

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

MARIANA DA SILVA MENDONÇA

Associação da metilação do DNA e dos polimorfismos genéticos 5-HTTLPR e STin2 no gene *SLC6A4* em binômios mãe-filho com depressão

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO 2017**

MARIANA DA SILVA MENDONÇA

Associação da metilação do DNA e dos polimorfismos genéticos 5-HTTLPR e STin2 no gene SLC6A4 em binômios mãe-filho com depressão

Dissertação apresentada ao
Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro – como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre
em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro
Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO 2017

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente, auxiliando na minha trajetória, me possibilitando a crescer e a aprender a cada dia.

Aos meus pais, Elinete e Benedito, por toda dedicação, amor, incentivo e apoio incondicional. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu irmão, avós, primos, tios e amigos pela confiança, carinho e por todo apoio durante todos esses anos.

Ao meu noivo, Makki, por ser essencial na minha vida, pelo incentivo, carinho, força e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro, pela oportunidade e confiança na realização desse projeto.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios, pela oportunidade de realização desse projeto, e também pelos ensinamentos, dedicação e confiança.

Aos colaboradores desse projeto, Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa, Profa. Dra. Ana Vilela Mendes e Profa. Dra. Sônia Regina Loureiro, pelas amostras cedidas, permitindo a realização do presente estudo.

À minha grande amiga e companheira de laboratório, Paula, por ter sido incansável na tentativa de ajudar na realização desse projeto e por tornar mais prazeroso o nosso ambiente de trabalho. Sem dúvidas, uma das pessoas mais especiais que conheci nos últimos anos.

À companheira e amiga de laboratório, Priscila, pela ajuda, conselhos e principalmente pela amizade.

À CAPES e a UENF pela aprovação e apoio financeiro do projeto.

A todos os meus amigos e familiares que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELA.....	V
LISTA DE GRÁFICOS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 GENÉTICA, EPIGENÉTICA E FATORES AMBIENTAIS NA ETIOLOGIA DAS DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS	1
1.2 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA DEPRESSÃO	4
1.3 ASSOCIAÇÃO DA DEPRESSÃO COM O GENE <i>SLC6A4</i>	6
1.4 A DEPRESSÃO MATERNA COMO FATOR DE ESTRESSE AMBIENTAL PARA A DEPRESSÃO EM CRIANÇAS.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 GERAL	13
2.2 ESPECÍFICOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS REGIÕES DIFERENCIALMENTE METILADAS EM PACIENTES COM DEPRESSÃO MAIOR (MDD-DMR) NO <i>SLC6A4</i> HUMANO	14
3.2 AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO	14
3.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	15
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	16
3.5 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	16
3.6 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS 5-HTTLPR E STIN2-VNTR	16
3.7 SEQUENCIAMENTO DE ALELOS DO POLIMORFISMO STIN2	17
3.8 ENSAIO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO SENSÍVEIS A METILAÇÃO ASSOCIADAS A PCR QUANTITATIVA (MSRED-QPCR)	17
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS 5-HTTLPR E STIN2- VNTR EM PACIENTES COM DEPRESSÃO E CONTROLES	19
4.1.1 O polimorfismo 5-HTTLPR.....	21
4.1.2 O polimorfismo STin2	27
4.2 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS 5-HTTLPR E STIN2 NA OCORRÊNCIA DE DEPRESSÃO EM FILHOS DE MÃES COM TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR	33
4.3 INTERAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS 5-HTTLPR E STIN2-VNTR DO GENE <i>SLC6A4</i> 37	37
4.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DO DNA EM UMA MDD-DMR DO GENE <i>SLC6A4</i> ..	41
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXO.....	71

ABREVIATURAS

- ❖ *5-HTT, SLC6A4, SERT* - transportador de 5-hidroxitriptamina
- ❖ VNTRs - do inglês, *Variable Number Tandem Repeats*
- ❖ DNA - ácido desoxirribonucleico
- ❖ dNTPs – dinucleotídeos
- ❖ CpGs - dinucleotídeo “Citosina-fosfato-Guanina”
- ❖ CpGI - do inglês, *CpG Islands*
- ❖ DNMT - DNA metiltransferase
- ❖ OMS – Organização Mundial de Saúde
- ❖ 5mC - 5'-metilcitosina
- ❖ Kb - Kilobase
- ❖ PCR - Reação em cadeia da Polimerase (do inglês - “*Polymerase Chain reaction*”)
- ❖ MSRE-qPCR – Ensaio com enzima de restrição sensível a metilação (do inglês - “*Methylation Sensitive Restriction Enzyme assay*”)
- ❖ *HpaII* - Enzima de restrição (endonuclease)
- ❖ DOHaD – do inglês, *Developmental Origins of Health and Disease*
- ❖ SNP- do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*
- ❖ TFBS - do inglês, *Transcription Factor Binding Sites*
- ❖ SCID - *Structured Clinical Interview for DSM-IV Disorders* – Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV
- ❖ PHQ-9 - Questionário sobre a saúde do Paciente
- ❖ DSM-IV - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª edição
- ❖ CID-10 - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde, 10ª revisão
- ❖ DAWBA - *Development and Well-Being Assessment*
- ❖ OR – Razão de chance (do inglês, *Odds Ratio*)
- ❖ MDD – Major depressive disorder
- ❖ MDD-DMR – regiões diferencialmente metiladas em pacientes com depressão maior
- ❖ SINE – do inglês, *Short Interspersed Nuclear Element*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 **Genotipagem das regiões STin2 e 5-HTTLPR do gene SLC6A4. . 19**

Figura 2 **Alinhamento das sequencias de DNA de homozigotos STin2.12/STin2.12 e STin2.10/STin2.10 20**

Figura 3 **Representação do alelo 9 do polimorfismo STin2 do gene SLC6A4. Gel de poliacrilamida (12%) corado com nitrato de prata (0,2% w/v) mostrando 32**

Figura 4 **Representação gráfica da região promotora e início do corpo gênico do SLC6A4 humano a partir do UCSC Genome Browser (chr17:28,560,336-28,567,163). 42**

LISTA DE TABELA

Tabela 1. **Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR encontradas nos grupos de indivíduos adultos com depressão e controles... 22**

Tabela 2 **Comparação entre os resultados encontrados na amostra total do presente estudo e dados publicados na literatura em populações brasileiras. 23**

Tabela 3 **Frequências de genótipos associados ao polimorfismo 5-HTTLPR em estudos comparativos entre pacientes com depressão e controles em diferentes países..... 24**

Tabela 4 **Resultados do teste exato de Fisher e de OR (IC 95%) de indivíduos portadores de pelo menos um alelo S no polimorfismo 5-HTTLPR para o diagnóstico positivo ou negativo de depressão..... 27**

Tabela 5 **Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo STin2 encontradas nos grupos de indivíduos adultos com depressão e controles 28**

Tabela 6 **Frequências de genótipos associados ao polimorfismo STin2 em estudos comparativos entre indivíduos com depressão e controle. 28**

Tabela 7 Frequência de indivíduos portadores de pelo menos um alelo 10 no polimorfismo STin2 e análise da razão de chances (OR) de ocorrência de depressão baseada na frequência dos genotípica 31

Tabela 8 Resultados encontrados para as distribuições genotípicas S/S e S/L do polimorfismo 5-HTTLPR entre diferentes grupos de pacientes com e sem depressão 35

Tabela 9 Resultados encontrados para as distribuições genotípicas STin2.10/STin2.10 e STin2.10/STin2.12 do polimorfismo STin2 entre diferentes grupos de pacientes com e sem depressão. 37

Tabela 10 Resultados do teste exato de Fisher e OR para presença de combinações genotípicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 com baixa e alta expressão segundo classificação estabelecidos por HRANILOVIC et al., (2004)..... 39

Tabela 11 Resultados do teste exato de Fisher e OR para presença de combinações genotípicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 com baixa expressão entre G1A e os demais grupos estudados 40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Frequência dos genótipos associados ao polimorfismo 5-HTTLPR nas crianças no grupo G1A, G1B e G2..... 34

Gráfico 2 Frequência genotípica das crianças no grupo G1A e G1B para o polimorfismo STin2..... 36

Gráfico 3 Média de 5mC% entre os grupos de pacientes investigados G1A, G1B e G2 44

Gráfico 4 Valores de média de 5mC% analisadas no elemento AluJb entre as mães e filhos nos grupos G1A, G1B e G2 46

Gráfico 5 Médias de 5mC% analisadas no elemento AluJb entre os indivíduos com diferentes genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR na amostra total. (p = 0.3827). 47

RESUMO

A associação entre polimorfismos genéticos relacionados a etiologia da depressão vem sendo alvo de diversos estudos nas últimas duas décadas. A variação genética em regiões regulatórias pode afetar o *status* epigenético e consequentemente afetar a transcrição gênica de maneira *loci* específica, contribuindo de forma aditiva a etiologia dessa doença. Os polimorfismos derivados de VNTRs (do inglês, *Variable Number Tandem Repeats*) presentes nas regiões regulatórias do gene *SLC6A4* têm sido associados com diversas doenças, principalmente com a depressão. Além de afetar a transcrição gênica, esses polimorfismos têm sido associados a padrões diferenciais de metilação em citosinas do DNA (5mC) no promotor desse gene. A ação conjunta de polimorfismos genéticos e a metilação do DNA pode ser afetada por fatores ambientais. Como exemplo de fator ambiental, a exposição a depressão materna pode contribuir com a maior susceptibilidade a psicopatologias em crianças, podendo ocorrer desde o período intrauterino até os primeiros anos de vida. O presente estudo teve como objetivo analisar a frequência e interação dos polimorfismos associados ao gene *SLC6A4* (5-HTTLPR e STin2) em uma amostra de binômios mãe-filho, onde as mães foram diagnosticadas com depressão. Nessas amostras foram analisados os níveis de metilação do DNA (5mC) em um elemento tipo *AluJb* localizado dentro do promotor desse gene. Para a genotipagem e a quantificação dos níveis de 5mC foram utilizadas as técnicas de PCR convencional e MSRED-qPCR (do inglês, *Methylation-Sensitive Restriction Enzyme Digestion - quantitative PCR*), respectivamente. Foi encontrada uma maior associação dos genótipos S/S (5-HTTLPR) em binômios onde mães e filhos apresentavam o diagnóstico de depressão. Enquanto o polimorfismo STin2 apresentou predominância do genótipo STin2.10/STin2.12 em indivíduos com depressão e predominância do genótipo STin2.12/STin2.12 em controles. Apesar de não encontrar diferença significativa entre as frequências dos grupos controle e com depressão, quando avaliados a interação dos polimorfismos, foi visto que portadores de ao menos um alelo S do 5-HTTLPR e um alelo 10 do STin2 foram mais frequentes em indivíduos com depressão. Os resultados da quantificação de 5mC mostraram

que em um subgrupo de mães e filhos que apresentavam depressão, ocorreu uma diminuição dos níveis de metilação do DNA em relação aos demais indivíduos analisados. Esse padrão de hipometilação se mostrou ainda mais acentuado em indivíduos portadores de ao menos um alelo S (indivíduos S/L e S/S), o que sugere que a presença do alelo S possa ter alguma relação com o perfil epigenético de segmentos desse promotor.

Palavras chaves: Metilação do DNA; *SLC6A4*; Depressão; Epigenética

ABSTRACT

The association between genetic polymorphisms related to the etiology of depression has been the subject of several studies in the last two decades. Genetic variation in regulatory regions can affect epigenetic status and consequently affect gene transcription in a specific loci manner, contributing in an additive way to the etiology of this disease. The polymorphisms derived from VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) present in the regulatory regions of the *SLC6A4* gene have been associated with several diseases, mainly with depression. In addition to affecting gene transcription, these polymorphisms have been associated with differential methylation patterns in DNA cytosines (5mC) in the promoter of this gene. The joint action of genetic polymorphisms and DNA methylation can be affected by environmental factors. As an environmental factor, an exposure to maternal depression may contribute to a greater susceptibility to psychopathology in children, which may occur from the intrauterine period to the years of life. The aim of the present study was to analyze the frequency and interaction of *SLC6A4* (5-HTTLPR and STin2) gene-associated polymorphisms in a sample of mother-child binomials, where mothers were diagnosed with depression. In these samples, the DNA methylation levels (5mC) were analyzed in an *AluJb* element located within the promoter of that gene. For the genotyping and quantification of the 5mC levels, the conventional PCR and MSRED-qPCR (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme Digestion - quantitative PCR) techniques were used, respectively. A greater association of S/S genotypes (5-HTTLPR) was found in binomials where mother and children presented the diagnosis of depression. While the STin2 polymorphism showed predominance of the STin2.10/STin2.12 genotype in individuals with depression and predominance of the STin2.12/STin2.12 genotype in controls. Although no significant difference was found between the control and depression frequencies, when the interaction of polymorphisms was evaluated, it was seen that patients with at least one 5-HTTLPR S allele and 10 STin2 allele were more frequent in individuals with depression. The results of the quantification of 5mC demonstrated that in a subgroup of mothers and children who presented depression, there was a decrease in DNA methylation

levels in relation to the other individuals analyzed. This hypomethylation pattern was even more pronounced in individuals carrying at least one S allele (S/L and S / S individuals), suggesting that the presence of the S allele may have some relation to the epigenetic profile of segments of this promoter.

Key words: DNA methylation; *SLC6A4*; Depression; Epigenetic

1. INTRODUÇÃO

1.1 Genética, epigenética e fatores ambientais na etiologia das doenças psiquiátricas

Nas últimas três décadas, o estudo dos componentes genéticos associado a etiologia de doenças psiquiátricas, tem identificado diversas variantes genéticas (polimorfismos de base única e de repetições nucleotídicas) em diferentes genes associados a fisiologia do sistema nervoso (LOPIZZO *et al.*, 2015). No entanto, estudos de associação entre polimorfismos genéticos em genes como o *SLC6A4*, *MAOA*, *BDNF*, *NR3C1*, *COMT* (entre outros) têm mostrado resultados discordantes em diferentes amostras populacionais. A caracterização da função de muitos desses polimorfismos ainda precisa ser melhor elucidada (GATT *et al.*, 2014).

Tem sido demonstrado que a variação genética em genes associados a doenças psiquiátricas, contribui de forma aditiva para etiologia das mesmas (SHRIVASTAVA & DESOUSA, 2016). Contudo, a contribuição fenotípica de cada polimorfismo pode apresentar uma forte variação temporal e tecido específico, influenciado pela exposição a diferentes fatores ambientais de estresse (LOPIZZO *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o desenvolvimento e o quadro clínico dessas psicopatologias ocorrem de forma estritamente individual, dependendo da vulnerabilidade genética e também epigenética de cada indivíduo. Quanto a variação nos sintomas de cada patologia, a interação dos componentes genéticos com os fatores ambientais parece variar dependendo do período de vida onde essa interação ocorreu além da intensidade da exposição aos fatores de estresse (CHROUSOS, 2009).

Um grande número de estudos sugere que essa interação genótipo *versus* ambiente ocorre devido a mecanismos epigenéticos, atribuindo a variações na expressão do gene sem que a sequência do DNA seja alterada (BAKUSIC *et al.*, 2017; CHAMPAGNE, 2010).

A epigenética desempenha um papel central no desenvolvimento de um indivíduo, agindo como um campo de interação entre a informação genética

contida no genoma e os fatores ambientais. Isso demonstra que a contribuição fenotípica de cada gene possui um espectro de intensidade influenciado pelo contexto externo ao qual cada indivíduo é exposto (MOORE, 2016).

Os mecanismos epigenéticos podem atuar diretamente na regulação da expressão gênica, ou indiretamente, através da modulação de fatores de regulação da transcrição (KOFINK *et al.*, 2013). Sua influência na expressão gênica se dá principalmente pelo estabelecimento de padrões diferenciais de condensação da cromatina no qual os genes se encontram, dessa forma controlando a transcrição dos mesmos (GIBNEY & NOLAN, 2010; HAMILTON, 2011). Alterações nesses mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento de uma grande variedade de doenças humanas (BROOKES & SHI, 2014; BAKUSIC *et al.*, 2017).

Entre os mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA é a mais estudada quando se deseja avaliar padrões epigenéticos diferenciais em indivíduos saudáveis ou acometidos por diferentes tipos de doença. Ela é regulada por um grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) que catalisam a transferência de um grupo metil a um carbono 5' de um anel de citosina, resultando no silenciamento gênico (VAN OTTERDIJK & MICHELS, 2016). Em mamíferos, a metilação do DNA ocorre preferencialmente em dinucleotídeos CpG (5mC). A presença dessa marca em promotores gênicos ou elementos regulatórios associados aos mesmos é quase sempre um indicativo da presença de heterocromatina, o qual está associado ao silenciamento gênico local (MOORE, 2016).

Nos últimos anos, diferentes estudos têm relatado que a ação da exposição a fatores de estresse pré e pós-natal, como por exemplo, o tabagismo, o uso de drogas, a deficiência nutricional, a ausência de cuidado materno, a exposição a violência física, entre outros, podem impactar negativamente no desenvolvimento neurológico e consequentemente influenciar o desenvolvimento de doenças psiquiátricas (SHRIVASTAVA & DESOUSA, 2016).

O estresse crônico representa o principal componente externo que contribui para a susceptibilidade as psicopatologias (UCHIDA *et al.*, 2011; BAKUSIC *et al.*, 2017). Ele resulta em uma modificação na homeostase,

através de uma variedade de fatores, seja em relação a um evento de estresse psicológico ou físico. A exposição ao estresse interfere no funcionamento físico ou mental de forma individual, dependendo de fatores genéticos e fatores externos vividos anteriormente (CATTANEO & RIVA, 2016).

A alteração da resposta ao estresse pode interferir em vários sistemas do organismo do ser humano, como o sistema endócrino, o metabólico, e cardiovascular (CHROUSOS, 2009). Diversas doenças estão relacionadas a resposta irregular ao estresse, entre elas, doenças imunológicas, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares, por exemplo. No entanto, fatores ambientais que geram o estresse e sua resposta fisiológica, estão intimamente associadas a psicopatologias como a depressão, ansiedade e estresse traumático (SMOLLER, 2016).

A epigenética comportamental é inserida no contexto para melhor elucidação de como o gene e seu padrão de expressão, em particular, são afetados por estímulos ambientais e de que forma isso favorece o desenvolvimento de doenças (LESTER *et al.*, 2016; PROVENZI *et al.*, 2016).

É interessante observar que, apesar de por definição os fatores epigenéticos não estão relacionados a mudanças nas sequências de nucleotídeos do DNA, sua deposição em diferentes *loci* depende em grande parte da ação de fatores de transcrição os quais atuam reconhecendo sítios específicos no DNA (PROVENZI *et al.*, 2016). Portanto, é coerente afirmar que polimorfismos em sítios de ligação de fatores de transcrição podem afetar padrões de marcas epigenéticas localmente. Isso cria uma interação molecular onde a variação epigenética decorrente da exposição a fatores ambientais poderia ser modulada também pela variação genética *loci* específica (SMOLLER, 2016).

Como exemplo dessa interação, pode-se citar os polimorfismos em regiões regulatórias de genes como *MAOA* e *SLC6A4*, nos quais se observa que a variação genética pode modular a influência da exposição a fatores ambientais de estresse celular (DORFMAN *et al.*, 2013; BAKUSIC *et al.*, 2017). Essa mesma variação também tem sido reportada como um fator que afeta os perfis de metilação do DNA nesses genes em diferentes contextos ambientais (BAKUSIC *et al.*, 2017).

1.2 Etiologia e epidemiologia da depressão

Entre as diversas psicopatologias existentes atualmente, a depressão ou depressão maior (do inglês *Major Depressive Disorder* – MDD) é a que apresenta a maior prevalência no mundo, atingindo aproximadamente 350 milhões de pessoas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Esse número de pessoas acometidas por depressão é maior que a população de países como o Brasil e os Estados Unidos (207,8 e 321,4 milhões respectivamente, segundo dados do Banco Mundial - 2015; www.worldbank.org). Esse transtorno representa a 4ª causa de incapacitação em todo o mundo, e de acordo com a OMS, em 2020 será a 2ª maior causa de incapacitação na sociedade moderna (WHO, 2012).

A depressão é caracterizada por queixas psicológicas constantes, como tristeza profunda, perda de interesse e prazer, sentimento de culpa e inutilidade, ideação suicida, distúrbio de sono e alimentar, fadiga e dificuldade de concentração (GUAN *et al.*, 2014). Muitas vezes a depressão, quando em estágio crônico, pode levar ao suicídio. Mais de 15% de indivíduos com depressão vêm a óbito devido ao suicídio, geralmente essa porcentagem está associada a indivíduos que não obtiveram tratamento adequado (MILANOVIC *et al.*, 2015). Aproximadamente 800 mil vidas são perdidas no ano devido a isso, o que representa cerca de 2000 mortes por suicídio todos os dias (WHO, 2015).

A depressão é um distúrbio complexo e multifatorial, podendo ocorrer devido a fatores genéticos e/ou devido a fatores ambientais em que o indivíduo é exposto durante a vida (HIDAKA, 2012; BAKUSIC *et al.*, 2017). Aproximadamente um terço do risco para o desenvolvimento da depressão é hereditário e dois terços são devidos a fatores externos (PROVENÇAL & BINDER, 2015).

Em um panorama geral, STEEL *et al.* (2014) em revisão de literatura, mostraram que a prevalência de psicopatologias ao longo da vida é de aproximadamente 29.2% (25,9–32,6%) e sua prevalência em um período de 12 meses é de aproximadamente 17,6% (16,3-18,9%) em cerca de 59 países.

FERRARI *et al.* (2013), em pesquisa baseada na prevalência de depressão entre países, mostraram que a prevalência de depressão variou de 2,46% (Japão) a 22,5% (Afeganistão). No Brasil, o índice de depressão é de 7,6% da população acima de 18 anos, equivalente a 11 milhões de pessoas (Dados do IBGE, 2013 - <http://www.ibge.gov.br>). Na cidade de São Paulo foi reportado uma prevalência de episódios de depressão no decorrer da vida de 18,4% e com 10,4% no período de 12 meses de prevalência (BROMET *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2013). Coelho *et al.* 2013 em pesquisa de prevalência de sintomas depressivos, mostraram que no Brasil esses sintomas ocorrem em 28,27% da população analisada (3,007 indivíduos), e que mulheres apresentam 2,65 vezes de chance a mais de terem depressão em comparação a homens. KESSLER & BROMET (2013) em avaliação em 18 países encontraram uma média de incidência de 5% dessa psicopatologia.

Diversos fatores estão associados a depressão, como gênero, idade, situação socioeconômica, entre outros. Estudos mostram que mulheres são duas vezes mais acometidas pela depressão em relação a homens (WHO, 2012; MILANOVIC *et al.*, 2015). De acordo com BROMET *et al.* (2011), essa diferença é significativa em 15 dos 18 países, e mesmo nos três países em que não houve diferença significativa, ainda assim as mulheres apresentaram maiores taxas de depressão do que homens. No Brasil os dados são semelhantes, com prevalência da enfermidade maior entre mulheres (10,9%) do que entre homens (3,9%) (Dados do IBGE, 2013 - <http://www.ibge.gov.br>).

Há estudos que mostram que a taxa de depressão decresce com a idade (ANDRADE *et al.*, 2003; BROMET *et al.*, 2011). BROMET *et al.* (2011) demonstraram que a média de idade de indivíduos acometidos pela depressão é semelhante entre países de alta e média-baixa renda (25,7 e 24 anos, respectivamente). Essa estatística é semelhante em 95% dos países avaliados, sugerindo que o período de risco para o início da depressão varia entre o meio da adolescência até os 40 anos em média. Em contrapartida, há estudos que sugerem que o padrão de idade não influencia no desenvolvimento do distúrbio e que essa variação de incidência pode estar associada a países de alta e baixa renda (VAN DE VELDE *et al.*, 2010).

Apesar desses dados epidemiológicos acrescentarem informações importantes para melhor interpretação dessa psicopatologia, com maiores incidências em relação a sexo, idade, entre outros, o desenvolvimento da depressão ocorre estritamente de forma individual. Outros fatores já supracitados, como as diferenças na exposição a fatores ambientais, por exemplo, entre países desenvolvidos e não desenvolvidos, e diferença na resposta individual ao estresse (perfis genéticos e epigenéticos) também são fatores determinantes no desenvolvimento da depressão.

1.3 Associação da depressão com o gene *SLC6A4*

Um grande número de genes tem sido associado a depressão, entre eles destacam-se os genes *SLC6A4*, *NR3C1*, *BDNF*, *MAOA*, *COMT*, *DRD2* e *HTR1A*. Entre os genes supracitados, o *SLC6A4* é um dos principais genes candidatos no envolvimento de psicopatologias, e além disso, apresenta vários relatos de alteração epigenética em pacientes com depressão (SUGAWARA *et al.*, 2011; BRAITHWAITE *et al.*, 2015; JANUAR *et al.*, 2015; MELAS & FORSELL, 2015).

O gene *transportador de 5-hidroxitriptamina (SLC6A4; 5-HTT; SERT)* codifica uma proteína integral de membrana que tem como função transportar serotonina da fenda sináptica para neurônios pré-sinápticos (FERRARI *et al.*, 2013). Esse gene está localizado no cromossomo 17 em humanos, na posição 17q11.1-q12 abrangendo um segmento cromossômico de 31Kb e 14 éxons (LESCH *et al.*, 1996).

O gene *SLC6A4* atua como o principal gene envolvido na regulação do sistema serotoninérgico e, além disso, age como um fator chave na susceptibilidade ao estresse (PROVENZI *et al.*, 2016). A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é um neurotransmissor que desempenha um papel crítico na modulação do humor, no ciclo de sono-vigília, na motivação, na percepção da dor e no efeito regulatório nas respostas ao estresse neuroendócrino (HORNUNG & HEIM, 2014).

Crescentes evidências apontam para função proeminente do comprometimento do sistema nervoso central (SNC) com o sistema 5-HT na

depressão, demonstrando em avaliações neuroendócrinas a atividade reduzida de neurônios serotoninérgicos em pacientes com depressão (MANN *et al.*, 1996; SAVEANU & NEMEROFF, 2012).

Diversos estudos têm procurado associar os polimorfismos do gene *SLC6A4* com alterações psicológicas e comportamentais, no entanto, os resultados até o presente momento são controversos devido ao grande número de variáveis que podem influenciar o efeito desse gene sobre os fenótipos que o mesmo influencia.

Entre os polimorfismos presentes nesse gene, o polimorfismo localizado aproximadamente -1.4 Kb do sítio de início da transcrição do mesmo, conhecido como 5-HTTLPR, é o que possui maior influência na modulação do comportamento humano e espécies de primatas não humano (GRESSIER *et al.*, 2016). O 5-HTTLPR consiste da inserção ou deleção de um fragmento de 43 pb compostos de pequenas repetições, os quais geram um alelo curto (S) e um alelo longo (L), com 14 e 16 elementos de repetição, respectivamente (cada um com 20-23 pb) (HEILS *et al.*, 1996). O alelo S está associado com a menor eficiência transcricional do promotor do gene *SLC6A4*, resultando na baixa absorção de serotonina em relação à absorção na presença do alelo L (PROVENZI *et al.*, 2016). O alelo L possui uma atividade transcricional duas a três vezes maior comparado ao alelo S, resultando em maiores níveis de captação de serotonina na fenda sináptica (CANLI & LESCH, 2007).

Dessa forma, supõe-se que o alelo S está mais propenso a conferir maior susceptibilidade a uma série de transtornos psiquiátricos, incluindo distúrbios de humor, transtorno obsessivo compulsivo, esquizofrenia, depressão, entre outros (PALMA-GUDIEL & FAÑANÁS, 2017).

Em adição, esse polimorfismo possui um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês - *Single Nucleotide Polymorphism*) sobreposto ao 5-HTTLPR, dentro da primeira das duas repetições extras do alelo L (alelo La e Lg) (GRESSIER *et al.*, 2016). Sendo assim, existe um terceiro alelo, derivado de um SNP (rs25531), que resulta na transição do nucleotídeo adenina por guanina. O alelo Lg está associado com baixos níveis de transcrição do gene *SLC6A4* e, dessa forma possui uma influência na transcrição semelhante ao alelo S (BOZINA *et al.*, 2012).

Em humanos, o polimorfismo 5-HTTLPR pode influenciar no desenvolvimento do sistema de serotonina em relação ao gênero. Estudos mostram que o genótipo 5-HTTLPR afeta a ligação a receptores centrais do sistema de serotonina (5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}) em mulheres (LOTHE *et al.*, 2009; GRESSIER *et al.*, 2016). Em relação a depressão, diversos estudos sugerem a maior associação do alelo S do 5-HTTLPR com depressão em mulheres do que em relação a homens em comparação com o alelo L (GONDA *et al.*, 2011). RUCCI *et al.* (2009) mostraram maior associação da depressão em mulheres com genótipo S/S baseado em 222 pacientes diagnosticados com depressão.

ZHAO *et al.* (2013), em um estudo entre gêmeos monozigóticos, encontraram maior nível de metilação do DNA em diferentes regiões do gene em indivíduos com sintomatologia de depressão mais elevada. Esses mesmos autores correlacionaram o aumento de metilação do DNA apenas em indivíduos portadores do alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR.

Outro polimorfismo do gene *SLC6A4*, localizado no intron 2 (STin2), consiste em uma VNTR, atuando como um elemento regulatório acentuador (*enhancer*) da transcrição. Essa VNTR consiste em aproximadamente 16 a 17 pb de sequências repetitivas que também está associada com a predisposição a psicopatologias como a esquizofrenia e a aspectos específicos da depressão (OGILVIE *et al.*, 1996; LAUZURICA *et al.*, 2003). O STin2 apresenta dois alelos comuns de 10 e 12 repetições e dois alelos raros de 9 e 11 elementos repetitivos (MURDOCH *et al.*, 2013).

MURDOCH *et al.* (2013), em pesquisa de prevalência populacional dos polimorfismos do *SLC6A4* demonstraram que curiosamente a distribuição do alelo de 9 elementos repetitivos ocorre em baixa frequência e apenas nos países europeus, semelhante aos resultados encontrados por OGILVIE *et al.* (1996). Enquanto o alelo de 11 elementos repetitivos ocorreu especificamente em apenas duas populações Africanas. Os alelos 9 e 11 representam uma frequência de aproximadamente 1% em todo o mundo. Os alelos 10 e 12 são os mais encontrados, sendo o alelo 12 o mais prevalente na maioria dos países (MURDOCH *et al.*, 2013).

Esta região atua como regulador da transcrição em diferentes níveis, no qual o alelo 12 com maior atividade de transcrição do gene quando comparado

ao alelo 10 (LOVEJOY *et al.*, 2003). No entanto, o genótipo homozigoto do alelo 12 está mais sujeito a disponibilidade reduzida de serotonina no cérebro (SAROSI *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2015).

Estudos indicam que indivíduos que apresentam o genótipo homozigoto STin2.12/STin2.12 para o polimorfismo exibem um maior risco de apresentarem transtorno de personalidade antissocial (GARCIA *et al.*, 2010). Outros apontam uma associação significativa do alelo 12 do STin2 com distúrbios como a esquizofrenia, transtornos de ansiedade e transtorno bipolar (OHARA *et al.*, 1999; FAN & SKLAR, 2005; SAROSI *et al.*, 2008).

LARA *et al.* (2006) demonstraram uma associação significativa entre o suicídio e a presença de ao menos uma cópia do alelo 10 do STin2. Diferente dos resultados publicados por LARA *et al.* (2006), HRANILOVIC *et al.* (2004) e BOZINA *et al.* (2012) não encontraram uma relação significativa entre os genótipos da região STin2 e suicídio em estudos que compararam indivíduos com tentativa de suicídio, indivíduos com ideações suicidas e indivíduos que relataram nunca ter tido ideação suicida. No entanto, os três estudos supracitados encontraram uma correlação da presença do alelo 10 a comportamentos suicidas.

Embora diversos estudos abordem a relação do polimorfismo STin2 com várias psicopatologias, a sua associação com depressão ainda é inconsistente. SAROSI *et al.* (2008) não encontraram diferença significativa na frequência alélica entre o grupo de pacientes e o grupo controle.

Estudos indicam que 33% dos casos de depressão ocorrem devido a fatores herdados geneticamente e 67% devido a fatores ambientais (SULLIVAN *et al.*, 2000; SAROSI *et al.*, 2008). Essa interação epigenótipo x ambiente poderia explicar muitas discordâncias relativas às associações ao polimorfismo 5-HTTLPR e a ocorrência de doenças. Essa correlação demanda a investigação de um maior número de amostras e uma melhor designação etiológica da população controle ou estudos em sistemas com variáveis controladas (DAMMANN *et al.*, 2011).

1.4 A depressão materna como fator de estresse ambiental para a depressão em crianças

A exposição parental ao estresse crônico, na qual resulta em psicopatologias como a depressão, é um grande fator de risco que contribui com a maior susceptibilidade de psicopatologias em crianças (BOWERS & YEHUDA, 2016).

No mundo, aproximadamente 5% dos adolescentes sofrem de depressão (WHO, 2012). Nos Estados Unidos, 50% dos indivíduos com psicopatologias desenvolveram a doença antes dos 14 anos (KESSLER *et al.*, 2005).

A exposição dos pais a fatores de estresse pode aumentar o risco para o surgimento de doenças para as próximas gerações através de possíveis alterações epigenéticas adquiridas durante diferentes fases do desenvolvimento humano e, pela interação com o contexto genético dos descendentes (LIU *et al.*, 2012; NON *et al.*, 2014; CONRADT *et al.*, 2016).

Tem sido demonstrado que estresse parental pode afetar o desenvolvimento embrionário (FRANKLIN *et al.*, 2010; DIAS & RESSLER, 2014; GAPP *et al.*, 2014). O período crítico de maior vulnerabilidade a falhas epigenética, decorrente da exposição a fatores ambientais, ocorre principalmente no período intrauterino e nos primeiros anos de vida do indivíduo (ONG *et al.*, 2015).

Por exemplo, WATSON *et al.* (1999) relataram que indivíduos que vivenciaram o terremoto Tangshan na China em 1976 ainda no período gestacional, apresentaram sintomas significativos de depressão comparados aos indivíduos controle não expostos. O'CONNOR *et al.* (2003) mostraram a influência da depressão materna durante a gestação em crianças de 6-7 anos de idade, sendo que as crianças com mães depressivas apresentaram altos níveis de ansiedade e sintomas depressivos comparado ao grupo controle.

Fatores ambientais vivenciados por parte dos pais e sua influência no desenvolvimento tanto fisiológico quanto psíquico da criança estão intimamente ligadas à hipótese conhecida como Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD – do inglês, *Developmental Origins of Health and Disease*) (RIAL-SEBBAG *et al.*, 2016). De acordo com essa hipótese, a exposição a

eventos de estresse no início da vida (durante o desenvolvimento embrionário, fetal e nos primeiros anos da vida pós-natal) podem contribuir na mudança da atividade de um gene através da indução de alterações epigenéticas, podendo em longo prazo aumentar as chances de um indivíduo desenvolver doenças psiquiátricas, imunes, metabólicas ou mesmo alguns tipos de câncer (RIAL-SEBBAG *et al.*, 2016).

Os efeitos gerados pelo estresse podem ser adquiridos pela criança independentemente de serem hereditários ou não. Mudanças fenotípicas geradas por mecanismos epigenéticos podem ocorrer como consequência de alienação parental, maus tratos, separação dos pais, entre outros (VOSTANIS *et al.*, 2006; BOWERS & YEHUDA, 2016).

O efeito do cuidado materno no desenvolvimento do sistema de resposta ao estresse é mediado por mudanças nos níveis de expressão de genes específicos, envolvidos na regulação de respostas comportamentais e endócrinas ao estresse. Estudos em roedores, por exemplo, demonstraram que removendo os filhotes recém-nascidos de suas mães, provocaram alterações nas respostas neurais, hormonais e comportamentais dos mesmos (WEAVER *et al.*, 2004; VAN OTTERDIJK & MICHELS, 2016).

A associação entre depressão materna e alterações comportamentais e emocionais em crianças é bem descrita na literatura. Crianças que vivem em um ambiente onde a mãe apresenta depressão geralmente apresentam menores níveis afetivos, além de diminuição cognitiva e de linguagem, estando mais sujeitas a desenvolverem transtornos depressivos ou até mesmo outros transtornos psiquiátricos (ROHDE *et al.*, 2005; KLUCZNIOK *et al.*, 2016).

A depressão em mães pode afetar a interação entre mãe e filho. Mães com depressão podem apresentar comportamentos negativos em resposta ao estado emocional de seus filhos, e tendem a expressar maiores sentimentos de raiva, crítica e tristeza em relação a mães que não apresentam esse transtorno (McCARTY & McMAHON, 2003; JOORMANN, TALBOT, & GOTLIB, 2007; MENDES *et al.*, 2011).

Como supracitado, nas últimas décadas diversos genes têm sido caracterizados como marcadores moleculares da susceptibilidade da depressão, (como por exemplo, o *SLC6A4*). Além da contribuição genética,

evidências sugerem um envolvimento de mecanismos epigenéticos na determinação da herança fenotípica em doenças psiquiátricas com a possibilidade de herança transgeracional dessas alterações epigenéticas (BRUXNER & WHITELAW, 2008; BABENKO *et al.*, 2015).

Grande parte dos estudos sobre variação epigenética desse gene não discriminam sua origem alélica, podendo prejudicar na avaliação dos valores reais dessa variação decorrente da exposição ambiental. Dando suporte a essa hipótese, pode-se citar o simples fato que o polimorfismo 5-HTTLPR (o qual afeta a expressão de *SLC6A4*) gera um módulo de regulação alelo específico (GLATZ *et al.*, 2003).

O estudo das bases moleculares associadas a doenças psiquiátricas humanas é uma tarefa de difícil execução, devido à complexidade da interação entre os mecanismos moleculares que as medeiam e ao impacto dos fatores ambientais sobre a modulação dos mesmos. Neste contexto, a natureza multifatorial da depressão justifica a proposta deste estudo em investigar a interação de fatores genéticos e epigenéticos no gene *SLC6A4* potencialmente associado à etiologia da depressão.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a investigação de fatores genéticos (polimorfismos 5-HTTLPR e STin2) e epigenéticos (5mC em um elemento *AluJb*) do gene *SLC6A4* em binômios de mães-filhos com e sem diagnóstico de depressão maior.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar se a variação genética e epigenética no gene *SLC6A4* estão associados a casos de depressão em binômios mães-filhos diagnosticados com transtorno de depressão maior.

2.2 Específicos

- Avaliar a associação dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 amostra populacional de binômios mães-filhos diagnosticados com transtorno de depressão maior;

- Relacionar as frequências dos polimorfismos encontradas com a ocorrência ou não de depressão nas crianças diagnosticadas com transtorno de depressão maior;

- Avaliar a associação dos polimorfismos do gene *SLC6A4* com o transtorno de depressão entre pacientes e com o grupo controle;

- Relacionar as combinações genotípicas dos polimorfismos de estudo com a ocorrência de depressão nas amostras estudadas;

- Relacionar o perfil de metilação do DNA no promotor do gene *SLC6A4* com a ocorrência de depressão nas amostras estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação *in silico* das regiões diferencialmente metiladas em pacientes com depressão maior (MDD-DMR) no *SLC6A4* humano

Para identificação de MDD-DMRs foi utilizado o banco de dados do *MethylomeDB*, o qual contém dados de metilação do DNA de amostras pós-morte de córtex pré-frontal ventral (*ventral prefrontal cortex* – vPFC) de pacientes com depressão maior e indivíduos saudáveis (controles) (XIN *et al.*, 2012; <http://www.neuroepigenomics.org/methylomedb>). Os dados de metilação e base única foram analisados em planilha de Windows Excel 2010. A diferença entre a média das amostras de pacientes com MDD foi subtraída da média das amostras dos pacientes controles. Os resultados com valores de aumento ou diminuição de no mínimo 10% foram consideradas diferencialmente metiladas (MDD-DMRs).

3.2 Amostras de DNA genômico

As amostras de DNA genômico utilizadas no presente estudo (total de 213) foram cedidas pelo Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa, Professor Associado do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). As amostras foram coletadas na Unidade Básica de Saúde da cidade de Uberaba, no estado de Minas Gerais. Os projetos que originaram a coleta de amostras para esta pesquisa foram encaminhados, apreciados e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Uberaba - UNIUBE, (CAAE: 0039.0.227.000-06) (ANEXO A). As amostras foram extraídas de amostras de epitélio bucal segundo o protocolo de salting out (Miller *et al.*, 1988).

3.3 População de estudo

As amostras de DNA são derivadas de extração de células bucais de amostras compostas por mulheres/mães e crianças/filhos de cidade de Uberaba, MG. O bairro onde está localizado a Unidade Básica de Saúde é afastado do centro da cidade, tendo o deslocamento de moradores limitado pela distância. A maioria dos indivíduos desse bairro são de baixa renda econômica e com pouco acesso a transporte.

A amostra de estudo foi constituída por binômios mães-filhos, sendo 109 mães e 104 crianças. Esse total foi dividido entre grupo G1 (105 indivíduos), no qual todas as crianças convivem com mães com depressão (crianças com e sem depressão), e G2 (108 indivíduos), no qual representa o grupo controle, mães e filhos sem diagnóstico de transtorno depressivo.

O grupo G1, foi subdividido em G1A (32 indivíduos), sendo mães e filhos com diagnóstico de depressão, e G1B (71 indivíduos), no qual os filhos convivem com mães com depressão, mas não apresentam o distúrbio.

Os dados para confirmação do diagnóstico de depressão nesses pacientes foram realizados pela Prof^a. Dr^a. Ana Vilela Mendes. Para a identificação dos indivíduos com depressão, esses foram submetidos a um questionário de rastreamento PHQ-9 (para diagnóstico de Desordem de Depressão Maior do DSM-IV) e uma avaliação por meio da SCID (Entrevista Clínica Estruturada para DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4^a edição). Além disso, para diagnóstico de depressão das crianças foi feito um levantamento sobre o Desenvolvimento e Bem-Estar de Crianças e Adolescentes (DAWBA) que fornece diagnósticos psiquiátricos com base nos critérios do DSM-IV e CID-10 (Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde, 10^a revisão) (OMS, 1992).

Todas as mães foram submetidas a questionários suplementares, com informações como, idade das mães e dos filhos, sexo das crianças, grau de escolaridade materna, situação socioeconômico, formato familiar (monoparental e biparental) e número de membros da família. Outros fatores associados a fatores de risco biológico também foram avaliados, como histórico

obstétrico da mãe, histórico psicológico familiar, suporte social, problemas no contexto escolar da criança, problemas econômicos e familiares.

3.4 Quantificação do DNA genômico

Para cada amostra foi quantificada 1µL de DNA através da leitura em espectrofotômetro (*NanoDrop2000*). A pureza do DNA foi verificada a partir da relação 260/280nm, sendo o último comprimento de onda utilizado para detectar proteínas. Quando a relação das densidades ópticas (260/280) obtidas estivesse entre valores de 1.8 a 2.0, o material era considerado como tendo boa qualidade para uso.

3.5 Desenho dos *primers*

Todos os *primers* utilizados no presente estudo foram desenhados utilizando os programas *Generunner v.3.05* (Hastings Software Inc.) e *UGENE*, a partir de sequências depositadas no banco de dados da Universidade da Califórnia Santa Cruz – UCSC (<http://genome.ucsc.edu>). As coordenadas genômicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 foram obtidas de ALI *et al.* (2010). As sequências referentes a quantificação de 5mC foram escolhidas segundo análise dos perfis diferenciais de metilação do DNA em tecido cerebral de pacientes com depressão e controles saudáveis depositados no banco de dados *MethylomeDB* (XIN *et al.*, 2012).

3.6 Genotipagem dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2-VNTR

Para genotipagem das VNTRs supracitadas foram utilizados os *primers*: 5-HTTLPR (F): 5'-CCCAGCAACTCCCTGTACC-3' e 5-HTTLPR (R): 5'-GGATAATGGGGGTTGAGG-3' correspondente à amplificação da região chr17:28564231-28564436 (17q11.2-GRCh37/hg19); STin2-VNTR (F): 5'-GTCAGTATCACAGGCTGCGAG-3' e STin2-VNTR (R): 5'-TGTTCCTAGTCTTACGCCAGTG-3' correspondente à amplificação da região chr17:28548335-28548633, (17q11.2 - GRCh37/hg19).

Para os ensaios de PCR foram realizadas em um volume final de 10µL (50mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl; dNTPs (100µM cada); *primers* (100nM cada); 1.5mM MgCl₂; 0.25U de Unitaq50 DNA Polimerase (Uniscience). A ciclagem de PCR foi realizada com 5 minutos a 95°C de desnaturação inicial, seguidos 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida (12%) corados com nitrato de prata (AgNO₃) 0.2%.

3.7 Sequenciamento de alelos do polimorfismo STin2

Devido o polimorfismo do intron 2 do gene *SLC6A4* humano possuir quatro alelos diferentes (STin2.12, STin2.10, STin2.11 e STin2.9) foi realizado sequenciamento do tipo *Sanger* para confirmação de quais alelos estavam sendo identificados no presente estudo. Foram predominantemente encontrados (em mais de 99% das amostras) dois perfis de amplificação. Dessa forma, foram sequenciadas duas amostras de indivíduos homozigotos para o alelo de maior fragmento amplificado e duas amostras de indivíduos para o de menor fragmento amplificado apenas para confirmação de quais alelos estavam sendo identificados na amostra estudada. Amostras de produto de PCR foram enviadas para o sequenciamento customizado, realizado pela empresa EUROFINS (Indaiatuba, SP- Brasil).

3.8 Ensaio com enzimas de restrição sensíveis a metilação associadas a PCR quantitativa (MSRED-qPCR)

A análise quantitativa do padrão de metilação das amostras estudadas foi realizada por PCR em tempo real conforme o protocolo de GOMES *et al.* (2007). Os *primers* utilizados para mensurar a metilação do DNA foram: 5-HTT-AluJb-5mC-F 5'- TGAGTAGCTGGGAACACAAG - 3' e 5-HTT-AluJb-5mC-R - 5'- TAACCAGCTACAGTTCAAAGC - 3, os quais amplificam um fragmento correspondente as coordenadas chr17:28563365-28563550 (17q11.2-GRCh37/hg19), pertencentes a uma CGI-*shore* no promotor do gene *SLC6A4*. As porcentagens de metilação do DNA de cada amostra foram calculadas

segundo a fórmula $5mC\% = 100 \times 0.5^{(-\Delta Ct)}$ ($\Delta Ct = Ct$ da amostra digerida – Ct da amostra não digerida) (GOMES *et al.*, 2007). Para o ensaio de qPCR, 150ng de cada amostra de DNA foi digerida com 5U de enzimas de restrição sensíveis a metilação *HpaII* (New England - Biolabs). As amostras de DNA foram incubadas por 4 horas a 37°C e posteriormente a 65°C por 20 minutos para inativação da enzima. O ensaio de digestão enzimática foi realizado em um volume final de 20µL (17,3µL ddH₂O, 2,0µL Tp10x, 0,2µL BSA (10000ng/µL), 0,5µL (5U) *HpaII*). Para controle foi utilizado DNA das amostras não digeridas; sendo que o volume da enzima foi substituído por H₂O Milli-Q. Os ensaios de qPCR foram realizados em um volume final de 10µL [10µM de cada *primer* (5-HTT-AluJb-5mC-F e 5-HTT-AluJb-5mC-R); 5,0µL PCR Master Mix – Sybr Green (AppliedBiosystem); 0,2µL água Milli-Q; 4,5µL de cada amostra (±10 ng de DNA)]. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; e 72°C por 30 segundos. Toda distribuição das alíquotas de mix de qPCR e das amostras de DNA digeridas e não digeridas foi realizada utilizando um micropipetador eletrônico monocanal da marca Gilson.

3.9 Análise estatística

Para averiguação se as frequências genóticas do polimorfismo 5-HTTLPR e STin2 estavam em concordância a hipótese de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi utilizado o teste de χ^2 utilizando a planilha online *Court lab - HWE calculator* (COURT, 2005). As análises de associação genotípica com indivíduos diagnosticados com depressão e entre caso controle foi realizada utilizando o teste exato de Fisher com subsequente cálculo da *Odds Ratio* (IC 95%) utilizando o software GaphPad Prism® 5.0. A análise dos resultados da quantificação da 5mC% foi realizada utilizando teste t ou *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de pos hoc de Newman-Keuls utilizando o software GaphPad Prism® 5.0. Para todas as análises estatísticas foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2-VNTR em pacientes com depressão e controles

Com os resultados obtidos dos ensaios de PCR qualitativa e visualização em gel de poliacrilamida (12% v/v) corado com nitrato de prata (0,2% w/v), foi possível genotipar os polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 (Figura 1A e 1B). Foram genotipadas no total 210 amostras de DNA para o 5-HTTLPR e para STin2.

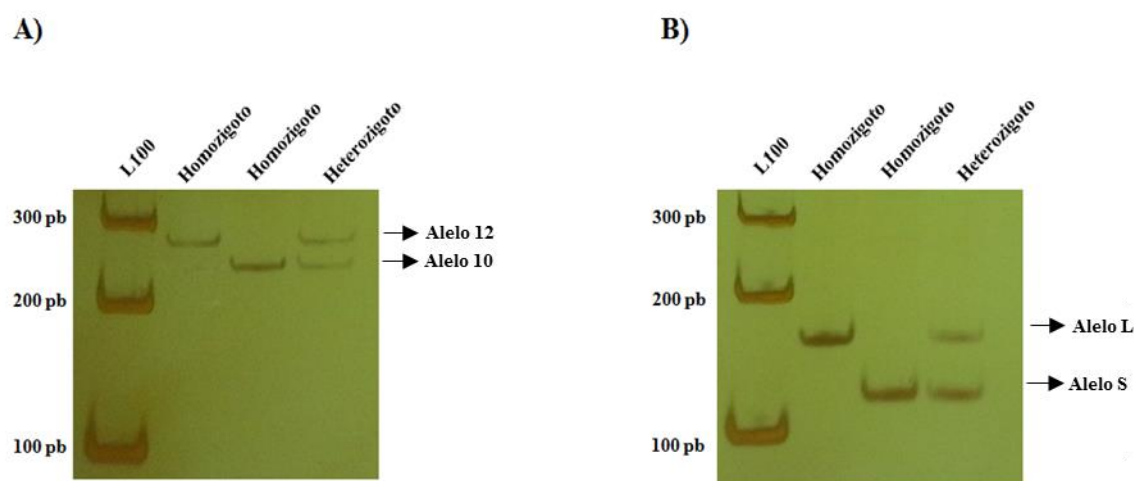


Figura 1 **Genotipagem das regiões STin2 e 5-HTTLPR do gene SLC6A4.** Géis de poliacrilamida (12%) corado com nitrato de prata (0,2% w/v) mostrando: Gel A: Poço 1 = padrão de peso molecular de 100 pares de base (ladder); Poço 2, 3 e 4 = produto de amplificação por PCR com os pares de primers para a amplificação do polimorfismo 5-HTTLPR. Gel B: Poço 1 = padrão de peso molecular de 100 pares de base (ladder); Poço 2, 3 e 4 = produto de amplificação por PCR com os pares de primers para a amplificação do polimorfismo STin2.

Devido ao polimorfismo STin2 contar com 4 alelos (STin2.9, STin2.10, STin2.11 e STin2.12) foi realizado o sequenciamento tipo Sanger de dois indivíduos homozigotos de maior fragmento amplificado e dois indivíduos de menor fragmento amplificado, para averiguação de quais alelos estavam sendo representados na amostra estudada (Figura 2). Os produtos de amplificação por PCR sequenciados correspondem aos perfis eletroforéticos de 99% dos encontrados no presente estudo

```

126_Stin2.12      GACACACGGCACTCTATCCCAGCGACCACCACCACCCTAGTGGCTGAGCT
136_Stin2.12      GACACACGGCACTCTATCCCAGCGACCACCACCACCCTAGTGGCTGAGCT
178_Stin2.10      GACACACGGCACTCTATCCCAGCGACCACCACCACCCTAGTGGCTGAGCT
185_Stin2.10      GACACACGGCACTCTATCCCAGCGACCACCACCACCCTAGTGGCTGAGCT
*****

126_Stin2.12      TCATCAAGGGGAACGGGAGACCTGGGGCAAGAAGGTGGATTTCCTTCTCT
136_Stin2.12      TCATCAAGGGGAACGGGAGACCTGGGGCAAGAAGGTGGATTTCCTTCTCT
178_Stin2.10      TCATCAAGGGGAACGGGAGACCTGGGGCAAGAAGGTGGATTTCCTTCTCT
185_Stin2.10      TCATCAAGGGGAACGGGAGACCTGGGGCAAGAAGGTGGATTTCCTTCTCT
*****

126_Stin2.12      CAGTGATTGGCTATGCTGTGGACCTGGGCAATGTCTGGCGCTTCCCCTAC
136_Stin2.12      CAGTGATTGGCTATGCTGTGGACCTGGGCAATGTCTGGCGCTTCCCCTAC
178_Stin2.10      CAGTGATTGGCTATGCTGTGGACCTGGGCAATGTCTGGCGCTTCCCCTAC
185_Stin2.10      CAGTGATTGGCTATGCTGTGGACCTGGGCAATGTCTGGCGCTTCCCCTAC
*****

126_Stin2.12      ATATGTTACCAGAATGGAGGGGGTCAGTATCACAGGCTGCGAGTAGAGGC
136_Stin2.12      ATATGTTACCAGAATGGAGGGGGTCAGTATCACAGGCTGCGAGTAGAGGC
178_Stin2.10      ATATGTTACCAGAATGGAGGGGGTCAGTATCACAGGCTGCGAGTAGAGGC
185_Stin2.10      ATATGTTACCAGAATGGAGGGGGTCAGTATCACAGGCTGCGAGTAGAGGC
*****

126_Stin2.12      TGTGACCCAGGGTGGGCTGTGACCCGGAGTGGGCTGTGACCCGGGGTGGG
136_Stin2.12      TGTGACCCAGGGTGGGCTGTGACCCGGAGTGGGCTGTGACCCGGGGTGGG
178_Stin2.10      TGTGACCCAGGGTGGGCTGTGACCCGGAGTGGGCTGTGACCCGGGGTGGG
185_Stin2.10      TGTGACCCAGGGTGGGCTGTGACCCGGAGTGGGCTGTGACCCGGGGTGGG
*****

126_Stin2.12      CTGTGACCCGGGTGGGCTGCGACCTGGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGG
136_Stin2.12      CTGTGACCCGGGTGGGCTGCGACCTGGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGG
178_Stin2.10      CTGTGACCCGGGTGGGCTGCGACCTGGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGG
185_Stin2.10      CTGTGACCCGGGTGGGCTGCGACCTGGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGG
*****

126_Stin2.12      CTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGGGGTGGGCTGTGACCCGGGTGGGC
136_Stin2.12      CTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGGGGTGGGCTGTGACCCGGGTGGGC
178_Stin2.10      CTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGG-----
185_Stin2.10      CTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGG-----
*****

126_Stin2.12      TGTGACCTGGGGTGGGCTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGGC
136_Stin2.12      TGTGACCTGGGGTGGGCTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGGC
178_Stin2.10      -----GGTGGGCTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGGC
185_Stin2.10      -----GGTGGGCTGTGACCCGGGTGGGCTGTGACCTGGGATGGGC
*****

126_Stin2.12      TGTAGGTCCTCTTGAGAGGCCAGAAGACAGATTATGTCTTTTCAGTCT
136_Stin2.12      TGTAGGTCCTCTTGAGAGGCCAGAAGACAGATTATGTCTTTTCAGTCT
178_Stin2.10      TGTAGGTCCTCTTGAGAGGCCAGAAGACAGATTATGTCTTTTCAGTCT
185_Stin2.10      TGTAGGTCCTCTTGAGAGGCCAGAAGACAGATTATGTCTTTTCAGTCT
*****

```

Figura 2 Alinhamento das sequencias de DNA de homozigotos STin2.12/STin2.12 e STin2.10/STin2.10. Foi utilizado o software online para alinhamentos múltiplos T-Cooffe (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffe>). Os “gaps” no alinhamento representam a falta das repetições 9 e 10 do alelo STin2.10.

As sequências encontradas correspondem aos alelos STin2.12 e STin2.10 segundo comparação os dados publicados por MURDOCH *et al.*

(2013). Na amostra populacional estudada esses foram os alelos predominantes, o que seria esperado em populações da América (MURDOCH *et al.*, 2013).

4.1.1 O polimorfismo 5-HTTLPR

Nos resultados de distribuição dos genótipos encontrados no presente estudo para o polimorfismo 5-HTTLPR, foi analisado um total de 210 indivíduos, incluindo pacientes com depressão e controles. Foi observada uma prevalência do genótipo para o homozigoto do alelo menor (S/S) com 43,81%. Os genótipos para o homozigoto maior (L/L) e heterozigoto (S/L) apresentaram frequências de 29,52% e 26,67%, respectivamente. As frequências alélicas observadas foram de 57,14% para o alelo S e 42,86% para o alelo L.

Em relação aos resultados entre os grupos controle e com depressão, avaliando apenas indivíduos adultos, visto que as amostras eram compostas de indivíduos consanguíneos, em ambos os grupos foram encontrados maior frequência do genótipo S/S no grupo com depressão (41,10%) e para o grupo controle (42,96%). As frequências alélicas observadas foram de 45,28% no grupo com depressão e 37,96% no grupo controle para o alelo L; e 54,72% no grupo com depressão e 62,04% no grupo controle para o alelo S (Tabela 1).

Apesar de não contar com dados de migração ou de consanguinidade nessas amostras é interessante observar que as frequências genotípicas para o polimorfismo 5-HTTLPR não seguem o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (para $p < 0.05$) (Tabela 1).

Considerando a alta variabilidade das frequências genotípicas desse polimorfismo em diferentes populações em todo mundo, essas prevalências de um genótipo em relação ao outro podem ocorrer (MURDOCH *et al.*, 2013; CHIAO *et al.*, 2010). Uma prevalência de genótipos carregando o alelo S especialmente de homozigotos S/S estão presentes em ambos os grupos de pacientes com depressão e controle, o que poderia ser pensado como um fator genético populacional específico para predisposição a depressão.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo 5-HTTLPR encontradas nos grupos de indivíduos adultos com depressão e controles.

Controle = todos os indivíduos adultos genotipados sem diagnóstico de depressão;
 Depressão = todos os indivíduos adultos genotipados com diagnóstico de depressão;
 HWE valor-p = valores de p derivados de teste χ^2 para averiguação de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Grupos	Indivíduos	Frequências genotípicas e alélicas (%)					HWE
	Adultos						Valor-p
	N	LL	SL	SS	Alelo L	Alelo S	
Depressão	53	32,08	26,42	41,10	45,28	54,72	0,000675
Controle	54	22,22	31,48	46,30	37,96	62,04	0,014809

No Brasil poucos trabalhos têm mostrado a distribuição dos genótipos do 5-HTTLPR na população. OLIVEIRA *et al.* (2000) analisaram o polimorfismo da região promotora do gene *SLC6A4* em uma população brasileira e encontraram frequências de S/L (44,99%), L/L (37,79%) e S/S (17,22%) e a frequência alélica observada foi de L (60,28%) e S (39,72%). Em um estudo mais recente, GREVET *et al.* (2007) observaram uma frequência genotípica de 55,29% (S/L), 18,61% (S/S) e 26,09% (L/L), com frequência alélica de 46,26% para S e 53,74 para L (Tabela 2).

Os resultados do presente estudo diferem dos resultados obtidos também pelo nosso grupo em uma população de Campos dos Goytacazes – RJ, onde foi encontrado uma frequência alélica L e S de 50%, com distribuição genotípica predominante de S/L (43,4%) (MENDONÇA *et al.*, 2015 – dados não publicados) (Tabela 2). As frequências apresentadas para o genótipo S/S diferem das demais publicações em populações brasileiras, sendo a maior encontrada (Tabela 2).

Tabela 2 Comparação entre os resultados encontrados na amostra total do presente estudo e dados publicados na literatura em populações brasileiras.

Estudos de população Brasileira	Indivíduos (N)	Frequências genotípicas e alélicas 5-HTTLPR (%)				
		LL	SL	SS	Alelo L	Alelo S
Mendonça <i>et al</i> (2017) (Estudo atual)	210	29,52	26,67	43,81	42,86	57,14
Mendonça <i>et al</i> (2015) (Dados não publicados)	106	28,3	43,4	28,3	50	50
Wachleski <i>et al.</i> (2008)	67	34,33	44,78	20,90	56,72	43,28
Oliveira <i>et al.</i> (2000)	389	37,79	44,99	17,22	60,28	39,72
Meira-Lima <i>et al.</i> (2004)	279	29,03	49,46	21,51	53,76	46,24
Marques <i>et al.</i> (2006)	332	27,41	52,41	20,18	53,61	46,39
Grevet <i>et al.</i> (2007)	548	26,09	55,29	18,61	53,74	46,26
Costa <i>et al.</i> (2008)	132	19,70	40,91	39,39	40,15	59,85
Zimmermann-Peruzatto <i>et al.</i> (2012)	113	32,7	50,4	16,9	42	58

Conforme supracitado na seção da introdução, o alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR pode conferir maior susceptibilidade a uma série de doenças psiquiátricas, devido sua associação com diminuição dos níveis de transcritos do gene, resultando na menor captação de serotonina da fenda sináptica (PALMA-GUDIEL & FAÑANÁS, 2017).

No entanto, apesar do grande número de estudos de associação do polimorfismo 5-HTTLPR a transtornos psiquiátricos como a depressão, os resultados da literatura apresentam muitas discordâncias entre si. Há estudos que sugerem maior associação do alelo S com etiologia de doenças psiquiátricas e outros que não encontram associação entre grupos com psicopatologias e controles, e a prevalência do alelo S (IGA *et al.*, 2016; TALATI *et al.*, 2015).

WATANABE *et al.* (2015), em um estudo em uma população japonesa, não encontraram diferença significativa na distribuição genotípica e na frequência alélica entre pacientes com depressão maior e controles (Tabela 3). Esses autores encontraram uma frequência do genótipo L/L (3,7% em

pacientes; 1,9% em controles) muito inferior aos resultados apresentados pelo nosso grupo (25,4% em pacientes; 27,5% em controles).

Em contrapartida, GROCHANS *et al.* (2013) em um estudo em mulheres com depressão em uma população polonesa, mostraram resultados divergentes aos do presente estudo. Esses autores encontraram frequências maiores do genótipo L/L em ambos os grupos, pacientes com depressão (48,4%) e controles (42,4%), e também frequência maior do alelo L, com 66,9% em pacientes e 63,3% em controles (Tabela 3).

Os resultados encontrados no presente estudo se assemelham aos de ZHANG *et al.* (2015) em estudo sobre a frequência do polimorfismo 5-HTTLPR em mulheres com depressão pós-parto, apresentando também uma predominância do genótipo S/S (55%) em um total de 260 indivíduos, incluindo pacientes com depressão e controles. O mesmo estudo encontrou a frequência alélica de 76,6% para o alelo S (Tabela 3).

Em um estudo com 369 adolescentes diagnosticados com depressão, ELEY *et al.* (2004) também apresentaram resultados similares ao encontrado em nosso estudo, com frequência de 56,09% para o alelo S e 43,90% para o alelo L.

Já é conhecido que as frequências dos alelos associados aos polimorfismos 5-HTTLPR podem variar entre diferentes etnias (MURDOCH *et al.*, 2013; CHIAO *et al.*, 2010). No entanto, não existe uma correlação direta entre as frequências desse polimorfismo e os índices de prevalência de depressão em uma população específica.

Ao se comparar a prevalência de depressão entre diferentes países e os resultados de frequências genóticas e alélicas do 5-HTTLPR revisadas por CHIAO *et al.* (2010), essa discordância genótipo-fenótipo pode ser melhor observada. Por exemplo, em países como o Japão, que apresentam a menor incidência de depressão (2,46%) entre os países estudados por FERRARI *et al.* (2013), apresentam a frequência do alelo S ($\pm$ 81,3%) consideravelmente superior ao alelo L ($\pm$ 18,7%) em pacientes com depressão (WATANABE *et al.*, 2015; IGA *et al.*, 2016). Da mesma forma, a Coreia do Sul, que assim como o Japão apresenta baixa prevalência dessa psicopatologia (2,48%) mostrou em

estudo realizado por LEE *et al.* (2015) alta frequência do alelo S (76,1%) em relação ao alelo L (23,9%) em pacientes com depressão.

Em contrapartida, países Europeus que apresentam maior prevalência dessa psicopatologia em comparação com o Japão e Coreia, como a Itália (4,84%) e a Polônia (3,91%) indicaram menor frequência do alelo S (37,58% na Itália; 36,4% na Polônia) em relação ao alelo L (62,42% na Itália; 63,3% na Polônia) (TALATI *et al.*, 2015; GROCHANS *et al.*, 2013).

Esses exemplos da discordância entre genótipo e fenótipo em estudos de diferentes países, corroboram para o entendimento da ausência de diferenças entre as frequências alélicas e genotípicas de pacientes com depressão e controles, encontrados no presente estudo. Apenas a presença de alelos para susceptibilidade a depressão não seriam o suficiente para ocorrência dessa psicopatologia. A interação com outros polimorfismos ou com fatores ambientais poderiam contribuir em conjunto aos genótipos do 5-HTTLPR para o surgimento do quadro clínico da depressão.

Assumindo que portadores de ao menos um alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR possuam níveis mais baixos de transcritos, foi avaliado se a frequência genotípica de S/S e S/L juntos em comparação com L/L para verificar a susceptibilidade de indivíduos portadores de alelo S desenvolver depressão. Dessa forma, foram utilizados o teste exato de Fisher e a medida referente à *Odds Ratio* (OR).

Nas amostras analisadas no presente estudo, não foram encontradas diferenças significantes entre indivíduos com depressão e controles portadores de ao menos um alelo S (valor-p = 1,00). O valor de OR encontrado foi de 1,04 entre indivíduos com depressão e indivíduos controle, ou seja, indivíduos com depressão possuem 4% de chance a mais de apresentar o alelo S em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 3 Frequências de genótipos associados ao polimorfismo 5-HTTLPR em estudos comparativos entre pacientes com depressão e controles em diferentes países.

Autor	Pacientes (N)	Frequências genotípicas e alélicas - MDD (%)					Indivíduos (N)	Frequências genotípicas e alélicas - Controle (%)					País
		LL	SL	SS	Alelo L	Alelo S		LL	SL	SS	Alelo L	Alelo S	
Mendonça <i>et al.</i> (2017) (estudo atual)	68	29,41	26,48	44,11	42,64	57,36	142	29,58	26,76	43,66	42,96	57,04	Brasil
Iga <i>et al.</i> (2016)	28	3,5	28,6	67,9	17,9	82,1	29	3,5	31	65,5	19	81	Japão
Lee <i>et al.</i> (2015)	112	6,8	34,1	59,1	23,9	76,1	122	4,9	37,7	57,4	23,8	76,2	Coreia do Sul
Talati <i>et al.</i> (2015)	103	22	64	13	54,36	45,64	161	35	53	11	62,42	37,58	Itália
Watanabe <i>et al.</i> (2015)	216	3,7	31,5	64,8	19,44	80,55	213	1,9	31,9	66,2	17,84	82,16	Japão
Zhang <i>et al.</i> (2015)	120	6,51	42,89	70,59	23,3	76,6	140	12,90	59,09	67,90	30,36	69,64	China
Grochans <i>et al.</i> (2013)	184	48,4	37	14,6	66,9	33,1	446	42,4	42,4	15,3	63,3	36,4	Polônia
Xu <i>et al.</i> (2013)	36	2,78	27,78	69,44	16,67	83,33	60	13,33	43,33	43,33	35	65	China
Zimmermann-Peruzatto <i>et al.</i> (2012)	15	20	66,7	13,3	53,3	46,7	113	32,7	50,4	16,9	42	58	Brasil

Tabela 4 Resultados do teste exato de Fisher e de OR (IC 95%) de indivíduos portadores de pelo menos um alelo S no polimorfismo 5-HTTLPR para o diagnóstico positivo ou negativo de depressão. OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; *teste exato de Fisher a 5% ($p < 0,05$) de significância.

Grupos	Genótipos – 5-HTTLPR		Valor-p	OR (IC 95%)
	SS-SL	LL		
Depressão	49	20	1,00	1,04
Controle	99	42		

4.1.2 O polimorfismo STin2

Os resultados de genotipagem do polimorfismo do intron 2 do gene *SLC6A4* (STin2-VNTR ou STin2), demonstraram uma frequência genotípica na amostra total de 17,14% (STin2.10/ STin2.10), 40% (STin2.10/STin2.12) e 42,86% (STin2.12/STin2.12), com frequência alélica de 37,14% para o alelo STin2.10 e 62,86% para o alelo STin2.12.

Quando avaliados separadamente, avaliando apenas indivíduos adultos, no grupo com depressão, a frequência encontrada foi de 41,51% (STin2.12/STin2.12), 39,62% (STin2.10/STin2.12), 20,75% (STin2.10/STin2.10), e frequência alélica de 59,43% no alelo STin2.12 e 40,57% no alelo STin2.10. No grupo controle foi encontrada frequência genotípica de 48,15% (STin2.12/STin2.12), 40,74% (STin2.10/STin2.12), 11,11% (STin2.10/STin2.10), com 68,52% de predominância do alelo STin2.12 e 31,48% do alelo STin2.10 (Tabela 5).

Tabela 5 Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo STin2 encontradas nos grupos de indivíduos adultos com depressão e controles

Controle = todos os indivíduos adultos genotipados sem diagnóstico de depressão; Depressão = todos os indivíduos adultos genotipados com diagnóstico de depressão.

HWE valor-p = valores de p derivados do teste de χ^2 para averiguação de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg

Grupos	Indivíduos Adultos	Frequências genotípicas e alélicas de STin2 (%)					HWE (valor-p)
		STin2.12 /STin2.12	STin2.10 /STin2.12	STin2.10 /STin2.10	Alelo 12	Alelo 10	
	N						
Depressão	53	41,51	39,62	20,75	59,43	40,57	0,194286
Controle	54	48,15	40,74	11,11	68,52	31,48	0,682615

A relação entre os alelos de STin2 e depressão também é pouco explorada, quando comparado a outros polimorfismos do *SLC6A4*. Segundo SAROSI *et al.* (2008), a presença de STin2.10 e a ausência de STin2.12 foi relacionada a depressão. O alelo STin2.10 também tem sido associado a casos de suicídio em pacientes com depressão (LOPEZ DE LARA *et al.*, 2006).

A associação desse polimorfismo com a etiologia da depressão ainda não foi bem elucidada. No entanto, em comparação com LEE *et al.* (2015), YEN *et al.* (2003) e ZIMMERMANN-PERUZATTO *et al.* (2012), os resultados do presente estudo foram semelhantes, com maior frequência do alelo 12 (Tabela 6).

Em contraste com a maioria dos estudos, LAUZURICA *et al.* (2003), em estudo com indivíduos controle encontraram uma frequência 3 vezes maior do genótipo STin2.10/STin2.10. Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa em população controle de Campos dos Goytacazes, não houve predominância do genótipo STin2.12/STin2.12 (35,4%), mas ocorreu uma maior frequência do genótipo STin2.10/STin2.12 (41,4%), enquanto o genótipo STin2.10/STin2.10 (23,1%) apresentou menor frequência. Ainda assim, houve maior frequência do alelo STin2.12 (56,73%) (MENDONÇA *et al.*, 2015 – dados não publicados).

Da mesma forma que o alelo S do polimorfismo 5-HTTLPR, o alelo STin2.10 também está associado a menores níveis de transcritos em relação ao alelo STin2.12. Até o presente momento, poucos estudos avaliaram a

associação do STin2 com a depressão, dessa forma é difícil afirmar se existe susceptibilidade de algum determinado alelo.

Considerando que o alelo STin2.10 gera uma diminuição dos níveis de transcritos, também foi avaliado a frequência genotípica entre STin2.10/STin2.10 e STin2.10/STin2.12 juntos em comparação com o genótipo STin2.12/STin2.12 para determinar o OR. De acordo com o OR encontrado entre indivíduos com depressão e controle (1,42) existe maior ocorrência do alelo 10 no grupo de indivíduos com depressão (Tabela 7).

Tabela 6 Frequências de genótipos associados ao polimorfismo STin2 em estudos comparativos entre indivíduos com depressão e controle.

Autor	N	Frequências genotípicas e alélicas STin2 - MDD					N	Frequências genotípicas e alélicas STin2 - Controle				
		STin2.12/ STin2.12	STin2.10/ STin2.12	STin2.10/ STin2.10	Alelo 12	Alelo 10		STin2.12/ STin2.12	STin2.10/ STin2.12	STin2.10/ STin2.10	Alelo 12	Alelo 10
Mendonça et al (2017) (dados não publicados)	68	36,76	45,59	17,65	59,56	40,44	142	45,77	37,33	16,9	64,44	35,56
Lee et al. (2015)	132	72	25	3	84,5	15,5	122	83,6	13,9	2,5	90,6	9,4
Yen et al. (2003)	77	80,5	18,2	1,3	89,6	10,4	169	85,8	11,8	2,4	91,7	8,3
Zimmermann- Peruzatto et al. (2012)	11	45,5	45,5	9	68,2	31,8	106	43,4	41,5	15,1	64,2	35,8

Tabela 7 **Frequência de indivíduos portadores de pelo menos um alelo 10 no polimorfismo STin2 e análise da razão de chances (OR) de ocorrência de depressão baseada na frequência dos genotípica.** OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *teste exato de Fisher a 5% ($p < 0,05$) de significância.

Grupos	Genótipos - STin2 (N)		Valor-p	OR (IC 95%)
	STin2.10/STin2.10 STin2.10/STin2.12	STin2.12/STin2.12		
Depressão	41	25	0,29	1,42
Controle	75	65		

Em relação ao alelo 9, BOZINA *et al.* (2012) em um estudo de análise de comportamento suicida, em um total de 519 amostras, apenas 4 indivíduos apresentaram o alelo com 9 repetições, todos eles faziam parte do grupo que apresentavam comportamento ou tentativa de suicídio. O alelo de 9 repetições é considerado um alelo raro, estando presente em apenas 1% dos indivíduos saudáveis e em 2% de vítimas de suicídio em uma população croata (BOZINA *et al.*, 2012).

No presente estudo, foram encontrados dois indivíduos portadores do alelo 9, apresentando o genótipo STin2.9/STin2.10 e STin2.9/STin2.12, sendo esses indivíduos mãe e filho com depressão (Figura 3).

Apesar de alguns estudos reportarem a presença do alelo 9 em populações, por se tratar de um alelo raro, é difícil associá-lo com pré-disposição a doença psiquiátricas, no entanto o alelo 9 encontrados neste estudo estão presentes em indivíduos com depressão. Devido a frequência baixa desse alelo, mais estudos ainda precisam ser realizados para a melhor compreensão do efeito do alelo 9 em populações naturais e quanto sua associação com a ocorrência de doenças psiquiátricas.

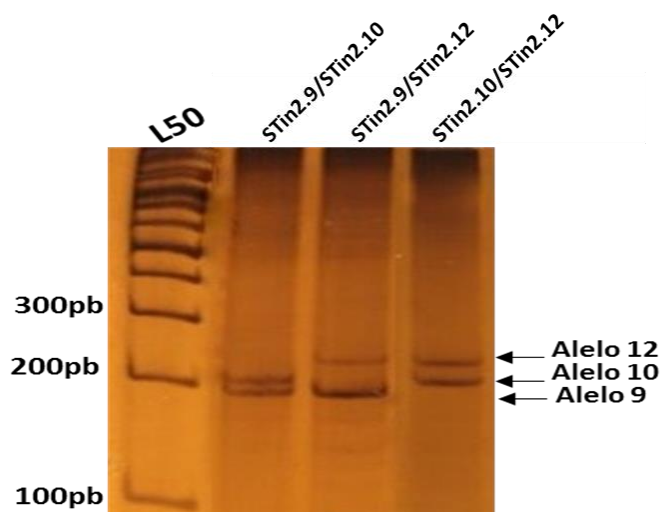


Figura 3 **Representação do alelo 9 do polimorfismo STin2 do gene SLC6A4. Gel de poliacrilamida (12%) corado com nitrato de prata (0,2% w/v) mostrando:** Poço 1 = padrão de peso molecular de 100 pares de base (ladder); Poço 2, 3 e 4 = produto de amplificação por PCR com os pares de *primers* para VNTR a STin2.

Portanto, ao se tratar dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2, é visto que existe uma grande variabilidade entre resultados, analisando indivíduos diferentes, com culturas diferentes e que se encontram em localizações distintas, em países desenvolvidos e não desenvolvidos por exemplo, cada um apresentando características genética e possivelmente epigenética únicas.

Nos resultados do presente estudo, analisando separadamente a associação dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 com a ocorrência de depressão, não foram encontradas associações entre os grupos de pacientes com depressão e controles. Contudo, vale lembrar que o genótipo analisado individualmente não é um fator incisivo para o desenvolvimento da depressão. Faz-se necessário avaliar outras variáveis, como por exemplo, a interação entre outros polimorfismos, gênero, e fatores externos vivenciados pelo indivíduo, que poderiam influenciar, por exemplo, na modulação do epigenótipo e logo na expressão do gene.

4.2 Associação dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 na ocorrência de depressão em filhos de mães com transtorno depressivo maior

A relação entre depressão materna e infantil tem sido extensivamente relatada na literatura científica (KLUCZINIOK *et al.*, 2016). Contudo, ainda não são bem compreendidos os mecanismos genéticos e epigenéticos pelos quais a depressão materna contribui para a vulnerabilidade da depressão infantil. Apenas a carga genética não é capaz de determinar a depressão, porém sua contribuição para a predisposição não pode ser ignorada.

Para análise da ocorrência ou não de depressão entre filhos de mães diagnosticadas com essa patologia, foram avaliadas as amostras do Grupo 1, subdividido em Grupo G1A (mães e filhos com depressão) e Grupo G1B (mães com depressão e filhos sem depressão). O grupo G2 também foi utilizado para comparações das frequências genóticas a G1A.

No grupo 1, onde todas as mães apresentam depressão, em um total de 52 duas mães, 30,8% dos filhos apresentaram o diagnóstico de depressão. Entre as crianças com depressão (grupo G1A), 56,25% das mães, além de apresentarem depressão, tiveram depressão pós-parto.

É importante ressaltar que esses dados são semelhantes a dados encontrados na literatura. Semelhante ao resultado do presente estudo, SULLIVAN *et al.* (2000) demonstraram que a herdabilidade do transtorno depressivo ocorre em aproximadamente 37% dos casos. Outros estudos de prevalência de depressão infantil mostram que 40 a 45% das crianças que convivem com mães com transtorno de depressão apresentam ao menos um transtorno psiquiátrico, diferente de crianças que não convivem com a depressão materna, que apresentam chances até quatro vezes menor de apresentar tais transtornos (HAMMEN & BRENNAN, 2003; LIEB, 2002; MENDES *et al.*, 2012).

Em relação distribuição do polimorfismo 5-HTTLPR, no grupo G1A, avaliando apenas as crianças, 56,3% apresentaram o genótipo S/S, 18,7% L/L e 25% S/L. Enquanto no grupo G1B, com crianças sem depressão, apresentaram uma frequência genotípica de 40% S/S, 37,14% L/L e 22,86% S/L. No grupo G2, o grupo controle, que as crianças não convivem com mães

com transtorno depressivo, apresentaram uma frequência de 43,39% S/S, 32,07 L/L e 24,54% S/L. (Gráfico 1). Embora haja maior prevalência do genótipo S/S em todos os grupos, pode-se perceber uma maior predominância do mesmo nas crianças com depressão.

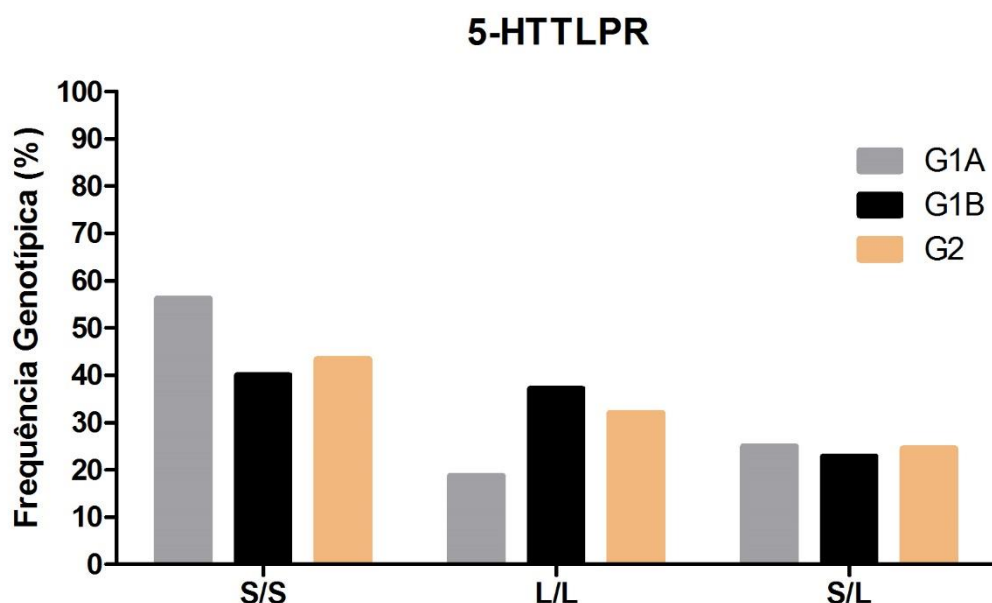


Gráfico 1 Frequência dos genótipos associados ao polimorfismo 5-HTTLPR nas crianças no grupo G1A, G1B e G2.

Considerando a hipótese que indivíduos carregando ao menos um alelo S desse polimorfismo seriam mais vulneráveis à ocorrência de depressão, foram avaliadas se as frequências genotípicas (S/L e S/S) diferem entre os grupos G1A, G1B e G2, tanto considerando grupos com diferentes padrões de ocorrência de depressão, quanto os mesmos grupos compostos apenas por mães ou filhos.

Os valores encontrados para as distribuições genotípicas entre G1A x G1B e G1A x G2 não apresentaram diferenças estatísticas significantes quando avaliados pelo teste exato de Fisher (Tabela 8). No entanto, os valores de *Odds Ratio* (OR) para ocorrência de genótipos carregando pelo menos um alelo S entre as crianças com depressão e as crianças sem depressão foram de 2,68 (G1A x G1B) e 2,04 (G1A x G2), o que demonstra o aumento das frequências genótipos carregando esse alelo no grupo de crianças diagnosticadas com depressão (Tabela 8).

Tabela 8 **Resultados encontrados para as distribuições genotípicas S/S e S/L do polimorfismo 5-HTTLPR entre diferentes grupos de pacientes com e sem depressão.** OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *teste exato de Fisher a 5% ($p < 0,05$) de significância.

Grupos	Genótipos SS/SL	
	Valor-p	OR (IC 95%)
Crianças G1A x G1B	0.2084	2.683
Crianças G1A x G2	0.3638	2.046
Mães G1A x G1B	1	1.056
Mães G1A x G2	0.5133	0.6286
Total G1A x G1B	0.3659	1.630
Total G1A x G2	1	1.115

Essa associação poderia constituir um modelo de interação G x E (*Genetic versus Environment*) onde a presença de um alelo que modula a expressão de *SLC6A4* (alelo S) estaria associada à variação fenotípica dependendo da presença de fatores de estresse ambiental, como a depressão materna.

Corroborando com os dados encontrados, GIBB *et al.* (2009), encontraram uma associação entre a presença dos alelos S ou Lg no polimorfismo 5-HTTLPR em crianças que apresentaram sintomas de depressão, filhos de mães diagnosticadas com depressão. A associação de alelos S, mais precisamente do genótipo S/S, também foi identificado por OPPENHEIMER *et al.* (2013) com o aumento de sintomas depressivos em jovens filhos de mães com depressão.

A exposição à depressão materna pós-natal também pode estar associada a alterações emocionais em indivíduos portadores de um ou dois alelos S (ARAYA *et al.*, 2009).

Apesar da não ocorrência de resultados estatisticamente significantes entre G1A e os demais grupos, esse aumento da frequência de genótipos carregando pelo menos um alelo S, pode sugerir um cenário genético favorável para vulnerabilidade a fatores de estresse, como a depressão materna.

Quanto ao polimorfismo STin2, as crianças do grupo G1A, apresentaram frequência genotípica prevalente do genótipo STin2.10/STin2.12, com 62,50%. Enquanto as outras frequências foram 6,25% STin2.10/STin2.10 e 31,25% STin2.12/STin2.12. Para o grupo G1B foi encontrado uma frequência de 20,59% STin2.10/STin2.10, 41,18% STin2.12/STin2.12 e 38,23% STin2.10/STin2.12. As frequências encontradas em G2 foram de 18,87% STin2.10/STin2.10, 47,17% STin2.12/STin2.12, 33,96% STin2.10/STin2.12 (Gráfico 2). As frequências alélicas observadas foram semelhantes entre os grupos G1A e G1B, com prevalência do alelo STin2.12 (62,50% grupo G1A e 60,30% grupo G1B).

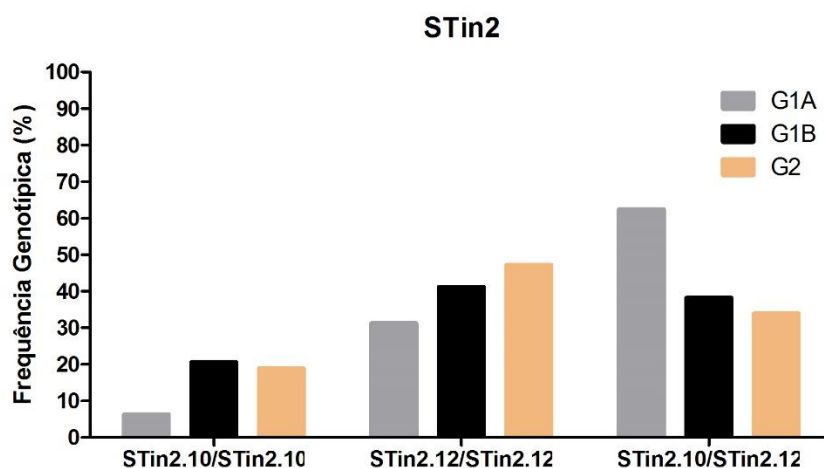


Gráfico 2 Frequência genotípica das crianças no grupo G1A e G1B para o polimorfismo STin2.

Quando comparado ao polimorfismo 5-HTTLPR, existem poucos estudos associando o STin2 a depressão e, nenhum estudo de associação entre suas variantes alélicas e o seu efeito na etiologia da depressão em filhos de mães com transtorno depressivo. O alelo STin2.10 já foi relacionado a ocorrência de transtorno depressivo e melancolia em associação com o alelo S do 5-HTTLPR (GUTIÉRREZ *et al.*, 1998). A presença desse mesmo alelo tem sido associada a episódios de suicídio em pacientes com transtorno depressivo maior (LOPEZ DE LARA *et al.*, 2006).

No presente estudo foi investigado a ocorrência de genótipos com ao menos um alelo STin2.10 nos pacientes com depressão, seguindo a análise

em diferentes comparações por grupo, semelhante ao realizado para o polimorfismo 5-HTTLPR.

Não foram encontrados valores significativos para o teste exato de Fisher. No entanto, os valores de OR demonstram uma associação com a presença de genótipos carregando ao menos um alelo STin2.10 em G1A quando comparado aos demais grupos (Tabela 9).

Os resultados do presente estudo mostram uma associação entre a presença de alelo S (5-HTTLPR) e 10 (STin2) no grupo de pacientes onde os filhos de mães diagnosticadas com depressão maior desenvolveram depressão. Esses dados reforçam a hipótese de que esses alelos estão associados à etiologia da depressão, sendo que no presente estudo, a presença dos mesmos está aumentada no grupo de crianças expostos a depressão materna que desenvolveram depressão.

Tabela 9 Resultados encontrados para as distribuições genótípicas STin2.10/STin2.10 e STin2.10/STin2.12 do polimorfismo STin2 entre diferentes grupos de pacientes com e sem depressão. Foi utilizado o teste exato de Fisher e os valores de OR. OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *teste exato de Fisher a 5% ($p < 0,05$) de significância.

Grupos	Genótipos - STin2.10/STin2.10 e STin2.10/STin2.12	
	Valor-p	OR (IC 95%)
Crianças G1A x G1B	0.75	1.40
Crianças G1A x G2	0.38	1.85
Mães G1A x G1B	0.22	0.43
Mães G1A x G2	0.78	0.81
Total G1A x G1B	0.65	0.77
Total G1A x G2	0.68	1.21

4.3 Interação entre os polimorfismos 5-HTTLPR e STin2-VNTR do gene SLC6A4

A relação entre os polimorfismos 5-HTTLPR ou STin2 à predisposição a doenças psiquiátricas como depressão, transtorno obsessivo compulsivo e ansiedade, é focada na maioria das vezes apenas em um desses

polimorfismos. No entanto, a análise da ação combinada de ambos os polimorfismos em modelos epissomais *in vitro* sugerem que eles possam interagir entre si na regulação da expressão gênica (ALI *et al.*, 2010).

Segundo ALI *et al.* (2010), o 5-HTTLPR e STin2 são alvos da interação com o fator de transcrição CTCF, o que sugere um modelo de interação em “loop” desses polimorfismos. Esses mesmos autores demonstraram que combinações de diferentes genótipos em ambos os polimorfismos resultaram em diferentes padrões de expressão gênica utilizando sistema de gene repórter para a avaliação (ALI *et al.*, 2010).

Segundo HRANILOVIC *et al.* (2004), o alelo STin2.10 está associado a baixa expressão de *SLC6A4*. Esse efeito regulatório corrobora com a hipótese de baixa expressão associada à etiologia de doenças psiquiátricas como a depressão, semelhante a ação do alelo S no polimorfismo 5-HTTLPR. Indivíduos carregando pelo menos um alelo S e um alelo STin2.10, possuem níveis menores de expressão de indivíduos L/L-STin2.12/STin2.12 (HRANILOVIC *et al.*, 2004).

Avaliando os polimorfismos separadamente é visto que a presença de ao menos um alelo S ou a homozigose para esse alelo no 5-HTTLPR diminui a expressão do gene em relação ao homozigoto L/L em 27% e 30% respectivamente (HRANILOVIC *et al.*, 2004). Da mesma forma, no STin2 a presença do alelo 10 também está relacionado a menor expressão do gene, entre 25% a 32% em relação ao homozigoto 12/12 (HRANILOVIC *et al.*, 2004).

Em vista disso, assume-se que os alelos S e STin2.10 desses polimorfismos são alelos associados a baixa expressão enquanto a presença do genótipo homozigoto L/L e STin2.12/STin2.12 são associados a genótipos de alta expressão do gene.

Baseado nessa premissa, foi avaliado a possível interação entre os polimorfismos, considerando a presença de ao menos um alelo de baixa expressão (S/S-STin2.10/STin2.10; L/L-STin2.10/STin2.12; L/L-STin2.10/STin2.10; S/L-STin2.12/STin2.12; S/S-STin2.12/STin2.12) em relação a alelos de alta expressão em ambos os *loci* (L/L-STin2.12/STin2.12) e a OR entre o grupo com depressão e o grupo controle.

Nos resultados encontrados, não foi identificada diferença significativa na distribuição de combinações genotípicas entre pacientes com depressão e controles. No entanto, o valor de OR encontrado, 1,72, indica um aumento da combinação genotípica para a baixa expressão comparando grupo com depressão e grupo controle (Tabela 8). Dessa forma, pode-se sugerir que ao analisar a interação dos polimorfismos do gene, a presença de ao menos um alelo de baixa expressão esteja associado a maior susceptibilidade para o desenvolvimento da depressão.

Tabela 10 Resultados do teste exato de Fisher e OR para presença de combinações genotípicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 com baixa e alta expressão segundo classificação estabelecidos por HRANILOVIC et al., (2004). Combinação genotípica de baixa expressão: S/S-STin2.10/STin2.10; L/L-STin2.10/STin2.12; L/L-STin2.10/STin2.10; S/L-STin2.12/STin2.12; S/S-STin2.12/STin2.12; Combinação alélica de alta expressão: L/L-STin2.12/STin2.12. OR: *Odds Ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *teste exato de Fisher a 5% ($p < 0,05$) de significância.

	Depressão	Controle	Valor-p	OR (IC 95%)
Baixa expressão	66	128	0,55	1,72
Alta expressão	3	10		

Quando comparadas as combinações genotípicas entre grupos, nota-se um aumento na ocorrência de combinações para baixa expressão no grupo G1A em relação aos demais grupos, com valores de OR ainda maiores (Tabela 11). O que não ocorreu quando comparados os grupos G1B e G2.

Tabela 11 Resultados do teste exato de Fisher e OR para presença de combinações genotípicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 com baixa expressão entre G1A e os demais grupos estudados. OR: *Odds Ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *teste exato de Fisher a 5% ($p < 0,05$) de significância.

Grupos	Valor- <i>p</i>	OR (IC 95%)
G1A x G1B+G2	0.23	5.40
G1A x G1B	0.17	6.45
G1A X G2	0.20	5.00
G1B x G2	0.77	0.78

Esse aumento na ocorrência de combinações de baixa expressão no grupo G1A corrobora com a hipótese de um contexto genético favorável a depressão quando relacionada a exposição a depressão materna. Não há dados na literatura identificando esse tipo de associação em crianças filhas de mães com depressão.

A presença de alelo combinada dos alelos STin2.10 e S (5-HTTLPR) foi associada a resposta positiva a tratamento com lítio em pacientes com transtorno bipolar (THAROOR *et al.*, 2013). Essa mesma combinação foi encontrada por GUTIÉRREZ *et al.* (1998) associada a pacientes com diagnóstico de depressão maior e melancolia. Em contrapartida, LEE *et al.* (2015) em estudo de genética populacional, não encontraram associação na interação desses polimorfismos em pacientes com transtorno depressivo e com tentativa de suicídio.

Os resultados apresentados levantam a hipótese que a interação entre os polimorfismos do gene *SLC6A4*, mais especificamente a presença da combinação de alelos de baixa expressão, pode estar associada à vulnerabilidade de indivíduos a fatores de estresse ambiental, estando estes mais susceptíveis ao desenvolvimento da depressão. No entanto mais estudos, com um numero maior de pacientes e em diferentes populações, precisam ser

realizados para elucidar com mais precisão natureza molecular dessa associação e quais os fatores ambientais estão influenciando a mesma.

4.4 Análise dos níveis de metilação do DNA em uma MDD-DMR do gene *SLC6A4*

Como mencionado anteriormente, apesar dos diversos estudos de associação dos polimorfismos 5-HTTLPR e STin2 e a etiologia da depressão, a clara discordância entre os resultados apresentados na literatura remete a ação de fatores ambientais, e não apenas a ação do contexto genético desses *loci* (DAMMANN *et al.*, 2011). Nesse cenário, diversos autores têm focado na ação de fatores epigenéticos, como a metilação do DNA, na regulação de genes associados à etiologia das doenças psiquiátricas (PROVENZI *et al.*, 2016).

A metilação em dinucleotídeos CpG (5mC) no promotor do *SLC6A4* foi analisada em um elemento *AluJb*, um retroelemento tipo SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*) localizado dentro do promotor desse gene (Figura 4). Essa região foi identificada como diferencialmente metilada em tecido cerebral de pacientes com depressão maior (MDD-DMR) utilizando o banco de dados de sequenciamento de DNA modificado por bissulfito de sódio do *MethylomeDB Browser* (<http://www.neuroepigenomics.org/methylomedb/>).

Essa sequência dentro do promotor de *SLC6A4* já foi investigada quanto aos seus perfis de metilação por DANNLOWSKI *et al.* (2014), os quais identificaram uma correlação entre a hipometilação desse elemento com alterações do volume da massa cinzenta do cérebro em humanos.

Com base nas coordenadas genômicas disponíveis no UCSC *genome browser* para o genoma de referência GRCh37/hg19, essa região corresponde a uma CGI-*shore* da ilha CpG presente no promotor do gene *SLC6A4*. Alterações de metilação em CGI-*shores* já foram encontradas no gene *NR3C1* associadas a eventos de estresse no início da vida (ELS - *Early-life stress*) em modelo de camundongos (BOCKMUHL *et al.*, 2015). Alterações na metilação do DNA têm sido encontradas em CGI-*shores* de pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar (LI *et al.*, 2015).

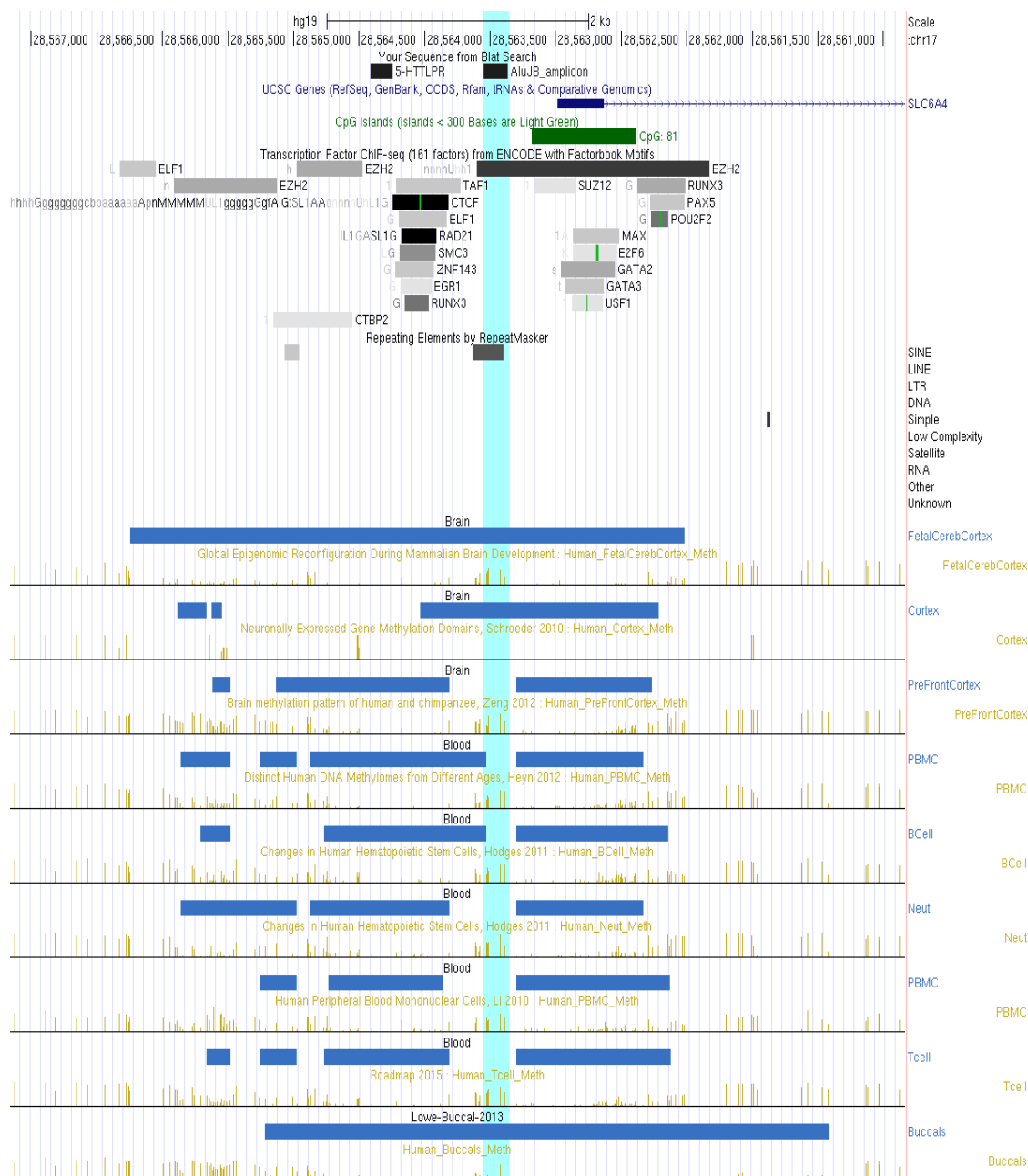


Figura 4 **Representação gráfica da região promotora e início do corpo gênico do SLC6A4 humano a partir do UCSC Genome Browser (chr17:28,560,336-28,567,163).** Estão adicionados a figura os *tracks* associados a características regulatórias do genoma humano: Metilação do DNA (tecido cerebral, sangue e células do epitélio bucal); Elementos repetitivos derivados do RepeatMasker; Presença de sítios de ligação de fatores de transcrição derivados do ENCODE e; Ilhas CpGs. Região do *amplicon* de *AluJb* está focalizada como um traço vertical em azul claro.

A região investigada apresenta níveis diferenciais de metilação do DNA tecido específicas, e dado a posição de regiões hipometiladas (faixas horizontais azuis - Figura 4), deve apresentar ancoragem diferencial de

proteínas regulatórias. É importante salientar, que grande parte dos artigos que analisam alterações de metilação do DNA associadas ao gene *SLC6A4* humano em primatas em diferentes contextos, focaram na investigação dos perfis de 5mC na ilha CpG localizada na extremidade 5' desse gene (PROVENZI *et al.*, 2016). No entanto, os resultados encontrados levantam a hipótese que outras regiões regulatórias podem estar modulando a expressão de *SLC6A4* como a CGI-shores, o que ressalta a importância de investigação da metilação do DNA nessas regiões.

Os níveis de metilação encontrados na amostra estudada variaram de 33,99% a 99,89%. Foram comparados perfis de metilação do DNA entre pacientes e controles, entre diferentes genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR e entre mães e filhos. Os resultados encontrados para a média dos níveis 5mC na população total (pacientes com depressão e controle) foram de 70,67%, com a média total de filhos e mães de 70,13% e 71,22%, respectivamente.

Quando comparados, os dados de metilação entre os grupos G1A, G1B e G2, foi detectada uma redução dos níveis de metilação no grupo G1A (Gráfico 3A). Mesmo quando analisados separadamente, mães e filhos, o Grupo G1A apresentou hipometilação em relação aos demais grupos. As diferenças na média de 5mC% entre G1A e G1B foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$) quando utilizado ANOVA seguido do teste pos hoc de Newman-Keuls.

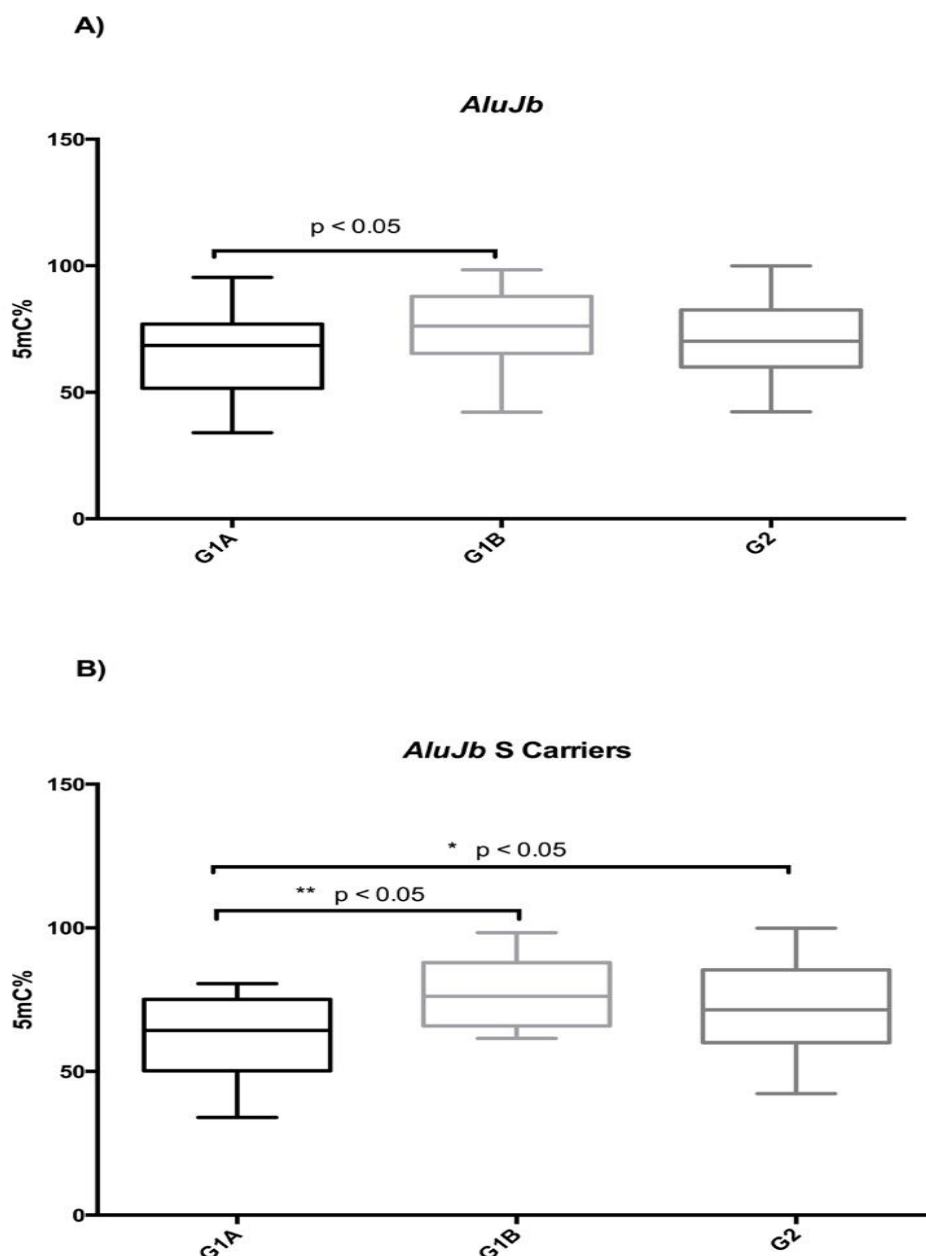


Gráfico 3 Média de 5mC% entre os grupos de pacientes investigados G1A, G1B e G2. A) Análise das médias entre os grupos considerando todos os genótipos de 5-HTTLPR - G1A (5mC% = 64.60%, Sd $\pm$ 15.30), G1B (5mC% = 76.46, Sd $\pm$ 14.05) e G2 (5mC% = 70.96; Sd $\pm$ 14,87) ($p = 0.0466$); B) Análise das médias de 5mC% entre os grupos considerando apenas os indivíduos portadores de pelo menos um alelo S - G1A (5mC% = 61.21, Sd $\pm$ 14.36), G1B (5mC% = 77.84, Sd $\pm$ 12.13) e G2 (5mC% = 71.54, Sd $\pm$ 15.82) ($p = 0.0067$). Resultados do gráfico derivados de ANOVA one way seguido pelo teste pos hoc de Newman-Keuls; $p < 0.05$ = estatisticamente significante).

Apesar de encontrar diferenças entre G1A e G1B, não foi encontrado diferença significativa entre G1A e G2. No entanto, é sugerido em vários

estudos que portadores de pelo menos um alelo S para 5-HTTLPR possuem uma maior predisposição a depressão e que diferentes composições alélicas desse polimorfismo podem afetar a metilação local (GRESSIER *et al.*, 2016; BAKUSIC *et al.*, 2017). Partindo dessa hipótese, os dados de metilação foram reavaliados utilizando apenas amostras com pelo menos um alelo S (S/S e S/L), excluindo homozigotos L/L.

Os resultados da análise de portadores do alelo S demonstraram uma redução na média de 5mC% ainda maior no grupo G1A em relação a G1B e G2. Foi encontrada nesse caso, para as médias de 5mC% entre os grupos, diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) entre G1A e G1B, G1A e G2, mas não entre G1B e G2 (Gráfico 3B).

Alterações na metilação do DNA podem ser provenientes aos aspectos relacionados ao desenvolvimento intrauterino e/ou pós-natal. Os sintomas depressivos durante a gestação podem afetar o ambiente intrauterino, expondo o feto a doses altas de glicocorticóides e citocinas, podendo afetar a programação fetal e aumentar o risco de doenças psiquiátricas dessas crianças (LAHTI *et al.*, 2017). O convívio com mães com transtorno depressivo, atribuídos, por exemplo, a aspectos interativos da relação mãe-filho (falta de interesse, insensibilidade materna), também pode impactar sobre aspectos fisiológicos, o que é sugerido como um fator ambiental para o desenvolvimento da depressão em criança (CICCHETTI *et al.*, 2016).

DEVLIN *et al.* (2010) encontraram níveis de metilação significativamente menores em mães com depressão em relação aos controles durante a gestação na região promotora do gene *SLC6A4*. Da mesma forma, os filhos recém-nascidos de mães com depressão apresentaram os níveis de 5mC semelhantes aos da mãe, não apresentando uma diferença significativa entre mães e filhos.

Semelhante a DEVLIN *et al.* (2010), nos resultados do presente estudo não foi encontrado correlação nos níveis de metilação do DNA entre mães e filhos em nenhum dos grupos, sendo a média de 5mC% dos filhos semelhante aos das mães (Gráfico 4).

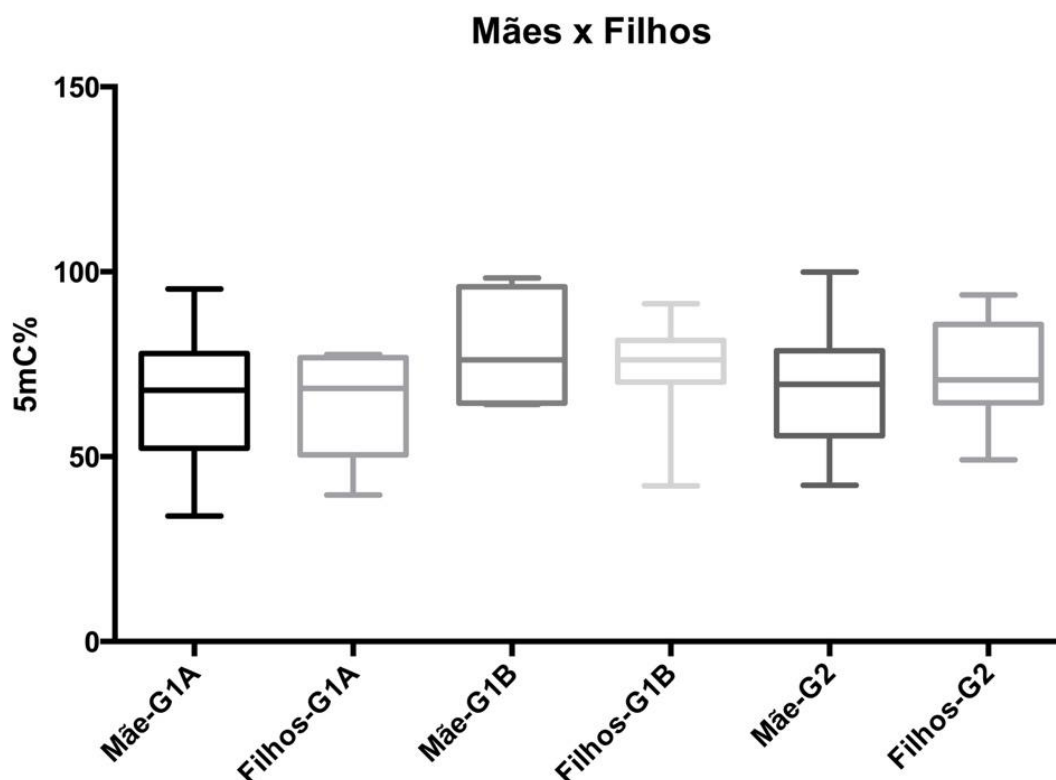


Gráfico 4 Valores de média de 5mC% analisadas no elemento *AluJb* entre as mães e filhos nos grupos G1A, G1B e G2. G1A Mães = 65.65 Sd $\pm$ 17.66, Filhos = 63.57 Sd $\pm$ 13.41, $p = 0.7716$; G1B Mães = 79.00 Sd $\pm$ 14.46, Filhos = 73.93 Sd $\pm$ 13.91 $p = 0.4346$; G2 Mães = 69.02 Sd $\pm$ 16.43, Filhos = 72.89 Sd $\pm$ 13.74, $p = 0.5723$). Teste t valor-p ($p < 0,05$) = estatisticamente significante.

Os perfis de metilação do DNA também podem ser afetados por variações nas sequências de DNA em regiões regulatórias. Em relação a metilação do DNA e os genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR, localizado próximo ao ponto analisado, foi encontrado perfis de metilação na população total para os genótipos SS (72,51% Sd $\pm$ 15.98), S/L (66,62% Sd $\pm$ 14.45) e L/L (72,26% Sd $\pm$ 14.81). Nenhum desses resultados difere significativamente entre as genótipos analisados (segundo resultados de ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$) (Gráfico 5).

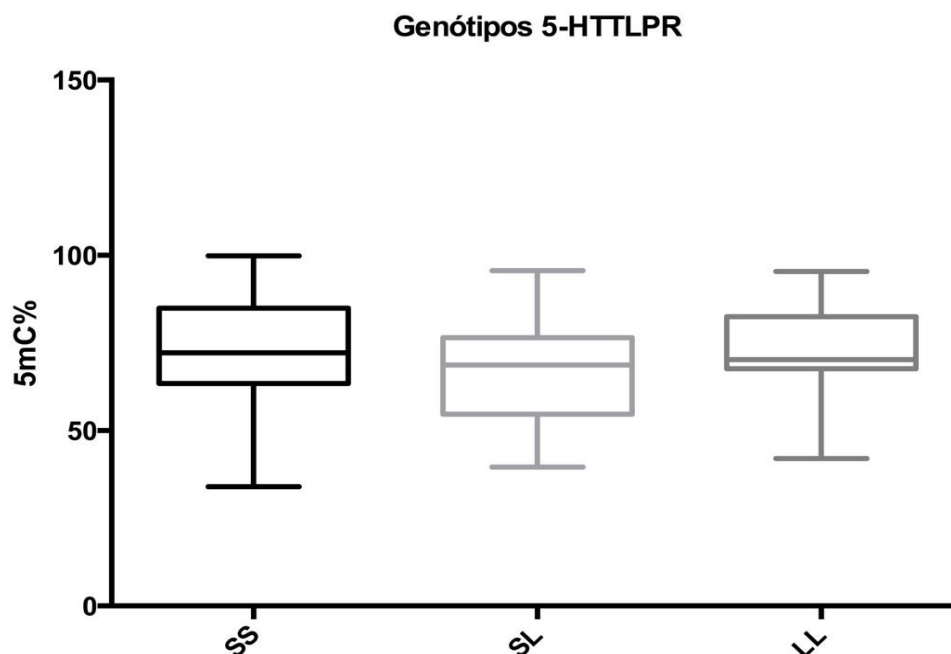


Gráfico 5 Médias de 5mC% analisadas no elemento *AluJb* entre os indivíduos com diferentes genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR na amostra total. ($p = 0.3827$).

WANKERL *et al.* (2014) analisaram os níveis de metilação em amostras de indivíduos que sofreram estresse pré-natal e encontraram maiores níveis de metilação do DNA nesses indivíduos comparado a indivíduos controle. No entanto, o mesmo estudo, não encontrou associação significativa entre os genótipos do 5-HTTLPR e metilação do DNA.

Apesar do presente estudo não ter encontrado associação entre o genótipo 5-HTTLPR e a metilação do DNA do gene *SLC6A4*, nosso grupo de pesquisa, em estudo anterior, encontrou diminuição nos níveis de metilação do DNA no promotor (na região do polimorfismo 5-HTTLPR) desse gene em indivíduos que apresentaram o genótipo S/S em uma população controle da cidade de Campos dos Goytacazes (MENDONÇA *et al.*, 2015 – dados não publicados).

A interação pré e pós-natal entre mãe e prole pode afetar a programação epigenética *loci* específica como tem sido observado em diferentes estudos utilizando modelos animais (PALACIOS-GARCÍA *et al.*, 2015; TEH *et al.*, 2014; YEHUDA *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2014; CONNOR *et al.*, 2012). As alterações epigenéticas decorrentes dessa perturbação no início do desenvolvimento pós-natal pode afetar características comportamentais e a

estrutura cerebral da progênie (McCOY *et al.*, 2016; O'DONNELL & MEANEY, 2016; RIFKIN-GRABOI *et al.*, 2013; CAMERON *et al.*, 2008).

Em humanos, apesar de ser um tópico pouco explorado, alterações do perfil de metilação (ganho ou perda) já foram detectados em crianças com um ano de idade, filhos de mães diagnosticadas com depressão (CICCHETTI *et al.*, 2016). A depressão materna pode afetar os perfis de 5mC de genes como o *NR3C1* e *BDNF* em crianças, como foi reportado por BRAITHWAITE *et al.* (2015) utilizando amostras de mucosa bucal de crianças com dois meses de idade.

Esses relatos, somados aos dados do presente estudo, indicam que a convivência com mães diagnosticadas com depressão pode afetar o epigenoma dos filhos. Os relatos de crianças que desenvolvem quadros de depressão com mães depressivas já são conhecidos na literatura (BOWERS & YEHUDA, 2016). Identificar alterações epigenéticas em um gene associado à etiologia da depressão em um grupo específico de pacientes (exposição a depressão materna) pode constituir um epimarcador associado a essa variante ambiental.

Nas amostras analisadas no presente estudo, não é possível afirmar que as alterações nos perfis de 5mC ocorreram no período intrauterino ou durante os primeiros anos de vida, uma vez que as amostras foram coletadas nas crianças entre 6 e 12 anos de idade. No entanto, nas amostras do grupo G1A ambos, mãe e filhos, apresentam uma redução de metilação em relação aos demais grupos, o que sugere algo inerente a esse grupo.

A hipótese de que um evento de alteração epigenética intrauterino possa ocorrer devido à depressão materna não pode ser descartado totalmente, tendo em vista que evidências desse tipo de alteração já foram relatados por NEMODA *et al.* (2015). Esses autores encontraram mais de 100 regiões com metilação diferencial em linfócitos T derivados do cordão umbilical de recém-nascidos filhos de mães com depressão.

Outra consideração importante sobre os dados encontrados quanto a presença de alterações de 5mC e a exposição de crianças a depressão materna refere-se a região avaliada no presente estudo. Segundo revisão de PROVENZI *et al.* (2016), variações da metilação no DNA do gene *SLC6A4*

constituem um marcador epigenético para eventos de estresse no início da vida, no entanto, quando observados diferentes estudos, as regiões investigadas representam segmentos diferentes do promotor desse gene.

Os dados de metilação encontrados no presente estudo demonstraram um perfil de hipometilação sequência específica (na região do elemento *AluJb*) no promotor do gene *SLC6A4* no grupo onde filhos de mães com depressão também desenvolvem essa doença.

Os resultados encontrados no presente estudo reforçam a necessidade de futuros estudos de associação do gene *SLC6A4* e depressão abordem tanto aspectos genéticos quanto epigenéticos e, que as regiões regulatórias estudadas sejam consideradas quanto a sua função. Devido a idade das crianças analisadas no presente estudo, novas investigações sobre a influência da depressão materna sobre a ocorrência de depressão em crianças devem ser realizadas em recém-nascidos, para uma melhor avaliação do efeito intrauterino sobre as alterações epigenéticas no gene *SLC6A4*.

5. CONCLUSÃO

- Na amostra estudada, para ambos os polimorfismos, as frequências genotípicas não obedecem ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que sugere que algum fator no ambiente local deve estar afetando as frequências dos mesmos;
- Foi observado, de acordo com a análise de OR, que separadamente ou em combinação da presença de um alelo S (S/S e S/L) e um alelo STin2.10 (STin2.10/STin2.12 e STin2.10/STin2.10) tem maior probabilidade de ocorrência no grupo de crianças e mães diagnosticadas com depressão comparado com o grupo controle;
- O grupo G1A caracterizado por filhos e mães diagnosticados por depressão apresentou um perfil de hipometilação do DNA no elemento *AluJb* analisado;
- Essa hipometilação se mostrou mais elevada quando apenas indivíduos portadores de pelo menos um alelo S para o 5-HTTLPR foram analisados;
- Somadas as prevalências de alelos S do 5-HTTLPR e a ocorrência de hipometilação do elemento *AluJb*, esses fatores podem representar novos marcadores moleculares para diagnóstico de depressão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, F.R., VASILIOU, S.A., HADDLEY, K., PAREDES, U.M., ROBERTS, J.C., MIYAJIMA, F., KLENOVA, E., BUBB, V.J., QUINN, J.P. **Combinatorial interaction between two human serotonin transporter gene variable number tandem repeats and their regulation by CTCF.** Journal of Neurochemistry. v. 1, p. 296-306, 2010

ANDRADE, L., CARAVEO-ANDUAGA, J.J., BERGLUND, P., BIJL, R.V., DRAGOMERICKA, E., KOHN, R., KELLER, M.B., KESSLER, R.C., KAWAKAMI, N., KILIC, C.O.D., USTUN, T.B., VICENTE, B., WITTCHEN, H. **The epidemiology of major depressive episodes: results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE).** International Journal of Methods in Psychiatric Research. v. 12, p.3-21, 2003

ARAYA, R., XIANZHANG, H.U., HERON, J., ENOCH, M.A., EVANS, J., LEWIS, G., NUTT, D., GOLDMAN, D. **Effects of Stressful Life Events, Maternal Depression and 5-HTTLPR Genotype on Emotional Symptoms in Pre Adolescent Children.** American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatry Genetic. v. 5, p. 670-782, 2009

BABENKO, O., KOVALCHUK, L., METZ, G.A. **Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews. v. 48, p. 70-91, 2015

BAKUSIC, J., SCHAUFELI W., CLAES, S., GODDERIS, L. **Stress, burnout and depression: A systematic review on DNA methylation mechanisms.** Journal of Psychosomatic Research. v. 92, p. 34-44, 2017

BANCO MUNDIAL, 2015. Disponível em: <http://www.worldbank.org>

BOCKMUHL, Y., PATCHEV, A.V., MADEJSKA, A., HOFFMANN, A., SOUSA, J.C., SOUSA, N., HOLSBOER, F., ALMEIDA, O.F., SPENGLER, D. **Methylation at the CpG island shore region upregulates Nr3c1 promoter activity after early-life stress.** Epigenetics. v. 10, p. 247-257, 2015

BOLLATI, V., BACCARELLI, A. **Environmental epigenetics**. Heredity. v. 105, p. 105-112, 2010

BOWERS, M.E., YEHUDA, R. **Intergenerational Transmission of Stress in Humans**. Neuropsychopharmacology. v.41, p. 232-424, 2016

BOZINA, N., JOVANOVIĆ, N., PODLESEK, A., KUZMAN, R.M., SLIJEPCEVIC, K.M., ROGULJIC, A., DIMITROVIC, A., BOZINA, T., LOVRIC, J., LJUBIC, H., MEDVED, V. **Suicide ideators and attempters with schizophrenia - the role of 5-HTTLPR, rs25531, and 5-HTTVNTR Intron 2 variant**. Journal of Psychiatric Research. v. 46, p. 767-773, 2012

BRAITHWAITE, E.C., KUNDAKOVIC, M., RAMCHANDANI, P.G., MURPHY S.E., CHAMPAGNE, F.A. **Maternal prenatal depressive symptoms predict infant NR3C1 1F and BDNF IV DNA methylation**. Epigenetics. v. 10, p. 408-417, 2015

BROMET, E., ANDRADE, L.H., HWANG, I., SAMPSON, A.N., ALONSO, J., GIROLAMO, G., GRAAF, R., DEMYTTENAERE, K., HU, C., IWATA, N., KARAM, A.N., KAUR, J., KOSTYUCHENKO, S., LÉPINE, J.P., LEVINSON, D., MATSCHINGER, H., MORA, M.E.M., BROWNE, M.O., POSADA-VILLA, J., VIANA, M.C., WILLIAMS, D.R., KESSLER, R.C. **Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode**. BMC Medicine. v. 9, p. 1-16, 2011.

BROOKES, E., SHI, Y. **Diverse Epigenetic Mechanisms of Human Disease**. Annual Review of Genetics. v. 48, p. 237-268, 2014

BRUXNER, T.J., WHITELAW, E. **Transgenerational epigenetic inheritance**. Current Opinion in Genetics & Development. v. 3, p. 371–386, 2008

CAMERON, N.M., FISH, E.W., MEANEY, M.J. **Maternal influences on the sexual behavior and reproductive success of the female rat**. Hormones and Behavior. v. 1, p. 178-184, 2008

CANLI, T., LESCH, P. **Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition.** Nature Neuroscience. v. 10, p. 1103-1109, 2007

OPPENHEIMER, C.W.M.A., BENJAMIN, L., HANKIN, P.D., JAMI, F., YOUNG., SMOLEN, A. **Youth genetic vulnerability to maternal depressive symptoms: 5-HTTpr as moderator of intergenerational transmission effects in a multiwave prospective study.** Depression and anxiety. v. 30, p.190-196, 2013

CASTRO, M.R.P., NUNES, S.O.V., GUEMBAROVSKI, R.L., ARIZA, C B., ODA, J.M.M., VARGAS, H.O., MELO, L.G.P., WATANABE, M.A.E., BERK, M., MAES, M. **STin2 VNTR polymorphism is associated with comorbid tobacco use and mood disorders.** Journal of Affective Disorders. v. 172, p. 347–354, 2015

CATTANEO, A., RIVA, M.A. **Stress-induced mechanisms in mental illness: A role for glucocorticoid signaling.** The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. v. 160, p. 169-174, 2016

CHAMPAGNE, F.A. **Epigenetic influence of social experiences across the lifespan.** Developmental Psychobiology. v. 52, p. 299-311, 2010

CHIAO, J.Y., BLIZINSKY, K.D. **Culture-gene coevolution of individualism-collectivism and the serotonin transporter gene.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. v. 1681, p. 529-537, 2010

CHROUSOS, G.P. **Stress and disorders of the stress system.** Nature Reviews Endocrinology. v. 5, p. 374-381, 2009

CICCHETTI, D., HETZEL, S., ROGOSCH, F.A., HANDLEY, E.D., TOTH, S.L. **Genome-wide DNA methylation in 1-year-old- infants of mothers with major depressive disorder.** Development and Psychopathology. v. 4, p. 1413-1419, 2016

COLE, P.M., LUBY, J., SULLIVAN, M.W. **Emotions and the development of childhood depression: Bridging the gap.** Child Development Perspectives. v. 2, p. 141–148, 2008

CONNOR, C.M., DINCER, A., STRAUBHAAR, J., HOUSTON, I., AKBARIAN, S. **Maternal immune activation alters behavior in adult offspring with subtle changes in the cortical transcriptome and epigenome.** Schizophrenia Research. v. 1, p. 175-184, 2012

CONRADT, E., HAWES, K., GUERIN D.B.S., ARMSTRONG D.A.M.S., MARSIT, C.J., TRONICK, E., LESTER, B.M. **The contributions of Maternal Sensitivity and Maternal Depressive Symptoms to Epigenetic Processes and Neuroendocrine Functioning.** Child Development. v.87, p.73-85, 2016

COSTA, J.E., GOMES, C.C., COTA, L.O., PATARO, A.L., SILVA, J.F., GOMEZ, R.S., COSTA, F.O. **Polymorphism in the promoter region of the gene for 5-HTT in individuals with aggressive periodontitis.** Journal of Oral Science. v. 2, p. 193-198, 2008

COURT, M.H. **Court lab-HW calculator**, 2005. Disponível em: <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20%20HW%20calculator.xls>.

DAMMANN, G., TESCHLER, S., HAAG, T., ALTMULLER, F., TUCZEK, F., DAMMANN, R.H. **Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder.** Epigenetics. v. 6, p. 1454-1462, 2011

DANNLOWSKI, U., KUGEL, H., REDLICH, R., HALIK, A., SCHNEIDER, I., OPEL, N., GROTEGERD, D., SCHWARTE, K., SCHETTLER, C., AMBREE, O., RUST, S., DOMSCHKE, K., AROLT, V., HEINDEL, W., BAUNE, R.T., SUSLOW, T., ZHANG, W., HOHOFF, C. **Serotonin transporter gene methylation is associated with hippocampal gray matter volume.** Human Brain Mapping. v. 11, p. 5356-5367, 2014

DEATER-DECKARD, K., PETRILL, S.A., THOMPSON, L.A. **Anger/frustration, task, persistence, and conduct problems in childhood: a behavioral genetic analysis.** Journal of Child Psychology and Psychiatry. v. 1, p. 80-87, 2007

DEVLIN, A.M., BRAIN, U., AUSTIN, J., OBERLANDER, T.F. **Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth.** PLoS One. v. 5, p. 1-8, 2010

DIAS, B.G., RESSLER, K.J. **Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations.** Nature Neuroscience. v. 17, p. 89-96, 2014

DORFMAN, H.M., MEYER-LINDENBERG, A., BUCKHOLTZ, J.W. **Neurobiological mechanisms for impulsive-aggression: The role of MAOA.** Current topics in Behavioral Neurosciences. v. 17, p. 297-313, 2013

ELEY, T.C., SUGDEN, K., CORSICO, A., GREGORY, A.M., SHAM, P., MCGUFFIN, P., PLOMIN, R., CRAIG, I.W. **Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression.** Molecular Psychiatry. v. 9, p. 908-915, 2004

FAN, J.B., SKLAR, P. **Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia.** Molecular Psychiatry. v. 10, p. 928-938, 2005

FERRARI, A.J., CHARLSON, F.J., NORMAN, R.E., PATTEN, S.B., FREEDMAN, G., MURRAY, C.J.L., VOS, T., WHITEFORD, H.A. **Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010.** Plos Medicine. v. 10, p. 1-12, 2013

FRANKLIN, T.B., RUSSIG, H., WEISS, I.C., GRAFF, J., LINDER, N., MICHALON, A., VIZI, S., MANSUY, I.M. **Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations.** Biological Psychiatry. v. 68, p. 408-415, 2010

GAPP, K., JAWAID, A., SARKIES, P., BOHACEK, J., PELCZAR, P., PRADOS, J., FARINELLI, L., MISKA, E., MANSUY, I.M. **Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice.** Nature Neuroscience. v. 17, p. 667-669, 2014

GARCIA, L.F., ALUJA, A., FIBLA, J., CUEVES, L., GARCÍA, O. **Incremental effect for antisocial personality disorder genetic risk combining 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms.** Psychiatry Research. v. 177, p. 161-166, 2010

GATT, J.M., BURTON, K.L.O., WILLIAMS, L.M., SCHOFIELD, P.R. **Specific and common genes implicated across major mental disorders: A review of meta-analysis studies.** Journal of Psychiatric Research. p. 1-13, 2014

GHATAK, S., MUTHUKUMARAN, R.B., NACHIMUTHU, S.K. **A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis.** Journal of Biomolecular Techniques. v. 24, p. 224-231, 2013

GIBB, B., BENAS, J.S., GRASSIA, M., MCGEARY, J. **Children's attentional biases and 5-HTTLPR genotype: Potential mechanisms linking and child depression.** Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology. v. 3, p. 415-426, 2009

GIBNEY, E.R., NOLAN, C.M. **Epigenetics and gene expression.** Nature. v. 105, p. 4-13, 2010

GINGNELL, M., COMASCO, E., ORELAND, L., FREDRIKSON, M., SUNDSTRÖM-POROMA, I. **Neuroticism-related personality traits are related to symptom severity in patients with premenstrual dysphoric disorder and to the serotonin transporter gene-linked polymorphism.** Archives of Women's Mental Health. v. 13, p. 417-423, 2010

GOMES, M.V., GOMES, C.C., PINTO-JR, W., RAMOS, E.S. **Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann Syndrome conceived by ICSI.** American Journal of Medical Genetics. v. 143, p. 625-29, 2007

GONDA, X., FOUNTOULAKIS, K.N., CSUKLY, G., BAGDY, G., PAP, D., MOLNÁR, E., LASZIK, A., LAZARY, J., SAROSI, A., FALUDI, G., SASVARI-SZEKELY, M., SZEKELY, A., RIHMER, Z. **Interaction of 5-HTTLPR genotype and unipolar major depression in the emergence of aggressive/hostile traits.** Journal of Affective Disorders. v. 132, p. 432-437, 2011

GRESSIER, F., CALATI, R., SERRETTI, A. **5-HTTLPR and gender differences in affective disorders: A systematic review.** Journal of Affective Disorders. v. 190, p.193–207, 2016

GREVET, E.H., MARQUES, F.Z., SALGADO, C.A., FISCHER, A.G., KALIL, K.L., VICTOR, M.M., GARCIA, C.R., SOUSA, N.O., BELMONTE-DE-ABREU, P., BAU, C.H. **Serotonin transporter gene polymorphism and the phenotypic heterogeneity of adult ADHD.** Journal of Neural Transmission. v. 12, p. 1631-1636, 2007

GROCHANS, E., GRZWACZ, A., JURCZAK, A., SAMOCHOWIEC, A., KARAKIEWICZ, B., BRODOWSKA, A., STARCZEWSKI, A., SAMOCHOWIEC, J. **The 5HTT and MAOA polymorphisms associate with depressive mood and climacteric symptoms in postmenopausal women.** Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry. v. 45, p. 125-130, 2013

GUAN, S., FANG, X., HU, X. **Factors influencing the anxiety and depression of patients with dilated cardiomyopathy.** International Journal of Clinical and Experimental Medicine. v. 7, p. 5691-5695, 2014

GUTIÉRREZ, B., PINTOR, L., GASTÓ, C., ROSA, A., BERTRANPETIT, J., VIETA, E., FAÑANÁS, L. **Variability in the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia.** Human Genetics. v. 103, p.319-322, 1998

HAMMEN, C., BRENNAN, P.A. Severity, chronicity, and timing of maternal depression and risk for adolescent offspring diagnoses in a community sample. **Archives of General Psychiatry**, V. 60, n. 3, p. 253-258, 2003

HAMILTON, J.P. **Epigenetics: Principles and practice**. Genetic Basis of Digestive Diseases. v. 29, p. 130-135, 2011

HEILS, A., TEUFEL, A., PETRI, S., STOBER, G., RIEDERER, P., BENDEL, D., LESCH, K.P. **Allelic variation of human serotonin transporter gene expression**. Journal of Neurochemistry. v. 66, p. 2621-2624, 1996

HIDAKA, B.H. **Depression as a disease of modernity: explanations for increasing prevalence**. Journal of Affective Disorders. v. 140, p. 205-214, 2012

HORNUNG, O.P., HEIM, C.M. **Gene-environment interactions and intermediate phenotypes: early trauma and depression**. Neuroendocrine Science. v. 5, p. 1-12, 2014

HRANILOVIC, D., STEFULJ, J., FURAC, I., KUBAT, M., BALIJA, M., JERNEJ, B. **Serotonin Transporter Gene Promoter (5-HTTLPR) and Intron 2 (VNTR) Polymorphisms in Croatian Suicide Victims**. Biological Psychiatry. v. 52, p. 884-889, 2004

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>

IGA, J.I., WATANABE, S-Y., NUMATA, S., UMEHARA, H., NISHI, A., KIMOSHITA, M., INOSHITA, M., SHIMODERA, S., FUJITA, H., OHMORI, T. **Association study of polymorphism in the serotonin transporter gene promoter, methylation profiles, and expression in patients with major depressive disorder**. Human Psychopharmacology Clinical and Experimental Journal. v. 31, p. 193-199, 2016

JANUAR, V., SAFFERY, R., RYAN, J. **Epigenetics and depressive disorders: a review of current progress and future directions.** International Journal of Epidemiology. v. 44, p. 1364-1387, 2015

JOORMANN, J., TALBOT, L., GOTLIB, I. H. **Biased processing of emotional information in girls at risk for depression.** Journal of Abnormal Psychology, v. 116, p. 135–143, 2007

KESSLER, R.C., BROMET, E.J. **The epidemiology of depression across cultures.** Annual Review of Public Health. v. 34, p. 119-138, 2013

KESSLER, R.C., CHIU, W.T., DEMLER, O., MERIKANGAS, K.R., WALTERS, E.E. **Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication.** Archives of general psychiatry. v. 6, p. 617-627, 2005

KLUCZNIOK, D., HINDI ATTAR, C., FYDRICH, T., FUEHRER, D., JAITE, C., DOMES, G., WINTER, S., HERPERTZ, S.C., BRUNNER, R., BOEDEKER, K., BERMPOHL, F. **Transgenerational effects of maternal depression on affect recognition in children.** Journal of Affective Disorders. v. 189, p. 233-239, 2016

KOFINK, D., BOKS, M.P., TIMMERS, H.T., KAS, M.J. **Epigenetic dynamics in psychiatric disorders: Environmental programming of neurodevelopmental processes.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews. v. 37, p. 831-845, 2013

LAHTI, M., SAVOLAINEN, K., TUOVINEN, S., PESOGNEN, A.K., LAHTI, J., HEINONEN, K., HAMALAINEN, E., LAIVUORI, H., VILLA, P.M., REYNOLDS, R.M., KAJANTIE, E., RAIKKONEN, K. **Maternal depressive symptoms during and after pregnancy and psychiatric problems in children.** Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. v. 1, p. 30-39, 2017

LARA, C.L., DUMAIS, A., ROULEAU, G., LESAGE, A., DUMONT, M., CHAWKY, N., ALDA, M., BENKELFAT, C., TURECKI, G. **STin2 Variant and Family History of Suicide as Significant Predictors of Suicide Completion in Major Depression.** *Biological Psychiatry*. v. 59, p. 114-120, 2005

LAUZURICA, N., HURTADOA, A., ESCARTÍ, A., DELGADO, M., BARRIOS, V., MORANDE, G., SORIANO, J., JAÚREGUI I., GONZÁLES-VALDEMORO, M.I., GARCÍA-CAMBA, E., FUENTES, J.A. **Polymorphisms within the promoter and the intron 2 of the serotonin transporter gene in a population of bulimic patients.** *Neuroscience Letters*. v. 352, p. 226-230, 2003

LEE, H.Y., HONG, J.P., HWANG, J.A., LEE, H.J., YOON, H.K., LEE, B.H., KIM, Y.K. **Possible association between serotonin transporter gene polymorphism and suicide behavior in major depressive disorder.** *Korean Neuropsychiatric Association*. v. 1, p. 136-141, 2015

LESCH, K.P., BENDEL, D., HEILS, A., SABOL, S.Z., GREENBERG, B.D., PETRI, S., BENJAMIN, J., MULLER, C.R., HAMER, D.H., MURPHY, D.L. **Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region.** *Science*. v. 274, p. 1527-1531, 1996

LESTER, B.M., CONRADT, E., MARSIT, C. **Introduction to the special section on epigenetics.** *Child Development*. v. 87, p. 29-37, 2016

LI, Y., CAMARILLO, C., XU, J., ARANA, T.B., XIAO, Y., ZHAO, Z., CHEN, H., RAMIREZ, M., ZAVALA, J., ESCAMILLA, M.A., ARMAS, R., MENDOZA, R., ONTIVEROS, A., NICOLINI, H., MAGAÑA, A.A., RUBIN, L.P., LI, X., XU, C. **Genome-wide methylome analyses reveal novel epigenetic regulation patterns in schizophrenia and bipolar disorder.** *BioMed Research International*. v. 2015, p. 1-15, 2015

LIEB, R.; ISENSEE, B.; HOFER, M.; PFISTER, H.; WITTCHEN, H.U. Parental major depression and other mental disorders in offspring: a prospective-longitudinal community study. **Archives of General Psychiatry**, V. 59, p. 365-374, 2002

LIU, Y., SUSAN, K., MURPHY, MURTHA, A.P., FUEMMELER, B.F., SCHILDKRAUT, J., HUANG, Z., OVERCASH, F., KURTZBERG, J., JIRTLE, R., IVERSEN, E.S., FORMAN, M.R., HOYO, C. **Depression in pregnancy, infant birth weight and DNA methylation of imprint regulatory elements.** Epigenetics. v. 7, p. 735-746, 2012

LOPEZ DE LARA, C., DUMAIS, A., ROULEAU, G., LESAGE, A., DUMONT, M., CHAWKY, N., ADA, M., BENKELFAT, C., TURECKI, G. **STin2 variant and Family history of suicide as significant predictors of suicide completion in major depression.** Biology of Psychiatry. v. 2, p. 114-120, 2006

LOPIZZO, N., BOCCHIO CHIAVETTO, L., CATTANE, N. PLAZZOTTA, G., TARAZI, F.I., PARIANTE, C.M., RIVA, M.A., CATTANEO, A. **Gene-environment interaction in major depression: focus on experience-dependent biological systems.** Frontiers in Psychiatry. v. 6, p. 1-12, 2015

LOTHE, A., BONI, C., COSTES, N., GORWOOD, P., BOUVARD, S., LE BARS, D., LAVENNE, F., RYVLIN, P. **Association between triallelic polymorphism of the serotonin transporter and [18F]MPPF binding potential at 5-HT1A receptors in healthy subjects.** Neuroimage. v. 15, p. 482-492, 2009

LOVEJOY, E.A., SCOTT, A.C., FISKESTRAND, C.E., BUBB, V.J., QUINN, J.P. **The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit.** European Journal of Neuroscience. v. 17, p. 417-420, 2003

MANN, J.J., MALONE, K.M., SWEENEY, J.A., BROWN, R.P., LINNOILA, M., STANLEY, B., STANLEY, M. **Attempted suicide characteristics and cerebrospinal fluid amine metabolites in depressed inpatients.** Neuropsychopharmacology. v. 15, p. 576-586, 1996

Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 4^a Edição. American Pschiatric Association.

MARQUES, F.Z., HUTZ, M.H., BAU, C.H. **Influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcohol-dependent individuals.** *Psychiatric Genetics*. v. 3, p. 125-131, 2006

MENDES, A.V. Crianças que convivem com a depressão materna: indicadores cognitivos, comportamentais e de psicopatologia infantil. 2012. 23 f. **Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Departamento de neurociências e ciências do comportamento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.** Ribeirão preto, sp. 2012

MCCARTY, C. A., MCMAHON, R. J. **Mediators of the relation between maternal depressive symptoms and child internalizing and disruptive behavior disorders.** *Journal of Family Psychology*. v. 4, p. 545–556, 2003

MCCOY, C.R., RANA, S., STRINGFELLOW, S.A., DAY, J.J., WYSS, J.M., CLINTON, S.M., KERMAN, I.A. **Neonatal maternal separation stress elicits lasting DNA methylation changes in the hippocampus of stress-reactive Wistar Kyoto rats.** *European Journal of Neuroscience*. v. 10, p. 2829-2845, 2016

MEIRA-LIMA, I., SHAVITT, R.G., MIGUITA, K., IKENAGA, E., MIGUEL, E.C., VALLADA, H. **Association analysis of the catechol-o-methyltransferase (COMT), serotonin transporter (5-HTT) and serotonin 2A receptor (5HT2A) gene polymorphisms with obsessive-compulsive disorder.** *Genes, Brain and Behavior*. v. 2, p. 75-79, 2004

MELAS, P.A., FORSELL, Y. **Hypomethylation of MAOA's first exon region in depression: a replication study.** *Psychiatry Research*. v. 30, p. 389-391, 2015

MENDES, A.V., LOUREIRO, S.R., CRIPPA, J.A., DE MENESES GAVA, C., GARCIA-ESTEVE, L., MARTIN-SANTOS, R. **Mothers with depression, school-age children with depression? A systematic review.** *Perspectives in Psychiatric Care*. v. 3, p. 138-148, 2012

MILANOVIC, S.M., ERJAVEC, K., POLJIČANIN, T., VRABEC, B., BREČIĆ, P. **Prevalence of depression symptoms and associated socio-demographic factors in primary health care patients.** *Psychiatria Danubina*. v. 27, p. 31-37, 2015

MONTIROSSO, R., PROVENZI, L., TAVIAN, D., MORANDI, F., BONANOMI, A., MISSAGLIA, S., TRONICK, E.D., BORGATTI, R. **Social stress regulation in 4-month-old infants: Contribution of maternal social engagement and infants' 5-HTTLPR genotype.** *Early Human Development*. v. 91, p. 173-179, 2015

MOORE, D.S. **Behavioral epigenetics.** *WIREs Systems Biology and Medicine*. v. 9, p. 1-8, 2016

MORENO, F.A., ROWE, D.C., KAISER, B., CHASE, D., MICHAELS, T., GELERNTER, J., DELGADO, P.L. **Association between a serotonin transporter promoter region polymorphism and mood response during tryptophan depletion.** *Journal of Molecular Psychiatry*. v. 7, p. 213-216, 2002

MURDOCH, D., SPEED, W.C., PAKSTIS, A.J., HEFFELFINGER, C.E., KIDD, K.K. **Worldwide population variation and haplotype analysis at the serotonin transporter gene SLC6A4 and implications for association studies.** *Biological Psychiatry*. v. 12, p. 87-889, 2013

NEMODA, Z., MASSART, R., SUDERMAN, M., HALLET, M., LI, T., COOTE, M., CODY, N., SUN, Z.S., SOARES, C.N., TURECKI, G., STEINER, M., SZYF, M. **Maternal depression is associated with DNA methylation changes in cord blood T lymphocytes and adult hippocampi.** *Translational Psychiatry*. v. 5, p. 1-8, 2015

NON, A.L., BINDER, A.M., KUBZANSKY, L.D., MICHELS, K.B. **Genome-wide DNA methylation in neonates exposed to maternal depression, anxiety, or SSRI medication during pregnancy.** *Epigenetics* v. 9, p. 964-972, 2014

O'CONNOR, T.G., HERON, J., GOLDING, J., GLOVER, V. **Maternal antenatal anxiety and behavioral/emotional problems in children: a test of a programming hypothesis.** Journal of Child Psychology and Psychiatry. v. 44, p. 1025–1036, 2003

O'DONNELL, K.J., MEANEY, M.J. **Fetal origins of mental health: The developmental origins of health and disease hypothesis.** The American Journal of Psychiatry. 2016

OGILVIE, A.D., BATTERSBY, S., BUBB, V.J., FINK, G., HARMAR, A.J., GOODWIM, G.M., SMITH, C.A. **Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression.** Lancet. v. 347, p. 731-733, 1996

OHARA, K., SUZUKI, Y., OCHIAI, M., TSUKAMOTO, T., TANI, K., OHARA, K. **A variable-number-tandem-repeat of the serotonin transporter gene and anxiety disorders.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. v. 23, p.55-65, 1999

OLIVEIRA, J.R., CARVALHO, D.R., PONTUAL, D., GALLINDO, R.M., SOUGEY, E.B., GENTIL, V., LAFER, B., MAIA, L.G., MORAIS, M.A.JR., MATIOLI, S., VALLADA, H., MORENO, R.A., NISHIMURA, A., OTTO, P.A., PASSOS-BUENO, M.R., ZATZ, M. **Analysis of the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in Brazilian patients affected by dysthymia, major depression and bipolar disorder.** Molecular Psychiatry. v. 4, p. 348-349, 2000

ONG, M.L., LIN, X., HOLBROOK, J.D. **Measuring epigenetics as the mediator of gene/environment interactions in DOHaD.** Journal of Developmental Origins of Health and Disease. v. 6, p. 10-16, 2015

PALACIOS-GARCÍA, I., LARA-VÁSQUEZ, A., MONTIEL, J.F., DÍAZ-VÉLIZ, G.F., SEPÚLVEDA, H., UTRERAS, E., MONTECINO, M., GONZÁLEZ-BILLAULT, C., ABOITIZ, F. **Prenatal stress down-regulates Reelin expression by methylation of its promoter and induces adult behavioral impairments in rats.** PLoS One. v. 2, 2015

PALMA-GUDIEL, H., FÑANANÁS, L. **An integrative review of methylation at the serotonin transporter gene and its dialogue with environmental risk factors, psychopathology and 5-HTTLPR.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews. v. 72, p. 190-209, 2017

PROVENÇAL, N., BINDER, E.B. **The effects of early life stress on the epigenome: From the womb to adulthood and even before.** Experimental Neurology. v. 268, p. 10-20, 2015

PROVENZI, L., GIORDA, R., BERI, S., MONTIROSSO, R. **SLC6A4 methylation as an epigenetic marker of life adversity exposures in humans: A systematic review of literature.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews. v. 71, p. 7-20, 2016

RIAL-SEBBAG, E., GUIBET LAFAYE, C., SIMEONI, U., JUNIEN, C. **DOHaD and epigenetic information: societal challenges.** Médecine/Sciences (Paris). v. 1, p. 100-105, 2016

RIFKIN-GRABOI, A., BAI, J., CHEN, H., HAMEED, W.B., SIM, L.W., TINT, M.T., LEUTSCHER-BROEKMAN, B., CHONG, Y.S., GLUCKMAN, P.D., FORTIER, M.V., MEANEY, M.J., QIU, A. **Prenatal maternal depression associates with microstructure of right amygdala in neonates at birth.** Biological Psychiatry. v. 11, p. 837-844, 2013

ROHDE, P., LEWINSOHN, P.M., KLEIN, D.N., SEELEY, J.R. **Association of parental depression with psychiatric course from adolescence to young adulthood among formerly depressed individuals.** Journal of Abnormal Psychology. v. 3, p. 409, 2005

RUCCI, P., NIMGAONKAR, V.L., MANSOUR, H., MINIATI, M., MASALA, I., FAGIOLINI, A., CASSANO, G.B., FRANK, E. **Gender moderates the relationship between mania spectrum and serotonin transporter polymorphisms in depression.** American Journal of Medical Genetics. v. 150, p. 907-913, 2009

SANJUAN, J., MARTIN-SANTOS, R., GARCIA-ESTEVE, L., CAROT, J.M., GUILLAMAT, R., GUTIERREZ-ZOTES, A., GORNEMANN, I., CANELLAS, F., BACA-GARCIA, E., JOVER, M., NAVINES, R., VALLES, V., VILELLA, E., DE DIEGO, Y., CASTRO, J.A., IVORRA, J.L., GELABERT, E., GUITART, M., LABAD, A., MAYORAL, F., ROCA, M., GRATACOS, M., COSTAS, J., VAN OS, J., DE FRUTOS, R. **Mood changes after delivery: role of the serotonin transporter gene.** British Journal of Psychiatry. v. 193, p. 383-388, 2008

SAROSI, A., GONDA, X., BALOGH, G., DOMOTOR, E., SZEKELY, A., HEJJAS, K., SASVARI-SZEKELY, M., FALUDI, G. **Association of the STin2 polymorphism of the serotonin transporter gene with a neurocognitive endophenotype in major depressive disorder.** Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry. v.32, p.1667-1672, 2008

SAVEANU, R.V., NEMEROFF, C.B. **Etiology of Depression: Genetic and Environmental factors.** Psychiatric Clinics of North America. v. 35, p. 51-71, 2012

SHRIVASTAVA, A., DESOUSA, A. **Resilience: A psychobiological construct for psychiatric disorders.** Indian Journal of Psychiatry. v. 58, p. 38-43, 2016

SMOLLER, J.W. **The Genetics of Stress-Related Disorders: PTSD, Depression, and Anxiety Disorders.** Neuropsychopharmacology. v. 41, p. 297-319, 2016

STEEL, Z., MARNANE, C., IRANPOUR, C., CHEY, T., JACKSON, J.W., PATEL, V., SILOVE, D. **The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013.** International Journal of Epidemiology. v. 43, p. 476-493, 2014

SUGAWARA, H., IWAMOTO, K., BUNDO, M., UEDA, J., MIYAUCHI, T., KOMORI, A., KAZUNO, A., ADATI, N., OKAZAKI, Y., ISHIGOOKA, J., KOJIMA, T., KATO, T. **Hypermethylation of serotonin transporter gene in bipolar disorder detected by epigenome analysis of discordant monozygotic twins.** Translational psychiatry. v. 26, p.1-24, 2011

SULLIVAN, P.F., NEALE, M.C., KENDLER, K.S. **Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis.** American Journal of Psychiatry. v. 157, p. 1552-1562, 2000

TALATI, A., GUFFANTI, G., ODGEREL, Z., IONITA-LAZA, J., MALM, H., SOURANDER, A., BROWN, A.S., WICKRAMARATNE, P.J., GINGRICH, J.A., WEISSMAN, M.M. **Genetic variants within the serotonin transporter associated with familial risk for major depression.** Psychiatry Research. v. 1, p. 170-173, 2015

TEH, A.L., PAN, H., CHEN, L., ONG, M.L., DOGRA, S., WONG, J., MACISAAC, J.L., MAH, S.M., MCEWEN, L.M., SAW, S.M., GODFREY, K.M., CHONG, Y.S., KWEK, K., KWOH, C.K., SOH, S.E., CHONG, M.F., BARTON, S., KARNANI, N., CHEONG, C.Y., BUSCHDORF, J.P., STÜNKEL, W., KOBOR, M.S., MEANEY, M.J., GLUCKMAN, P.D., HOLBROOK, J.D. **The effect of genotype and in utero environment on interindividual variation in neonate DNA methylomes.** Genome Research. v. 7, p. 1064-1074, 2014

THAROOR, H., KOTAMBAIL, A., JAIN, S., SHARMA, P.S., SATYAMOORTHY, K. **Study of the association of serotonin transporter triallelic 5-HTTLPR and STin2 VNTR polymorphisms with lithium prophylaxis response in bipolar disorder.** Psychiatry Genetic. v. 23, p. 77-81, 2013

UCHIDA, S., HARA, K., KOBAYASHI, A., OTSUKI, K., YAMAGATA, H., HOBARA, T., SUZUKI, T., MIYATA, N., WATANABE, Y. **Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events.** Neuron. v. 69, p. 359–372, 2011

VAN DE VELDE, S., BRACKE, P., LEVECQUE, K. **Gender differences in depression in 23 European countries. Cross-national variation in the gender gap in depression.** Social Science & Medicine. v. 71, p. 305-313, 2010

VAN OTTERDIJK, S.D. & MICHELS, K.B. **Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence?** FASEB Journal. v. 30, p. 2457-2465, 2016

VOSTANIS, P., GRAVES, A., MELTZER, H., GOODMAN, R., JENKINS, R., BRUGHA, T. **Relationship between parental psychopathology, parenting strategies and child mental health findings from the GB national study.** Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology. v. 7, p. 509-514, 2006

WACHLESKI, C., BLAYA, C., SALUM, G.A., VARGAS, V., LEISTNER-SEGAL, S., MANFRO, G.G. **Lack of association between the serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and personality traits in asymptomatic patients with panic disorder.** Neuroscience Letters. v. 2, p. 173-178, 2008

WANKERL, M., MILLER, R., KIRSCHBAUM, C., HENNIG, J., STALDER, T., ALEXANDER, N. **Effects of genetic and early environmental risk factors for depression on serotonin transporter expression and methylation profiles.** Translational Psychiatry. v. 4, p. 1-9, 2014

WATANABE, S.Y., IGAM J.I., NUMATA, S., UMEHARA, H., NISHI, A., KINOSHITA, M., INOSHITA, M., OHMORI, T. **Polymorphism in the promoter of the gene for the serotonin transporter affects the age of onset of major depressive disorder in the japanese population.** Journal of Affective Disorders. v. 3, p. 15-18, 2015

WATSON, J.B., MEDNICK, S.A., HUTTUNEN, M., WANG, X. **Prenatal teratogens and the development of adult mental illness.** Development and Psychopathology. v. 11, p. 457-466, 1999

WEAVER, I.C., CERVONI, N., CHAMPAGNE, F.A., D'ALESSIO, A.C., SHARMA, S., SECKL, J.R., DYMOV, S. SZYF, M., MEANEY, M.J. **Epigenetic programming by maternal behavior.** Nature Neuroscience. v. 7, p. 847–854, 2004

WILLEIT, M., PRASCHAK-RIEDER, N., NEUMEISTER, A., ZILL, P., LEISCH, F., STASTNY, J., HILGER, E., THIERRY, N., KONSTANTINIDIS, A., WINKLER, D., FUCHS, K., SIEGHART, W., ASCHAUER, H., ACKENHEIL, M., BONDY, B., KASPER, S. **A polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter promoter gene is associated with DSM-IV depression subtypes in seasonal affective disorder.** Journal of Molecular Psychiatry. v. 8, p. 942-946, 2003

WOLFFE, A.P., GUSCHIN, D. **Chromatin structural features and targets that regulate transcription.** Journal of Structural Biology. v. 129, p. 102-122, 2000

World Health Organization. **The Global Burden of Disease 2004 update.** http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf

World Health Organization, **World suicide prevention day 2012.** http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_suicide_prevention_day/en/

World Health Organization, 2015. Disponível em: <http://www.who.int>

XIN, Y., CHANRION, B., O'DONNELL, A.H., MILEKIC, M., COSTA, R., GE, Y., HAGHIGHI, F.G. **MethylomeDB: a database of DNA methylation profiles of the brain.** Nucleic Acids Research, 2012

XU, J., CHENG, Y.Q., CHEN, B., BAI, R., LI, S., XU, X.F., XU, L., WEN, J.F., LU, Z.P., ZHENG, X.F. **Depression in systemic lupus erythematosus patients is associated with link-polymorphism but not methylation status of the 5HTT promoter region.** Lupus. v. 22, p. 1001-1010, 2013

YEHUDA, R., DASKALAKIS, N.P., LEHRNER, A., DESARNAUD, F., BADER, H.N., MAKOTKINE, I., FLORY, J.D., BIERER, L.M., MEANEY, M.J. **Influences of maternal and paternal PTSD on epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor gene in Holocaust survivor offspring.** The American Journal of Psychiatry. v. 8, p. 872-880, 2014

YEN, F.C., HONG, C.J., HOU, S.J., WANG, J.K., TSAI, S.J. **Association study of serotonin transporter gene VNTR polymorphism and mood disorders, onset age and suicide attempts in a Chinese sample.** Neuropsychobiology. v. 48, p. 5-9, 2003

ZHANG, X., WANG, L., HUANG, F., LI, J., XIONG, L., XUE, H., ZHANG, Y. **Evaluation of the promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter gene in females with postpartum depression.** Experimental and Therapeutic Medicine. v. 9, p. 245-249, 2015

ZHAO, J., GOLDBERG, J., VACCARINO, V. **Promoter methylation of serotonin transporter gene is associated with obesity measures: a monozygotic twin study.** International Journal of Obesity. v. 37, p. 140–145, 2013

ZHENG, J., XIAO, X., ZHANG, Q., YU, M. **DNA Methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life.** British Journal of Nutrition. v. 112, p. 1850-1857, 2014

ZIMMERMANN-PERUZATTO, J.M., ALMEIDA, S., LUCION, A.B., OSES, J.P., QUEVEDO, L.A., PINHEIRO, K.A.T., DA SILVA, R.A., PINHEIRO, R.T., GIOVENARDI, M. **Evaluation of the 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms in the serotonin transporter gene in women with postpartum depression.** Neuroscience & Medicine. v. 3, p. 275-280, 2012

ANEXO**ANEXO A - Documento de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Uberaba-MG****Comitê de Ética em Pesquisa**

CEP-098/06

Uberaba, 22 de junho de 2006

Ilm^a. Professora**Ana Vilela Mendes Fontoura**

Assunto: Encaminha parecer 0041/06-CEP-UNIUBE sobre o protocolo de Cuidados primários à Saúde: Depressão materna e aspectos comportamentais de crianças em idade escolar" – CAAE nº 0039.0.227.000-06.

Prezada Professora

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEP-UNIUBE na reunião de 13/06/06, tendo sido tendo sido **aprovado**.

Na oportunidade gostaria de lembrá-la sobre o disposto no item VII.13, letra d da Resolução 196/96, relativo a necessidade de enviar a este Comitê, um relatório anual para o acompanhamento do desenvolvimento do projeto.

Atenciosamente,



Prof. João Eduardo Caixeta Ribeiro
Coordenador do CEP-UNIUBE

