the (simple) solution. *Biol. Psychiatry* 75 (1), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.006>.
- Khalid, M., Driessens, T.M., Lee, J.S., Téjwani, L., Rasool, A., Saqlain, M., Shiq, P.A., Hanif, M., Nawaz, A., DeWan, A.T., Raja, G.K., Lim, J., 2018. Association of CACNA1C with bipolar disorder among the Pakistani population. *Gene* 664, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.061>.
- Lahiri, D.K., Nurnberger, J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of

- HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>.
- Lancaster, T.M., Foley, S., Tansey, K.E., Linden, D.E., Caseras, X., 2016. *CACNA1C* risk variant is associated with increased amygdala volume. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 266, 269–275. <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0609-x>.
- Lima-Costa, M.F., Rodrigues, L.C., Barreto, M.L., Gouveia, M., Horta, B.L., Mambrini, J., Kehdy, F., Pereira, A., Rodrigues-Soares, F., Victoria, C.G., Tarazona-Santos, E., Epigen-Brazil group, 2015. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (the Epigen initiative). *Sci. Rep.* 5, 981. <https://doi.org/10.1038/srep09812>.
- Linkowski, P., Kerkhofs, M., Rielaert, C., Mendlewicz, J., 1986. Sleep during mania in manic-depressive males. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* 235, 339–341.
- Maigaard, K., Hageman, I., Jørgensen, A., Jørgensen, M.B., Wörtwein, G., 2012. Electroconvulsive stimulations prevent chronic stress-induced increases in L-type calcium channel mRNAs in the hippocampus and basolateral amygdala. *Neurosci. Lett.* 516, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.043>.
- McGuffin, P., Rijssdijk, F., Andrew, M., Sham, P., Katz, R., Cardno, A., 2003. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 497–502. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.5.497>.
- Min, J.A., Lee, H.J., Lee, S.H., Park, Y.M., Kang, S.G., Park, Y.G., Chae, J.H., 2017. RORA polymorphism interacts with childhood maltreatment in determining anxiety sensitivity by sex: a preliminary study in healthy young adults. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 15, 402–406. <https://doi.org/10.9758/cpn.2017.15.4.402>.
- Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat. Genet.* 43, 977–983. <https://doi.org/10.1038/ng.943>.
- Stahl, E.A., Breen, G., ... Bipolar Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2019. Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder. *Nat. Genet.* 51, 793–803. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0397-8>.
- Starawaska, A., Demontis, D., Pen, A., Hedemand, A., Nielsen, A.L., Staunstrup, N.H., Grove, J., Als, T.D., Jaram, A., O'Brien, N.L., Mors, O., McQuillin, A., Børglum, A.D., Nyegaard, M., 2016. *CACNA1C* hypermethylation is associated with bipolar disorder. *Transl. Psychiatry* 6, e831. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.99>.
- Uemura, T., Green, M., Warsh, J.J., 2016. *CACNA1C* SNP rs1006737 associates with bipolar I disorder independent of the Bcl-2 SNP rs956572 variant and its associated effect on intracellular calcium homeostasis. *World J. Biol. Psychiatry* 17, 525–534. <https://doi.org/10.3109/1562975.2015.1019360>.
- van Harmelen, A.L., van Tol, M.J., Demenes, L.R., van der Wee, N.J., Veltman, D.J., Aleman, A., van Buchem, M.A., Spinthoven, P., Penninx, B.W., Elzinga, B.M., 2013. Enhanced amygdala reactivity to emotional faces in adults reporting childhood emotional maltreatment. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 8, 362–369. <https://doi.org/10.1080/14697688.2013.785307>.
- Vinkers, C.H., Kalafateli, A.L., Rutten, B.P., Kas, M.J., Kaminsky, Z., Turner, J.D., Boks, M.P., 2015. Traumatic stress and human DNA methylation: a critical review. *Epigenomics* 7, 593–608. <https://doi.org/10.2217/epi.15.11>.
- World Health Organization (WHO), 2018. Mental Disorders. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders> (accessed 19 January, 2019).
- Wray, N.R., Pergadia, M.L., Blackwood, D.H., Penninx, B.W., Gordon, S.D., Nyholt, D.R., Ripke, S., MacIntyre, D.J., McGhee, K.A., Maclean, A.W., Smit, J.H., Hottenga, J.J., Willemsen, G., Middeldorp, C.M., de Geus, E.J., Lewis, C.M., McGuffin, P., Hickie, I.B., van den Oord, E.J., Liu, J.Z., Macgregor, S., McEvoy, B.P., Byrne, E.M., Medland, S.E., Statham, D.J., Henders, A.K., Heath, A.C., Montgomery, G.W., Martin, N.G., Boomsma, D.I., Madden, P.A., Sullivan, P.F., 2012. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. *Mol. Psychiatry* 17, 36–48. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.109>.
- Zeni, C.P., Mwangi, B., Cao, B., Hasan, K.M., Walss-Bass, C., Zunta-Soares, G., Soares, J.C., 2016. Interaction between BDNF rs6265 met allele and low family cohesion is associated with smaller left hippocampal volume in pediatric bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 189, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.09.031>.
- Zhang, X., Zhang, C., Wu, Z., Wang, Z., Peng, D., Chen, J., Hong, W., Yuan, C., Li, Z., Yu, S., Fang, Y., 2013. Association of genetic variation in *CACNA1C* with bipolar disorder in Han Chinese. *J. Affect. Disord.* 150, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.04.004>.

Supplementary table 1. Clinical characteristics of the sample according to the diagnosis of BD.

Clinical characteristic	Bipolar disorder		
	No (n=779)	Yes (n=99)	p-value
Subtype of diagnosis			
Bipolar I	-	70 (70.7)	
Bipolar II	-	29 (29.3)	
Medication*			<0.001
Not use	201 (34.9)	20 (27.4)	
Psychiatric	56 (9.7)	21 (28.8)	
Others	319 (55.4)	32 (43.8)	
Smoke (% yes)	140 (18.0)	45 (45.9)	<0.001
Anxiety disorders (% yes)	168 (21.6)	69 (69.7)	<0.001
Drug abuse (% yes)	53 (6.8)	10 (10.2)	0.307

Values were obtained by the χ^2 -test and presented as n (%). *missing

Supplementary table 2. Binary logistic regression showing OR values for BD in each genotype/haplotype evaluated according to childhood trauma.

Reference group	Minor frequency allele not exposed to trauma		Without minor frequency allele exposed to trauma		Minor frequency allele with trauma		
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	
rs1006737	1	0.60 (0.32- 1.12)	0.106	2.76 (1.52-4.99)	0.001	3.25 (1.84-5.72)	<0.001
rs4765913	1	0.477 (0.22-1.04)	0.064	2.50 (1.46-4.28)	0.001	4.28 (2.45-7.50)	<0.001
rs1006737- rs4765913	1	0.461 (0.20-1.05)	0.066	2.50 (1.47-4.28)	0.001	4.40 (2.51-7.67)	<0.001

Results obtained from binary logistic regression adjusted for sex. Individuals without minor allele not exposed to childhood trauma were considered as reference (OR=1). OR: Odds Ratio.

ARTIGO 2:

Temperament traits mediate the relationship between CACNA1C polymorphisms and bipolar disorder in women

Artigo formatado para submissão na revista “*The World Journal of Biological Psychiatry*”

Temperament traits mediate the relationship between *CACNA1C* polymorphisms and Bipolar Disorder in women

Clarissa Ribeiro Bastos^a, Bertha Bueno Bock^a, Janaina Xavier^a, Laísa Camerini^a, Samantha Seibt Dewes^a, Mateus Grellert^b, Hudson Wander de Carvalho^c, Karen Jansen^a, Ricardo Azevedo da Silva^a, Luciano de Mattos Souza^a, Jean Pierre Osés^d, Luis Valmor Portela^e, Diogo Rizzato Lara^f, Luciana Tovo-Rodrigues^g, Gabriele Ghisleni^{a*}

^a Post-graduation Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; ^b Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ^c Department of Psychology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; ^d Institute of Bioscience, Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brazil; ^e Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ^f Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ^g Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Running Head: Impact of *CACNA1C* on temperament traits

*Corresponding Author: Gabriele Ghisleni

E-mail: ghisleni.g@gmail.com

Laboratory of Clinical Neuroscience

Post-Graduation Program of Health and Behavior

Center of Health Science

Catholic University of Pelotas

373, 324C Gonçalves Chaves Street,

CEP 96015-560

Pelotas/RS/Brazil

Fone: +55 53 2128-8031

Fax: +55 53 2128 8229

Abstract

Background: The influence of temperament traits on bipolar disorder (BD) has been well documented. Both temperament traits and BD are partially genetically determined and seem to be influenced by variations in the *CACNA1C* gene. These variations presented a significant interactive effect with biological sex. Here, we assess the mediation effect of temperament traits on the relationship between two polymorphisms in the *CACNA1C* gene (rs1006737 and rs4765913) and BD according to sex. **Methods:** This is a cross-sectional study consisted of 878 Caucasian individuals (508 women and 370 men), aged 18-35, enrolled in a population-based study in the city of Pelotas, Southern Brazil. BD diagnosis was performed using a clinical interview MINI 5.0, and temperament traits were assessed with the Affective and Emotional Composite Temperament Scale (AFECTS). The mediation models were tested using the modeling tool PROCESS (version 3.3) for SPSS.

Results: Bootstrapping-enhanced mediation analyses in women indicated that anger (39%), and caution (27%) mediated the association between the rs4765913 SNP and BD. While volition (29%), anger (35%), and caution (29%) mediated the association between the AA haplotype (rs1006737-rs4765913) and the BD. No effect was demonstrated for men.

Conclusion: Our model revealed that paths from *CACNA1C* SNPs to BD go through the temperament scores in women, indicating that temperament traits are endophenotypes possible in this relationship.

Keywords: Calcium channels L-type; Bipolar disorder; Temperament; AFECTS;

1. Introduction

Temperament is a concept analog to personality, that represents the basic emotional response patterns of an individual. It can be inferred by the way the individual reacts behaviorally and emotionally to diverse physiological, psychosocial, and energetic stimuli. As temperament is the basis of humor fluctuation, it reflects in several dimensions such as cognition, interpersonal relationships, and affectivity, being a potential predictor in mental health outcomes (Lara et al., 2012). The Affective and Emotional Composite Temperament model describes temperament as a self-regulated system. Its original version proposed six emotional dimensions: volition (positive emotionality), anger (aggression and emotional intensity), inhibition (fear and caution), emotional sensitivity (vulnerability to environment and personal stressors), coping (ability to learn with experience), and control (focus and emotional regulation) (Lara et al., 2012). More recently, an expanded version of the AFECTS model was proposed and validated (Carvalho et al., 2020) in which inhibition was divided into 2 independent factors of fear and caution. It is thought that dysregulation of these temperament traits predisposes to the development of several psychiatric disorders, like bipolar disorder (BD), with extreme trait variations conferring greater risk (Akiskal et al., 1977; Akiskal and Akiskal, 1992; Johnson et al., 2016; Fico et al., 2019).

Over the last decades, studies have demonstrated the power of temperament traits to predict risk for BD (Akiskal, 1985; Lozano and Johnson, 2001; Quilty et al., 2009), and to discriminate between bipolar patients, healthy relatives and controls (Evans et al., 2005; Mendlowicz et al., 2005). Interestingly, healthy relatives demonstrate similar patterns of bipolar patients suggesting that temperaments traits are related to the genetic risk and may serve as endophenotypes (Evans et al., 2005; Kesebir et al., 2005). In fact, the temperament traits are moderately heritable, with genetic differences representing up to 60% of its variability within a population (Jang et al., 1996; Vernon et al., 2008). New molecular

techniques have led to the discovery of associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and several psychological traits such as extraversion, neuroticism, and anger (Lo et al., 2017; Mick et al., 2014).

In this context, the *CACNA1C* gene, one of the most robust discoveries linked to BD (Ferreira et al., 2008; Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011; Green et al., 2013; Mullins et al., 2021), seems to be involved in the genetic architecture of personality traits, like neuroticism, sense of coherence, dispositional optimism, perceived social support, interpersonal sensitivity, extraversion, harm avoidance, and hostility (Erk et al., 2010; Roussos et al., 2011; Strohmaier et al., 2013; Takeuchi et al., 2019). The *CACNA1C* gene is located on chromosome 12 and encodes the pore-forming alpha-1c subunit of the $\text{Ca}_v1.2$ voltage-gated L-type calcium channels (LTCCs). The $\text{Ca}_v1.2$ channels are present in the membrane of most excitable cells and are activated in response to cellular depolarization, mediating the Ca^{2+} influx. They are responsible for regulating several intracellular processes such as contraction, secretion, neurotransmission, and gene expression (Catterall, 2011; Striessnig et al., 2014).

Dysfunction of these channels may affect temperament traits through alterations in brain activity patterns (Kabir et al., 2017). Indeed, *CACNA1C* SNPs appear to cause structural and functional brain alterations, with consistent effects detected in the amygdala (Wessa et al., 2010; Jogia et al., 2011), hippocampus (Bigos et al., 2010), and prefrontal cortex (PFC) (Bigos et al., 2010; Jogia et al., 2011). The mechanism through which this occurs is not completely elucidated. However, a possible explanation is the regulation of several genes expression through calcium influx, including those that have neurotrophic and neuroprotective effects on corticolimbic frontotemporal structures, like *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* and *B-cell lymphoma 2 (BCL2)* (Tao et al., 1998; Pinton et al., 2000). The levels of these genes products can be altered by variations in the $\text{Ca}_v1.2$

expression, which are related to intron 3 polymorphisms (including the rs1006737 and rs4765913) (Eckart et al., 2016; Starnawska et al., 2016).

Noteworthy, there seems to be a significant interactive effect between *CACNA1C* SNPs and sex, both on BD and temperament characteristics (Dao et al., 2010; Strohmaier et al., 2013; Witt et al., 2014). Genetic studies that ignore these effects could fail to identify a significant proportion of the genes that contribute to the risk for psychiatric diseases (Ober et al., 2008). Moreover, the developmental trajectories of temperament and its correlates may be intrinsically linked to biological sex (Buthmann et al. 2018). Thus, the sex impact is strong and not be longer be ignored.

Based on the above, a plausible hypothesis is that the effect of *CACNA1C* SNPs on BD is mediated by temperament traits and differ according to sex. The exploration of this association is important to clarify the role of *CACNA1C* gene on BD. Thus, we sought to assess the mediation effect of temperament traits on the relationship between rs1006737 (G/A) and rs4765913 (A/T) SNPs and their haplotypes and BD according to sex in Caucasian young adults from the city of Pelotas, Brazil.

2. Methods

2.1. Study design and participants

Data from the present study were obtained from a cross-sectional population-based study conducted in the urban area of the city of Pelotas, southern Brazil, between June 2011 and May 2013, which evaluated 878 individuals aged between 18 years and 35 years. The sample selection was performed by multistage clusters considering a population of 97,000 young adults and the census of 495 sectors, both sources of data provided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). More details have been previously described by Bastos et al. (2020). After initial contact and presentation of the study, residents of the

specified age range were invited to participate and signed the informed consent form. Individuals unable to participate in the interviews owing to physical or cognitive problems were excluded. The home visits were performed in the morning, where the participants answered questionnaires with sociodemographic, lifestyle, and comorbid information. The skin color of the participants was self-reported, and only white individuals were included in this study to reduce genetic variability in the findings. The study was approved by the Ethical Committee of the Catholic University of Pelotas, Brazil (Protocol number 2010/15), and the individuals diagnosed with BD were referred to psychological/psychiatric care.

2.2. Psychological Assessment

The BD diagnosis was performed by trained psychologists using a structured clinical interview, the Mini International Neuropsychiatric Interview, according to the DSM-IV criteria (M.I.N.I. 5.0., Brazilian version/DSM IV, Medical Outcome Systems Inc., Jacksonville, USA). The bipolar group was characterized by the presence of past or current history of episodes of mania or at least one hypomanic episode and one depressive episode. Emotional temperament traits were assessed using the emotional section of the Affective and Emotional Composite Temperament Scale (AFECTS), a self-report instrument validated from Brazil with adequate psychometric properties (Lara et al., 2012; Carvalho et al., 2020). The emotional section of this instrument is a 7-point bipolar scale (e.g., Pessimistic 1 2 3 4 5 6 7 Optimistic) with 48 items, divided into 5 dimensions of 8 questions and 2 dimensions with 4 items each. The five 8-items dimensions are: Volition, Anger, Sensitivity, Coping and Control. Inhibition was divided into two (Fear and Caution) 4-item each dimension. The total score of each dimension is the sum of scores from 1 to 7 for each question, therefore the dimension scores range from 8 to 56 or 4 to 16.

2.3. Molecular analysis

Ten milliliters of blood were obtained in the morning by venipuncture after the clinical interview. Blood was immediately centrifuged at 3500g for 15 min, and total DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes using a standard salting-out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). Two polymorphisms were investigated: rs1006737, placed in chromosome 12p:2236129, and rs4765913, placed in chromosome 12p:2310730 (median distance of 74Kb). The choice of these SNPs was based on: (1) previous results of Genome-Wide Association Studies (GWAS) relating these SNPs with the BD (Ferreira et al. 2008; Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011); (2) A possible regulatory effect on *CACNA1C*, as shown by *quantitative trait expression loci* (eQTL) (Eckart et al. 2016); (3) allelic frequencies of the variants; (4) and technical viability. The SNPs were genotyped using primers and probes contained in the 40× Human Custom TaqMan Genotyping Assay (Life Technologies, Foster City, USA) by real-time PCR (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems). More details on the molecular analysis have been previously described (Bastos et al. 2020).

2.4. Statistical Analyses

The Hardy-Weinberg equilibrium deviation was tested using the Chi-squared (χ^2) test. Haploview 4.2 (Barrett et al., 2005) was applied to estimate and visualize the linkage disequilibrium (LD) (expressed as D') between rs1006737 and rs4765913. The haplotypes were estimated using the UNPHASED 3.1.7 (Dudbridge, 2008). *CACNA1C* rs1006737 and rs4765913 SNPs were grouped by the presence of the minor frequency allele (A), and haplotype analysis was performed based on the presence or absence of the AA haplotype. Sociodemographic, clinical, and biological characteristics were described according to BD

diagnosis and tested using the χ^2 test followed by the Bonferroni's post-hoc test or the Student's t-test, as appropriate. Linear regression was used to test the association between SNPs and temperamental traits. All statistical models were adjusted for age. The above-mentioned analyses were performed in SPSS 22.0, and graphs were analyzed in GraphPad Prism. P values $<.05$ were considered statistically significant.

2.4.1 Mediation analysis

We explore temperament traits as a mediator of the association between *CACNA1C* SNPs and BD. First, we tested the association between temperament traits and BD, as well as between temperament traits and *CACNA1C* SNPs. The temperamental traits associated with both *CACNA1C* SNPs and BD were included in the mediation analysis. We chose to include all traits in the same analysis, in order to assess the specific indirect effect of each one, after controlling for the other mediators. The mediation models were tested using the modeling tool PROCESS (version 3.3) for SPSS (Hayes, 2017), which enabled us to assess mediation for dichotomous (BD) and continuous (temperament traits) outcomes. We apply Model 4 which allows up to 10 mediators to operate in parallel, and we used the bootstrap approach to assess the statistical significance of the mediation. Bootstrapping is a robust nonparametric technique for hypothesis testing and effect size estimation without making assumptions of normal distribution (Preacher and Hayes, 2008). It estimates a parameter from repeated resampling of data with replacement ($k=5000$) to form a 95% confidence interval for the estimate. If 95% of the CI does not include zero, the result is statistically significant.

The mediation model is presented in Figure 1. The coefficient c' represents the effect of X (the independent variable [predictor; here genotype]) on Y (the dependent variable [outcome; here bipolar disorder]), after controlling for the effect of M (the intervening

variable [mediator; here temperament traits]). The coefficient a represents the effect of the SNP on the mediator, and coefficient b represents the effect of the mediator on the BD. Therefore, the mediated (or indirect) effect of the SNP on the BD via the temperament traits is represented as ab . The total effect of the SNP on the BD (including the indirect and direct effect) is estimated as $ab + c'$, and the proportion mediated is estimated for the equation " $ab/(c' + ab)$ ", as a way to gauge the magnitude of the indirect effect. For the evaluated the impact of *CACNA1C* SNPs and BD in the temperament traits, we employed linear regression analyses estimating the β coefficients. For evaluated the temperament traits effect in BD, logistic regression was used having log-odds metric as an effect measure.

3. Results

3.1. Sociodemographic and clinical characteristics

A total of 878 young adults were included in this study. Of these, 11.3% were diagnosed with BD (70.7% type 1 and 29.3% type 2), 50.5% carried the minor frequency allele for the rs1006737 SNP, and 33.0% carried the minor frequency allele for the rs4765913 SNP. The SNPs evaluated were in strong LD, $D' = 0.87$. The genotype distributions of the rs1006737 and rs4765913 SNPs were 49.5% GG, 42.4% AG, 8.1% AA, and 67.0% TT, 30.0% AT, 3.0% AA, respectively. The frequency of haplotypes in our sample was 69.1% GT, 16.0% AA, 13.3% AT, and 1.6% GA (Bastos et al., 2020). The genotypic distributions of SNPs did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium for rs1006737 ($\chi^2 = 0.054$ $p = 0.814$) and rs4765913 ($\chi^2 = 0.029$ $p = 0.863$). The distribution of genotypes did not differ about sociodemographic and biological characteristics such as sex, age, and anxiety disorders (data not shown).

The temperament traits differ according to sex. Compared to men, women had lower volition [β (95%CI) = -3.01 (-4.30 – -1.73); $p < 0.001$] and caution [β (95%CI) = -0.82 (-

$1.60 - -0.05$; $p = 0.037$], and higher anger [β (95%CI) = 4.49 (2.95 – 6.03); $p < 0.001$], sensitivity [β (95%CI) = 5.74 (4.35 – 7.13); $p < 0.001$], and fear [β (95%CI) = 1.45 (0.79 – 2.11); $p < 0.001$]. No differences were observed for coping [β (95%CI) = -0.89 (-2.14 – 0.36); $p = 0.163$], and control [β (95%CI) = -1.21 (-2.50 – 0.08); $p = 0.067$] (data not shown). The characteristics of the sample according to the BD diagnosis have been summarized in Table 1. Among the variables studied, we observed that individuals with BD presented higher comorbidity with anxiety disorders (including agoraphobia, generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder) ($p < 0.001$), and reported more use of tobacco ($p < 0.001$). All the temperament traits, except fear, showed mean scores that significantly differed between the groups, in which anger ($p < 0.001$) and sensitivity ($p < 0.001$) scores were increased in individuals with BD. Meanwhile, mean scores of volition ($p < 0.001$), caution ($p < 0.001$), coping ($p < 0.001$) and control ($p < 0.001$) were significantly decreased in individuals with BD.

3.2 Mediation analysis

We tested the association between *CACNA1C* SNPs and temperament traits. For men, none effect statistically significant was observed (Supplementary figure 1). On the other hand, in women, the *CACNA1C* SNPs had a significative effect on four temperament traits, volition, anger, caution and control (Figure 2). Thus, we sought to investigate if these traits mediated the relationship between *CACNA1C* SNPs and BD (Figure 3). First, the regression results (a coefficient) showed that the A-allele of rs1006737 SNP negatively influenced the volition ($\beta = -1.86$; $p = 0.035$), and control ($\beta = -1.97$; $p = 0.023$) scores. The A-allele of rs4765913 SNP and AA haplotype negatively influenced the volition [$(\beta = -2.35$; $p = 0.011)$; $(\beta = -2.69$; $p = 0.004)$, respectively], caution [$(\beta = -1.22$; $p = 0.027)$; $(\beta = -1.30$; $p = 0.021)$] and control [$(\beta = -2.71$; $p = 0.003)$; $(\beta = -3.26$; $p <$

0.001)] scores, and positively influenced the anger scores [$(\beta = 2.84; p = 0.010)$; ($\beta = 2.60; p = 0.021$)]. Moreover, volition (*log odds*= -0.04; $p = 0.027$) and caution (*log odds*= -0.08; $p = 0.014$) scores also shown to negatively influence the BD, while anger had a positive effect on the disorder (*log odds*: 0.05; $p = 0.010$). The control lost the effect on BD when adjusted for the other mediators (*log odds*: -0.006; $p = 0.721$) (*b* coefficient).

The analyses did not show that any direct effect of *CACNA1C* SNPs on BD ($p > 0.05$) (c' coefficient). However, the indirect effect was observed for rs4765913 SNP and haplotype. For rs4765913 SNP, an indirect effect on BD was demonstrated through the mediators, anger [*log odds (95% CI)* = 0.13 (0.02 – 0.30)] (with mediated proportion of the 39%), and caution [*log odds (95% CI)* = 0.09 (0.003 – 0.25)] (with mediated proportion of the 27%). In relation to the AA haplotype, its effect on BD was mediated by volition [*log odds (95% CI)* = 0.10 (0.002 – 0.251)] (with mediated proportion of the 29%), anger [*log odds (95% CI)* = 0.12 (0.012 – 0.29)] (with mediated proportion of the 35%) and caution [*log odds (95% CI)* = 0.10 (0.004 – 0.26)] (with mediated proportion of the 29%). No indirect effects were observed for rs1006737 SNP.

4. Discussion

The present study showed that emotional traits of temperament (volition, anger, and caution) mediate the relationship between *CACNA1C* SNPs and BD in women. The AA haplotype (rs1006737-rs4765913) mediated this relationship through the lower volition and caution scores, and higher anger scores. These characteristics may be related to unstable temperaments (cyclothymic, volatile, dysphoric) and, consequently, to psychopathology.

Variations in temperament traits are common in the population. However, its extreme manifestations can increase the probability of developing psychiatric disorders (Akiskal and

Akiskal, 1992; Johnson et al., 2016). The AFECT model is based on the principle that volition and anger (Activation processes) and fear and caution (Inhibition processes) are the basic emotional vectors of the mind. Sensitivity and coping are the way in which this system reacts to the environment and control involves the monitoring of the environment by discipline and planning (Lara et al., 2012). The activation and/or inhibition imbalance is proposed as the mechanism fundamental to the maladaptive mood states. According to Lara and contributors (2012), the probability of developing one or more psychiatric disorders would be related to individual differences in the activation and inhibition, with more pronounced clinical pictures if anger and fear expressions are too high and volition and caution, too low.

In our study, the BD was associated with alterations in all temperament traits, except fear. Similar results have already been described with other scales, where bipolar individuals had higher global measures of neuroticism (related to sensitivity and anger) (Jylhä et al., 2010; Barnett et al., 2011), lower conscientiousness scores (indicative of control) (Nowakowska *et al.*, 2005; Barnett et al., 2011), and lower self-directedness scores (concept closely related to volition and coping) (Engström *et al.*, 2004; Nowakowska *et al.*, 2005). The harm avoidance trait (approximately related to fear) seems to increase on BD (Nowakowska *et al.*, 2005; Nery et al., 2008). However, we found no difference in fear scores between bipolar and controls. Regarding the sex impact on temperament, our study agrees with previous findings, which showed differences in the traits of activation, inhibition, and sensitivity between men and women (Lara et al. 2012).

The impact of *CACNA1C* SNPs was observed in four temperament traits, volition, anger, caution, and control only in women, with a more pronounced effect of haplotype on volition, caution, and control, and a more pronounced effect of rs4765913 on anger scores. Volition, caution, and control are temperament traits related to executive function, that is,

they are linked to the ability to manage cognitive and emotional resources. This ability is especially related (though not exclusively) to the prefrontal cortex (PFC) (Funahashi and Andreau, 2013). Interestingly, the *CACNA1C* SNPs were associated with cortical architecture of BD patients (Smedler et al., 2020). The patients A-allele carriers of the rs1006737 SNP present worse executive function performance (Soeiro-de-Souza et al., 2013), and reduced activity of the right ventrolateral PFC during emotional processing (Jogia et al., 2011). Moreover, in healthy individuals, the AA genotype was associated with prefrontal cortical inefficiency during working memory (Bigos et al., 2010), a pattern associated with mental disorders.

In this line, the A-allele of rs1006737 SNP also has been associated with greater *CACNA1C* messenger RNA expression in the PFC (Bigos et al., 2010), and with higher levels of intracellular calcium in BD patients (Uemura et al., 2016). Excessive levels of calcium signaling can have important detrimental effects, like open nearby K⁺ channels to weaken synaptic efficacy and reduce neuronal firing, and over a longer timeframe, induce an inflammatory response via calcium overload of mitochondria (Arnsten and Wang, 2020). With regard to anger, it can be governed by subcortical brain circuits in the hypothalamus, and amygdala. Moreover, the PFC also may contribute to this regulation, modulating the activation of these structures (Nelson and Trainor, 2007). Previous neuroimaging studies have reported alterations in amygdala structure and function in BD (Altshuler et al., 1998; Altshuler et al., 2005; Brambilla et al., 2003; Kalmar et al., 2009). These alterations also were observed in A-allele carriers of rs1006737, which presented increase amygdala volume (Lancaster et al., 2016), and increased activation of the left amygdala in response to the negative faces paradigm (Tesli et al., 2013).

Noteworthy, rs1006737 SNP also was associated with reduced functional connectivity within the corticolimbic neural system (Wang et al., 2011), a pattern observed on BD

(Strakowski et al., 2012). Thus, the decrease or inefficiency in PFC activation by the *CACNAC* SNPs may be related to the lower scores of volition, control, and caution observed in our study, and a increased activation in amygdala may be associated with higher anger scores. Furthermore, a failure to establish a healthy PFC-limbic modulation may create a permissive environment for manic symptoms. Curiously in our study, rs1006737 SNP (the most widely studied), may alter volition and control scores but this was not sufficient to mediate disease expression. However, we observed a significant effect combinatorial effect between it and rs4765913. This is in agreement with studies that suggest a combinatorial effect of genetic variants in LD on *CACNA1C* gene expression (Eckart et al., 2016).

It is important to consider that the studies described above did not evaluate the SNPs effect according to sex. However, recently, a study showed that *CACNA1C* variation has sex-dependent effects on brain functional activity. In healthy female the minor allele of rs1024582 SNP [high LD with rs4765913 ($D'=0.93$) and rs1006737 ($D'=0.90$)] was associated with reduced activity in the frontolimbic regions at rest (right dorsolateral PFC), and during a working memory task (right hippocampus and parahippocampal gyrus, right medial parietal cortex, and right thalamus) (Takeuchi et al., 2019). Moreover, differences in the diagnosis, course, and recovery of psychiatric disorders according to sex already were observed for *CACNA1C* SNPs (Dao et al., 2010, Heilbronner et al., 2015; Strohmaier et al., 2013). The mechanism involved in this difference is not understood. However, there appears to be a *CACNA1C* hypermethylation in females compared with males, suggesting that increased DNA methylation in females could determine sex-specific endophenotypes of BD (Starnawska et al., 2016). Furthemore, this difference also it can be the result of the action of the sexual hormones, like the beta-estradiol that regulates signaling calcium pathways, and the voltage-gated calcium channels expression (Banciu et al., 2018).

A limited number of studies evaluated the impact of *CACNA1C* gene on temperament traits. In a population-based study with healthy individuals, Strohmaier et al. (2013) also reported different effects of rs1006737 SNP according to sex, but the A-allele was linked to positive effects in women (lower emotional lability and stronger resilience), which can be considered out of line with our results. However, our results are in accordance with previous findings that demonstrated SNPs located in intron 3 of the *CACNA1C* gene, including rs1006737 and rs4765913, appear to lead to a more harmful phenotype in women (Takeuchi et al., 2019; Witt et al., 2014; Dao et al., 2010). In fact, the minor allele of rs1024582 SNP was associated with greater hostility in females and at the uncorrected level was associated with other traits of negative effects, as greater harm avoidance, increased frequency of paranoia, and lower intrapersonal emotional intelligence (Takeuchi et al., 2019).

A GWAS of proneness to anger observed a nominal association with *CACNA1C* SNP (rs215996) and suggested that signaling pathways regulating intracellular calcium homeostasis, may underlie the expression of angry temperament (Mick et al., 2014). Our results evidenced a strong effect of rs4765913 SNP in the anger scores, and its effect mediated 39% of the relationship between this SNP and BD. Despite being little studied, the A-allele of this SNP was associated with risk for BD in two independent GWAS of European cohorts and been shown to increase sleep latency in infants (Kantojärvi et al., 2017). Moreover, previous findings also revealed that individuals A-allele carriers of rs4765913 SNP exposed to childhood trauma are more likely to develop BD (Bastos et al., 2020).

The dysregulation in temperament traits may explain why *CACNA1C* SNPs also are associated with several other disorders, such as schizophrenia, depression, and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics

Consortium, 2013). These findings bolster the evidence that genes associated with psychiatric diseases can show stronger effects at the level of emotional processing and cognitive information. However, our results should be interpreted in the context of some limitations. The first limitation is regarding the sample size, which may have impacted the precision of our findings. Further studies with larger sample sizes will be noteworthy to replicate our results and evaluate separately individuals with BD type I and II. The second limitation is the use of only one diagnostic instrument, which can generate a proportion of false positives. Moreover, although the temperament traits have a low correlation in general, the control exhibits a moderate correlation with volition ($r=0.55$), which may explain why its association with BD is lost when included in the model with the other mediators.

In conclusion, we suggested that temperament traits are endophenotypes possible in the relationship between *CACNA1C* SNPs and BD in women, and its use can be one way to reduce heterogeneity and facilitate more powerful genetic analysis.

Funding: This research was funded by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior* (CAPES) and PRONEX-FAPERGS (08/2009 – Pronex, grant number 10/0055-0).

Ethics approval/ Consent to participate: The study protocol was approved by the Ethics Committee of Catholic University of Pelotas, Pelotas, Brazil (Protocol number 2010/15) and was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the Declaration of Helsinki. All participants signed the written informed consent.

Availability of Data and Material: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Akiskal, H. S., & Akiskal, K. (1992). Cyclothymic, hyperthymic, and depressive temperaments as subaffective variants of mood disorders. *American Psychiatric Press Review of Psychiatry*, 11, 43–62.
2. Akiskal, H. S., Djenderedjian, A. M., Rosenthal, R. H., & Khani, M. K. (1977). Cyclothymic disorder: validating criteria for inclusion in the bipolar affective group. *The American journal of psychiatry*, 134(11), 1227–1233. <https://doi.org/10.1176/ajp.134.11.1227>
3. Akiskal, H. S., Downs, J., Jordan, P., Watson, S., Daugherty, D., & Pruitt, D. B. (1985). Affective disorders in referred children and younger siblings of manic-depressives. Mode of onset and prospective course. *Archives of general psychiatry*, 42(10), 996–1003. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1985.01790330076009>
4. Altshuler, L. L., Bartzokis, G., Grieder, T., Curran, J., & Mintz, J. (1998). Amygdala enlargement in bipolar disorder and hippocampal reduction in schizophrenia: an MRI study demonstrating neuroanatomic specificity. *Archives of general psychiatry*, 55(7), 663–664. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.7.663>
5. Altshuler, L., Bookheimer, S., Proenza, M. A., Townsend, J., Sabb, F., Firestone, A., Bartzokis, G., Mintz, J., Mazziotta, J., & Cohen, M. S. (2005). Increased amygdala activation during mania: a functional magnetic resonance imaging study. *The American journal of psychiatry*, 162(6), 1211–1213. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.6.1211>
6. Arnsten, A., Datta, D., & Wang, M. (2020). The genie in the bottle-magnified calcium signaling in dorsolateral prefrontal cortex. *Molecular psychiatry*, 10.1038/s41380-020-00973-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00973-3>
7. Banciu, A., Banciu, D. D., Mustaciosu, C. C., Radu, M., Cretoiu, D., Xiao, J., Cretoiu, S. M., Suciu, N., & Radu, B. M. (2018). Beta-Estradiol Regulates Voltage-Gated Calcium Channels and Estrogen Receptors in Telocytes from Human Myometrium. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1413. <https://doi.org/10.3390/ijms19051413>
8. Barnett, J. H., Huang, J., Perlis, R. H., Young, M. M., Rosenbaum, J. F., Nierenberg, A. A., Sachs, G., Nimgaonkar, V. L., Miklowitz, D. J., & Smoller, J. W. (2011). Personality and bipolar disorder: dissecting state and trait associations between mood

- and personality. *Psychological medicine*, 41(8), 1593–1604.
<https://doi.org/10.1017/S0033291710002333>
9. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(2), 263–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
 10. Bastos, C. R., Tovo-Rodrigues, L., Ardais, A. P., Xavier, J., Salerno, P., Camerini, L., Jansen, K., de Mattos Souza, L. D., da Silva, R. A., Lara, D. R., & Ghisleni, G. (2020). The role of *CACNA1C* gene and childhood trauma interaction on bipolar disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 101, 109915. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109915>
 11. Bigos, K. L., Mattay, V. S., Callicott, J. H., Straub, R. E., Vakkalanka, R., Kolachana, B., Hyde, T. M., Lipska, B. K., Kleinman, J. E., & Weinberger, D. R. (2010). Genetic variation in *CACNA1C* affects brain circuitries related to mental illness. *Archives of general psychiatry*, 67(9), 939–945. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.96>
 12. Brambilla, P., Harenski, K., Nicoletti, M., Sassi, R. B., Mallinger, A. G., Frank, E., Kupfer, D. J., Keshavan, M. S., & Soares, J. C. (2003). MRI investigation of temporal lobe structures in bipolar patients. *Journal of psychiatric research*, 37(4), 287–295. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(03\)00024-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(03)00024-4)
 13. Buthmann, J., Finik, J., & Nomura, Y. (2018). Sex differences in the relations between infant temperament and electrodermal responses in early childhood. *International journal of behavioral development*, 42(6), 535–542. <https://doi.org/10.1177/0165025418757705>
 14. Catterall W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
 15. Carvalho, H.W., Cogo-Moreira, H., Jansen, K., Souza, L., Branco, J., Silva, R., Lara, D. (2020). The latent structure and reliability of the emotional trait section of the Affective and Emotional Composite Temperament Scale (AFECTS). *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, 47(1). <https://doi.org/10.1590/0101-60830000000225>
 16. Cloninger, C. R., Cloninger, K. M., Zwir, I., & Keltikangas-Järvinen, L. (2019). The complex genetics and biology of human temperament: a review of traditional concepts in relation to new molecular findings. *Translational psychiatry*, 9(1), 290. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0621-4>

17. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2013). Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet (London, England)*, 381(9875), 1371–1379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62129-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62129-1)
18. Dao, D. T., Mahon, P. B., Cai, X., Kovacsics, C. E., Blackwell, R. A., Arad, M., Shi, J., Zandi, P. P., O'Donnell, P., Bipolar Genome Study (BiGS) Consortium, Knowles, J. A., Weissman, M. M., Coryell, W., Scheftner, W. A., Lawson, W. B., Levinson, D. F., Thompson, S. M., Potash, J. B., & Gould, T. D. (2010). Mood disorder susceptibility gene *CACNA1C* modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biological psychiatry*, 68(9), 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.019>
19. Dudbridge F. (2008). Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Human heredity*, 66(2), 87–98. <https://doi.org/10.1159/000119108>
20. Eckart, N., Song, Q., Yang, R., Wang, R., Zhu, H., McCallion, A. S., & Avramopoulos, D. (2016). Functional Characterization of Schizophrenia-Associated Variation in *CACNA1C*. *PloS one*, 11(6), e0157086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157086>
21. Engström, C., Brändström, S., Sigvardsson, S., Cloninger, R., & Nylander, P. O. (2004). Bipolar disorder: I. Temperament and character. *Journal of affective disorders*, 82(1), 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2003.09.004>
22. Erk, S., Meyer-Lindenberg, A., Schnell, K., Opitz von Boberfeld, C., Esslinger, C., Kirsch, P., Grimm, O., Arnold, C., Haddad, L., Witt, S. H., Cichon, S., Nöthen, M. M., Rietschel, M., & Walter, H. (2010). Brain function in carriers of a genome-wide supported bipolar disorder variant. *Archives of general psychiatry*, 67(8), 803–811. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.94>
23. Evans, L., Akiskal, H. S., Keck, P. E., Jr, McElroy, S. L., Sadovnick, A. D., Remick, R. A., & Kelsoe, J. R. (2005). Familiality of temperament in bipolar disorder: support for a genetic spectrum. *Journal of affective disorders*, 85(1-2), 153–168. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2003.10.015>
24. Ferreira, M. A., O'Donovan, M. C., Meng, Y. A., Jones, I. R., Ruderfer, D. M., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R. H., Green, E. K., Smoller, J. W., Grozeva, D., Stone, J., Nikolov, I., Chambert, K., Hamshere, M. L., Nimagaonkar, V. L., Moskvina, V., Thase, M. E., Caesar, S., ... Wellcome Trust Case Control Consortium (2008). Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and

- CACNA1C* in bipolar disorder. *Nature genetics*, 40(9), 1056–1058.
<https://doi.org/10.1038/ng.209>
25. Fico, G., Caivano, V., Zinno, F., Carfagno, M., Steardo, L. J., Sampogna, G., Luciano, M., & Fiorillo, A. (2019). Affective Temperaments and Clinical Course of Bipolar Disorder: An Exploratory Study of Differences among Patients with and without a History of Violent Suicide Attempts. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(7), 390. <https://doi.org/10.3390/medicina55070390>
26. Funahashi, S., & Andreato, J. M. (2013). Prefrontal cortex and neural mechanisms of executive function. *Journal of physiology, Paris*, 107(6), 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2013.05.001>
27. Green, E. K., Hamshere, M., Forty, L., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Russell, E., Grozeva, D., Kirov, G., Holmans, P., Moran, J. L., Purcell, S., Sklar, P., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Jones, L., WTCCC, Jones, I. R., & Craddock, N. (2013). Replication of bipolar disorder susceptibility alleles and identification of two novel genome-wide significant associations in a new bipolar disorder case-control sample. *Molecular psychiatry*, 18(12), 1302–1307. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.142>
28. Hayes, A. F. (2017). Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach. Guilford Press.
29. Heilbronner, U., Malzahn, D., Strohmaier, J., Maier, S., Frank, J., Treutlein, J., Mühlleisen, T. W., Forstner, A. J., Witt, S. H., Cichon, S., Falkai, P., Nöthen, M. M., Rietschel, M., & Schulze, T. G. (2015). A common risk variant in *CACNA1C* supports a sex-dependent effect on longitudinal functioning and functional recovery from episodes of schizophrenia-spectrum but not bipolar disorder. *European neuropsychopharmacology*, 25(12), 2262–2270. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.09.012>
30. Jang, K. L., Livesley, W. J., & Vernon, P. A. (1996). Heritability of the big five personality dimensions and their facets: a twin study. *Journal of personality*, 64(3), 577–591. <https://doi.org/10.1111/j.1467-6494.1996.tb00522.x>
31. Jorgia, J., Ruberto, G., Lelli-Chiesa, G., Vassos, E., Maierú, M., Tatarelli, R., Girardi, P., Collier, D., & Frangou, S. (2011). The impact of the *CACNA1C* gene polymorphism on frontolimbic function in bipolar disorder. *Molecular psychiatry*, 16(11), 1070–1071. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.49>

32. Johnson, S. L., Tharp, J. A., Peckham, A. D., & McMaster, K. J. (2016). Emotion in bipolar I disorder: Implications for functional and symptom outcomes. *Journal of abnormal psychology, 125*(1), 40–52. <https://doi.org/10.1037/abn0000116>
33. Jylhä, P., Mantere, O., Melartin, T., Suominen, K., Vuorilehto, M., Arvilommi, P., Leppämäki, S., Valtonen, H., Rytsälä, H., & Isometsä, E. (2010). Differences in neuroticism and extraversion between patients with bipolar I or II and general population subjects or major depressive disorder patients. *Journal of affective disorders, 125*(1-3), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.01.068>
34. Kabir, Z. D., Martínez-Rivera, A., & Rajadhyaksha, A. M. (2017). From Gene to Behavior: L-Type Calcium Channel Mechanisms Underlying Neuropsychiatric Symptoms. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 14*(3), 588–613. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0532-0>
35. Kalmar, J. H., Wang, F., Chepenik, L. G., Womer, F. Y., Jones, M. M., Pittman, B., Shah, M. P., Martin, A., Constable, R. T., & Blumberg, H. P. (2009). Relation between amygdala structure and function in adolescents with bipolar disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 48*(6), 636–642. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e31819f6fbc>
36. Kantojärvi, K., Liuhanen, J., Saarenpää-Heikkilä, O., Satomaa, A. L., Kylliäinen, A., Pölkki, P., Jaatela, J., Toivola, A., Milani, L., Himanen, S. L., Porkka-Heiskanen, T., Paavonen, J., & Paunio, T. (2017). Variants in calcium voltage-gated channel subunit Alpha1 C-gene (*CACNA1C*) are associated with sleep latency in infants. *PloS one, 12*(8), e0180652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180652>
37. Kesebir, S., Vahip, S., Akdeniz, F., Yüncü, Z., Alkan, M., & Akiskal, H. (2005). Affective temperaments as measured by TEMPS-A in patients with bipolar I disorder and their first-degree relatives: a controlled study. *Journal of affective disorders, 85*(1-2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2003.10.013>
38. Lara, D. R., Bisol, L. W., Brunstein, M. G., Reppold, C. T., de Carvalho, H. W., & Ottoni, G. L. (2012). The Affective and Emotional Composite Temperament (AFECT) model and scale: a system-based integrative approach. *Journal of affective disorders, 140*(1), 14–37. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.08.036>
39. Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I., Jr (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research, 19*(19), 5444. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>

40. Lancaster, T. M., Foley, S., Tansey, K. E., Linden, D. E., & Caseras, X. (2016). *CACNA1C* risk variant is associated with increased amygdala volume. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 266(3), 269–275. <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0609-x>
41. Lo, M. T., Hinds, D. A., Tung, J. Y., Franz, C., Fan, C. C., Wang, Y., Smeland, O. B., Schork, A., Holland, D., Kauppi, K., Sanyal, N., Escott-Price, V., Smith, D. J., O'Donovan, M., Stefansson, H., Bjornsdottir, G., Thorgeirsson, T. E., Stefansson, K., McEvoy, L. K., Dale, A. M., ... Chen, C. H. (2017). Genome-wide analyses for personality traits identify six genomic loci and show correlations with psychiatric disorders. *Nature genetics*, 49(1), 152–156. <https://doi.org/10.1038/ng.3736>
42. Lozano, B. E., & Johnson, S. L. (2001). Can personality traits predict increases in manic and depressive symptoms?. *Journal of affective disorders*, 63(1-3), 103–111. [https://doi.org/10.1016/s0165-0327\(00\)00191-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0327(00)00191-9)
43. Mendlowicz, M. V., Jean-Louis, G., Kelsoe, J. R., & Akiskal, H. S. (2005). A comparison of recovered bipolar patients, healthy relatives of bipolar probands, and normal controls using the short TEMPS-A. *Journal of affective disorders*, 85(1-2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2004.01.012>
44. Mick, E., McGough, J., Deutsch, C. K., Frazier, J. A., Kennedy, D., & Goldberg, R. J. (2014). Genome-wide association study of proneness to anger. *PLoS one*, 9(1), e87257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087257>
45. Mullins, N., Forstner, A. J., O'Connell, K. S., Coombes, B., Coleman, J., Qiao, Z., Als, T. D., Bigdeli, T. B., Børte, S., Bryois, J., Charney, A. W., Drange, O. K., Gandal, M. J., Hagenaars, S. P., Ikeda, M., Kamitaki, N., Kim, M., Krebs, K., Panagiotaropoulou, G., Schilder, B. M., ... Andreassen, O. A. (2021). Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology. *Nature genetics*, 10.1038/s41588-021-00857-4. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00857-4>
46. Nelson, R. J., & Trainor, B. C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(7), 536–546. <https://doi.org/10.1038/nrn2174>
47. Nery, F. G., Hatch, J. P., Glahn, D. C., Nicoletti, M. A., Monkul, E. S., Najt, P., Fonseca, M., Bowden, C. L., Cloninger, C. R., & Soares, J. C. (2008). Temperament and character traits in patients with bipolar disorder and associations with comorbid alcoholism or anxiety disorders. *Journal of psychiatric research*, 42(7), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2007.06.004>

48. Nowakowska, C., Strong, C. M., Santosa, C. M., Wang, P. W., & Ketter, T. A. (2005). Temperamental commonalities and differences in euthymic mood disorder patients, creative controls, and healthy controls. *Journal of affective disorders*, 85(1-2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2003.11.012>
49. Ober, C., Loisel, D. A., & Gilad, Y. (2008). Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nature reviews. Genetics*, 9(12), 911–922. <https://doi.org/10.1038/nrg2415>
50. Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2000). Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *The Journal of cell biology*, 148(5), 857–862. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.5.857>
51. Preacher, K. J., & Hayes, A. F. (2008). Asymptotic and resampling strategies for assessing and comparing indirect effects in multiple mediator models. *Behavior research methods*, 40(3), 879–891. <https://doi.org/10.3758/brm.40.3.879>
52. Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature genetics*, 43(10), 977–983. <https://doi.org/10.1038/ng.943>
53. Quilty, L. C., Sellbom, M., Tackett, J. L., & Bagby, R. M. (2009). Personality trait predictors of bipolar disorder symptoms. *Psychiatry research*, 169(2), 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.07.004>
54. Roussos, P., Giakoumaki, S. G., Georgakopoulos, A., Robakis, N. K., & Bitsios, P. (2011). The *CACNA1C* and *ANK3* risk alleles impact on affective personality traits and startle reactivity but not on cognition or gating in healthy males. *Bipolar disorders*, 13(3), 250–259. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2011.00924.x>
55. Smedler, E., Abé, C., Pålsson, E., Ingvar, M., & Landén, M. (2020). *CACNA1C* polymorphism and brain cortical structure in bipolar disorder. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, 45(1), 182–187. <https://doi.org/10.1503/jpn.190029>
56. Soeiro-de-Souza, M. G., Bio, D. S., Dias, V. V., Vieta, E., Machado-Vieira, R., & Moreno, R. A. (2013). The *CACNA1C* risk allele selectively impacts on executive function in bipolar type I disorder. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 128(5), 362–369. <https://doi.org/10.1111/acps.12073>
57. Starnawska, A., Demontis, D., Pen, A., Hedemand, A., Nielsen, A. L., Staunstrup, N. H., Grove, J., Als, T. D., Jarram, A., O'Brien, N. L., Mors, O., McQuillin, A., Børglum, A. D., & Nyegaard, M. (2016). *CACNA1C* hypermethylation is associated with bipolar disorder. *Translational psychiatry*, 6(6), e831. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.99>

58. Strakowski, S. M., Adler, C. M., Almeida, J., Altshuler, L. L., Blumberg, H. P., Chang, K. D., DelBello, M. P., Frangou, S., McIntosh, A., Phillips, M. L., Sussman, J. E., & Townsend, J. D. (2012). The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar disorders*, 14(4), 313–325. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2012.01022.x>
59. Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., & Tuluc, P. (2014). L-type Ca^{2+} channels in heart and brain. *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling*, 3(2), 15–38. <https://doi.org/10.1002/wmts.102>
60. Strohmaier, J., Amelang, M., Hothorn, L. A., Witt, S. H., Nieratschker, V., Gerhard, D., Meier, S., Wüst, S., Frank, J., Loerbroks, A., Rietschel, M., Stürmer, T., & Schulze, T. G. (2013). The psychiatric vulnerability gene *CACNA1C* and its sex-specific relationship with personality traits, resilience factors and depressive symptoms in the general population. *Molecular psychiatry*, 18(5), 607–613. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.53>
61. Takeuchi, H., Tomita, H., Taki, Y., Kikuchi, Y., Ono, C., Yu, Z., Nouchi, R., Yokoyama, R., Kotozaki, Y., Nakagawa, S., Sekiguchi, A., Iizuka, K., Hanawa, S., Araki, T., Miyauchi, C. M., Sakaki, K., Nozawa, T., Ikeda, S., Yokota, S., Magistro, D., ... Kawashima, R. (2019). A Common *CACNA1C* Gene Risk Variant has Sex-Dependent Effects on Behavioral Traits and Brain Functional Activity. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 29(8), 3211–3219. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy189>
62. Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1998). Ca^{2+} influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20(4), 709–726. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81010-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81010-7)
63. Tesli, M., Skatun, K. C., Ousdal, O. T., Brown, A. A., Thoresen, C., Agartz, I., Melle, I., Djurovic, S., Jensen, J., & Andreassen, O. A. (2013). *CACNA1C* risk variant and amygdala activity in bipolar disorder, schizophrenia and healthy controls. *PloS one*, 8(2), e56970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056970>
64. Uemura, T., Green, M., & Warsh, J. J. (2016). *CACNA1C* SNP rs1006737 associates with bipolar I disorder independent of the *Bcl-2* SNP rs956572 variant and its associated effect on intracellular calcium homeostasis. *The world journal of biological psychiatry: the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 17(7), 525–534. <https://doi.org/10.3109/15622975.2015.1019360>

65. Vernon, P.A., Martin, R.A., Schermer, J.A., Mackie, A. (2008). A behavioral genetic investigation of humor styles and their correlations with the Big-5 personality dimensions. *Personality and Individual Differences*, 44 (5), 1116-1125. <https://doi.org/10.1016/j.paid.2007.11.003>
66. Wang, F., McIntosh, A. M., He, Y., Gelernter, J., & Blumberg, H. P. (2011). The association of genetic variation in *CACNA1C* with structure and function of a frontotemporal system. *Bipolar disorders*, 13(7-8), 696–700. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2011.00963.x>
67. Wessa, M., Linke, J., Witt, S. H., Nieratschker, V., Esslinger, C., Kirsch, P., Grimm, O., Hennerici, M. G., Gass, A., King, A. V., & Rietschel, M. (2010). The *CACNA1C* risk variant for bipolar disorder influences limbic activity. *Molecular psychiatry*, 15(12), 1126–1127. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.103>
68. Witt, S. H., Kleindienst, N., Frank, J., Treutlein, J., Mühleisen, T., Degenhardt, F., Jungkunz, M., Krumm, B., Cichon, S., Tadic, A., Dahmen, N., Schwarze, C. E., Schott, B., Dietl, L., Nöthen, M. M., Mobaesch, A., Lieb, K., Roepke, S., Rujescu, D., Rietschel, M., ... Bohus, M. (2014). Analysis of genome-wide significant bipolar disorder genes in borderline personality disorder. *Psychiatric genetics*, 24(6), 262–265. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000060>

Table 1. Characteristics of participants according to the Bipolar Disorder diagnosis

Characteristic	Bipolar disorder		P-value
	No	Yes	
Sex (% female)	452 (58.0)	56 (56.6)	0.866
Socioeconomic class			0.595
Low	126 (16.2)	20 (20.2)	
Intermediate	376 (48.3)	45 (45.5)	
High	277 (35.6)	34 (34.3)	
Age (years)	26.03±5.30	25.37±5.22	0.244
Tobacco use (% yes)	140 (18.0)	45 (45.9)	<0.001
Drug abuse (% yes)	53 (6.8)	10 (10.2)	0.307
Anxiety disorders (% yes)	168 (21.6)	69 (69.7)	<0.001
Temperament traits (scores)			
Volition	44.02±9.28	38.62±11.00	<0.001
Anger	29.64±11.23	40.19±10.24	<0.001
Fear	14.59±4.90	14.13±5.41	0.382
Caution	19.94±5.58	15.12±5.81	<0.001
Sensitivity	29.89±10.51	35.45±10.80	<0.001
Coping	45.84±8.97	41.62±11.03	<0.001
Control	44.70±9.57	40.53±9.63	<0.001
Total	779	99	

Values were obtained by the χ^2 -test or t-test, as appropriate and presented as n (%) or mean ± standard deviation. P-value <0.05 was considered statistically significant.

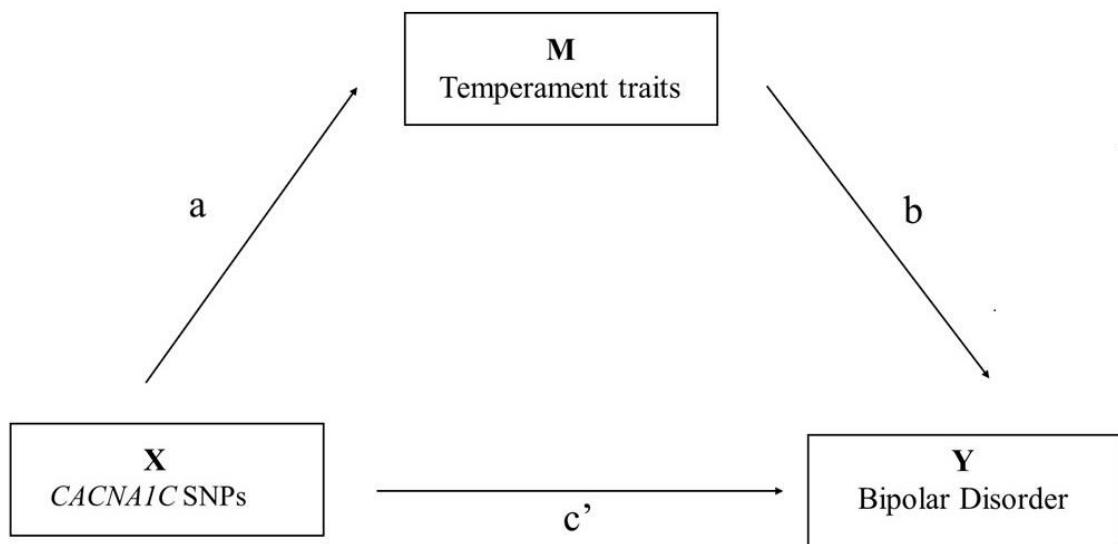


Figure 1. Path diagram for a mediation model. *CACNA1C* SNPs, independent variable; Temperament traits, mediating variable; Bipolar disorder, dependent variable. The mediation model decomposes the total effect of X on Y (c) into two parts: the indirect effect of X on Y, reflected by ab , and the direct effect of X on Y with the effect of the mediator removed, reflected by c' .

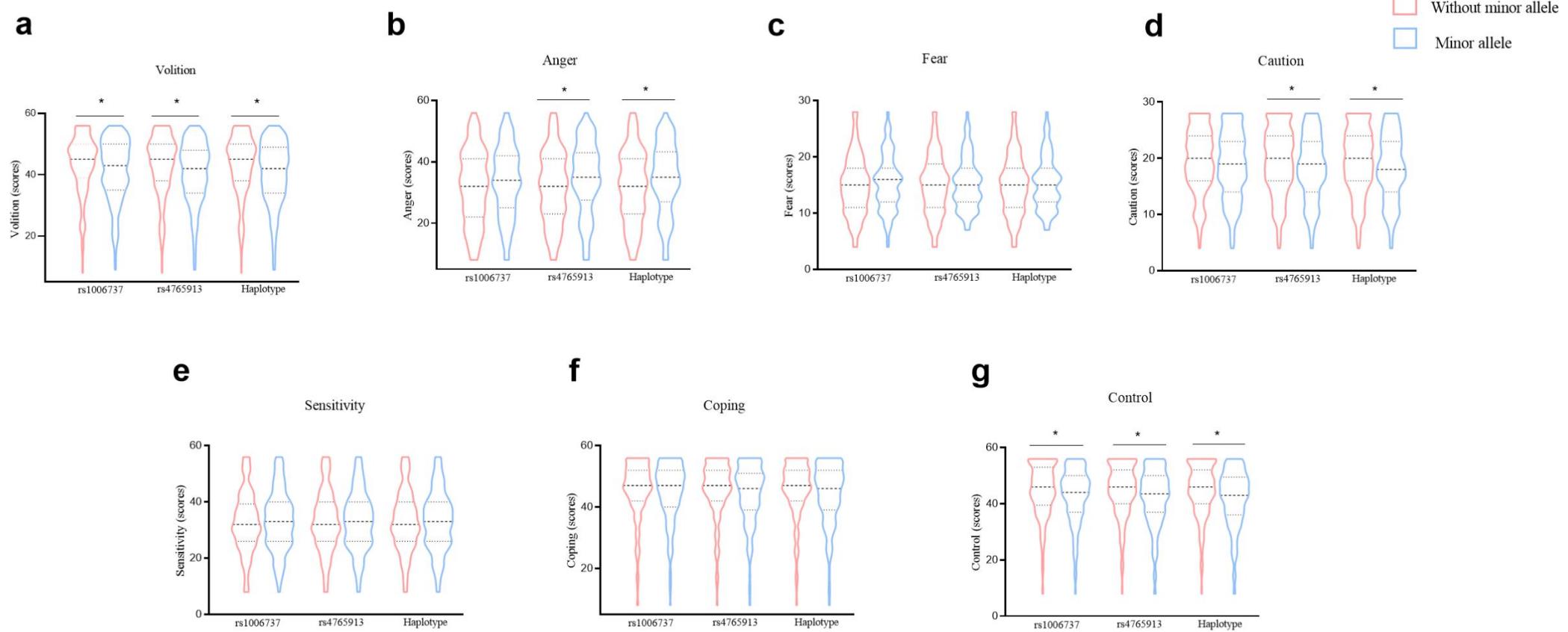


Figure 2. Temperament traits according to *CACNA1C* genotypes/haplotype in women. *P-values were obtained by linear regression adjusted by age. The number of individuals by genotype are as follows: rs1006737 (GG: 239; GA/AA: 269); b) rs4765913 (TT: 328; TA/AA: 180); c) Haplotype (0 AA copies: 343; 1or 2 AA copies: 165).

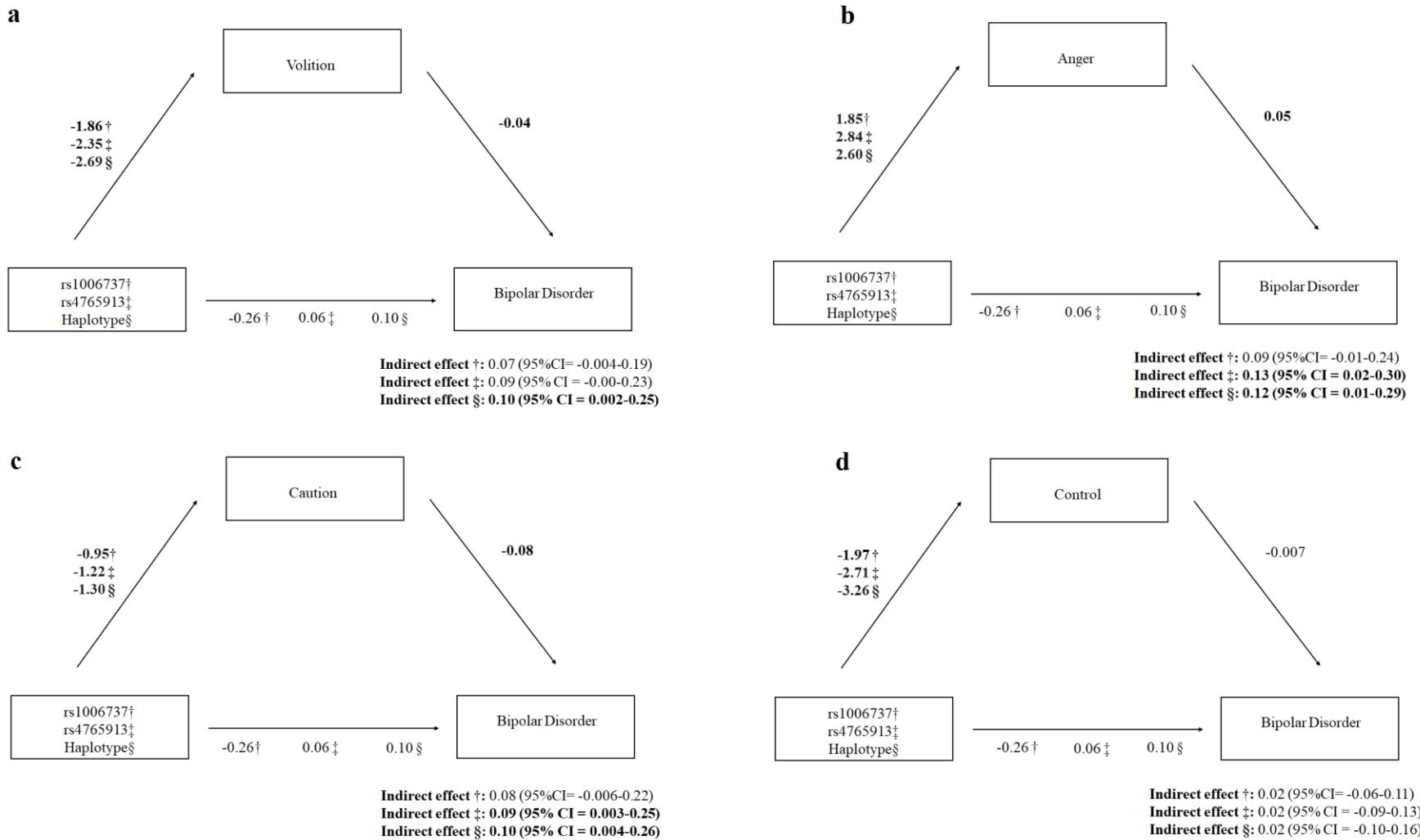


Figure 3. Temperament traits mediate the relationship between *CACNA1C* SNPs and the BD. (A) Depicts mediation model according to volition scores. (B) Depicts mediation model according to anger scores. (C) Depicts mediation model according to caution scores. (D) Depicts mediation model according to control scores. Temperament traits are represented separately but were included within the same mediation model. Values in bold are statistically significant. The analyses were adjusted for age. † Values obtained for rs1006737 SNP; ‡ Values obtained for rs4765913 SNP; § Values obtained for haplotype.

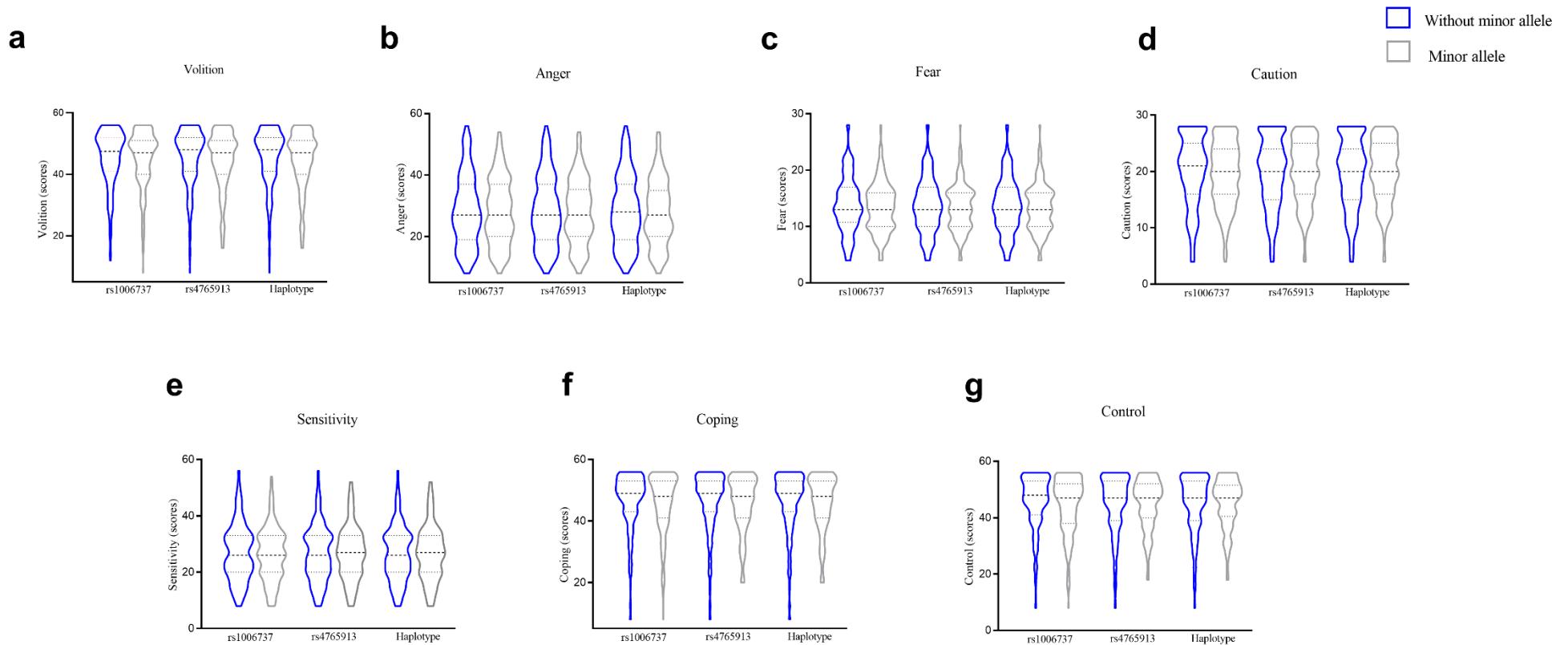


Figure S1. Temperament traits according to *CACNA1C* genotypes/haplotype in men. *P-values were obtained by linear regression adjusted by age. The number of individuals by genotype are as follows: rs1006737 (GG: 196; GA/AA: 174); b) rs4765913 (TT: 260; TA/AA: 110); c) Haplotype (0 AA copies: 263; 1or 2 AA copies: 107).

ARTIGO 3

BDNF levels according to variations in the CACNA1C gene: sex-based disparity

Artigo formatado para submissão na revista “*Journal of Psychiatric Research*”

BDNF levels according to variations in the CACNA1C gene: sex-based disparity

Clarissa Ribeiro Bastos^a, Janaina Xavier^a, Laísa Camerini^a, Samantha Seibt Dewes^a, Fernanda Pedrotti Moreira^a, Carolina David Wiener^a, Karen Jansen^a, Manuella Pinto Kaster^b, Luciano Dias de Mattos Souza^a, Ricardo Azevedo da Silva^a, Jean Pierre Osse^c, Luis Valmor Portela^d, Diogo Rizzato Lara^e, Luciana Tovo-Rodrigues^f, Gabriele Ghisleni^{a*}.

^aLaboratory of Clinical Neuroscience, Post-graduation Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; ^b Department of Biochemistry at the Federal University of Santa Catarina, Brazil; ^c Institute of Bioscience, Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brazil; ^d Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul; ^e Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ^f Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Funding information: The study was supported by PRONEX-FAPERGS (08/2009 – Pronex, grant number 10/0055-0).

*Corresponding Author: Gabriele Ghisleni

E-mail: ghisleni.g@gmail.com

Laboratory of Clinical Neuroscience

Post-Graduation Program of Health and Behavior

Center of Health Science

Catholic University of Pelotas

373, 324C Gonçalves Chaves Street,

CEP 96015-560

Pelotas/RS/Brazil

Fone: +55 53 2128-8031

Fax: +55 53 2128 8229

Abstract

Background: The *CACNA1C* gene encodes the pore-forming alpha-1c subunit of L-type voltage-gated calcium channels. The calcium influx through these channels regulates the transcription of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Polymorphisms in this gene have been consistently associated with psychiatric disorders, and alterations in BDNF levels are a possible biological mechanism to explain such associations. Here, we sought to investigate the effect of the *CACNA1C* rs1006737 and rs4765913 polymorphisms and their haplotypes on serum BDNF concentration. We further aim to investigate the regulatory function of these SNPs and the ones linked to them. **Methods:** The study enrolled 641 young adults (362 women and 279 men) in a cross-sectional population-based survey. Linear regression was used to test the effects of polymorphisms and haplotypes on BDNF levels adjusted for potential confounders. Moreover, regulatory putative functional roles were assessed using *in silico* approach. **Results:** BDNF levels were not associated with *CACNA1C* polymorphisms/haplotype in the total sample. When the sample was stratified by sex, the A-allele of rs4765913 was associated with lower BDNF levels in women ($p=0.010$). The AA (rs1006737-rs4765913) haplotype was associated with BDNF levels in opposite directions regarding sex, with lower levels of BDNF in women ($p=0.040$), while with higher levels in men ($p=0.027$). These findings were supported by the presence of regulatory marks only on the male fetal brain. **Conclusions:** Our results suggest that the BDNF levels regulation may be a potential mechanism underpinning the association between *CACNA1C* and psychiatric disorders, with a differential role in women and men.

Keywords: Calcium channels L-type, Brain-derived neurotrophic factor, Polymorphisms;

1. Introduction

The *CACNA1C* gene encodes the pore-forming alpha-1c subunit of the Ca_v1.2 voltage-gated L-type calcium channels (LTCCs), through which calcium influx occurs in the cell and activates a gene expression complex program (Greer & Greenberg, 2008). In the central nervous system (CNS), the maintenance of Ca²⁺ levels is essential for homeostasis, controlling many neural functions, such as the generation of brain rhythms, information processing, and changes in synaptic plasticity that support learning and memory (Berridge, 1998; Berridge, 2012). Disruption of these functions may cause changes in signaling pathways and play an important role in psychiatric disease.

Indeed, *CACNA1C* gene is one of the most robust discoveries of genetic studies in mental health (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013) and its variations have been associated with depression (Green et al., 2010), bipolar disorder (Ferreira et al., 2008; Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011; Khalid et al., 2018), schizophrenia (Green et al., 2010), and autistic spectrum disorders (Lu et al., 2012; Li et al., 2015). Moreover, neuroimaging studies have demonstrated effects of *CACNA1C* variants on altering various brain phenotypes, including circuits involved in emotional processing and executive cognition (Bigos et al., 2010), attention (Thimm et al., 2011), and memory (Erk et al., 2010).

The biological mechanism involved in this association remains unclear. Given that the Ca_v1.2 is an important factor for stimulating and transcribing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Tao et al., 1998; Lee et al., 2016), it has been suggested as a possible pathway to link genetic risk to the disease (Smedler et al., 2021; Sykes et al., 2019). The BDNF is a neurotrophin that promotes the neural survival, being vital for cognitive performance in the short-term and for adaptations in brain morphology, such as plasticity, in the long-term (Piepmeyer & Etnier, 2015). The downregulation of *CACNA1C* gene in

animal models is correlated with lower BDNF mRNA levels in the prefrontal cortex (Sykes et al., 2019) and lower protein levels in the hippocampus (Lee et al., 2016). Moreover, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the intron 3 of *CACNA1C* gene can affect the serum levels of BDNF (Smedler et al., 2021) and its expression in the prefrontal cortex in humans (Sykes et al., 2019).

Even though the BDNF levels modulation is a plausible hypothesis to explain the association of *CACNA1C* with psychiatric disorders, the effect of *CACNA1C* SNPs in the serum BDNF levels was reported in few studies, in clinical samples. The exploration of this association in a populational-based study is important to clarify the functional role of *CACNA1C*. To the best of our knowledge, no study has tested that to date. Thus, the current study sought investigate the association of the *CACNA1C* rs1006737 (G/A) and rs4765913 (A/T) polymorphisms and their haplotypes with serum BDNF levels in a population-based study of young adults from the city of Pelotas, Brazil, and to investigate the regulatory function of these SNPs, and the ones linked to them.

2. Methods

2.1 Study design and participants

Data was obtained from a cross-sectional study nested in a population-based study conducted in the urban area of the city of Pelotas, southern Brazil, between June 2011 and May 2013. The present study evaluated 641 individuals aged between 18 and 35 years old. Sample selection was performed by multistage clusters, considering the census division of the city in 2010, which included a population of 97,000 young adults, and the census of 495 sectors. The Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) provided both sources of data. To guarantee a wide and representative sample, 83 census-based sectors were systematically and randomly selected with a skip of six sectors. The home selection was

performed according to a systematic sampling procedure: the first selected house was at the corner pre-established by the IBGE as the beginning of the sector, with the next four houses skipped; thus, every fifth residence was selected. After initial contact and presentation of the study, residents of the specified age range were invited to participate and signed the informed consent form. Individuals unable to understand and/or respond to the instruments due to physical or cognitive issues were excluded from the study. Home visits were performed in the morning, where the participants answered questionnaires with sociodemographic, lifestyle, and comorbid information. On the same day of questionnaire application, the investigators measured weight and height of participants in order to calculate the body mass index (BMI). The skin color of the participants was self-attributed and classified as white or non-white (including Black, Asians, and Native-American). This study was approved by the Ethics Committee of the Catholic University of Pelotas, Brazil (Protocol number 2010/15), and was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the Declaration of Helsinki. All participants signed the written informed consent.

2.2. Sample collection

Ten milliliters of blood were obtained in the morning (between 8:00 and 11:00 a.m.) by venipuncture after the clinical interview. Blood samples from anticoagulant-free tubes were immediately centrifuged at 3500g for 15 min for serum isolation. Serum was kept frozen at -80°C until biochemical analysis was performed. Peripheral blood leukocytes from samples collected in EDTA tubes were used for total DNA extraction using a standard salting-out procedure (Lahiri & Nurnberger, 1991).

2.3. Molecular analysis

The selection of the *CACNA1C* rs1006737 (G/A) and rs4765913 (A/T) SNPs was based on: (1) Previous results of GWAS relating these SNPs with psychiatric disorders (Ferreira et al., 2008; Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011); (2) A possible regulatory effect on *CACNA1C*, as showed by quantitative trait expression loci (eQTL) (Eckart et al., 2016); (3) Allelic frequencies of the variants; (4) and technical viability. The rs1006737 (G/A) SNP, was genotyped using TaqMan C_2584015_10 assay (AAGTTCCATTCCATCTCAGCCCGAA [A/G] TGTTTCAGAGCCGGAGACCTCACCA), and the rs4765913 (A/T) using TaqMan C_2582119_20 assay (CACAGGGTTCTTCATTCTGTGGGC [A/T] CCAGTTCTCTGGCATGAGAGATGC) (Life Technologies, Foster City, USA). The reactions were conducted on a 96-well plate with a total 5- μ L reaction volume using 2 ng of genomic DNA, 1× TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), and 1× Custom TaqMan Genotyping Assay. The plates were then positioned in a real time PCR thermal cycler (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems), then heated for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Fluorescence data files from each plate were analyzed using an automated allele-calling software (SDS 2.0.1; Applied Biosystems).

2.4. Serum BDNF levels measurement

Serum levels of BDNF was measured using commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit for BDNF (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). The intra-assay coefficient of variation (CV) was less than 5% and the inter-assay CV was less than 10%. All samples and standards were measured in duplicate. Serum BDNF level was expressed in ng/mL.

2.5. Statistical analysis

The Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the Chi-squared (χ^2) test. Haplovview 4.2 was applied to estimate and visualize the linkage disequilibrium (LD) (expressed as D') between rs1006737 and rs4765913 (www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haplovview/haplovview, RRID: SCR_003076). The haplotypes were estimated using the UNPHASED 3.1.7 (www.ub.edu/geneticaclasses/master/Unphased_manual.pdf, RRID:SCR_009056). *CACNA1C* rs1006737 and rs4765913 SNPs were grouped by the presence of the minor frequency allele (A), and haplotype analysis was performed based on the presence or absence of the AA haplotype. Sociodemographic and clinical characteristics were described or compared using the χ^2 test or the Student's t-test, as appropriate. Serum BDNF levels showed a skewed distribution and were logarithmically transformed before unpaired t test and represented as mean and standard deviation (SD).

Linear regression was performed to verify the association of BDNF levels with SNPs/haplotype adjusting for sex, age, skin color, and smoking status. The values were expressed as β value and 95% confidence interval (CI). Values of $p \leq .05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, v22.0, software, and graphs were analyzed in the GraphPad Prism.

2.6. *In silico* functionality analysis

In order to provide information about the flanking sequences of the SNPs included in this study, we evaluated a 116 Kb region within the intron 3 (2,324,000 to 2,440,000), which includes the rs1006737 and rs4765913 SNPs. For this analysis, we evaluated European individuals from the 1000 Genomes Project phase 3 ($n = 503$)

(www.1000genomes.org, RRID: SCR_006828). The variant call format files located on the 1000 Genomes server were extract using the Ferret tool (<http://limousophie35.github.io/Ferret/>) (Limou, Taverner & Winkler, 2016). The LD D' was calculated based on SNPs with MAF> 0.1, and the HW p-value cutoff was 0.001. The plots were generated by Haploview 4.2, and the haplotype blocks were partitioned using the confidence interval (CI) method by Gabriel and collaborators (2002).

The NHGRI-EBI GWAS Catalog was accessed to check possible associations between the SNPs identified in the 116 Kb region of intron 3, and psychopathologies (www.ebi.ac.uk/gwas/, RRID: SCR_012745). After that, we explored the putative regulatory function of SNPs located in the main blocks associated with these disorders using HaploReg v4.1 (www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php, RRID: SCR_006796). The HaploReg is a tool for exploring annotations of the noncoding genome in the variants. Information on the chromatin state and protein binding annotation from the Roadmap Epigenomics and The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) projects are functional evidence integrated in this dataset (Ward & Kellis, 2012). We evaluated 10 different brain regions (hippocampus middle, substantia nigra, anterior caudate, cingulate gyrus, inferior temporal lobe, angular gyrus, dorsolateral prefrontal cortex, germinal matrix, and male and female fetal brain), and astrocytes primary cells.

3. Results

3.1. Sample characteristics

A total of 641 young adults were included in this study. Amongst participants, 56.5% were female, and the average age was 26.06±5.08 years old. The majority of individuals were whites (77.5%) and belonged to the middle economic class (49.0%). Regarding clinical characteristics, 22.1% were tobacco users and 26.2% presented mood

disorder. The average of BDNF peripheral serum levels was 7.47 ± 2.19 in the studied population, and the average BMI (kg/m^2) was 26.32 ± 5.56 (Table 1).

The minor allele frequencies were 0.30 (A-allele) for rs1006737 and 0.16 (A-allele) for rs4765913. The SNPs did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium for rs1006737 [$\chi^2 = 0.030$ ($N = 641$); $p = 0.860$], and rs4765913 [$\chi^2 = 0.091$ ($N = 641$); $p = 0.763$]. The SNPs evaluated were in strong LD, $D' = 0.88$, and the frequency of haplotypes in our sample was 68.3% GT, 14.8% AA, 15.6% AT, and 1.3% GA. Distribution of rs1006737 genotypes differed according to skin color with a higher proportion of AA genotype in non-white individuals [$\chi^2 = 4.90$ ($N = 641$); $p = 0.027$]. However, skin color did not differ in relation to rs4765913 and haplotype risk. Moreover, other sociodemographic and biological characteristics such as sex, BMI, age, and mood disorders did not differ according to genotypes (data not shown).

3.2. *CACNA1C* vs BDNF levels association

Regarding BDNF levels, we did not observe difference according to SNPs/haplotype in the total sample adjusted for sex, age, skin color, and smoke (Table 2). However, after sex stratification and adjustment for confounders, this analysis showed that women A-allele carriers of rs4765913 SNP had lower BDNF levels compared to TT genotype [β (95% CI) = -0.045 (-0.078 – -0.011); $p = 0.010$]. For men, the association direction was the opposite, however, not statistically significant [β (95% CI) = 0.034 (-0.003 – 0.070); $p = 0.074$]. For the rs1006737 SNP, the effect was neither significant in women [β (95% CI) = 0.001 (-0.031 – 0.032); $p = 0.982$] nor in men [β (95% CI) = 0.032 (-0.001 – 0.065); $p = 0.061$]. When we tested the haplotypes, the presence of AA (rs1006737 - rs4765913) haplotype was associated with lower levels of BDNF in women [β (95% CI) = -0.036 (-0.071 – -0.002); $p = 0.040$] while with higher in men [β (95% CI) = 0.042 (0.005 – 0.079); $p = 0.027$] (Figure 1).

3.3. *In silico* functionality analysis

Linkage analysis of the 116 Kb region identified ten haplotype blocks that ranged in size from 0 kb to 29 Kb, and that included 92 SNPs (Supplementary figure 1). The rs1006737 is placed in block 3, and the rs4765913 is placed in block 8, and despite the SNPs studied are located away and a different block, they present strong LD ($D'=0.85$).

The GWAS Catalog data confirm the importance of this region, since twelve of the 92 SNPs have already been reported as associated with psychiatric disorders. Interestingly, rs1006737 and rs4765913 are placed in regions that contain the largest number of SNPs associated with psychopathologies. Block 3 comprises 41.67% of disease-associated SNPs, and the 7, 8, and 9 blocks comprise a total of 41.68% (Supplementary table 1). The regulatory function of SNPs located in these four main haplotype blocks is described below.

3.4. Regulatory function of SNPs

We explored the potential regulatory function of rs4765913 and rs1006737 SNPs using HaploReg information. The rs4765913 site is placed in a region with enhancer marks in 9 tissues, including in the brain (astrocytes primary cells). Moreover, promoter marks and DNase I hypersensitive sites in other tissues were observed (Table 3). Considering the regulatory regions specific in the brain, this SNP is placed in a region of weak enhancers of chromatin only in male fetal brain tissues (based on the Roadmap Epigenomics Consortium 25 chromatin state model) (Supplementary table 2). At the rs1006737 site, an elusive functional regulatory function in the brain was observed. However, DNase I hypersensitive sites were observed in other tissues (Table 3). In addition, individual marks of the histone H3 lysine 4 monomethylation (H3K4me1) for enhancers in the fetal brain male was related (Supplementary table 2).

We also explored other sixteen SNPs located in the blocks 3, 7, 8, and 9. Out of them, 18.75% were placed in regions containing histone marks indicative of promoters, 81.25% in regions containing histone marks characteristic for enhancers, and 75% were found to be located DNase I hypersensitive sites. A total of 15 SNPs were predicted to alter motifs, and two SNPs - rs4765914 and rs10774037 - were found to be located in binding sites to p300 protein (Table 3). Considering the regulatory regions specific in the brain, ten SNPs with different marks according to sex were identified. Thus, in addition to rs1006737 and rs4765913 SNPs (described above), the SNPs rs769087, rs2007044, rs2159100, rs11062170, rs882195, rs882194 (block 3), rs12311439 (block 7), and rs4765914 (block 9) presented any difference regarding epigenetic marks between the female and male fetal brain (Supplementary table 2). Among them, rs2159100, rs12311439 (Block 3), and rs4765914 (Block 9) are noteworthy placed in enhancers in several brain areas (Supplementary table 2), suggesting they may be appropriate targets for future research. Besides that, the rs4765914 SNP is situated within the binding sites of P300 protein, a histone acetyltransferase that regulates transcription via chromatin remodeling, and it mediates cAMP-gene regulation by binding specifically to phosphorylated CREB protein.

4. Discussion

The growing number of robust and replicable genetic associations with the *CACNA1C* gene in psychiatric disorders has increased the need of understanding the biological foundations underlying genetic signals. Here, we suggest that one of the mechanisms that link genetic risk with these disorders is the BDNF levels alteration. Our main finding was that the AA haplotype (rs1006737 - rs4765913) affects the BDNF levels with different effects regarding sex, leading to lower levels in women and higher in men. As the variants studied are non-coding sequences, their effects can be potentially attributed to gene

expression regulation. *In silico* analyses also identified other SNPs with marks that indicate potential effects in the gene expression, including methylation and acetylation histone marks, DNase I hypersensitive sites, alterations of motifs, and protein-binding domain in a region of 116kb in intron 3 comprising the SNPs investigated. Moreover, the data obtained from GWAS Catalog revealed that the two SNPs evaluated in this study mark important regions of intron 3 associated with psychopathologies.

In fact, the SNPs located in this region of intron 3 were shown to have a regulatory effect on 3-dimensional genome architecture and to influence *CACNA1C* expression, through interactions with its transcription start site (Roussos et al., 2014). The expression studies in the cell lines and postmortem tissue suggest that genetic variants in this region may downregulate the *CACNA1C* expression, although the direction of effect has varied between studies and tissue types (Bigos et al., 2010; Eckart et al., 2016; Gershon et al., 2014; Roussos et al., 2014; Yoshimizu et al., 2015). Moreover, the protein binding experiments suggest that more than one SNP may be involved in regulating *CACNA1C* expression. A complex regulatory mechanism thus would involve a combinatorial effect of genetic variants in LD on gene expression (Eckart et al., 2016).

Recent findings showed that reduced expression of *CACNA1C* gene can lead to distinct biological alterations, with a verified effect on BDNF expression (Lee et al., 2016; Sykes et al., 2019). In this context, it is known that the Ca²⁺ influx through Ca_v1.2 leads to membrane depolarization with phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB), which can bind to a critical Ca²⁺ response element (CRE) within the BDNF gene activating its transcription (Tao et al., 1998). Indeed, forebrain-Ca_v1.2 cKO mice have lower hippocampal BDNF levels and exhibit enhanced cell death of young hippocampal neurons (Lee et al., 2016). Moreover, *CACNA1C* hemizygosity in rats is associated with decreased Bdnf expression in the pre-frontal cortex (Sykes et al., 2019), and the impaired

hippocampal synaptic plasticity (Tigaret et al., 2021). Interestingly, the BDNF mimetic drug use can rescue behavioral and synaptic plasticity deficits in *Cacna1c*^{+/−} rats (Tigaret et al., 2021).

Clinical evidence also shows an association between *CACNA1C* SNPs and BDNF. Using the brain samples deposited on the Brain eQTL Almanac (BRAINEAC), Sykes et al. (2019) showed that rs1006737 and rs2007044 SNPs modify the BDNF expression in the frontal cortex, and the minor frequent alleles were associated with decreased BDNF expression. Moreover, associations between *CACNA1C* SNPs with serum levels of this neurotrophin have already been reported, where A-allele of rs1006737 corresponded to 18% lower BDNF levels (Smedler et al., 2021). These compiled data suggest that *CACNA1C* SNPs can affect BDNF levels by altering the Ca_v1.2 expression, and then leading to changes in Ca²⁺ signaling.

To our knowledge, this is the first study to show a differential *CACNA1C* effect on BDNF levels according to sex, with opposite effects. These findings were supported by the regulatory function showing that the SNPs studied have different marks on the male and female fetal brain. Although our findings partially contrast with the association findings reported above (Smedler et al., 2021; Sykes et al., 2019), they are in accordance with previous findings that demonstrated that sex-specific genetic architecture influences human phenotypes, including disease traits (Ober, Loisel & Gilad, 2008). Such a differential effect has been largely shown for *CACNA1C*, both in animal- and human-based studies, with differences between sex in diagnosis (Dao et al., 2010), course, and recovery of psychiatric disorders (Heilbronner et al., 2015; Strohmaier et al., 2013). Although the results are mixed, SNPs located in intron 3 of *CACNA1C* gene, including rs1006737 and rs4765913, appear to lead to a more harmful phenotype in women (Takeuchi et al., 2019; Witt et al., 2014).

Moreover, the opposite effect of *CACNA1C* variants in men and women were previously evidenced by other studies (Heilbronner et al., 2015; Strohmaier et al., 2013). Heilbronner et al. (2015) using a proxy for rs1006737 showed that in schizophrenia-spectrum affected males, the minor allele had a beneficial effect increasing the global assessment of functioning scores, while in women the minor allele was associated with impaired recovery. In contrast, Strohmaier et al. (2013) showed that the A-allele of rs1006737 SNP was associated with higher emotional lability and lower resilience in men with opposite effect in women. The mechanism responsible for this difference between sex is not understood. However, it can be the result of the sexual dimorphism that exists between men and women, which is evident in many brain regions (Cahill, 2006), and/or also by sexual hormones, like the steroid hormone estrogen (17β -estradiol, E2) that plays an important role in Ca^{2+} -dependent processes and can lead to downregulation of $\text{Ca}_v1.2$ (Banciu et al., 2018). So, these disparate findings point to the need for further investigations to better understand the role of sex on these associations.

Some limitations should be taken into consideration when interpreting these results. The first is regarding the sample size, which may have impacted the precision of our findings. Further studies with larger sample sizes will be noteworthy to replicate our results. The second limitation regards population stratification. Although we cannot rule this bias out, our sample is composed of a majority of white people and analysis was adjusted by skin color.

Finally, as the BDNF is an essential neurotrophin for synaptic plasticity and a key regulator of the survival and differentiation of neuronal populations, including dopaminergic, GABAergic, cholinergic, and serotonergic neurons (Pillai, 2008), its decline can lead to several alterations in CNS being a common condition of psychiatric disorders (Corominas-Roso et al., 2013; Green et al., 2011; Kishi et al., 2018; Lin, 2009). Thus, the

BDNF deregulation is one of the possible mechanisms through which *CACNA1C* SNPs increase susceptibility to psychiatric disorders. In conclusion, our results suggest that the important role the *CACNA1C* gene exerts in the mechanisms that underlie psychiatric disease may be partly due to changes in BDNF levels, suggesting a differential role in women and men. Noteworthy, because of the large number of SNPs in LD in the intron 3, fine-mapping studies are needed to narrow these regions to a reliable set of variants that support the association signal. Here, we attempt to provide the reader data for predicting the regulatory potential effect of variants, suggesting some SNPs as targets, mainly those that are placed in enhancers in several brain regions or protein-binding domains.

Availability of Data and Material: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of interest: All authors disclose no conflict of interest.

Acknowledgements: We would like to thank the assistance of our research team. The authors are grateful to *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior* (CAPES) and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS) for their research fellowships.

References

1. Banciu, A., Banciu, D. D., Mustaciosu, C. C., Radu, M., Cretoiu, D., Xiao, J., ...Radu, B. M. (2018). Beta-Estradiol Regulates Voltage-Gated Calcium Channels and Estrogen Receptors in Telocytes from Human Myometrium. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1413. doi:10.3390/ijms19051413.
2. Berridge, M.J. (1998). Neural calcium signalling. *Neuron*, 21(1), 13–26. doi:10.1016/s0896-6273(00)80510-3.
3. Berridge, M.J. (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochemical Society Transactions*, 40(2), 297-309. doi:10.1042/BST20110766.

4. Bigos, K. L., Mattay, V. S., Callicott, J. H., Straub, R. E., Vakkalanka, R., Kolachana, B., ... Weinberger, D. R. (2010). Genetic variation in CACNA1C affects brain circuitries related to mental illness. *Archives of general psychiatry*, 67(9), 939–945. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.96.
5. Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(6), 477–484. doi:10.1038/nrn1909.
6. Corominas-Roso, M., Ramos-Quiroga, J. A., Ribases, M., Sanchez-Mora, C., Palomar, G., Valero, S., ... Casas, M. (2013). Decreased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16(6), 1267–1275. doi:10.1017/S1461145712001629.
7. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. 2013. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome wide analysis. *Lancet (London, England)*, 381(9875), 1371–1379. doi:10.1016/S0140-6736(12)62129-1.
8. Dao, D. T., Mahon, P. B., Cai, X., Kovacsics, C. E., Blackwell, R. A., Arad, M., ... Gould, T. D. (2010). Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biological psychiatry*, 68(9), 801–810. doi:10.1016/j.biopsych.2010.06.019.
9. Eckart, N., Song, Q., Yang, R., Wang, R., Zhu, H., McCallion, A. S., & Avramopoulos, D. (2016). Functional Characterization of Schizophrenia-Associated Variation in CACNA1C. *PloS one*, 11(6), e0157086. doi:10.1371/journal.pone.0157086.
10. Erk, S., Meyer-Lindenberg, A., Schnell, K., Opitz von Boberfeld, C., Esslinger, C., Kirsch, P., ... Walter, H. (2010). Brain function in carriers of a genome-wide supported bipolar disorder variant. *Archives of general psychiatry*, 67(8), 803–811. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.94.
11. Ferreira, M. A., O'Donovan, M. C., Meng, Y. A., Jones, I. R., Ruderfer, D. M., Jones, L., ... Wellcome Trust Case Control Consortium. (2008). Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nature genetics*, 40(9), 1056–1058. doi:10.1038/ng.209.
12. Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., ... Altshuler, D. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5576), 2225–2229. doi:10.1126/science.1069424.
13. Gershon, E. S., Grennan, K., Busnello, J., Badner, J. A., Ovsiew, F., Memon, S., ... Liu, C. (2014). A rare mutation of CACNA1C in a patient with bipolar disorder, and decreased

- gene expression associated with a bipolar-associated common SNP of CACNA1C in brain. *Molecular psychiatry*, 19(8), 890–894. doi:10.1038/mp.2013.107.
14. Green, E. K., Grozeva, D., Jones, I., Jones, L., Kirov, G., Caesar, S., ...Craddock, N. (2010). The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 15(10), 1016–1022. doi:10.1038/mp.2009.49.
 15. Green, M. J., Matheson, S. L., Shepherd, A., Weickert, C. S., & Carr, V. J. (2011). Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Molecular psychiatry*, 16(9), 960–972. doi:10.1038/mp.2010.88.
 16. Greer, P.L., & Greenberg, M.E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, 59(6), 846–860. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.002.
 17. Heilbronner, U., Malzahn, D., Strohmaier, J., Maier, S., Frank, J., Treutlein, J., ...Schulze, T. G. (2015). A common risk variant in CACNA1C supports a sex-dependent effect on longitudinal functioning and functional recovery from episodes of schizophrenia-spectrum but not bipolar disorder. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(12), 2262–2270. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.09.012.
 18. Khalid, M., Driessen, T. M., Lee, J. S., Tejwani, L., Rasool, A., Saqlain, M., ...Lim, J. (2018). Association of CACNA1C with bipolar disorder among the Pakistani population. *Gene*, 664, 119–126. doi:10.1016/j.gene.2018.04.061.]
 19. Kishi, T., Yoshimura, R., Ikuta, T., & Iwata, N. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Major Depressive Disorder: Evidence from Meta-Analyses. *Frontiers in psychiatry*, 8, 308. doi:10.3389/fpsyg.2017.00308.
 20. Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I., Jr (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*, 19(19), 5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444.
 21. Lee, A. S., De Jesús-Cortés, H., Kabir, Z. D., Knobbe, W., Orr, M., Burgdorf, C., ...Pieper, A. A. (2016). The Neuropsychiatric Disease-Associated Gene cacna1c Mediates Survival of Young Hippocampal Neurons. *eNeuro*, 3(2), ENEURO.0006-16.2016. doi:10.1523/ENEURO.0006-16.2016.
 22. Li, J., Zhao, L., You, Y., Lu, T., Jia, M., Yu, H., ...Wang, L. (2015). Schizophrenia Related Variants in CACNA1C also Confer Risk of Autism. *PLoS one*, 10(7), e0133247. doi:10.1371/journal.pone.0133247.

23. Limou, S., Taverner, A. M., & Winkler, C. A. (2016). Ferret: a user-friendly Java tool to extract data from the 1000 Genomes Project. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(14), 2224–2226. doi:10.1093/bioinformatics/btw147.
24. Lin, P. Y. (2009). State-dependent decrease in levels of brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: a meta-analytic study. *Neuroscience letters*, 466(3), 139–143. doi:10.1016/j.neulet.2009.09.044.
25. Lu, A. T., Dai, X., Martinez-Agosto, J. A., & Cantor, R. M. (2012). Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Molecular autism*, 3(1), 18. doi:10.1186/2040-2392-3-18.
26. Ober, C., Loisel, D. A., & Gilad, Y. (2008). Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nature reviews. Genetics*, 9(12), 911–922. doi:10.1038/nrg2415.
27. Piepmeier, A. T., & Etnier, J. L. (2015). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a potential mechanism of the effects of acute exercise on cognitive performance. *Journal of Sport and Health Science*, 4(1), 14-23. doi:10.1016/j.jshs.2014.11.001.
28. Pillai, A. (2008). Brain-derived neurotropic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neuro-Signals*, 16(2-3), 183–193. doi:10.1159/000111562.
29. Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature genetics*, 43(10), 977–983. doi:10.1038/ng.943.
30. Roussos, P., Mitchell, A. C., Voloudakis, G., Fullard, J. F., Pothula, V. M., Tsang, J., ... Sklar, P. (2014). A role for noncoding variation in schizophrenia. *Cell reports*, 9(4), 1417–1429. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.015.
31. Smedler, E., Pålsson, E., Hashimoto, K., & Landén, M. (2021). Association of CACNA1C polymorphisms with serum BDNF levels in bipolar disorder. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science*, 218(2), 77–79. doi:10.1192/bjp.2019.173.
32. Strohmaier, J., Amelang, M., Hothorn, L. A., Witt, S. H., Nieratschker, V., Gerhard, D., ... Schulze, T. G. (2013). The psychiatric vulnerability gene CACNA1C and its sex-specific relationship with personality traits, resilience factors and depressive symptoms in the general population. *Molecular psychiatry*, 18(5), 607–613. doi:10.1038/mp.2012.53.
33. Sykes, L., Haddon, J., Lancaster, T. M., Sykes, A., Azzouni, K., Ihssen, N., ... Hall, J. (2019). Genetic Variation in the Psychiatric Risk Gene CACNA1C Modulates Reversal Learning Across Species. *Schizophrenia bulletin*, 45(5), 1024–1032. doi:10.1093/schbul/sby146.

34. Takeuchi, H., Tomita, H., Taki, Y., Kikuchi, Y., Ono, C., Yu, Z., ...Kawashima, R. (2019). A Common CACNA1C Gene Risk Variant has Sex-Dependent Effects on Behavioral Traits and Brain Functional Activity. *Cerebral cortex (New York, N.Y.:1991)*, 29(8), 3211–3219. doi:10.1093/cercor/bhy189.
35. Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1998). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20(4), 709–726. doi:10.1016/s0896-6273(00)81010-7.
36. Thimm, M., Kircher, T., Kellermann, T., Markov, V., Krach, S., Jansen, A., ...Krug, A. (2011). Effects of a CACNA1C genotype on attention networks in healthy individuals. *Psychological medicine*, 41(7), 1551–1561. doi:10.1017/S0033291710002217.
37. Tigaret, C. M., Lin, T. E., Morrell, E. R., Sykes, L., Moon, A. L., O'Donovan, M. C., ...Hall, J. (2021). Neurotrophin receptor activation rescues cognitive and synaptic abnormalities caused by hemizygosity of the psychiatric risk gene Cacna1c. *Molecular psychiatry*, 10.1038/s41380-020-01001-0. doi:10.1038/s41380-020-01001-0.
38. Ward, L. D., & Kellis, M. (2012). HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic acids research*, 40, D930–D934. doi:10.1093/nar/gkr917.
39. Witt, S. H., Kleindienst, N., Frank, J., Treutlein, J., Mühleisen, T., Degenhardt, F., ...Bohus, M. (2014). Analysis of genome-wide significant bipolar disorder genes in borderline personality disorder. *Psychiatric genetics*, 24(6), 262–265. doi:10.1097/YPG.000000000000060.
40. Yoshimizu, T., Pan, J. Q., Mungenast, A. E., Madison, J. M., Su, S., Ketterman, J., ...Tsai, L. H. (2015). Functional implications of a psychiatric risk variant within CACNA1C in induced human neurons. *Molecular psychiatry*, 20(2), 284. doi:10.1038/mp.2014.181.

Table 1: Descriptive characteristics of participants.

Variables	
Sex (% female)	362 (56.5)
Skin color (% white)	497 (77.5)
Socioeconomic class	
Low	132 (20.6)
Middle	314 (49.0)
High	195 (30.4)
Age (years)	26.06±5.08
BDNF levels (ng/ml)	7.47±2.19
Tobacco use (% yes)	141 (22.1)
Body Mass Index	26.32±5.56
Mood disorder (% yes)	168 (26.2)
rs1006737 genotypes	
GG	308 (48.0)
AG	276 (43.1)
AA	57 (8.9)
rs4765913 genotypes	
TT	448 (69.9)
AT	179 (27.9)
AA	14 (2.2)
Haplotype (rs1006737- rs4765913)*	
GT	68.3
AA	14.8
AT	15.6
GA	1.3
Total	641 (100%)

Univariate analysis represented by n (%), % or mean ± standard deviation (SD). BDNF: Brain-derived neurotrophic factor.

Table 2. Linear regression analysis between polymorphisms in the *CACNA1C* gene and serum BDNF levels.

Polymorphisms/Haplotype	N	β	95% Confidence Interval	p-value
rs1006737	641	0.014	-0.009 - 0.037	0.226
rs4765913	641	-0.010	-0.036 - 0.015	0.429
rs1006737-rs4765913	641	-0.003	-0.028 - 0.023	0.842

Values obtained for linear regression adjusted for sex, age, skin color, and smoke.

Table 3. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) regulatory information available in Haploreg v4.1.

Variants	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	Motifs changed
Block 3					
rs7965923	no	yes (3 tissues)	yes(SKIN)	no	4 altered motifs
rs769087	no	yes (4 tissues)	no	no	4 altered motifs
rs2007044	no	yes (4 tissues)	yes (HRT)	no	3 altered motifs
rs1006737	no	no	yes (HRT, OVRY)	no	no
rs2159100	no	yes (3 tissues)	no	no	2 altered motifs
rs12315711	no	yes (3 tissues)	yes (3 tissues)	no	3 altered motifs
rs11062170	yes (HRT)	yes (9 tissues)	yes (9 tissues)	no	3 altered motifs
rs4765905	yes (HRT)	yes (8 tissues)	yes (HRT)	no	2 altered motifs
rs882195	no	yes (7 tissues)	yes (3 tissues)	no	no
rs882194	no	yes (7 tissues)	yes (BRN)	no	Sox altered motif
Block 7					
rs12311439	no	yes (18 tissues)	yes (6 tissues)	no	2 altered motifs
rs1024582	no	no	no	no	3 altered motifs
rs4298967	no	yes (7 tissues)	yes (MUS)	no	Hoxd10 altered motif
rs1860002	no	yes (9 tissues)	no	no	ATF3 altered motif
Block 8					
rs4765913	yes (GI, SKIN)	yes (9 tissues)	yes (SKIN)	no	2 altered motifs
rs10848645	no	no	yes (11 tissues)	no	3 altered motifs
Block 9					
rs4765914	yes (3 tissues)	yes (11 tissues)	yes (10 tissues)	P300	2 altered motifs
rs10774037	no	no	yes (10 tissues)	P300	22 altered motifs

HRT: Heart; KID: kidney; GI: gastrointestinal tract; MUS: Muscle; BRN: Brain. Search conducted on 18 Dec 2020.

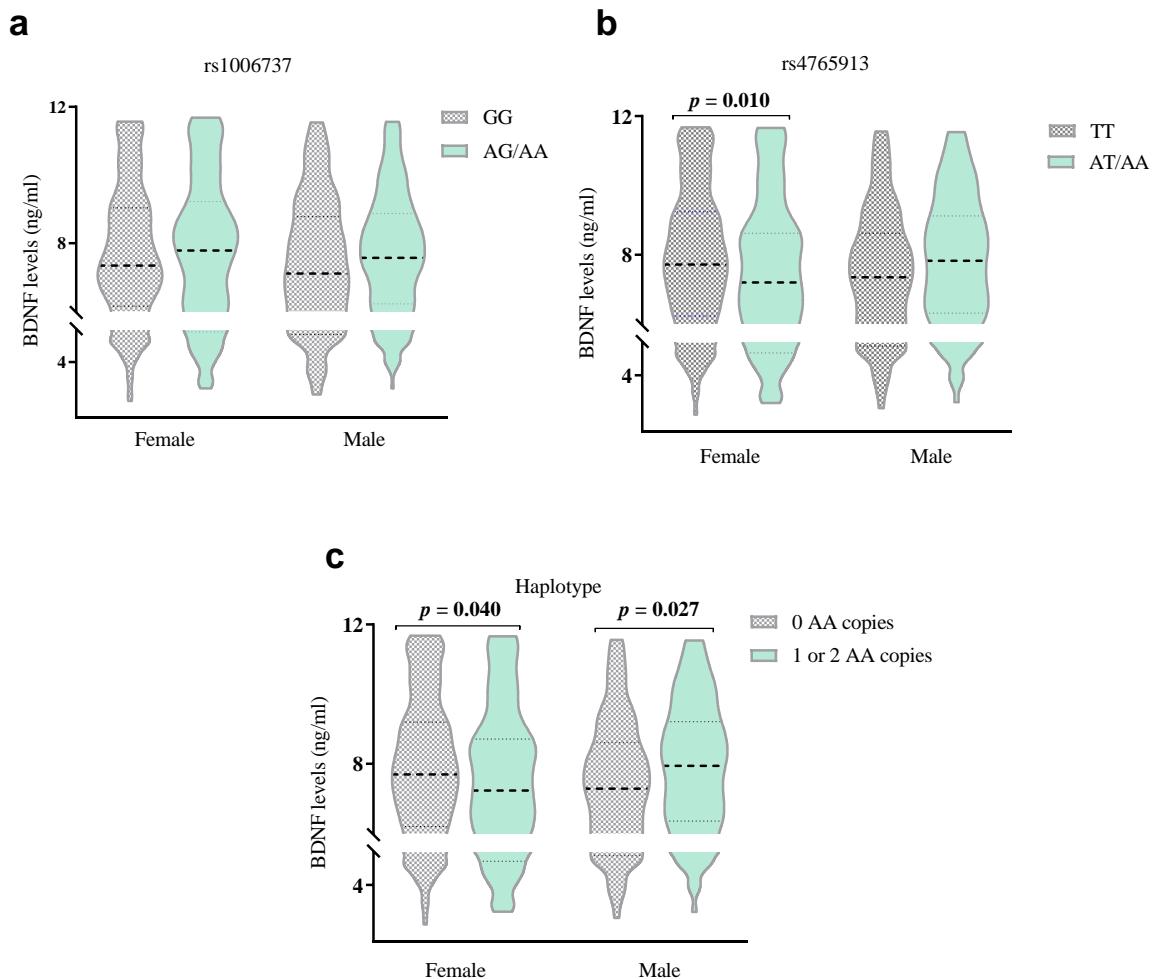


Figure. 1 Violin plot analysis comparing the serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) according to *CACNA1C* genotypes/haplotype stratified for sex. P-value were obtained by linear regression adjusted by age, skin color, and tobacco use. The number of individuals by groups (women or men) and by genotype are as follows: a) rs1006737 (GG: 170, 138; GA/AA: 192, 141); b) rs4765913 (TT: 247, 201; TA/AA: 115, 78); c) Haplotype (0 AA copies: 256, 205; 1or 2 AA copies: 106,74).

Table S1. Data obtained by the GWAS Catalog for the 92 SNPs identified in this study, significance threshold ($p < 2 \times 10^{-6}$)

SNPs	GWAS	Trait	Study
rs7957545	no results	-	-
Block 1			
rs11062159	no results	-	-
rs2238056	no results	-	-
rs11062161	no results	-	-
rs10774034	no results	-	-
rs3922316	no results	-	-
rs2190771	no results	-	-
rs10848642	no results	-	-
rs11062162	no association	-	-
rs4765904	no results	-	-
rs1108221	no results	-	-
rs1108222	no results	-	-
rs1108074	no results	-	-
rs1108073	no results	-	-
rs1108075	no results	-	-
rs11062166	no results	-	-
rs7977619	no results	-	-
rs2239030	no association	-	-
rs2239032	no results	-	-
rs2283291	no results	-	-
rs2239033	no results	-	-
rs3794297	no results	-	-
rs68089646	no results	-	-
rs6489353	no results	-	-
Block 2			
rs3829331	no results	-	-
rs3794296	no results	-	-
rs34382810	2 associations	Psychosis predisposition measurement	Ortega-Alonso et al., 2017
Block 3			
rs7965923	no results	-	-
rs769087	1 association	unipolar depression or BD	Coleman et al., 2020
rs2007044	6 associations	Autism spectrum disorder or SCZ (1); SCZ (4); intelligence, SCZ, self-reported educational attainment (1)	Autism Spectrum Disorders Working Group, 2017; SCZ Working Group, 2014; Lam et al., 2019; Goes et al., 2015; Periyasamy et al., 2019; Pardiñas et al., 2018
rs1006737	8 associations	BD (3); SCZ (2); SCZ, unipolar depression, autism spectrum disorder, BD, ADHD (1); BD, unipolar depression (1); BD, SCZ (1)	Ruderfer et al., 2014; Liu et al., 2011; Ferreira et al., 2008; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013; Ripke et al., 2013.
rs2159100	3 associations	SCZ (3)	Li et al., 2017; Lam et al., 2019; Ikeda et al., 2019
rs12315711	no results	-	-
rs11062170	no results	-	-
rs4765905	3 associations	SCZ (3)	Bergen et al., 2012; SCZ Psychiatric GWAS Consortium, 2011
rs882195	no results	-	-
rs882194	no results	-	-
rs882193	no results	-	-
Block 4			
rs2370413	no results	-	-
rs7297582	no results	-	-
rs576194963	no results	-	-
rs758170	no results	-	-
rs2239037	no results	-	-
rs4765910	no results	-	-
rs4765911	no results	-	-

rs2370414	no results	-	-
rs10774035	no results	-	-
rs2239038	no results	-	-
rs2238057	no results	-	-
Block 5			
rs149715368	no results	-	-
rs11062181	no results	-	-
Block 6			
rs10774036	no results		-
rs10744560	3 associations	BD (2); bipolar I disorder (1)	Wu et al., 2020; Stahl et al., 2019
rs563348819	no results	-	-
Block 7			
rs12311439	no results	-	-
rs1024582	3 associations	SCZ (2); Autism spectrum disorder, SCZ (1)	Wu et al., 2020; Ikeda et al., 2019; Autism Spectrum Disorders Working Group, 2017
rs4298967	3 associations	Anorexia nervosa, ADAH, autism spectrum disorder, BD, major depression, obsessive-compulsive disorder, SCZ, or Tourette syndrome (pleiotropy) (1); BD (1); SCZ (1)	Wu et al., 2020; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2019
rs1860002	no results	-	-
Block 8			
rs4765913	2 associations	BD (2)	Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011; Charney et al. 2017
rs10848645	no results	-	-
Block 9			
rs4765914	1 association	BD, unipolar depression (1)	Amare et al., 2020
rs10774037	1 association	Unipolar depression, SCZ (1)	Amare et al., 2020
Block 10			
rs2108570	no results	-	-
rs2283294	no results	-	-
rs2283295	no results	-	-
rs2283296	no results	-	-
rs2238060	no results	-	-
rs2238061	no results	-	-
rs7132652	no results	-	-
rs2239041	no results	-	-
rs16929248	no results	-	-
rs2239042	no results	-	-
rs12317078	no results	-	-
rs4765919	no results	-	-
rs2239045	no results	-	-
rs2283297	no results	-	-
rs2239046	no results	-	-
rs2283298	no results	-	-
rs2283299	no results	-	-
rs2239047	no results	-	-
rs3819526	no results	-	-
rs3819530	no results	-	-
rs3819531	no results	-	-
rs3819532	no results	-	-
rs3819533	no results	-	-
rs3819534	no results	-	-
rs3819535	no results	-	-
rs3819536	no association	-	-
rs10848646	no results	-	-
rs2238062	no results	-	-
rs1544503	no results	-	-
rs1544502	no results	-	-

In bold the target SNPs of this study. Attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD), bipolar disorder (BD), schizophrenia (SCZ). Search conducted on 15 Dec 2020. No results= none result of GWAS data. No association= none result of GWAS for psychiatric disorder.

Table S2. Regulatory sites available for the eighteen SNPs in *CACNA1C* locus in brain tissues using HaploReg v4.1.

Description	Chromatin states (Core 15-State Model)	Chromatin States (25- State Model Using 12 Imputed Marks)	H3K4me1	H3K4me3	H3K27ac	H3K9ac	DNase
BLOCK 3							
rs7965923							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	-	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	-	-	-	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	-	-	-
Brain Angular Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	-	-	-	-	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	-	-	-	-	-
rs769087							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	7_Enh	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
rs2007044							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	-	-	-	-	-

Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	7_Enh	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
<u>rs1006737</u>							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
<u>rs2159100</u>							
Brain Hippocampus Middle	7_Enh	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	17_EnhW2	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	7_Enh	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
<u>rs12315711</u>							
Brain Hippocampus Middle	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	17_EnhW2	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-

Brain Angular Gyrus	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	7_Enh	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Female	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	DNase
Fetal Brain Male	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	DNase
rs11062170							
Brain Hippocampus Middle	7_Enh	14_EnhA2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	15_EnhAF	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Anterior Caudate	-	14_EnhA2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	14_EnhA2	H3K4me1_Enh	H3K4me3_Pro	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	14_EnhA2	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	-	15_EnhAF	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	14_EnhA2	H3K4me1_Enh	H3K4me3_Pro	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Germinal Matrix	7_Enh	15_EnhAF	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Female	7_Enh	14_EnhA2	H3K4me1_Enh	-	-	-	DNase
Fetal Brain Male	7_Enh	13_EnhA1	H3K4me1_Enh	-	-	-	DNAse
rs4765905							
Brain Hippocampus Middle	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Anterior Caudate	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Inferior Temporal Lobe	7_Enh	17_EnhW2	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	7_Enh	15_EnhAF	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	15_EnhAF	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Female	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
rs882195							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	H3K9ac_Pro	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-

Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	DNase
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	DNase
Fetal Brain Male	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
rs882194							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	H3K9ac_Pro	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Angular Gyrus	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	DNase
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
BLOCK 7							
rs12311439							
Brain Hippocampus Middle	7_Enh	15_EnhAF	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Substantia Nigra	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh		H3K27ac_Enh		
Brain Anterior Caudate	7_Enh	-	H3K4me1_Enh	H3K4me3_Pro	-	H3K9ac_Pro	-
Brain Cingulate Gyrus	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Brain Angular Gyrus	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	7_Enh	15_EnhAF	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	H3K9ac_Pro	-
Brain Germinal Matrix	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	15_EnhAF	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-
Fetal Brain Female	-	17_EnhW2	H3K4me1_Enh	-	-	-	DNase
Fetal Brain Male	-	17_EnhW2	-	-	-	-	-
rs1024582							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	-	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	-	-	-	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	H3K27ac_Enh	-	-

Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	-	-	-
Brain Angular Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	7_Enh	15_EnhAF	H3K4me1_Enh				
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	17_EnhW2	-	-	-	-	-
rs10848645							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	-	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	-	-	-
Brain Angular Gyrus	-	-	-	-	-	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	DNase
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	-	-	-	-	-
BLOCK 9							
rs4765914							
Brain Hippocampus Middle	-	19_DNase	-	-	-	-	-
Brain Substantia Nigra	-	22_PromP	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	19_DNase	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Cingulate Gyrus	-	19_DNase	-	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	19_DNase	-	-	-	-	-
Brain Angular Gyrus	-	19_DNase	-	-	-	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	7_Enh	22_PromP	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
Brain Germinal Matrix	/-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	7_Enh	14_EnhA2	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	DNase
Fetal Brain Female	-	19_DNase	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	17_EnhW2	-	-	-	-	-
rs10774037							
Brain Hippocampus Middle	-	-	-	-	-	-	-
Brain Substantia Nigra	-	-	-	-	-	-	-
Brain Anterior Caudate	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-

Brain Cingulate Gyrus	-	-	-	-	-	-	-	-
Brain Inferior Temporal Lobe	-	-	-	-	-	-	-	-
Brain Angular Gyrus	-	-	-	-	-	-	-	-
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-	-
Brain Germinal Matrix	-	-	H3K4me1_Enh	-	-	-	-	-
NH-A Astrocytes Primary Cells	-	-	H3K4me1_Enh	-	H3K27ac_Enh	-	-	DNase
Fetal Brain Female	-	-	-	-	-	-	-	-
Fetal Brain Male	-	-	-	-	-	-	-	-

H3K4me1 (histone H3 lysine 4 monomethylation) is a mark of regulatory elements associated with enhancers and other distal elements but also enriched downstream of transcription starts; H3K4me3 (histone H3 lysine 4 trimethylation) is a mark of regulatory elements primarily associated with promoters/transcription starts; H3K27ac (Histone H3 lysine 27 acetylation) is a mark of active regulatory elements and may distinguish active enhancers and promoters from inactive counterparts; H3K9ac (Histone H3 lysine 9 acetylation) is a mark of active regulatory elements with preference for promoters. Enh= Enhancers; EnhW2= Weak Enhancer 2; EnhA1= Active Enhancer 1; EnhA2= Active Enhancer 2; EnhAF= Active Enhancer Flank; PromP= Poised Promoter.

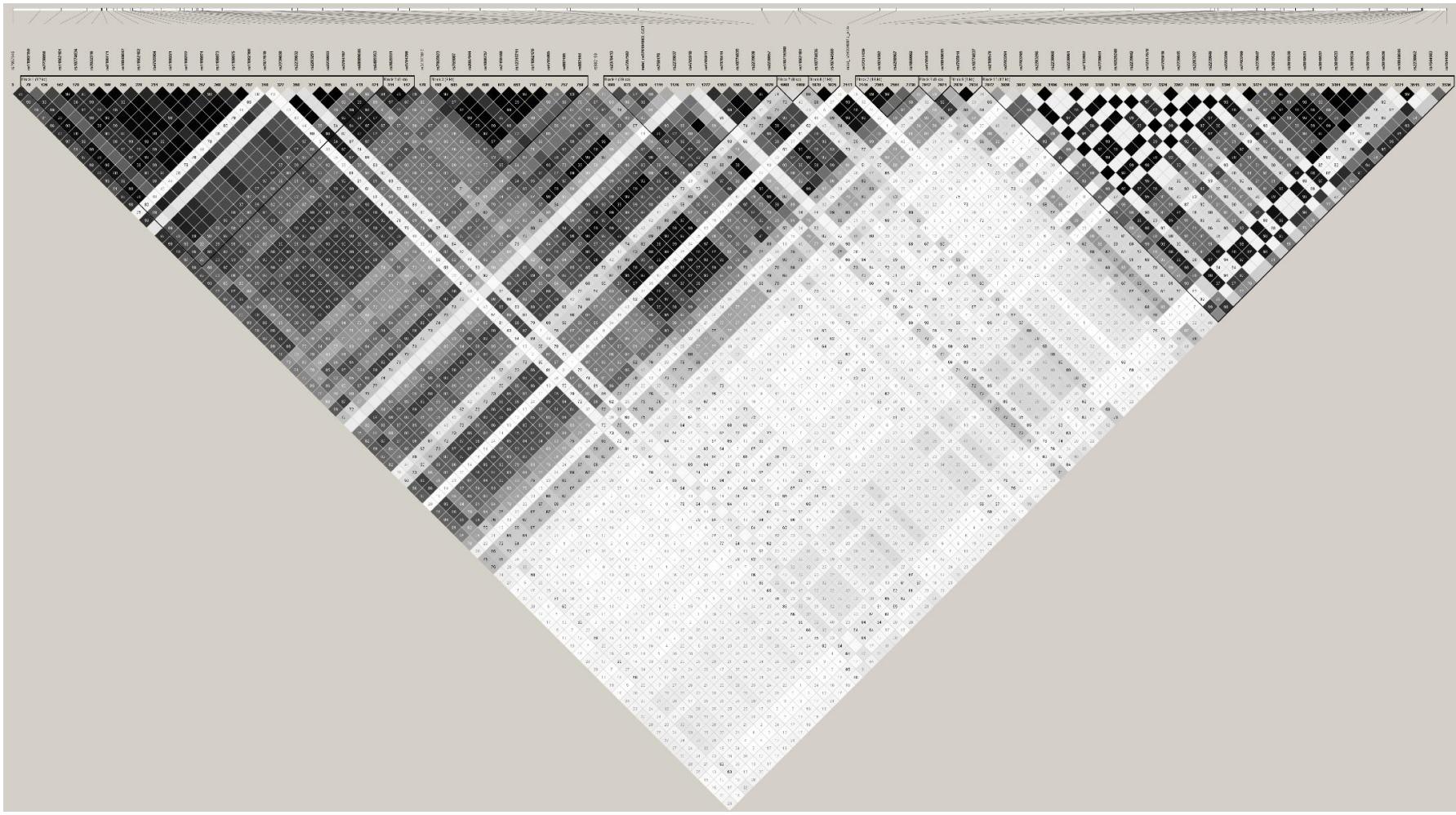


Figure S1. Linkage disequilibrium (LD) plot generated using Haploview 4.2. The plot depicts a region containing 116 kb of the intron 3 of the *CACNA1C* gene in the European population. The analysis revealed 92 single nucleotide polymorphisms (SNPs). Solid lines mark the ten identified blocks. Order of blocks and SNPs from left to right: rs7957545; Block 1 (12 kb): rs11062159, rs2238056, rs11062161, rs10774034, rs3922316, rs2190771, rs10848642, rs11062162, rs4765904, rs1108221, rs1108222, rs1108074, rs110873, rs1108075, rs11062166, rs7977619, rs2239030, rs2239032, rs2283291, rs2239033, rs3794297, rs68089646, rs6489353; Block 2 (0 kb): rs3829331, rs3794296; rs34382810; Block 3 (9Kb): rs7965923, rs769087, rs2007044, **rs1006737**, rs2159100, rs12315711, rs11062170, rs4765905, rs882195, rs882194; rs882193; Block 4 (29Kb): rs2370413, rs7297582, rs576194963, rs758170, rs2239037, rs4765910, rs4765911, rs2370414, rs10774035, rs2239038, rs2238057; Block 5 (0 Kb): rs149715368, rs11062181; Block 6 (0 Kb): rs10774036, rs10744560; rs563348819; Block 7 (19 Kb): rs12311439, rs1024582, rs4298967, rs1860002; Block 8 (0 Kb): **rs4765913**, rs10848645; Bock 9 (0 Kb): rs4765914, rs10774037; Block 10 (17 Kb): rs2108570, rs2283294, rs2283295, rs2283296, rs2238060, rs2238061, rs7132652, rs2239041, rs16929248, rs2239042, rs12317078, rs4765919, rs2239045, rs2283297, rs2239046, rs2283298, rs2283299, rs2239047, rs3819526, rs3819530, rs3819531, rs3819532, rs3819533, rs3819534, rs3819535, rs3819536, rs10848646, rs2238062, rs1544503, rs1544502.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

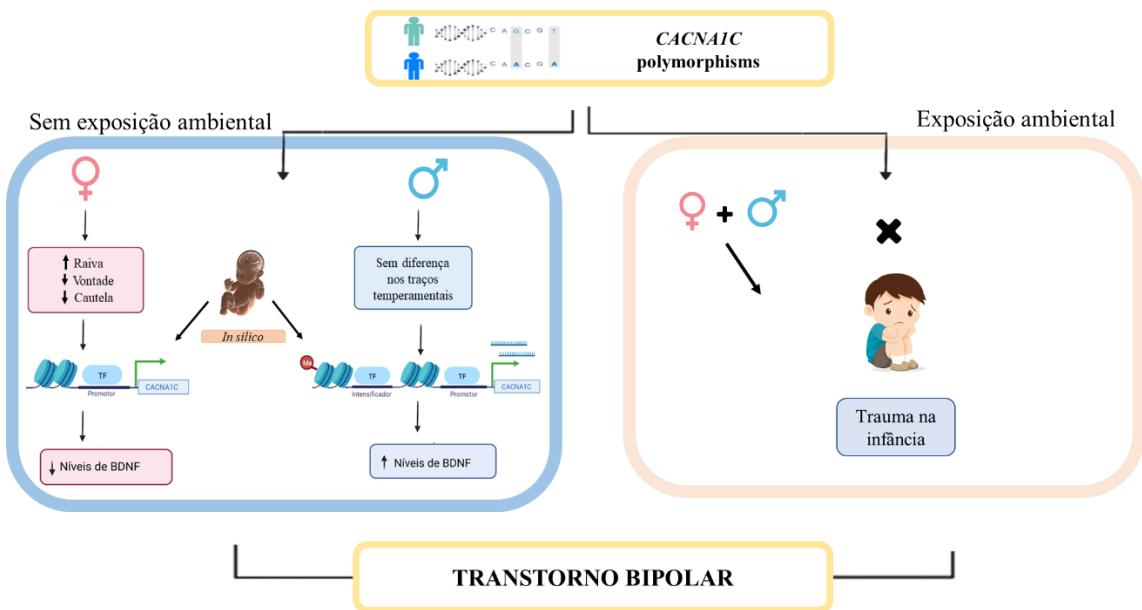
Nas últimas décadas, com o crescimento da genética psiquiátrica, várias abordagens distintas surgiram com o objetivo de compreender o papel dos fatores genéticos na etiologia dos transtornos psiquiátricos. Neste volume, três diferentes abordagens foram empregadas para verificar o papel das variações no gene *CACNA1C* no TB, são elas, a análise de efeito direto, a análise baseada em endofenótipos e a interação gene x ambiente. Os resultados obtidos reforçam o quanto cada abordagem é única e fornece diferentes perspectivas da relação gene-transtorno. O estudo de efeito direto não mostrou nenhum impacto dos SNPs avaliados (rs1006737 e rs4765913) no TB. No entanto, quando consideramos traços temperamentais como possíveis endofenótipos, encontramos uma relação indireta significativa em mulheres, ou seja, os SNPs influenciaram os traços de temperamento e assim impactaram no TB. Na terceira abordagem pudemos identificar uma interação gene x ambiente significativa, sendo que o trauma na infância modificou o efeito dos polimorfismos levando a um risco aumentado de TB em indivíduos com alelo mutado.

Os diferentes resultados obtidos através dessas abordagens, apenas reforçam a complexidade envolvida por trás dessas associações. O gene *CACNA1C* é uma das descobertas mais robustas da genética psiquiátrica, e mesmo assim poucas informações estavam disponíveis sobre seu papel nos traços de temperamento e sua interação com fatores ambientais. Nossos achados auxiliam a preencher essa lacuna na literatura e destacam a importância desses elementos. Além disso, para complementar o estudo, buscamos traduzir o sinal genético em um mecanismo biológico subjacente, e descobrimos que os SNPs avaliados estão associados a variações nos níveis de BDNF, de forma oposta entre os sexos. Essa diferença de efeito entre os sexos foi apoiada por análises *in silico* que identificaram diferentes marcas epigenéticas para esses polimorfismos entre o cérebro fetal feminino e masculino.

Vale ressaltar que quando as adversidades ambientais não foram consideradas, encontramos um efeito prejudicial dos polimorfismos apenas no sexo feminino (traços de temperamento desadaptativos e menores níveis de BDNF). Sugerindo que, em mulheres, os SNPs podem ter um impacto independente da exposição ao trauma. Já nos homens, nenhum efeito dos polimorfismos foi demonstrado nos traços de temperamento, e um

aumento nos níveis de BDNF foi observado, o que pode indicar um efeito protetor. No entanto, quando consideramos as adversidades ambientais, os polimorfismos foram associados a maior suscetibilidade ao TB em ambos os sexos (Figura 1).

Figura 1. Compilado dos principais resultados discutidos nesse volume.



Legenda: A figura ilustra os principais resultados obtidos e discutidos ao longo da tese. O haplótipo AA formado pelos polimorfismos estudados (rs1006737-rs4765913) mostrou impactar diferentemente o sexo feminino e masculino quando a exposição ambiental não foi considerada. Nas mulheres, o haplótipo AA levou a maiores escores de raiva e menores escores de vontade e cautela, bem como a menores níveis de BDNF. Já nos homens nenhum efeito do haplótipo foi observado nos traços temperamentais. No entanto, neles o haplótipo AA foi associado a maiores níveis de BDNF. Além disso, análises *in silico* revelaram marcas de intensificadores no cérebro fetal masculino (Quadro azul). Já quando o fator ambiental, trauma na infância, foi considerado, o haplótipo AA mostrou aumentar o risco de TB em ambos os sexos (Quadro rosa). Fonte: O autor.

A presente tese de doutorado aumenta o corpo de evidências que vincula o gene *CACNA1C* ao TB. No entanto, é importante deixar claro que assim como para outros transtornos, no TB não existe um mapeamento unitário simples entre um gene e a doença. O risco genético para cada indivíduo é uma combinação única de muitas variantes, das comuns às raras. Conhecer essas variantes nos direciona aos sistemas que podem estar desregulados nesses pacientes, fornecendo importantes informações para inovações a nível de medicamentos. Nesse sentido, em contraste com a maioria dos genes implicados nos transtornos psiquiátricos, o gene *CACNA1C* é conhecido por codificar proteínas alvo de medicamentos, tornando-o um grande alvo de interesse.

ANEXOS

ANEXO A- Carta de aprovação do Comitê de Ética



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

RESULTADO

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

Número: 2010/15

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

Investigador(a) principal: Ricardo Azevedo da Silva

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

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

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

Pelotas, 30 de julho de 2010

Prof. Ricardo Tavares Pinheiro
Coordenador CEP/UCPel

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS - UCPEL CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

Iniciaremos as entrevistas em agosto de 2010 e pretendemos finalizá-las 2011.

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

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

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

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

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

Você é livre para abandonar o estudo em qualquer momento, sem prejuízos ou danos.

Em caso de dúvidas sobre o estudo, maiores informações poderão ser obtidas com os pesquisadores e coordenadores do projeto: através dos números (53) 2128-8328 Laboratório do Mestrado; - (53) 8403-8723 (Jerônimo Branco); (53) 8122-8378 (Ricardo Silva); – (53) 9156-8075 (Jean Osse).

Declaração do Participante

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

Participante: _____

Declaração de Entrevistador

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

ANEXO C- Questionário Sociodemográfico

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

QUEST	
<i>Setor:</i> _____	<i>Pessoa:</i> _____
1. Sexo do entrevistado:	
(1) feminino	(2) masculino
2. Qual é a tua idade? ____ em anos completos	
3. A tua cor ou raça é? (LER AS OPÇÕES)	
(1) branca	
(2) preta	
(3) mulata	
(4) amarela	
(5) indígena	
4. Peso: (Kg):	
5. Altura (cm):	
6. Qual a escolaridade do chefe da família? (chefe da família = pessoa de maior renda)	
(1) nenhuma ou até 3º série (primário incompleto)	
(2) 4º série (primário completo) ou 1º grau (ginasial) incompleto	
(3) 1º grau (ginasial) completo ou 2º grau (colegial) incompleto	
(4) 2º grau (colegial) completo ou nível superior incompleto	
(5) nível superior completo	
7. Quantas peças são utilizadas como dormitórios nesta casa? ____ peças	
8. Quantos banheiros existem na casa? (Considere somente os que têm vaso mais chuveiro ou banheira). ____ banheiros (00) Caso não tenha banheiro	
NESTE DOMICÍLIO TÊM, E SE TÊM: QUANTOS?	
9. Televisão:	(0) (1) (2) (3) (4 ou +)
10. Automóvel (de uso particular):	(0) (1) (2) (3) (4 ou +)
NESTE DOMICÍLIO TÊM? (em condições de uso)	
11. Rádio:	(0) não (1) sim
12. Geladeira ou freezer:	(0) não (1) sim
13. Videocassete ou DVD:	(0) não (1) sim
14. Máquina de lavar roupa (não considerar o tanquinho):	(0) não (1) sim

15. Forno de micro-ondas: (0) não (1) sim microond __
 16. Telefone fixo (não considerar celular): (0) não (1) sim telfix __
 17. Microcomputador: (0) não (1) sim microc __
 18. Aparelho de ar condicionado: (0) não (1) sim arcond __
- 19. Até a série que tu completaste na escola, são quantos anos de estudo?**
 (00) se nunca estudou ____ anos completos. escolj __
- 20. Qual o teu estado civil?**
 (0) solteiro (1) casado/vive junto (2) separado/divorciado ecivil __
- 21. Estás trabalhando atualmente?**
 (0) não (1) sim (8) Nunca trabalhou trabatu __
- 22. Tu tens pais separados?**
 (0) não (1) sim apisepa __
- 23. Atualmente, moras com:**
Pai? (0) Não (1) sim mpai __
 SE NÃO: Até que idade morou? ____ anos completos (88) quando mora até hoje iddpai __

Mãe? (0) Não (1) sim mmae __
 SE NÃO: Até que idade morou? ____ anos completos (88) quando mora até hoje iddmae __
- 24. Morastes por pelo menos um mês com padrasto ou madrasta? (mesmo que more com os pais)** (0) Não (1) sim padrast __
- 25. Tu tens filhos? SE SIM: Quantos?**
 (00) Não tem filhos (*pule para questão 27*) ____ filhos filho __
- 26. Com quantos anos tiveste o primeiro filho?** ____ anos (88) NSA iddfilho __
- SE: TEVE FILHOS com 20 anos ou mais pule para questão 29.**
27. Teu primeiro filho foi planejado?
 (0) não (1) sim (8) NSA planej __
28. Tu moras com teu filho?
 (0) não (1) já morei, não moro mais (2) sim (8) NSA mfilho __
- 29. Você faz atividade física regularmente?**
 (0) Não (1) Sim (*pule para a questão 29*) ativreg __

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

- (01) Falta de tempo
- (02) Falta de dinheiro
- (03) Cansaço, preguiça
- (04) Falta de companhia
- (05) Falta de local apropriado
- (06) Lesão, doença ou restrição médica
- (07) Não precisa/não gosta
- () Outro. Qual? _____
- (88) Não se aplica

princnao ____

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

- (01) Importante para a saúde/bem-estar
- (02) Por problema(s) de saúde/doença
- (03) Recomendação/orientação médica
- (04) Preparo físico/condicionamento
- (05) Emagrecimento/perda de peso
- (06) Beleza/estética/manter a forma
- (07) Porque gosta/por diversão ou lazer
- () Outro. Qual? _____
- (88) Não se aplica

prinsim ____

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

32. Desde <dia da semana> passada, quantos dias tu caminhastes por, "pelo menos, 10 minutos seguidos" no seu tempo livre? (não considere as caminhadas para ir ou voltar do seu trabalho ou escola) (0) Nenhum (pule para a questão 34) _____ dias na semana

ipaq1 ____

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

ipaq2 ____

❖ A próxima pergunta é sobre atividade física FORTE.

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

34. Desde <dia da semana> passada, quantos dias tu fez atividades FORTES no teu tempo livre, por pelo menos 10 minutos contínuos, como correr, fazer ginástica/academia, nadar rápido ou pedalar rápido? (0) Nenhum (pule para a questão 36) _____ dias na semana

ipaq3 ____

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

ipaq4 ____

❖ A próxima pergunta é sobre atividade física MÉDIA.

Atividades física "média" é aquela que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar

"um pouco" mais forte que o normal (não considere as atividades feita no trabalho)

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

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

ipaq5 _____

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

ipaq6 _____

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

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

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

ipaq7 _____

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

ipaq8 _____

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

(0) Nenhum (pule para a questão 42) _____ dias na semana

ipaq9 _____

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

ipaq10 _____

❖ Agora vamos falar sobre alguns aspectos de tua saúde.

42. Tu tens algum problema de saúde?

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

doenca _____

SE SIM:	43. Qual a doença? _____
	Qual a doença? _____
	Qual a doença? _____
	Qual a doença? _____

quald1 _____

quald2 _____

quald3 _____

quald4 _____

cons _____

44. Tu já consultaste com psiquiatra ou psicólogo?

(0) não (1) sim

tratpsi _____

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

(0) não (1) sim

intern _____

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

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

nintern _____

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

(0) não (1) sim

medic _____

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

48. Alguma vez na vida tu fizeste tratamento com acupuntura?

(0) não (pule para a questão 50) (1) sim

acupunt __

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

Motivo 1: _____	(88) Não se aplica
Motivo 2: _____	(88) Não se aplica
Motivo 3: _____	(88) Não se aplica

mot1acu __ __
mot2acu __ __
mot3acu __ __

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

- | | | |
|--|---------|---------|
| 50. Morte do cônjuge | (1) sim | (0) não |
| 51. Separação | (1) sim | (0) não |
| 52. Casamento | (1) sim | (0) não |
| 53. Morte de alguém da família | (1) sim | (0) não |
| 54. Gravidez | (1) sim | (0) não |
| 55. Doença na família | (1) sim | (0) não |
| 56. Acréscimo ou diminuição do número de pessoas morando em sua casa | (1) sim | (0) não |
| 57. Nascimento na família | (1) sim | (0) não |
| 58. Mudança de casa | (1) sim | (0) não |
| 59. Mudança de escola | (1) sim | (0) não |
| 60. Reconciliação matrimonial | (1) sim | (0) não |
| 61. Aposentadoria | (1) sim | (0) não |
| 62. Perda de emprego | (1) sim | (0) não |
| 63. Mudança de trabalho (favorável ou desfavorável) | (1) sim | (0) não |
| 64. Dificuldades com a chefia | (1) sim | (0) não |
| 65. Reconhecimento profissional | (1) sim | (0) não |
| 66. Acidentes | (1) sim | (0) não |
| 67. Perdas financeiras | (1) sim | (0) não |

eventa __
eventb __
eventc __
eventd __
evente __
eventf __
eventg __
eventh __
eventi __
eventj __
eventk __
eventl __
eventm __
eventn __
evento __
eventp __
eventq __
eventr __

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

ANEXO D- Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)

QUESI

Identificação: _____

Idade: _____

Sexo: _____

As afirmações abaixo se referem a algumas experiências de quando você era criança ou adolescente.
 Embora estas afirmações sejam de natureza pessoal, por favor, responda o mais sinceramente possível.
 Para cada afirmação, circule a resposta que melhor descreve o que você acha que ocorreu enquanto crescia.
 Se você desejar mudar sua resposta, coloque um X na antiga e circule a nova escolha.

Enquanto eu crescia...	Nunca	Poucas Vezes	Às Vezes	Muitas Vezes	Sempre
1. Eu não tive o suficiente para comer.	•	•	•	•	•
2. Eu soube que havia alguém para me cuidar e proteger.	•	•	•	•	•
3. As pessoas da minha família me chamaram de coisas do tipo "estúpido (a)", "preguiçoso (a)" ou "feio (a)".	•	•	•	•	•
4. Meus pais estiveram muito bêbados ou drogados para poder cuidar da família.	•	•	•	•	•
5. Houve alguém na minha família que ajudou a me sentir especial ou importante.	•	•	•	•	•
6. Eu tive que usar roupas sujas.	•	•	•	•	•
7. Eu me senti amado (a).	•	•	•	•	•
8. Eu achei que meus pais preferiam que eu nunca tivesse nascido.	•	•	•	•	•
9. Eu apanhei tanto de alguém da minha família que tive de ir ao hospital ou consultar um médico.	•	•	•	•	•
10. Não houve nada que eu quisesse mudar na minha família.	•	•	•	•	•
11. Alguém da minha família me bateu tanto que me deixou com machucados roxos.	•	•	•	•	•
12. Eu apanhei com cinto, vara, corda ou outras coisas que machucaram.	•	•	•	•	•
13. As pessoas da minha família cuidavam umas das outras.	•	•	•	•	•
14. Pessoas da minha família disseram coisas que me machucaram ou me ofenderam.	•	•	•	•	•
15. Eu acredito que fui maltratado (a)	•	•	•	•	•

fisicamente.					
16. Eu tive uma ótima infância.
17. Eu apanhei tanto que um professor, vizinho ou médico chegou a notar.
18. Eu senti que alguém da minha família me odiava.
19. As pessoas da minha família se sentiam unidas.
20. Tentaram me tocar ou me fizeram tocar de uma maneira sexual.
21. Ameaçaram me machucar ou contar mentiras sobre mim se eu não fizesse algo sexual.
22. Eu tive a melhor família do mundo.
23. Tentaram me forçar a fazer algo sexual ou assistir coisas sobre sexo.
24. Alguém me molestou.
25. Eu acredito que fui maltratado (a) emocionalmente.
26. Houve alguém para me levar ao médico quando eu precisei.
27. Eu acredito que fui abusado (a) sexualmente.
28. Minha família foi uma fonte de força e apoio.

ANEXO E- Affective and Emotional Composite Temperaments Scale (AFFECTS)

Marque a alternativa que mais corresponde ao seu jeito de ser e de agir em geral. Não há respostas certas ou erradas, responda de acordo com o que você é, não com o que você desejaría ser. Cada item possui características opostas de temperamento. Escolha a que mais corresponde a você (uma alternativa por linha).

	Muito	Médio	Um pouco	Neutro	Um pouco	Médio	Muito	
Medroso								Ousado 1
Tímido								Extrovertido 2
Prudente e cauteloso								Imprudente e descuidado 3
Sinto vergonha facilmente								É raro eu sentir vergonha 4
Receoso, penso antes de agir								Impulsivo, ajo sem pensar 5
Preocupado								Despreocupado 6
Fico paralisado frente ao perigo								Reajo rapidamente frente ao perigo 7
Inibido e contido								Desinibido e espontâneo 8
Pessimista								Otimista 9
Fico indiferente a novas atividades								Fico entusiasmado com novas atividades 10
É difícil eu sentir prazer								É fácil eu sentir prazer 11
Desmotivado e desinteressado								Motivado e interessado 12
Facilmente desanimo frente a dificuldades								Dificilmente desanimo frente a dificuldades 13
Inseguro								Autoconfiante 14
Faltam-me objetivos e força de vontade								Tenho objetivos e força de vontade 15
Triste e desanimado								Alegre e animado 16
Indisciplinado								Disciplinado 17
Desorganizado								Organizado 18
Desatento								Atento 19
Dispersivo								Focado 20
	Muito	Médio	Um pouco	Neutro	Um pouco	Médio	Muito	

	Muito	Médio	Um pouco	Neutro	Um pouco	Médio	Muito	
Não ligo para detalhes								Detalhista 21
Desisto fácil								Persistente 22
Planejo mal minhas atividades								Planejo bem minhas atividades 23
Irresponsável								Responsável 24
Tranquilo								Apressado e imediatista 25
Ponderado								Sou de extremos, do tipo 8 ou 80 26
Calmo								Irritado 27
Flexível								Teimoso 28
Pacífico								Agressivo 29
É difícil eu guardar rancor								Rancoroso 30
Confio nas pessoas								Desconfiado 31
Paciente								Impaciente 32
Dificilmente fico magoado								Eu fico magoado facilmente 33
Dificilmente me enjoar das coisas								É fácil eu me enjoar das coisas 34
Tenho baixa tolerância à frustração								Tenho alta tolerância à frustração 35
Eu me culpo facilmente								É raro eu me sentir culpado 36
Lido mal com a rejeição								Lido bem com a rejeição 37
Tenho dificuldade em superar traumas								Tenho facilidade em superar traumas 38
Lido mal com situações de pressão								Lido bem com situações de pressão 39
Resisto bem ao estresse								Sou sensível ao estresse 40
	Muito	Médio	Um pouco	Neutro	Um pouco	Médio	Muito	

Observação para o revisor: medo (questões 1 a 8), vontade, (9 a 16) controle (17 a 24), raiva (25 a 32) e sensibilidade (33 a 40).

Na questão 2 abaixo, a ordem dos temperamentos afetivos é: a) depressivo, b) ansioso, c) ciclotímico, d) disfórico, e) apático, f) eutítmico, g) irritável, h) lábil, i) desinibido, j) hipertímico, k) obsessivo.

1. Marque o quanto cada afirmação abaixo tem a ver com você:

A) Tenho tendência à tristeza e à melancolia; vejo pouca graça nas coisas; tendo a me desvalorizar; não gosto muito de mudanças; prefiro ouvir a falar.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

B) Sou muito cauteloso e precavido; frequentemente me sinto inseguro e apreensivo; imagino que coisas ruins estão prestes a acontecer; tento evitar situações de risco; estou sempre alerta e vigilante.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

C) Meu humor é imprevisível e instável (altos e baixos), muda rapidamente ou de maneira desproporcional aos fatos; tenho fases de grande energia, entusiasmo e agilidade que se alternam com outras fases de lentidão, perda de interesse e desânimo.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

D) Tenho uma forte tendência a me sentir agitado, ansioso e irritado ao mesmo tempo.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

E) Tenho pouca iniciativa; com frequência me desligo do que os outros estão dizendo ou fazendo; muitas vezes não concluo o que comecei; tendo à passividade e sou um pouco lento.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

F) Meu humor é equilibrado e previsível, costuma mudar só quando há um motivo claro; tenho boa disposição e, em geral, me sinto bem comigo mesmo.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

G) Sou muito sincero, direto e determinado, mas também irritado, explosivo e desconfiado.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

H) Sou dispersivo, agitado, desligado e desorganizado; às vezes sou precipitado ou inconveniente e só me dou conta mais tarde; mudo de interesse rapidamente; tenho dificuldade em concluir tarefas e fazer o que deveria.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

I) Sou inquieto, ativo, espontâneo e distraído; muitas vezes ajo de maneira precipitada e inconsequente; é muito comum eu deixar para fazer as coisas na última hora; quando me irrito, logo fico bem de novo.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

J) Estou sempre de bom humor, me sinto muito confiante e me divirto facilmente; adoro novidades e estou sempre pronto para novas atividades; faço várias coisas sem me cansar; quando quero alguma coisa, vou atrás e consigo conquistá-la; tenho forte tendência à liderança.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

K) Sou exigente, dedicado, perfeccionista, detalhista e rígido; preciso ter o controle das coisas; não lido bem com incertezas e erros.

Nada a ver comigo Tudo a ver comigo

3. Escolha a letra correspondente à descrição da questão 2 anterior que mais se aproxima do seu perfil (somente uma alternativa). Das 11 descrições leia bem as que têm mais a ver com você antes de optar pela resposta.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

4. Em que medida você tem ou já teve problemas ou prejuízos pessoais em função do seu jeito de ser, do seu comportamento e do seu padrão de humor?

Nenhum problema Muitos problemas

5. Em que medida você tem ou já teve vantagens ou benefícios pessoais em função do seu jeito de ser, do seu comportamento e do seu padrão de humor?

Nenhuma vantagem Muitas vantagens