

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**Análise de metilação do DNA em regiões regulatórias intrônicas do gene  
*FKBP5* e região promotora do gene *NR3C1* em binômios mãe-filho com  
depressão**

**MARIANA DA SILVA MENDONÇA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**JUNHO 2021**

**Análise de metilação do DNA em regiões regulatórias intrônicas do gene  
*FKBP5* e região promotora do gene *NR3C1* em binômios mãe-filho com  
depressão**

**MARIANA DA SILVA MENDONÇA**

**Tese 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 Doutor em  
Biociências e Biotecnologia**

**Orientador: Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios**

**Coorientador: Milton Masahiko Kanashiro**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**JUNHO 2021**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M539

Mendonça, Mariana da Silva.

Análise de metilação do DNA em regiões regulatórias intrônicas do gene *FKBP5* e região promotora do gene *NR3C1* em binômios mãe-filho com depressão. / Mariana da Silva Mendonça. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

56 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Alvaro Fabricio Lopes Rios.

Coorientador: Milton Masahiko Kanashiro.

1. FKBP5. 2. NR3C1. 3. Depressão. 4. Metilação do DNA. 5. Epigenética. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

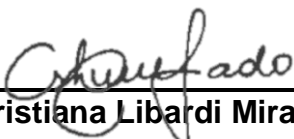
## MARIANA DA SILVA MENDONÇA

Análise de metilação do DNA em regiões regulatórias intrônicas do gene *FKBP5* e região promotora do gene *NR3C1* em binômios mãe-filho com depressão

Tese 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 Doutor em Biociências e Biotecnologia

Aprovada em 30 de junho de 2021

### BANCA EXAMINADORA




---

Prof.ª Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado - UFC



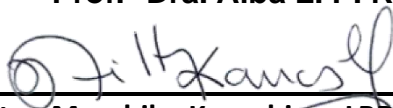
---

Prof.ª Dra. Alline Cristina de Campos – FMRP-USP



---

Prof.ª Dra. Alba L. P. Rangel Gama



---

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro - LBR/UENF (Coorientador)



---

Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios – LBT/UENF (Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por estar sempre presente, auxiliando na minha trajetória, me possibilitando a crescer e a aprender a cada dia. Por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, Elinete e Benedito, por estarem ao meu lado me apoiando e me incentivando em todos os momentos. Vocês são meus maiores incentivadores e os responsáveis por eu chegar até aqui.

Ao meu irmão, sobrinho, avós, primos, tios e amigos pela confiança, carinho e por todo apoio durante todos esses anos, e por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu marido, Makki, por ser essencial na minha vida e por me incentivar e apoiar em todos os momentos.

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios, pela oportunidade de realização desse projeto, e também pelos ensinamentos, dedicação e confiança ao longo desses anos.

Ao Prof. Ângelo B. Dias, agradeço pelo apoio e pela permissão da realização dos experimentos no LRMGA-CCTA-UENF.

Aos colaboradores desse projeto, Prof. Dr. José Alexandre Crippa, Profa. Dra. Ana Mendes e Prof. Jaime Hallak, pelas amostras cedidas, permitindo a realização desse projeto.

A todos os companheiros do grupo de pesquisa do Prof. Álvaro, pelos momentos de estudo e aprendizado.

À minha amiga e melhor companheira de laboratório, Paula, por me ajudar em todos os momentos durante esses dez anos de UENF. Além de ser minha dupla inseparável no trabalho se tornou uma grande amiga que vou levar pra vida. Obrigada por tornar mais prazeroso o nosso ambiente de trabalho.

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

À FAPESP e ao INCT-TM pelo apoio financeiro do projeto.

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

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Sistema de resposta e regulação ao estresse .....	3
1.2 DoHaD na Relação – criança x fator de estresse depressão materna.....	7
1.3 Papel dos genes <i>FKBP5</i> e <i>NR3C1</i> no sistema de resposta ao estresse ..	9
2. OBJETIVOS .....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 População de estudo .....	15
3.2 Extração de DNA .....	16
3.4 Escolha das regiões analisadas dos genes <i>FKBP5</i> e <i>NR3C1</i> e desenho dos primers .....	17
3.5 Ensaio com enzimas de restrição sensíveis à metilação associadas a PCR quantitativa (MSRED-qPCR).....	18
3.6 Análise estatística .....	19
4. RESULTADOS .....	20
4.1 Metilação do DNA grupo de risco <i>versus</i> grupo controle .....	20
4.2 Efeito das variáveis de risco na metilação do DNA em crianças.....	24
4.3 Correlação da metilação do DNA nos pares mãe-filho .....	28
5. DISCUSSÃO .....	32
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
8. ANEXO 1 .....	55
9. ANEXO 2.....	56

## ABREVIATURAS

- YLDs - do inglês, *Years Lived with Disability* - Anos vividos com incapacidade
- IHME - do inglês, *Institute for Health Metrics and Evaluation* - Instituto de Métricas e Avaliação de Saúde
- GBD - do inglês, *Global Burden of Disease* - Carga Global de Doenças
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- dNTPs – dinucleotídeos
- CpGs - dinucleotídeo “Citosina-fosfato-Guanina”
- CpGI - do inglês, *CpG Islands*
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- HPA - Eixo Hipotálamo Pituitário Adrenal
- GXE - Interação gene-ambiente
- GCs - Glicocorticoides
- CRH - Hormônio liberador de corticotrofina
- AVP - Arginina vasopressina
- ACTH - Hormônio adrenocorticotropina
- GR - Receptor de glicocorticoide
- MR - Receptor de mineralocorticoides
- Hsp90 - Proteína de choque térmico 90
- FKBP51 - Proteína de ligação FK506 51
- FKBP52 - Proteína de ligação FK506 52
- *FKBP5* - FKBP Prolil Isomerase 5 - gene codificador da proteína FKBP51
- *NR3C1* - Receptor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 1 - gene codificador do GR
- GREs - Elementos de resposta a glicocorticoides

- 5mC - 5'-metilcitosina
- Kb - Kilobase
- PCR - do inglês, *Polymerase Chain reaction*
- MSRE-qPCR - do inglês, *Methylation Sensitive Restriction Enzyme assay*
- HpaII - Enzima de restrição (endonuclease)
- HpyCH4IV - Enzima de restrição (endonuclease)
- BstUI - enzima de restrição (endonuclease)
- DOHaD – do inglês, *Developmental Origins of Health and Disease*
- SNP- do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*
- SCID - do inglês, *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 - do inglês, *Development and Well-Being Assessment*
- MDD - Transtorno Depressivo Maior - do inglês, *Major depressive disorder*
- MDD-DMR – regiões diferencialmente metiladas em pacientes com  
depressão maior
- DPP - Depressão pós-parto



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1. Modelo de interação G x E no desenvolvimento da depressão.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2. Sistema de resposta ao estresse mediado pelo eixo HPA.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3. Representação esquemática do gene <i>NR3C1</i> e <i>FKBP5</i> e localização das sequências analisadas no presente estudo.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 4. Sequência da ilha CpG da região promotora do gene <i>NR3C1</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 5. Média da metilação do DNA nos genes <i>FKBP5</i> e <i>NR3C1</i> entre grupo de risco (G1A e G1B) e grupo controle (G2)..</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6. Média da metilação do DNA nos genes <i>FKBP5</i> e <i>NR3C1</i> entre mães com depressão (G1) e mães sem depressão (G2).....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 7. Média da metilação do DNA nos genes <i>FKBP5</i> e <i>NR3C1</i> nas crianças dos grupos G1A, G1B e G2.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 8. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na criança no íntron 2 do gene <i>FKBP5</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 9. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na criança no íntron 5 do gene <i>FKBP5</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 10. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na criança no íntron 7 do gene <i>FKBP5</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 11. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na criança no gene <i>NR3C1</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 12. Correlação da metilação do DNA entre os pares mãe-filho dos grupos G1A, G1B e G2.....</b>	<b>30</b>

<b>Figura 13. Mapa de calor da metilação do DNA entre os binômios mãe-filho do grupo G1A, G1B e G2. ....</b>	<b>31</b>
--	-----------

## RESUMO

A regulação da resposta ao estresse, mediada pelo eixo hipotálamo pituitário adrenal (HPA) está intimamente relacionada ao desencadeamento da depressão, um dos transtornos mentais mais prevalentes no mundo. A etiologia da depressão é fortemente influenciada pelos efeitos da interação gene e ambiente. Os genes *FKBP5* e *NR3C1* envolvidos na regulação de hormônios glicocorticoides possuem um papel essencial na resposta ao estresse e no impacto na saúde mental. Além disso, a exposição a fatores de estresse no início da vida como a depressão materna pode contribuir na regulação de genes envolvidos na resposta a glicocorticoides, através de modificações epigenéticas, aumentando a susceptibilidade a diferentes transtornos mentais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de metilação do DNA no contexto da depressão materno-infantil nas regiões regulatórias próximas a elementos de resposta a glicocorticoides do gene *FKBP5* e no promotor alternativo do gene *NR3C1*. Dessa forma, avaliamos um total de 60 pares mãe-filho. Nessas amostras foram analisados os níveis de metilação do DNA das regiões intrônicas do *FKBP5* e do promotor 1F do *NR3C1* pela técnica de MSRED-qPCR (do inglês, Methylation-Sensitive Restriction Enzyme Digestion - quantitative PCR). Foi observado um perfil de aumento da metilação do DNA no promotor do gene *NR3C1* em crianças com MDD e crianças expostas a MDD materna. Além disso, foi observado uma correlação da metilação do DNA entre mães e filhos expostos a MDD materna. Sugere-se que existe um possível efeito intergeracional da exposição da MDD materna na prole. No *FKBP5* foi observado uma diminuição na metilação do DNA no íntron 7 em crianças expostas a MDD materna durante a gravidez e uma correlação da metilação do DNA entre mães e filhos expostos a MDD materna. Estes resultados indicam alterações nos níveis de metilação do DNA em regiões regulatórias do *FKBP5* e *NR3C1* no contexto MDD materno-infantil representam um possível alvo de estudos para a melhor compreensão da etiologia da MDD e como isso ocorre entre as gerações.

## ABSTRACT

The hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), which mediates stress response regulation, is closely related to depression development. Depression is one of the most prevalent mental disorders in the world. Environmental and gene interaction has a strong influence on depression etiology. The *FKBP5* and *NR3C1* genes are involved in regulating glucocorticoid hormones and play an essential role in the stress response and impact on mental health. Stress factors exposure in early life, such as maternal depression, may contribute to gene regulation involved in the response to glucocorticoids. These environmental factors may contribute to epigenetic modifications in stress response genes, increasing the susceptibility to different psychiatric disorders. The present study aimed to evaluate the DNA methylation profile in maternal-infant depression in regulatory regions close to glucocorticoid response elements of the *FKBP5* gene and the alternative promoter of the *NR3C1* gene. We evaluated 60 mother-infant pairs. In these samples, the levels of DNA methylation of the intronic regions of *FKBP5* and the 1F promoter of *NR3C1* were analyzed by the MSRED-qPCR technique (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme Digestion - quantitative PCR). We observed an increased DNA methylation profile in the *NR3C1* gene promoter in children with depression and children exposed to maternal depression. In addition, we observed a correlation of DNA methylation between mothers and offspring exposed to maternal depression. This correlation shows a possible intergenerational effect of maternal MDD exposure in the offspring. In *FKBP5*, we found a decrease in DNA methylation at intron 7 in children exposed to maternal MDD during pregnancy and a correlation of DNA methylation between mothers and children exposed to maternal MDD. These results indicate changes in DNA methylation levels in regulatory regions of *FKBP5* and *NR3C1* in the maternal-infant MDD context and represent a potential target of studies to better understand the depression etiology and how it occurs among generations.

## 1. INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais correspondem a mais de 10% da carga global de doenças, e são as principais causas de incapacidade, sendo responsáveis por mais de 37% dos anos vividos com incapacidade (do inglês *Years Lived with Disability* - YLDs) entre indivíduos com 15 anos ou mais (MATHERS *et al.*, 2017).

Os últimos estudos que apresentam a estimativa de prevalência de transtornos mentais, realizado em 2017 pelo Instituto de Métricas e Avaliação de Saúde (do inglês – *Institute for Health Metrics and Evaluation* – IHME), e Carga Global de Doenças (do inglês – *Global Burden of Disease* – GBD) relataram a estimativa de que 792 milhões de pessoas apresentam transtornos psiquiátricos, incluindo depressão, ansiedade, transtorno bipolar, transtornos alimentares e esquizofrenia (*Institute for Health Metrics and Evaluation*, 2018). Dentre eles, a depressão está entre os transtornos mentais mais prevalentes no mundo, sendo uma das principais doenças que causa incapacitação, pois impacta diretamente na qualidade de vida. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (do inglês – *World Health Organization* – WHO), estimam que 322 milhões de pessoas sofrem de depressão. No Brasil a depressão atinge 5,8% da população brasileira, o que corresponde em média a 12 milhões de pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

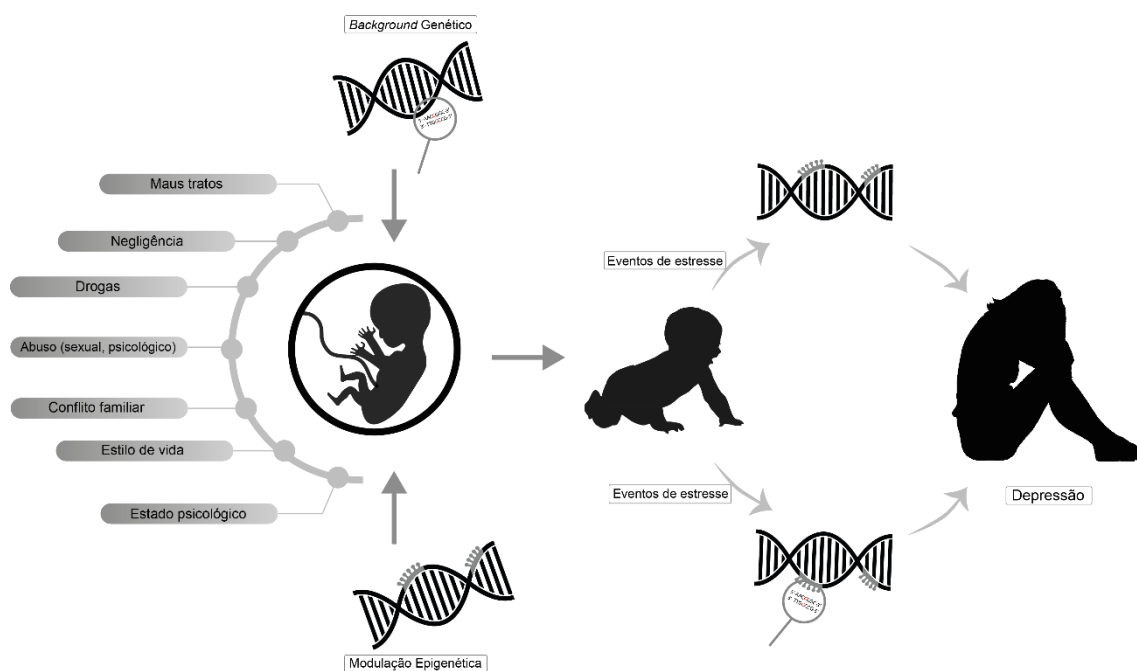
Diversos fatores influenciam no desenvolvimento dos transtornos mentais, o que torna ainda mais complexo o seu entendimento. Evidências demonstram que os fatores genéticos atuam como um forte fator de risco para o desenvolvimento da depressão, com contribuição estimada em cerca de 35%. Portanto, a depressão, também conhecida como transtorno depressivo maior (MDD), é um transtorno complexo e heterogêneo (FLINT; KENDLER, 2014; OTTE *et al.*, 2016; SULLIVAN, PATRICK F; NEALE; KENDLER, 2000). Variantes genéticas presentes em regiões codificadoras e não codificadoras de diversos genes têm sido relacionadas ao aumento de risco de transtornos mentais. A predisposição genética, apesar de não ser o fator único e determinante na saúde mental, pode influenciar em processos bioquímicos e moleculares na neurofisiologia (CATTANEO; RIVA, 2015).

Além da contribuição genética, o fator ambiental é forte componente no desenvolvimento de transtornos mentais (THAPAR; RIGLIN, 2020). Desse modo, a depressão pode se manifestar de forma diferente entre os indivíduos ao longo da vida. Sua etiologia resulta em uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (KWONG *et al.*, 2019).

A complexidade da etiologia da depressão ocorre pela alta heterogeneidade, de modo que cada indivíduo carrega um espectro único de combinações de variantes alélicas associadas ao risco, em conjunto com a exposição a fatores ambientais. Além disso, a partir de mecanismos epigenéticos, o padrão de expressão gênica pode ser alterado, aumentando ou diminuindo a transcrição de genes, o que pode contribuir com a predisposição para esse transtorno mental (FLINT; KENDLER, 2014; TORRES-BERRÍO *et al.*, 2019). Uma das fontes mais relevantes de influência nas modificações epigenéticas são os fatores ambientais, associados a eventos adversos no decorrer da vida (KLENGEL; BINDER, 2015). Essas ações levam a um conjunto de disfunções em diferentes vias associadas a depressão, como o sistema serotoninérgico, dopaminérgico e o eixo hipotálamo pituitário adrenal (HPA) (CRESPI, 2020).

A epigenética atua como um mediador entre a interação gene-ambiente (do inglês - *Gene x Environment* - GxE), sendo considerados mecanismos chave para o desencadeamento de várias doenças (ASSARY *et al.*, 2017). A abordagem GxE é aplicada no nível de vulnerabilidade, em que alguns indivíduos com uma base genética específica são mais susceptíveis a eventos de estresse e mais propensos a desenvolver certos transtornos mentais, como a depressão (LIMA-OJEDA; RUPPRECHT; BAGHAI, 2018; LOPIZZO *et al.*, 2015; MENDONÇA; MANGIAVACCHI; RIOS, 2021) (Figura 1). Os fatores de estresse vivenciados no início da vida, principalmente durante o período pré-natal, como o estresse materno, as infecções e a desnutrição, a exposição ao álcool e as drogas são fortes fatores de risco para o desenvolvimento da depressão (NANNI; UHER; DANESE, 2012).

Considerando as evidências supracitadas, é evidente que a depressão é um problema de saúde pública global. Apesar dos grandes avanços nos estudos para melhor compreensão da sua etiologia, devido a sua heterogeneidade, eles estão longe de ser totalmente elucidados.



**Figura 1. Modelo de interação G x E no desenvolvimento da depressão.** A exposição a eventos adversos, principalmente no início da vida está relacionado a maiores chances de desenvolver transtornos psiquiátricos. Fatores ambientais podem influenciar na modulação genética e epigenética do indivíduo. A presença de determinadas variantes genéticas pode conferir maior susceptibilidade ao desenvolvimento da depressão, no qual pode ser desencadeado a partir da exposição a eventos de estresse (modificado de MENDONÇA *et al.*, 2021).

### 1.1 Sistema de resposta e regulação ao estresse

O estresse está ligado à regulação de diversos sistemas relacionados a emoção, comportamento, cognição e saúde física. A exposição prolongada ao estresse implica na desregulação desses sistemas, levando a uma resposta não adaptativa, contribuindo para o desenvolvimento de doenças em geral (CATTANEO; RIVA, 2015). O eixo HPA é responsável por orquestrar o sistema de liberação do glicocorticoide cortisol em resposta a fatores de estresse, tanto exógenos quanto endógenos. Os glicocorticoides (GCs) influenciam em uma variedade de processos fisiológicos, atuando em funções metabólicas, cardiovasculares, imunológicas e cognitivas (TROUBAT *et al.*, 2021).

O eixo HPA apresenta um papel central na relação entre resposta ao estresse e desenvolvimento da depressão. O sistema de resposta ao estresse é ativado após um estímulo interno ou externo, levando a ativação do hipotálamo (Figura 2). Após sua ativação, o núcleo paraventricular do hipotálamo estimula a produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP), que por sua vez estimula a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotropina (ACTH) através da glândula pituitária. A partir disso ocorre a síntese de glicocorticoides (GCs) pelo córtex adrenal e sua liberação em todos os tecidos, atuando em diferentes funções, incluindo sistema imunológico, ósseo, muscular, tecido adiposo e cérebro (SILVA *et al.*, 2021).

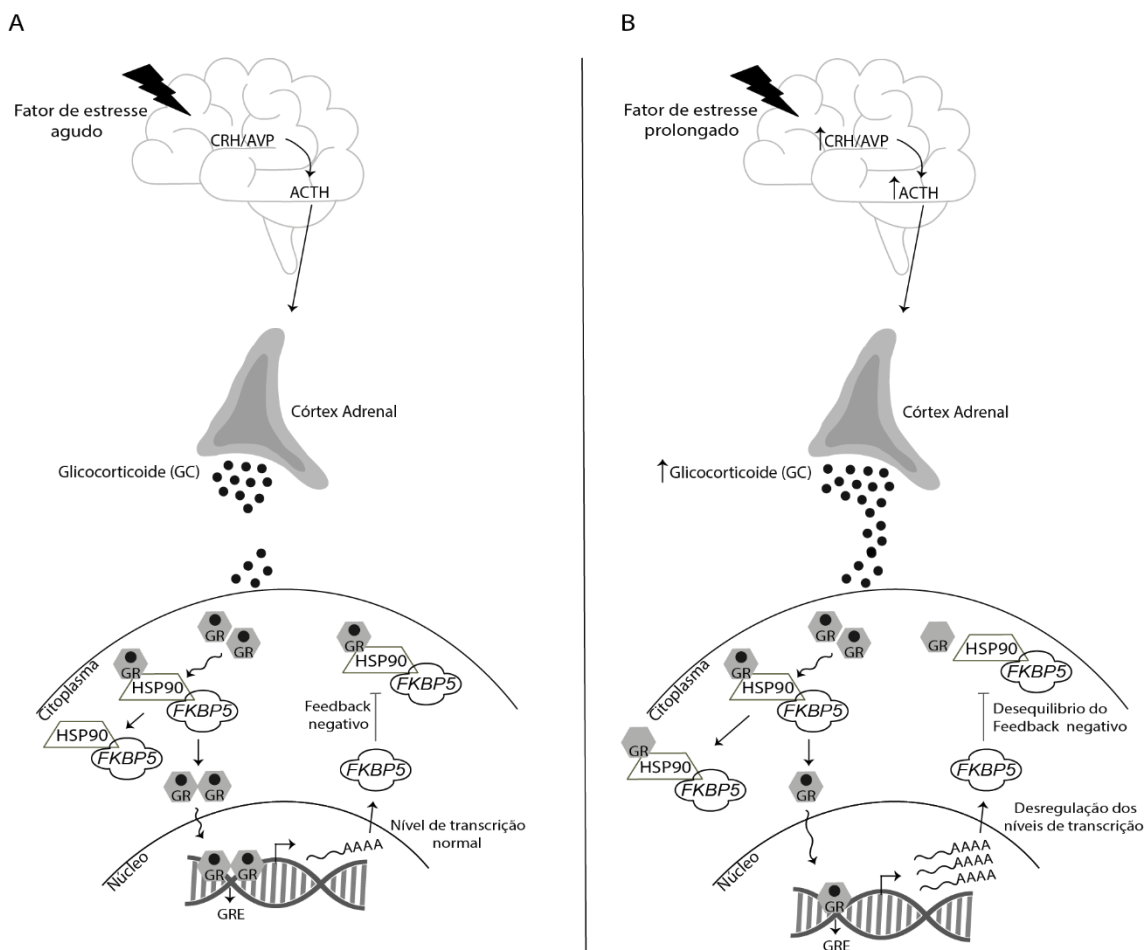
Os GCs se ligam a receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides (GR and MR), na qual os MRs estão relacionados à regulação do feedback negativo durante o estresse agudo ou normal, e são menos específicos a ligação ao GC. Por outro lado, os GRs estão envolvidos em mecanismos cerebrais ativados pelo estresse severo ou prolongado, além de se ligar mais especificamente ao GC (JURUENA *et al.*, 2018; KRONTIRA; CRUCEANU; BINDER, 2020).

A sensibilidade a GR é regulada pela proteína de ligação FKBP51, uma co-chaperona associada à proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Essas proteínas se ligam ao GR no citoplasma, formando o complexo GR, juntamente com outras proteínas co-chaperonas FKBP52 e p23. Na presença de GCs os receptores se dissociam do complexo ligando-se ao mesmo. Após a ligação de GRs à GCs, os GCs serão translocados para o núcleo onde irão atuar na transcrição de genes alvos (BINDER, 2009; MENKE, 2019). No núcleo, o GR se liga diretamente ao DNA através de elementos de resposta a glicocorticoides (GREs) induzindo a expressão do gene codificador da proteína FKBP51. Conseqüentemente, forma-se um loop de *feedback* negativo entre a produção FKBP51 e a sensibilidade a GR (KRONTIRA; CRUCEANU; BINDER, 2020).

Altos níveis intracelulares de FKBP51 diminui a afinidade de GR a GC, e sua translocação para o núcleo ocorre de forma menos eficiente. A desregulação do eixo HPA, gerada por níveis alterados na síntese de GCs, gera um desequilíbrio do *feedback* negativo (ARNETT *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2021). Em pacientes com depressão, a sensibilidade a GR é prejudicada, gerando a uma alteração no mecanismo de *feedback* negativo e conseqüentemente



desregulação na síntese de CRH e ACTH, levando a um aumento de produção de GCs (MENKE, 2019; TROUBAT *et al.*, 2021).



**Figura 2. Sistema de resposta ao estresse mediado pelo eixo HPA.** (A) Sinalização de GC em condições normais. O estímulo de estresse considerado normal ou agudo leva a atividade normal do eixo HPA, resultando em uma boa resposta a GCs. (B) Sinalização de GC em condições de estresse crônico. O estímulo de estresse crônico ou contínuo leva a desregulação da atividade de do eixo HPA. CRH - hormônio liberador de corticotrofina; AVP - arginina vasopressina; ACTH - hormônio adrenocorticotropina; GR – receptor de glicocorticoide; GC – glicocorticoide; Hsp90 - proteína de choque térmico 90; FKBP5 - proteína de ligação FKBP51; GRE – elemento de resposta a glicocorticoide (Mendonça et al., submitted article).

Dessa forma, pode-se afirmar que fatores ambientais, tanto físicos quanto a exposição a eventos adversos durante a vida atuam como reguladores do eixo HPA e podem induzir alterações na resposta a GCs, que podem permanecer

estáveis no decorrer da vida. Essas alterações podem ser geradas por variantes genéticas que conferem uma resposta diferencial frente ao fator de estresse ou através de marcas epigenéticas (BUSCHDORF; MEANEY, 2016).

O papel da epigenética na etiologia dos transtornos mentais vem sendo muito explorada na última (BABENKO; KOVALCHUK; METZ, 2014; DARBY; SABUNCIYAN, 2014; NESTLER, 2016; TORRES-BERRÍO *et al.*, 2019). Sabe-se que a epigenética é o estudo das modificações na função gênica potencialmente herdáveis sob o DNA que não alteram sua sequência original (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013). As marcas epigenéticas são reversíveis e atuam como um campo de interação entre a sequência de DNA e as exposições ambientais. O principal efeito dessas modificações é a alteração do perfil de expressão gênica (TRIANTAPHYLLOPOULOS; IKONOMOPOULOS; BANNISTER, 2016). As principais marcas epigenéticas são as modificações de histonas, microRNA (miRNA) e a metilação do DNA.

Entre eles a metilação do DNA é a marca epigenética melhor caracterizada e mais investigada nos últimos anos (BROWN, S. J.; STOILOV; XING, 2012; LI *et al.*, 2020; WIKENIUS *et al.*, 2019). A metilação do DNA ocorre preferencialmente em dinucleotídeo CpG. Apenas 25% da metilação do DNA em humanos ocorre em locais não CpG (CpA, CpT e CpC) (GUO *et al.*, 2015). Esse mecanismo geralmente está relacionado ao silenciamento da transcrição gênica em regiões promotoras, através da condensação da cromatina e o bloqueio de ligação de fatores de transcrição. Além do papel de repressão da transcrição do gene, a metilação do DNA pode gerar outros efeitos funcionais no genoma, como uma interação com proteínas de ligação de histonas e fatores de transcrição que afetam indiretamente a transcrição gênica (LI *et al.*, 2020). Dessa forma, a atuação da metilação do DNA na transcrição gênica é complexa e não está apenas relacionada ao silenciamento gênico. Estudos de meta-análise mostram que a metilação do DNA ocorre em vários locais do genoma, incluindo promotores, elementos transponíveis, regiões regulatórias e regiões intergênicas (GATTA *et al.*, 2021; GRÄFF *et al.*, 2011; WEN; TANG, 2014).

Diversos estudos associam as alterações epigenéticas em genes associados ao eixo HPA com o desenvolvimento de transtornos mentais. Além disso, sugere-se que a metilação do DNA e a acetilação de histonas interagem com outros locais ao longo do genoma, na qual sugere-se que a regulação dos

sistemas neuroendócrinos é coordenada pela interação de genes, em *clusters* genéticos (ARNETT *et al.*, 2016; BUSCHDORF; MEANEY, 2016). Em geral, modificações epigenéticas em genes relacionados à regulação do eixo HPA demonstram um papel importante na resposta ao estresse, envolvendo intensidade e duração de resposta (LEE, R.; SAWA; SCIENCES, 2015). Essas modificações refletem diretamente na regulação do humor, resposta emocional e cognitiva. A metilação do DNA nesses genes, vêm sendo bastante explorada neste âmbito, devido ao seu papel direto na resposta molecular ao estresse (BROWN, A.; FIORI; TURECKI, 2019; STANKIEWICZ; SWIERGIEL; LISOWSKI, 2013).

Tendo isto em vista, os transtornos mentais são fortemente influenciados pelos efeitos da interação entre gene e ambiente. Os avanços nos estudos de genética na compreensão das etiologias desses transtornos têm contribuído significativamente na prática clínica e no desenvolvimento de novas formas de tratamento e prevenção das mesmas (CRESPI, 2020).

## **1.2 DoHaD na Relação – criança x fator de estresse depressão materna**

A incidência do desenvolvimento de transtornos psiquiátricos geralmente está mais propícia a ocorrer durante a fase de transição da infância e adolescência para a vida adulta. Cerca de 75% dos transtornos psiquiátricos são desencadeados até o início da vida adulta (KESSLER *et al.*, 2005; THAPAR; RIGLIN, 2020). Estudos de neurodesenvolvimento associados à depressão destacam que o período primordial para o surgimento de doenças relacionadas à saúde mental ocorre no período pré-natal, nos primeiros anos de vida e adolescência. Esses períodos são fatores chaves no desenvolvimento de transtornos durante a vida adulta (TALAROWSKA, 2020).

O estresse, principalmente nos primeiros anos de vida, pode apresentar consequências decisivas no desenvolvimento de doenças relacionadas à saúde mental. A exposição à adversidade no início da vida afeta em média de 10 a 15% dos indivíduos até 18 anos. A exposição recorrente a episódios de estresse, como maus tratos e negligência durante a infância apresenta maior risco de desenvolver transtornos relacionados à saúde mental (ERICKSON; JULIAN;

MUZIK, 2019; GILBERT *et al.*, 2009; LANE; DUBOWITZ, 2021; LEMOULT *et al.*, 2020). Além disso, indivíduos com histórico de estresse precoce têm uma probabilidade duas vezes maior de desenvolver depressão crônica e episódios depressivos mais frequentes e prolongados (SILVA *et al.*, 2021).

Os primeiros fatores de estresse vivenciados na infância podem influenciar mais significativamente nas mudanças biológicas e conseqüentemente interferir mais fortemente em alterações no desenvolvimento, comportamento e saúde do indivíduo (ARISTIZABAL *et al.*, 2020). Uma das principais associações de alterações epigenéticas na etiologia da depressão está relacionada a eventos de estresse no início da vida. Esses eventos vivenciados precocemente estão relacionados com o aumento no risco de depressão e também potencializar os efeitos da exposição a adversidades na vida adulta (LI *et al.*, 2020; OPEL *et al.*, 2019).

A exposição a eventos adversos no início da vida pode não somente conferir maior susceptibilidade a doenças mentais como também estar relacionado a maior resiliência e adaptação a esses fatores (CATTANEO; RIVA, 2015). Essa complexidade entre exposição ao trauma e efeito gerado justifica o crescente número de estudos relacionados à biologia da saúde mental. A hipótese da Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença (do inglês - *Developmental Origins of Health and Disease* - DOHaD) visa uma melhor compreensão da relação da exposição a traumas desde o período embrionário e fetal, a infância e a adolescência e os efeitos na saúde humana (ABDUL-HUSSEIN *et al.*, 2020).

O período intrauterino é o período de maior plasticidade neural, dessa forma muitos estudos afirmam que fatores como transtornos psiquiátricos materno, uso de drogas e problemas conjugais, por exemplo, podem induzir mudanças nos circuitos neurais e em vias biológicas no período de desenvolvimento intrauterino, contribuindo com a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças futuras (SILVA *et al.*, 2021). Em adição, esses fatores podem provocar alterações na reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário, período crítico no estabelecimento do padrão de metilação do DNA associado à diferenciação celular (KOFINK *et al.*, 2013).

Além disso, apesar do cortisol desempenhar um papel essencial no desenvolvimento fetal, elevados níveis desse hormônio durante a gravidez eleva

também os níveis de cortisol do feto (CAO-LEI *et al.*, 2020). Existe uma barreira placentária que protege o feto contra níveis elevados de GCs, fazendo com que em apenas 3 a 10% dos GCs encontrados na circulação materna atinjam o compartimento fetal. No entanto, níveis exacerbados de cortisol materno podem provocar a desregulação do eixo HPA no feto, podendo impactar no neurodesenvolvimento fetal e alterações epigenéticas (KRONTIRA; CRUCEANU; BINDER, 2020).

Estudos sugerem que o cuidado materno altera a expressão de uma grande quantidade de genes. Além disso, essas alterações no padrão de expressão gênica se correlacionam com modificações epigenéticas, tanto em promotores gênicos como também em regiões transcricionais e intergênicas (BUSCHDORF; MEANEY, 2016; WEAVER; MEANEY; SZYF, 2006). Portanto, sugere-se que a partir da exposição a fatores ambientais, a modulação epigenética é gerada modificando a resposta do eixo HPA, o que pode contribuir na susceptibilidade a transtornos psiquiátricos.

### **1.3 Papel dos genes *FKBP5* e *NR3C1* no sistema de resposta ao estresse**

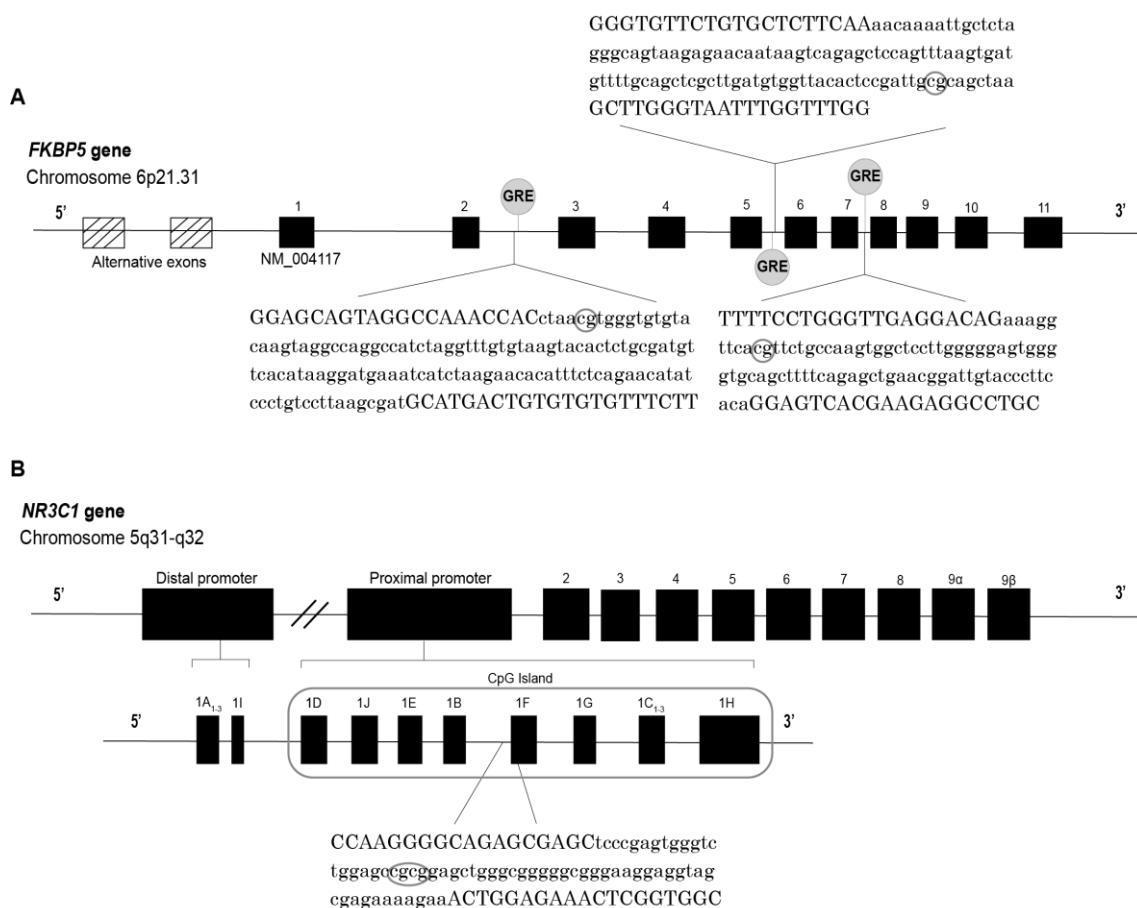
Os efeitos do estresse variam de acordo com a intensidade, duração, frequência e até mesmo o momento em que ocorre o estímulo. Esses efeitos são mediados por GR (JUSZCZAK; STANKIEWICZ, 2018). Os GCs são os produtos finais da resposta ao estresse, e sua atuação depende da ligação à GR. Por sua vez, o GR atua como um fator de transcrição, se ligando ao GRE nos promotores dos genes responsivos a GC ativando a transcrição gênica, e também atuam regulando outros fatores de transcrição (BINDER, 2009).

Antes de se ligar a GC o GR reside no citoplasma da célula, ligado ao complexo GR, que o mantém em uma conformação estrutural adequada para receber o seu ligante. Na presença de GC, o GR se dissocia desse complexo, permitindo sua acessibilidade ao ligante e sua translocação para o núcleo. Os GCs interferem na transcrição de diversos genes relacionados ao sistema nervoso (ARGENTIERI *et al.*, 2017).

Os genes que codificam proteínas importantes nessa sinalização celular são os genes *FKBP5* e o *NR3C1* (Figura 3). O gene *NR3C1* (receptor nuclear da

subfamília 3, grupo C, membro 1), codifica o GR, membro de uma grande família de receptores hormonais nucleares, desempenhando um papel essencial na ação imunossupressora e metabólica de GC (GATTA *et al.*, 2021). Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q31.3), e consiste em 8 éxons codificantes e 1 não codificante. A região 5' não traduzida do gene *NR3C1* é composta por vários éxons 1, sendo 4 na região promotora distal (A1-3 e I) e 10 éxons na região promotora proximal (D, J, E, B, F, G, C1-3 e H), sendo estes localizado em uma ilha CpG. Dessa forma, o éxon 1 consiste em vários éxons alternativos que dão origem a vários transcritos que codificam a mesma proteína (RADTKE *et al.*, 2015; YEHUDA R, DASKALAKIS NP, LEHRNER A, 2014). A transcrição do gene *NR3C1* gera, por *splicing* alternativo, diferentes variantes de transcrição que codificam as mesmas isoformas e também isoformas diferentes. As múltiplas isoformas de GR apresentam diferentes potenciais de transdução de sinais, com diferentes padrões de translocação para o núcleo e atividade transcricional (BORÇOI *et al.*, 2020).

Além do gene *NR3C1*, o gene *FKBP5* é um importante regulador da ligação de GR a GC. O gene *FKBP5*, responsável por codificar a proteína de ligação FKBP51, se localiza no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31) e possui quatro isoformas, devido ao *splicing* alternativo (BINDER, 2009). A proteína FKBP51 é uma co-chaperona, pertencente à família de proteínas immunofilinas, responsáveis por atuar em processos de imunorregulação e em processos celulares que envolvem o dobramento e o tráfego de proteínas. Em conjunto com as proteínas Hsp90, FKBP52 e p23, a proteína FKBP51 regula a sinalização de GC (CRIADO-MARRERO *et al.*, 2018a).



**Figura 3. Representação esquemática do gene *NR3C1* e *FKBP5* e localização das sequências analisadas no presente estudo.** (A) Descrição e localização do gene *FKBP5* e dos elementos de resposta a glicocorticoides (GRE). Amplicons para análise de metilação do DNA nos íntrons 2, 5 e 7. Descrição e localização do gene *NR3C1*, ilha CpG na região promotora. Amplicon para análise de metilação no promotor 1F do gene *NR3C1*. Todas as coordenadas genômicas foram retiradas do UCSC Genome Browser Build 2009 / hg19. Os dinucleotídeos CpG analisados neste estudo estão indicados por um círculo (Mendonça *et al.*, submitted article).

Alterações nos níveis de transcritos do gene *FKBP5* e *NR3C1* podem ser causadas devido a fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Alterações na metilação do DNA no gene *NR3C1* estão associadas a diferentes transtornos mentais (CASTRO-VALE; CARVALHO, 2020; JANUAR; SAFFERY; RYAN, 2015; TYRKA; RIDOUT; PARADE, 2016). Diferentes estudos no promotor do gene *NR3C1* associam o aumento de metilação do DNA em indivíduos que sofrem maus tratos durante a infância a maior vulnerabilidade para desenvolver

transtornos de saúde mental (LABONTE *et al.*, 2012; MCGOWAN *et al.*, 2009; RADTKE *et al.*, 2015).

A maioria dos estudos de metilação do DNA no gene *NR3C1* focam na região promotora do éxon 1F. Maiores níveis de metilação nessa região tem sido relacionada a redução dos níveis de transcritos de *GR*, interferindo na redução da eficiência do *feedback* negativo e maior acúmulo de glicocorticoides intracelulares (JC *et al.*, 2013; TYRKA; RIDOUT; PARADE, 2016). Altos níveis de metilação no promotor do gene *NR3C1* vem sendo associado principalmente com redução da expressão de *GR* e aumento da reatividade do eixo HPA (CATTANEO; RIVA, 2015).

A transcrição do *FKBP5* induzida por *GR*, por sua vez, é mediada pela ligação de *GR* a GREs localizados em uma região que abrange mais de 100kb e varia desde a montante do promotor gênico até as regiões dos íntrons 2, 5 e 7 deste gene. A intensidade da atividade de GC na transcrição do *FKBP5* é moderada por mecanismos genéticos e epigenéticos (MATOSIN; HALLDORSOTTIR; BINDER, 2018; ZANNAS *et al.*, 2016). Estudos relevantes em tecidos de cérebro humano e camundongos demonstraram que a metilação do DNA no gene *FKBP5* é inversamente correlacionada com a expressão (CRIADO-MARRERO *et al.*, 2018b; EWALD *et al.*, 2014; KLENGEL; BINDER, 2013).

Estudos de conformação de cromatina demonstraram que a presença da variante de risco do polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês - *single nucleotide polymorphism* - SNP) rs1360780, polimorfismo que mais tem demonstrado efeito funcional relacionado a transtornos psiquiátricos no gene *FKBP5*, interage mais fortemente com o GRE intrônico e o sítio de início de transcrição do gene do que o alelo comum, gerando maior expressão do *FKBP5*. Ao mesmo tempo, menores níveis de metilação do DNA no GRE intrônico foi associado a portadores do alelo de risco quando expostos a eventos de estresse, relacionado ao aumento na expressão de *FKBP5* e maior resistência a GC (KLENGEL; BINDER, 2013, 2015). A demetilação do DNA foi encontrada em várias regiões de GREs intrônicos, associados a diferentes contextos ambientais (ZANNAS *et al.*, 2016).

A exposição prolongada ao estresse resulta em mudanças no sistema de resposta do eixo HPA, levando a super ativação de *GR*. O *GR* é distribuído por



todo o corpo e por todas as regiões do cérebro límbico. A super ativação de GR e alterações que levam o aumento da resistência de ligação a GC pode ser a base para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como a depressão (TYRKA; RIDOUT; PARADE, 2016)

A maioria dos estudos de avaliação de metilação do DNA dos genes *FKBP5* e *NR3C1* em depressão são realizados em estudos separados, o que dificulta o entendimento de como esses genes interagem entre si. Isso se deve a condução de cada estudo e principalmente pelas características de população de estudo, tipo de tecido estudado, metodologia conduzida, variáveis clínicas e *background* genético individual. Apesar de um número significativo de estudos que focam na metilação do DNA nos genes *NR3C1* e *FKBP5* em exposição ao trauma precoce, poucos estudos avaliam o perfil de metilação do DNA desses genes em pacientes com depressão.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de metilação do DNA no contexto da depressão materno-infantil nos genes *FKBP5* e *NR3C1*; e se a metilação do DNA está associada a fatores de estresse como depressão materna, depressão pré- e pós-natal e conflitos familiares, vivenciados pela criança.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliação do perfil de metilação do DNA nas regiões intrônicas que abrangem os GREs do gene *FKBP5* em indivíduos com depressão;
- Avaliação do perfil de metilação do DNA no promotor do gene *NR3C1* em indivíduos com depressão;
- Efeito da depressão materna na metilação do DNA nos genes *FKBP5* e *NR3C1* nas crianças;
- Efeito das variáveis clínicas associadas à exposição ao estresse no início da vida na metilação do DNA em crianças;
- Correlação da metilação do DNA entre mãe e filho nos genes *FKBP5* e *NR3C1*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 População de estudo

As amostras de DNA são derivadas de extração de células bucais de amostras compostas por mulheres/mães e crianças/filhos da cidade de Uberaba, MG. A amostra de estudo foi constituída por um total de 120 indivíduos, sendo binômios mães-filhos (60 mães e 60 crianças). Desse total foi dividido entre grupo G1 (30 mães e 30 crianças), no qual todas as crianças convivem com a MDD materna, e G2 (30 mães e 30 crianças), no qual representa o grupo controle, mães e filhos sem diagnóstico de depressão e sem exposição a fator de risco MDD materna. Para analisar a metilação do DNA em mães e filhos do grupo de risco separadamente, dividimos o grupo G1 em subgrupos. Neste caso, o grupo G1 compreende o subgrupo G1A (G1A-mãe com MDD e G1A-criança com MDD) e G1B (G1B-mãe com MDD e G1B-criança, na qual convivem com a MDD materna, mas não apresentam diagnóstico de MDD).

Os dados para confirmação do diagnóstico de depressão nesses pacientes foram realizados pela Profa. Dra. Ana Vilela Mendes (atualmente docente da Universidade Católica do Salvador, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas). 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, 4ª 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, 10ª revisão).

Os critérios de inclusão das mulheres utilizadas foram mães não grávidas, com filhos biológicos com idade entre 6 a 12 anos, sem deficiências físicas e/ou sensoriais aparentes. Mulheres com outros diagnósticos de transtornos psiquiátricos foram excluídas do estudo para garantir a não interferência de outras variáveis que não a depressão.

Os critérios de inclusão das crianças foram ter idade entre 6 a 12 anos, ambos os gêneros e morar junto com a mãe biológica. Em relação aos critérios de exclusão, não fizeram parte do estudo crianças com histórico de doenças orgânicas ou com deficiência sensorial aparente, a fim de evitar variáveis de confusão que pudessem interferir no comportamento da criança.

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 aspectos 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.

### **3.2 Extração de DNA**

As amostras de DNA utilizadas no presente estudo foram obtidas no banco de dados de DNA do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. As amostras foram coletadas na Unidade Básica de Saúde de Uberaba, Minas Gerais. A coleta de amostras de células bucais para isolamento de DNA foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade de Uberaba (UNIUBE) (CAAE: 0039.0.227.000-06). O DNA foi isolado de células epiteliais bucais seguindo o protocolo de *salting-out* (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992).

Para cada amostra foi quantificada 1 $\mu$ L de DNA através da leitura em espectrofotômetro (NanoDrop One-C). 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.

### 3.4 Escolha das regiões analisadas dos genes *FKBP5* e *NR3C1* e desenho dos primers

Foram analisadas regiões regulatórias relatadas anteriormente nos íntrons do *FKBP5* (2, 5 e 7) e o promotor alternativo 1F do gene *NR3C1*, na qual há relatos de alteração na metilação do DNA em estudos anteriores de pacientes com diagnóstico psiquiátrico (ARGENTIERI *et al.*, 2017; DASKALAKIS; YEHUDA, 2014; KLENGEL *et al.*, 2013). As coordenadas genômicas usadas no presente trabalho foram derivadas do genoma de referência GRCh37/hg19 do banco de dados da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC – <http://genome.ucsc.edu/>) para caracterizar a localização dessas regiões, com *tracks* como a posição da ilha CpG e do GenEnhancer, além da sobreposição com sítios de ligação de fator de transcrição (*tracks* de regulação ENCODE - Txn Factor CHIP).

Com base nos dados obtidos, foi utilizado células de epitélio bucal derivadas de pares mãe-filho para realizar a análise de busca por regiões diferencialmente metiladas no transtorno depressivo maior (MDD-DMR do inglês *Major Depressive Disorder - Differentially Methylated Regions*). Sugere-se que as células de epitélio bucal são o tipo de célula mais sensível ao estudar a metilação do DNA no *FKBP5* e *NR3C1* em distúrbios comportamentais (DI SANTE *et al.*, 2018; SMITH *et al.*, 2015; VUKOJEVIC *et al.*, 2014). Além da facilidade de se obter essas células, elas derivam da mesma camada ectodérmica durante o desenvolvimento das células cerebrais (LOWE *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2015).

O desenho de *primers* dos genes *FKBP5* e *NR3C1* foram realizados através dos Softwares Generunner v.3.05 (Hastings Software Inc.) e UGENE (Unipro UGENE v.38), a partir de sequências depositadas no banco de dados UCSC. As coordenadas genômicas das regiões intrônicas do gene *FKBP5* e do promotor do *NR3C1* analisadas no presente estudo estão representadas na figura 3.

O sítio CpG analisado, localizado na ilha CpG do promotor 1F do gene *NR3C1*, utilizou como referência a numeração dos sítios CpGs baseado no estudo de revisão de Palma-Gudiel *et al.* 2015 (Figura 4).



foram incubadas por 4 horas a 37°C (HpyCH4IV; HhaI) e 60°C (BstUI) e posteriormente submetidas a tempo e temperatura de inativação de acordo com a especificação para cada enzima. Para controle foi utilizado DNA das amostras não digeridas; sendo que o volume da enzima foi substituído por H<sub>2</sub>O Milli-Q. Os ensaios de qPCR foram realizados em um volume final de 10µL [10µM de cada par de primer; 5,0µL PCR Master Mix – Sybr Green (AppliedBiosystem); 0,2µL água Milli-Q; 4,5µL de cada amostra ( $\pm$ 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. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.6 Análise estatística

A análise dos resultados da quantificação da 5mC% foi realizada utilizando *Unpaired t test with Welch's correction* e o ANOVA One-way- *Tukey's multiple comparisons test* e *Bonferroni's multiple comparisons test*. Para as análises de correlação da metilação do DNA entre os pares mãe-filho foi realizado o teste de correlação Kendall 's tau. Os softwares utilizados para o processamento de dados e análises estatísticas foram o GraphPad Prism 5.0 e R versão 4.0.5. Para todas as análises estatísticas foram adotadas o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

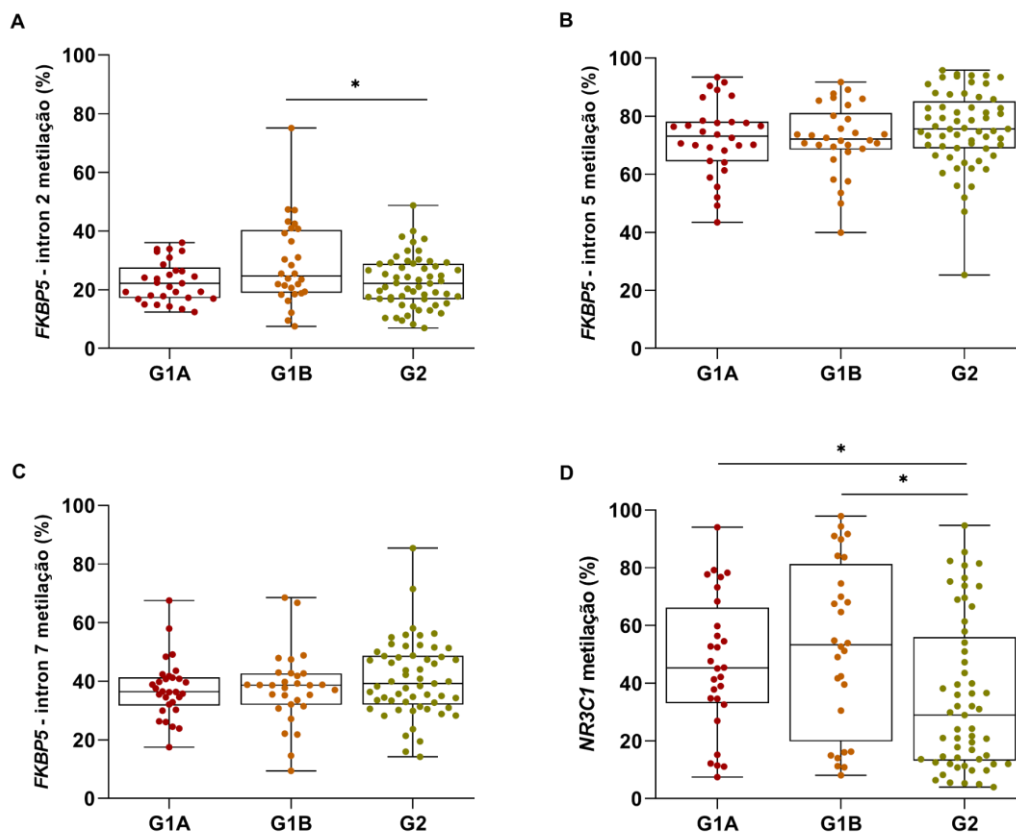
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Metilação do DNA grupo de risco *versus* grupo controle

Com base nos objetivos do presente estudo, a princípio foi avaliado o perfil de metilação do DNA em regiões regulatórias dos genes *FKBP5* e *NR3C1* em associação com o diagnóstico de depressão de binômios mães e filhos. E também o efeito da exposição a variáveis clínicas na metilação do DNA nessas regiões nas crianças.

Inicialmente foi avaliado a média da metilação do DNA no grupo G1A e G1B *versus* G2. No gene *FKBP5*, foi observado uma diferença significativa na metilação do DNA do íntron 2 no grupo G1B em relação ao G2 ( $p < 0,05$ ) (Figura 5A). O grupo G1B apresentou uma média de metilação do DNA de 28,84% enquanto no grupo G2 a média foi de 22,58%. Nos íntrons 5 e 7, as médias de metilação do DNA nas regiões analisadas foram semelhantes em ambos os grupos, não havendo diferença estatística (Figura 5B-C). Em contrapartida, na região promotora analisada do *NR3C1* foi visto uma diferença significativa entre a média de metilação geral dos grupos. Os grupos G1A e G1B apresentaram maiores níveis de metilação do DNA, em média 45,93% e 52,68% respectivamente, enquanto que o G2 apresentou uma média de 34,97% ( $p < 0,05$ ) (Figura 5D).



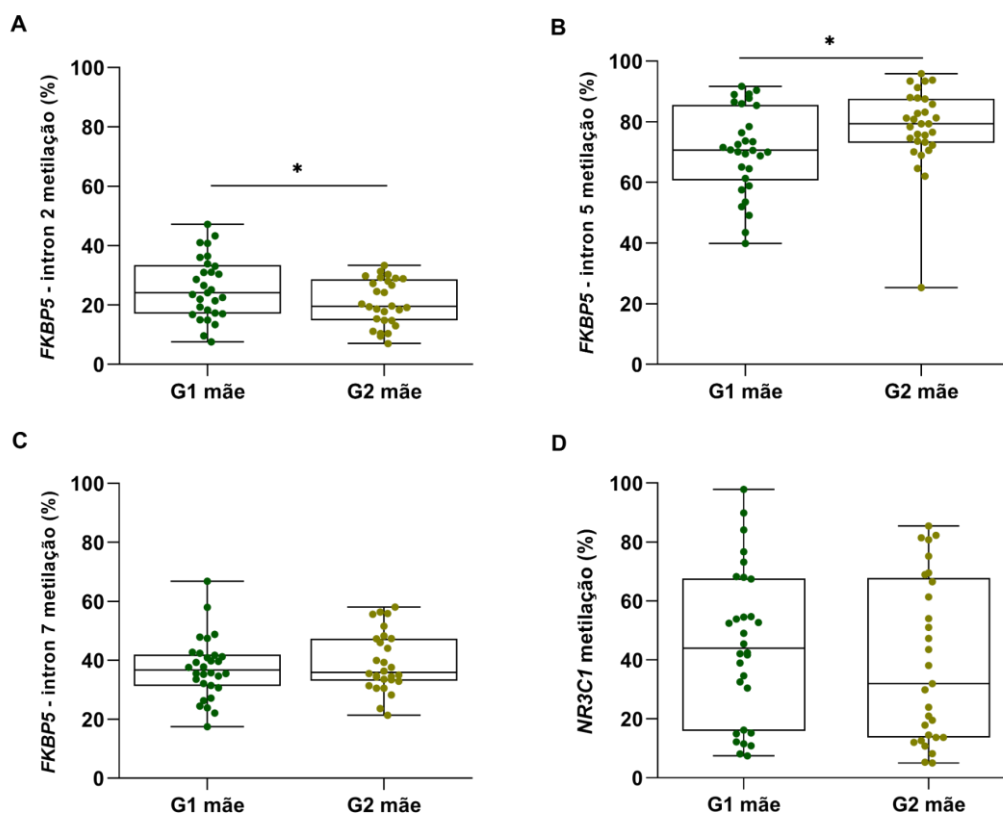


**Figura 5. Média da metilação do DNA nos genes *FKBP5* e *NR3C1* entre grupo de risco (G1A e G1B) e grupo controle (G2).** (A) 5mC% íntron 2 - *FKBP5*. Diferença significativa na metilação do DNA do grupo G1B em relação ao G2 ( $p < 0,05$ ) (B) 5mC% íntron 5 - *FKBP5*. Não houve diferença significativa na metilação do DNA entre os grupos. (C) 5mC% íntron 7 - *FKBP5*. Não houve diferença significativa na metilação do DNA entre os grupos. (D) 5mC% *NR3C1*. Diferença significativa na metilação do DNA do grupo G1A e G1B em relação ao G2 ( $p < 0,05$ ) (Teste Anova *One-way* - *Tukey's multiple comparisons test*).

Assumindo que o G1 é considerado o grupo de risco, exposto à MDD materna, e o G2, grupo controle, foi avaliado a metilação do DNA em mães e filhos separadamente entre os grupos. Dessa forma, foi visto o padrão de metilação do DNA entre mães com MDD (G1-mães) e mães sem MDD (G2-mães); e, crianças com MDD (G1A), crianças sem MDD, mas que convivem com a MDD materna (G1B), e crianças controle (G2).

Observando as mães separadamente, no gene *FKBP5* foi encontrado uma diferença significativa nas mães com MDD (G1-mães), para as mães sem

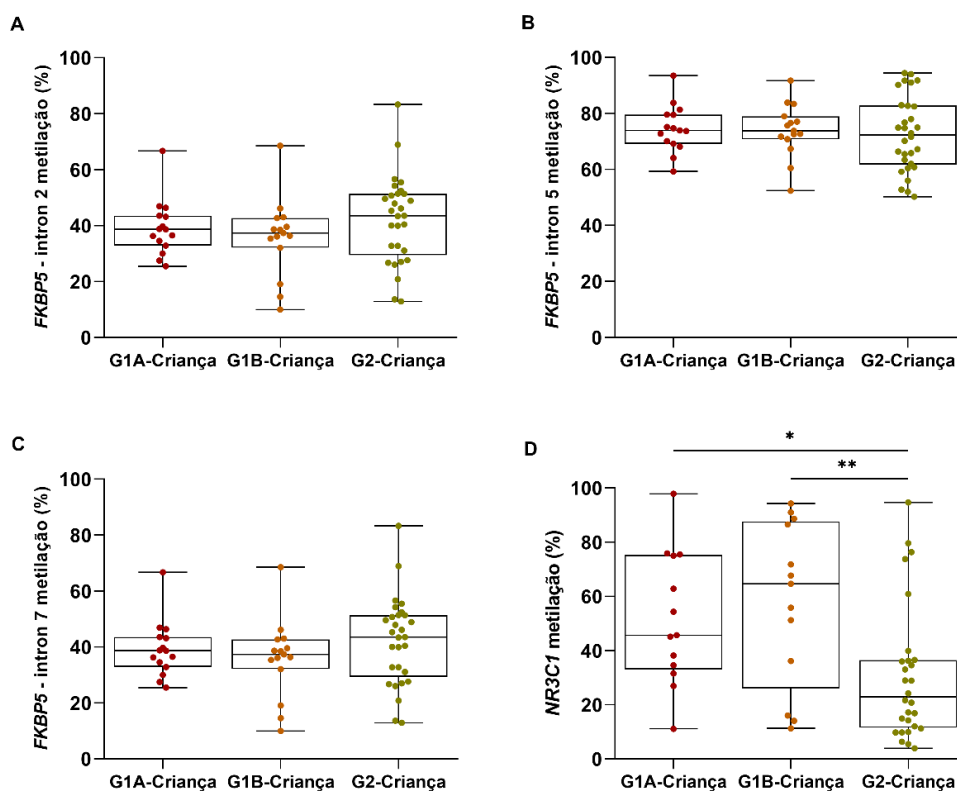
MDD (G2-mães), no íntron 2 e 5 (Figura 6A-B). Na região do íntron 2 foi observado uma média de metilação de 25,75% no G1 e 20,78% no G2 ( $p < 0,05$ ); e no íntron 5 a média foi de 70,57% no G1 e 78,22% no G2 ( $p < 0,05$ ). Na região do íntron 7 do *FKBP5* e no promotor do *NR3C1* não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 6C-D).



**Figura 6. Média da metilação do DNA nos genes *FKBP5* e *NR3C1* entre mães com depressão (G1) e mães sem depressão (G2).** (A) % metilação do íntron 2 - *FKBP5*. Diferença significativa na metilação do DNA do grupo G1 em relação ao G2 ( $p < 0,05$ ). (B) % metilação do íntron 5 - *FKBP5*. Diferença significativa na metilação do DNA do grupo G1 em relação ao G2 ( $p < 0,05$ ). (C) % metilação do íntron 7 - *FKBP5*. Não houve diferença significativa na metilação do DNA entre os grupos. (D) % metilação do *NR3C1*. Não houve diferença significativa na metilação do DNA entre os grupos. (*Unpaired t test with Welch's correction*).

Em contrapartida, nas crianças foi encontrado um aumento significativo da metilação do DNA apenas no promotor do gene *NR3C1*, tanto no grupo G1A como no grupo G1B em comparação com o G2. Nas crianças do G1A a média

de metilação do DNA observada no *NR3C1* foi de 51,89%, e no G1B 57,62%, enquanto as crianças do G2 apresentaram uma média de 30,64% ( $p < 0,05$  e  $p < 0,002$ , respectivamente) (Figura 7D). A média de metilação do DNA no grupo G1A, no qual as crianças apresentam diagnóstico de MDD apresentou valor aproximadamente 20% maior do que o G2. Da mesma forma, as crianças do G1B que não apresentam MDD, mas estão expostas a MDD materna, a metilação do DNA foi em média 27% maior comparado com a média das crianças do G2. Nas regiões analisadas dos íntrons 2, 5 e 7 do gene *FKBP5* não foi observada relação significativa da metilação do DNA entre as crianças do G1A, G1B e G2. Em ambas as regiões a média de metilação foi semelhante entre os grupos (Figura 7A-C).



**Figura 7. Média da metilação do DNA nos genes *FKBP5* e *NR3C1* nas crianças dos grupos G1A, G1B e G2.** (A) % metilação do íntron 2 - *FKBP5*. Não houve diferença significativa na metilação do DNA entre os grupos. (B) % metilação do íntron 5 - *FKBP5*. Não houve diferença significativa na metilação do DNA entre os grupos. (C) % metilação do íntron 7 - *FKBP5*. Não houve diferença significativa na metilação do DNA entre os grupos. (D) % metilação do *NR3C1* (G1A versus G2  $p < 0,05$ ; G1B versus G2  $p < 0,002$ ). (Teste Anova One-way - Tukey's multiple comparisons test).

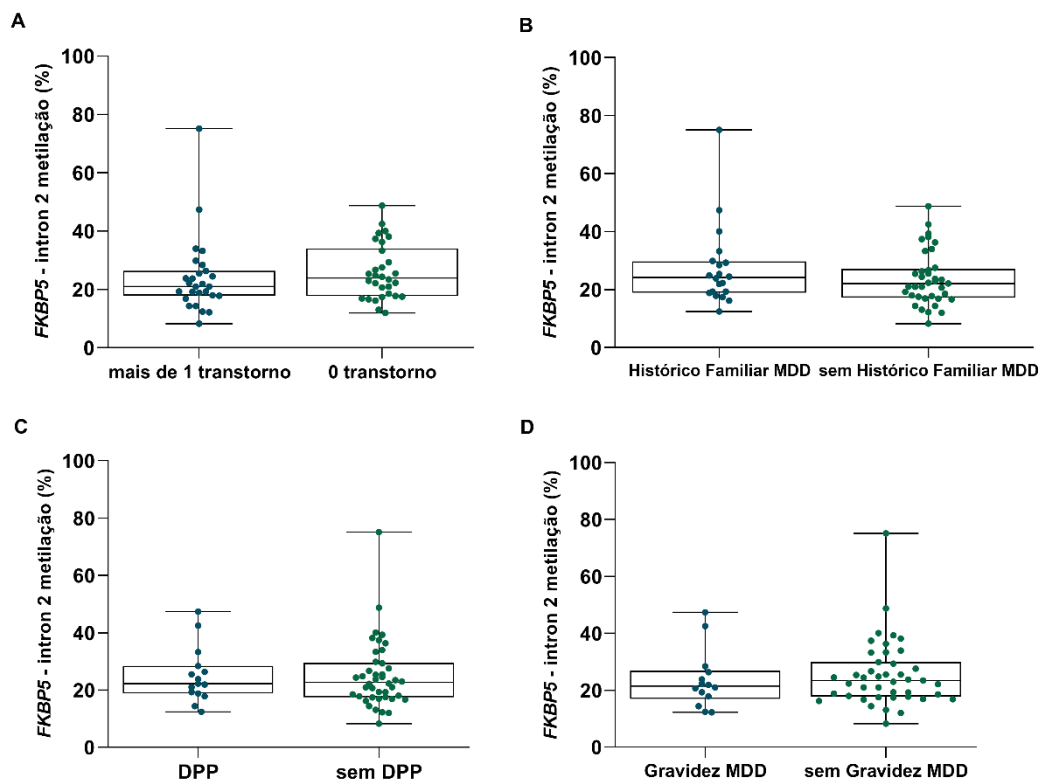
Em geral, de acordo com os resultados do presente estudo, pode-se observar que as regiões apresentam um padrão semelhante de metilação do DNA entre os grupos avaliados. Os íntrons 2 e 7 do *FKBP5* apresentam uma tendência a níveis mais baixos de metilação do DNA, média de 24% e 39%, respectivamente; enquanto o íntron 5 apresenta uma tendência a níveis mais altos, em média 74% na população total estudada. Em contrapartida, no *NR3C1* foi observado um padrão de aumento da metilação do DNA no *NR3C1* no grupo de risco em comparação com o grupo controle.

Em adição, os resultados apresentados demonstram a ocorrência de alterações na metilação do DNA detectadas de maneira geração e gene específicos, na qual mães com MDD apresentaram alterações significativas na metilação do DNA dos íntrons 2 e 5 do gene *FKBP5*, enquanto os filhos expostos a MDD materna apresentaram alterações de metilação do DNA no *NR3C1*.

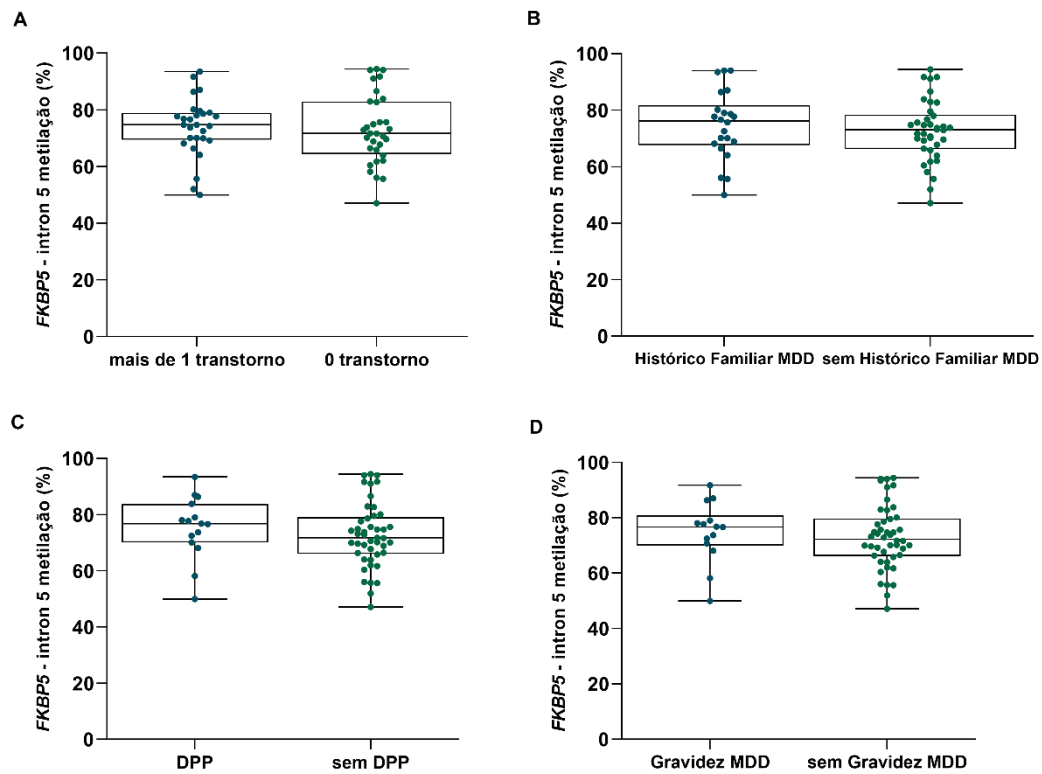
#### **4.2 Efeito das variáveis de risco na metilação do DNA em crianças**

Além da média geral de filhos com e sem MDD dos grupos expostos a MDD materna e do grupo controle, foi avaliado o efeito de variáveis clínicas, como a presença de outros transtornos mentais nas crianças (TDAH e transtorno de ansiedade), depressão pós parto (DPP), MDD durante a gravidez e histórico familiar de depressão na metilação do DNA dos genes *FKBP5* e *NR3C1* nas crianças.

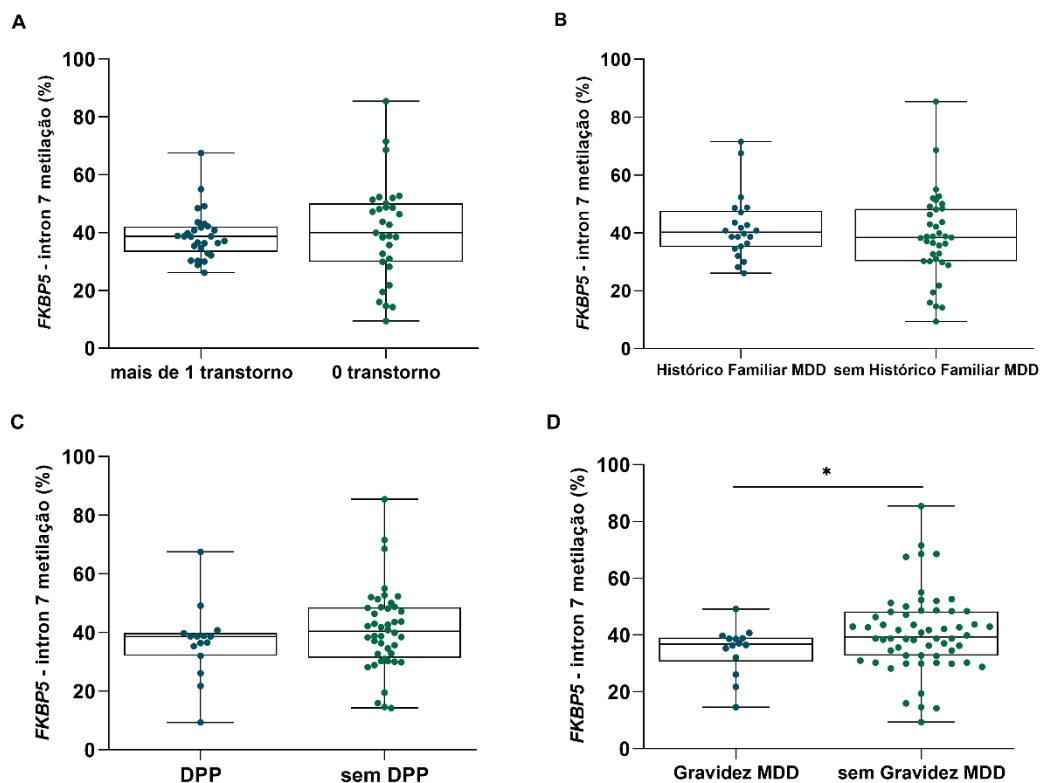
Tanto as regiões analisadas do íntron 2 quanto o íntron 5 do *FKBP5* não apresentaram diferença significativa na metilação do DNA entre a presença e ausência das variáveis clínicas (Figura 8 e 9). No íntron 7 foi encontrado uma diminuição significativa na metilação do DNA entre a presença de diagnóstico de MDD durante a gravidez (34,68%) e a ausência (40,74%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 10D). Já as variáveis clínicas relacionadas a número de transtornos, DPP e histórico familiar de depressão não houve relação entre presença e ausência.



**Figura 8. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na criança no íntron 2 do gene *FKBP5*.** (A) % metilação do íntron 2 - *FKBP5* associado a presença de transtornos psiquiátricos. (B) % metilação do íntron 2 - *FKBP5* associado ao histórico familiar de MDD. (C) % metilação do íntron 2 - *FKBP5* associado a DPP materna. (D) % metilação do íntron 2 - *FKBP5* associado a MDD durante a gravidez. Nenhuma associação significativa no teste t. (*Unpaired t test with Welch's correction*).



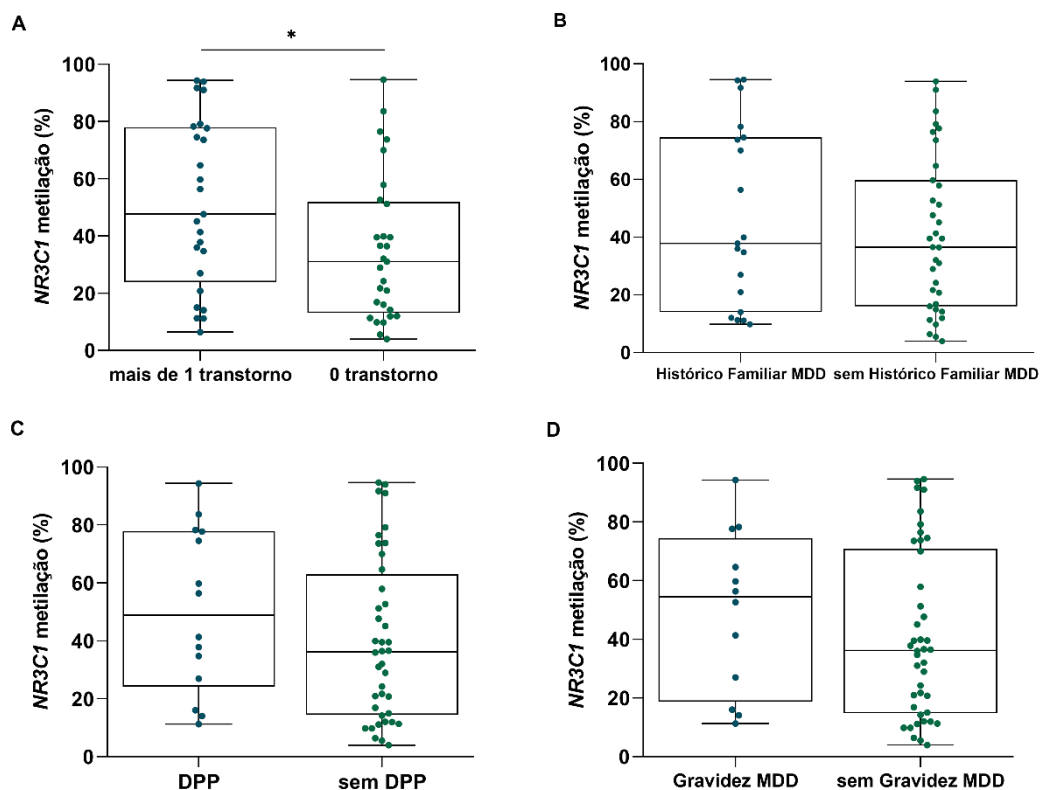
**Figura 9. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na criança no íntron 5 do gene *FKBP5*.** (A) % metilação do íntron 5 - *FKBP5* associado a presença de transtornos psiquiátricos. (B) % metilação do íntron 5 - *FKBP5* associado ao histórico familiar de MDD. (C) % metilação do íntron 5 - *FKBP5* associado a DPP materna. (D) % metilação do íntron 5 - *FKBP5* associado a MDD durante a gravidez. Nenhuma associação significativa no teste t. (*Unpaired t test with Welch's correction*).



**Figura 10. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na infância no íntron 7 do gene *FKBP5*.** (A) % metilação do íntron 7 - *FKBP5* associado a presença de transtornos psiquiátricos. (B) % metilação do íntron 7 - *FKBP5* associado ao histórico familiar de MDD. (C) % metilação do íntron 7 - *FKBP5* associado a DPP materna. (D) % metilação do íntron 7 - *FKBP5* associado a MDD durante a gravidez ( $p < 0,05$ ). (*Unpaired t test with Welch's correction*).

Na região analisada do promotor do *NR3C1*, foi observado uma associação do aumento do nível de metilação do DNA na presença de um ou mais transtornos psiquiátricos (transtorno de ansiedade e TDAH), com uma média de 51,33% em comparação a 35,26% naqueles que não apresentam nenhum transtorno ( $p < 0,05$ ). As demais variáveis, DPP, MDD durante a gravidez e histórico familiar de depressão não apresentaram diferença significativa nos níveis de metilação do DNA do *NR3C1* entre a presença e a ausência. No entanto, pode-se observar uma diferença média de aproximadamente 10% entre a presença de DPP (50,48%) e MDD durante a gravidez (49,44%) e o grupo não

diagnosticado com esses transtornos, 39,97% e 40,77%, respectivamente (Figura 11C-D).



**Figura 11. Relação da metilação do DNA com variáveis clínicas presentes na criança no gene *NR3C1*.** (A) % metilação do *NR3C1* associado a presença de transtornos psiquiátricos ( $p < 0,05$ ). (B) % metilação do *NR3C1* associado ao histórico familiar de MDD. (C) % metilação do *NR3C1* associado a DPP materna. (D) % metilação do *NR3C1* associado a MDD durante a gravidez (*Unpaired t test with Welch's correction*).

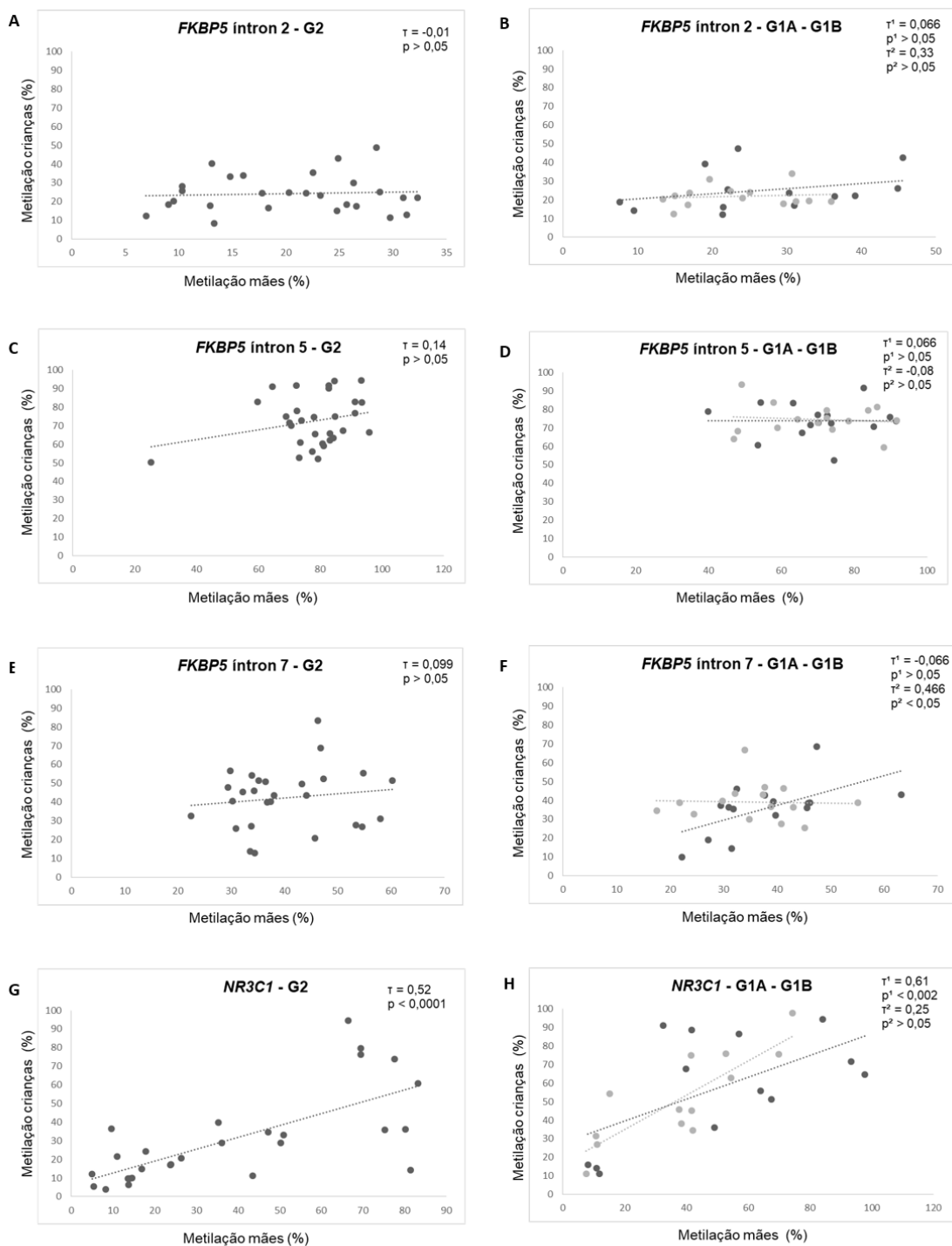
### 4.3 Correlação da metilação do DNA nos pares mãe-filho

Para avaliar o efeito da exposição a estresse no início da vida nos padrões de metilação dos genes *FKBP5* e *NR3C1* foi feita uma análise de correlação da metilação do DNA nos pares mãe-filho nos grupos G1A, G1B e G2. A correlação da metilação do DNA entre mãe e filho foi significativa nas regiões alvo do gene *NR3C1* e no íntron 7 do *FKBP5*. No *NR3C1* a correlação dos níveis de metilação do DNA ocorreu tanto no grupo de risco G1A quanto no grupo controle G2 ( $\tau = 0,2$ ;



$p < 0,002$  e  $r = 0,5$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 12G-H), na qual o grupo G1A apresenta um padrão de aumento de metilação do DNA do promotor do *NR3C1*, e o grupo controle uma diminuição dos níveis de metilação do DNA. Em contrapartida, no íntron 7 do gene *FKBP5* a correlação entre mãe e filho foi observada apenas no grupo de risco G1B ( $r = 0,4$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 12F). Nos íntrons 2 e 5 do gene *FKBP5* não foi encontrada correlação significativa na metilação do DNA entre mães e filhos (Figura 12A-D).

Além disso, foi realizada uma análise de associação da metilação do DNA das mães em relação à metilação do DNA dos filhos. Apesar de não apresentar significância estatística, foi observado que o padrão de metilação do DNA no promotor do gene *NR3C1* se contrapõe entre os grupos de risco G1A e G1B em relação ao grupo controle G2 (Figura 13). Os filhos dos grupos de risco apresentam uma tendência a maiores níveis de metilação do DNA no promotor do *NR3C1* comparado às mães do mesmo grupo, diagnosticadas com MDD. Enquanto no grupo controle os filhos apresentam menores níveis de metilação do DNA em relação às respectivas mães.



**Figura 12. Correlação da metilação do DNA entre os pares mãe-filho dos grupos G1A, G1B e G2.** Nos gráficos do G1A e G1B o círculo e linha de tendência na cor preta correspondem aos pares mãe-filho G1A; Círculo e linha de tendência na cor cinza correspondem aos pares mãe-filho G1B.  $\tau^1$  e  $p^1$  correspondem ao dado estatístico do G1A enquanto  $\tau^2$  e  $p^2$  correspondem ao dado estatístico do G1B. (Teste de correlação de Kendall 's tau).

	<i>FKBP5 - 12</i>	<i>FKBP5 - 15</i>	<i>FKBP5 - 17</i>	<i>NR3C1 prom</i>
G1A crianças	21,9%	74,5%	39,1%	51,8%
G1A mães	24%	69,5%	35,5%	40,7%
G1B crianças	28,7%	73,9%	35,8%	57,6%
G1B mães	28,2%	70,3%	38%	48,4%
G2 crianças	23,9%	72,5%	42%	30,6%
G2 mães	20,8%	77,9%	39,4%	39,1%

**Figura 13. Mapa de calor da metilação do DNA entre os binômios mãe-filho do grupo G1A, G1B e G2.** Média de metilação do DNA acima de 50% representado na cor verde; média de metilação do DNA abaixo de 50% representada na cor vermelho ( $p > 0,05$ ). (Teste Anova *One-way - Bonferroni's multiple comparisons test*).

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar o perfil de metilação do DNA do *NR3C1* e *FKBP5* em pares mãe-filho com MDD e o efeito da exposição à depressão materna como fator de estresse no início da vida. De acordo com nossos resultados, na análise geral de binômios mãe-filho do gene *FKBP5* entre os grupos G1A, G1B e G2 foi observado um aumento significativo na metilação do DNA apenas no íntron 2 do grupo G1B em relação ao G2. Nos íntrons 5 e 7 não foi observada associação significativa na metilação do DNA nos grupos de risco em relação ao controle. No entanto, analisando mães e filhos separadamente observamos uma diferença significativa na metilação do DNA dos íntrons 2 e 5 em mães com MDD em comparação com as mães do grupo controle. Na região do íntron 2 houve um aumento de metilação do DNA nas mães com MDD, enquanto que no íntron 5 houve uma diminuição dos níveis de metilação do DNA nas mães com MDD em relação às mães do grupo controle.

Até o momento nenhum estudo na literatura relatou alteração no padrão de metilação do DNA nos íntrons 2 e 5 do gene *FKBP5* em indivíduos com MDD, destacado no presente estudo no contexto de mães com MDD. Existem poucos estudos na literatura sobre a metilação do DNA do *FKBP5* em pacientes com depressão (CHIARELLA *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2017; HÖHNE *et al.*, 2014; KLINGER-KÖNIG *et al.*, 2019; SAITO *et al.*, 2020; TOZZI *et al.*, 2018). A maioria deles focam na metilação do DNA do íntron 7, no qual tem sido associado à mudança conformacional da cromatina em indivíduos expostos ao estresse no início da vida (KLENGEL *et al.*, 2013). Diferente dos nossos achados, alguns estudos associam baixos níveis de metilação do DNA no íntron 7 em pacientes com depressão (CHIARELLA *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2017; KLINGER-KÖNIG *et al.*, 2019; TOZZI *et al.*, 2018). No entanto, a maior parte desses estudos relacionam menores níveis de metilação no íntron 7 com a presença do alelo de risco do SNP rs1360780, localizado no íntron 2, que não foi avaliado no presente estudo.

Em nosso estudo não observamos relação da metilação do DNA no íntron 7 com o diagnóstico de transtornos psiquiátricos nas crianças, DPP e depressão materna, exceto na MDD durante a gravidez, na qual foi observado uma redução significativa da metilação do DNA no íntron 7 em relação às crianças não

expostas a MDD durante a gravidez. Semelhante aos nossos achados, Ramo-Fernandés et al. (2019) associaram a redução na média de metilação do DNA de 79 sítios CpG do íntron 7 em amostras de sangue periférico de mulheres que sofreram maus-tratos na infância. No entanto, a média de metilação nesses sítios é superior (~75%) à média observada na região analisada no presente estudo (~40%). Outros achados também reportaram menores níveis de metilação do DNA no íntron 7 do gene *FKBP5* em crianças expostas a traumas na infância (KLENGEL et al., 2013; TYRKA; RIDOUT; PARADE, 2016). Em contraste, Grasso et al. (2020) relataram um aumento na metilação do DNA em 4 sítios CpGs do íntron 7 em bebês expostos a fatores de estresse materno e gravidade dos sintomas de transtorno de estresse pós-traumático materno.

O presente estudo é um dos primeiros que avaliou a metilação do *FKBP5* nos íntrons 2, 5 e 7, e o primeiro a avaliar paralelamente essas regiões no contexto de mãe e filhos com depressão. Estudo anterior não relatou efeito significativo na exposição ao estresse em crianças nos íntrons 2 e 7 no *FKBP5* (BUSTAMANTE et al., 2018). Em contrapartida, Klengel et al. (2013) avaliaram a metilação do DNA nos íntrons 2, 5 e 7 de indivíduos que sofreram abuso físico e sexual na infância e encontraram uma relação de metilação-genótipo dependente associado ao trauma no íntron 7. Para os íntrons 2 e 5, o mesmo estudo não encontrou relação de alteração epigenética e trauma na infância. Duis et al. (2018) também fizeram uma associação da metilação do DNA no íntron 5 dependente do genótipo do SNP rs1360780 (íntron 2), na qual a exposição ao transtorno afetivo materno está relacionada ao aumento de metilação do DNA nessa região em portadores do genótipo homocigoto do alelo de risco. Em resumo, não há relatos suficientes na literatura sobre os íntrons 2 e 5 do gene *FKBP5*. Nossos resultados preliminares apontam uma relação significativa na metilação do DNA entre mães com depressão em comparação a mães sem depressão, porém o mesmo não foi visto em relação a crianças.

Em relação a metilação do DNA no gene *NR3C1*, nossos resultados demonstram que um padrão de metilação do DNA diferencial nos grupos de risco (crianças expostas a MDD materna). Nossos resultados destacam um perfil de ganho de metilação do DNA no *NR3C1* nos grupos de risco comparados ao grupo controle, no qual apresentaram um aumento significativo de cerca de 20 a 27% a mais do que no grupo controle. Nossos achados corroboram com estudos

que associam o aumento da metilação do DNA no *NR3C1* em pacientes com MDD (BAKUSIC *et al.*, 2020; BORÇOI *et al.*, 2020; NANTHARAT *et al.*, 2015; ROY; SHLETON; DWIVEDI, 2017). O sítio CpG (CpG 36) analisado no presente estudo está próximo a um sítio de ligação da proteína NGFI-A, fator de transcrição que regula a expressão do GR. Maiores níveis de metilação do DNA em regiões sobrepostas ao sítio de ligação a NGFI-A tem sido associada ao estresse precoce e depressão (LIU; NUSSLOCK, 2017; WEAVER *et al.*, 2004).

Um estudo que avaliou vários sítios CpGs dentro da ilha CpG no promotor do *NR3C1*, observou maiores níveis de metilação do DNA no sítio CpG 12 e CpG 20 em pacientes com depressão, ambas regiões de sobreposição do sítio de ligação a NGFI-A. A média de metilação do DNA de todos os CpGs analisados também foi superior e significativa em relação ao controle (BAKUSIC *et al.*, 2020). Outro estudo avaliou os CpGs 40-47 da ilha CpG na região promotora do gene e observou um aumento dos níveis de metilação do DNA nos CpGs 40, 42 e 46, e na média dos sítios CpGs 40-47 nos indivíduos com MDD (BORÇOI *et al.*, 2020). Em comparação com os nossos resultados, na qual encontramos relação da metilação do DNA com depressão no CpG 36 do promotor alternativo do *NR3C1*, Bakusic *et al.* (2020) não encontraram associação significativa nesse sítio CpG específico. Semelhante aos nossos achados, Roy *et al.* (2017) e Farrell *et al.* (2018) reportaram o aumento dos níveis de metilação em indivíduos com depressão nos sítios CpGs 35-37 e CpGs 36-39, respectivamente. Além disso, Roy *et al.* (2017) associaram o aumento de metilação do DNA à menor expressão gênica, demonstrando a importância funcional destes sítios na regulação de *NR3C1*. Poucos estudos relataram menores níveis de metilação do DNA no gene *NR3C1* associados a MDD (BUSTAMANTE *et al.*, 2016; NA *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos de metilação do DNA no *NR3C1* foca neste gene como um mediador no efeito da exposição a trauma na infância (MURGATROYD *et al.*, 2015; OBERLANDER *et al.*, 2008; PALMA-GUDIÉL *et al.*, 2015; TYRKA; RIDOUT; PARADE, 2016). Um dos objetivos principais do nosso estudo foi avaliar o efeito da MDD, DPP e depressão durante a gravidez na metilação do DNA em crianças. Nossos resultados mostraram uma média de metilação do DNA mais elevada em crianças com depressão e outros transtornos psiquiátricos (transtorno de ansiedade e TDAH) e que convivem com a depressão materna.

Bustamante *et al.* (2016) encontraram um aumento na metilação do DNA dos sítios CpGs 35-38 na exposição a maus-tratos na infância, mas uma diminuição significativa na média de metilação do DNA nos sítios CpGs 39-47 em pacientes com depressão. Maiores porcentagens de metilação do DNA em crianças expostas ao trauma e adolescentes com depressão corroboram na mesma região-alvo dos nossos resultados (BUSTAMANTE *et al.*, 2016; EFSTATHOPOULOS *et al.*, 2018).

Murgatroyd *et al.* (2015) relataram que a exposição à depressão pré- e pós natal está associada a um aumento de metilação do DNA no promotor 1F do *NR3C1* em bebês, mas que essa alteração epigenética pode ser reversível pelo cuidado materno após as primeiras semanas de vida. Da mesma forma, foi relatado que a exposição à MDD materna está associada ao aumento de metilação do DNA no *NR3C1* no sítio de ligação de NGFI-A e ao aumento dos níveis de cortisol nos primeiros meses de vida (OBERLANDER *et al.*, 2008). Dessa forma, pode-se observar que a maioria dos estudos associam maiores níveis de metilação do DNA no sítio de ligação do fator de transcrição NGFI-A ou próximo a ela. Sugere-se que essa região possa ser um possível alvo regulatório da etiologia da depressão.

Outro objetivo do presente estudo foi investigar a correlação da metilação do DNA nessas regiões associadas à resposta ao estresse em pares de mãe-filho. Nosso estudo é o primeiro que avalia a correlação dos íntrons 2, 5 e 7 do *FKBP5* neste contexto de mães e filhos com depressão e seu possível efeito intergeracional em amostras de epitélio bucal. Nossos resultados demonstram uma correlação significativa na metilação do DNA do *NR3C1* no grupo de risco G1A, entre mães e filhos com MDD. Além disso, foi visto uma correlação na metilação do DNA entre mãe e filho no íntron 7 do gene *FKBP5* apenas no grupo de risco G1B, na qual as crianças convivem com a MDD materna mas não apresentam MDD. Esses dados sugerem que fatores de estresse, como os transtornos afetivos materno (MDD, depressão durante a gravidez, DPP) podem estar associados ao surgimento de alterações epigenéticas no gene *NR3C1* que podem ser passadas para as próximas gerações. Poucos estudos até o momento relataram correlação da metilação do DNA no gene *FKBP5* e *NR3C1* em pares mãe-filho (ASWEGEN *et al.*, 2021; BIERER *et al.*, 2020; BOWERS;

YEHUDA, 2015; RAMO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2019; YEHUDA R, DASKALAKIS NP, LEHRNER A, 2014).

Nossos resultados não encontraram correlação na metilação do DNA entre mãe e filho com MDD no íntron 7 do gene *FKBP5*, no entanto houve correlação no grupo de crianças sem MDD, mas expostas a MDD materna. Semelhante aos nossos achados na região do íntron 7, Yehuda *et al.* (2014; 2015) observaram o efeito intergeracional do gene na região próxima ao GRE do íntron 7 no *FKBP5* em filhos de sobreviventes do Holocausto. Esses relatos sugerem que a exposição a fatores relacionados a trauma por parte dos pais, pode refletir na metilação do DNA na próxima geração. Além disso, Yehuda *et al.* (2014; 2015) também reportaram uma interação significativa na metilação do DNA no promotor 1F do *NR3C1* em relação ao estresse pós-traumático paterno. Ramo-Fernandez *et al.* (2019) não observaram efeito intergeracional na metilação do DNA nos genes *FKBP5* e *NR3C1* em amostras de sangue periférico e do cordão umbilical de mães que sofreram maus tratos na infância e filhos recém nascidos, respectivamente. Além disso, os níveis de metilação do DNA não foram correlacionados à expressão gênica desses indivíduos. Este é o primeiro estudo que fornece evidências de correlação da metilação do DNA no gene *NR3C1* em pares mãe-filho com MDD, sugerindo um possível efeito intergeracional nesta região.

Embora 50% das mães do grupo de risco do presente estudo tenham histórico de MDD durante a gravidez, não é possível afirmar ao certo que há um efeito intergeracional na metilação do DNA pois a idade média das crianças participantes foi de 6 a 9 anos. Apesar de estudos anteriores abordarem o efeito intergeracional mesmo na prole adulta e criança com idade média de 8 a 16 anos (ASWEGEN *et al.*, 2021; BOWERS; YEHUDA, 2015), a metilação do DNA pode variar de acordo com as exposições ambientais ao longo dos anos de vida. No entanto, nossos achados corroboram com a hipótese DoHaD, na qual os primeiros anos de vida são cruciais na manutenção e regulação epigenética na vida adulta (BIANCO-MIOTTO *et al.*, 2017). Dessa forma, a exposição a doenças materno-afetivas como MDD, MDD durante a gravidez e DPP são considerados fatores de estresse no início da vida que podem desencadear transtornos psiquiátricos futuros.



Outro ponto a ser destacado no presente estudo foi o perfil de metilação do DNA no gene *NR3C1* entre mães e filhos. Apesar de não significativo, nos grupos de risco observamos que o perfil de metilação do DNA nas crianças apresenta níveis mais altos em relação às mães, em torno de 10% de diferença. Em contrapartida, no grupo controle a criança apresentou menores níveis de metilação do DNA em relação às mães. Variações na metilação do DNA do gene *NR3C1* têm sido relatadas tanto na exposição pré quanto pós natal (CHEN *et al.*, 2017; GALBALLY *et al.*, 2020; KUNDAKOVIC; JARIC, 2017). A infância é um dos períodos de maior vulnerabilidade a modificações epigenéticas (JIANG *et al.*, 2019; NEMODA; SZYF, 2017). Dessa forma, essa tendência a maiores níveis de metilação do DNA nas crianças expostas a MDD materna em relação a mãe, pode ser explicada pelo período de vida mais propício a sofrer alterações epigenéticas, na qual a exposição a fatores de risco nos primeiros anos de vida possa estar ligada a maiores níveis de metilação do DNA no *NR3C1*.

No contexto mãe e filho, essa alteração parece ser geração específico, visto que alterações na metilação do DNA nos íntrons 2 e 5 do *FKBP5* foram observadas apenas nas mães com MDD, e nos filhos expostos a MDD materna foi observado alteração na metilação do DNA no gene *NR3C1*. No entanto, alterações de metilação do DNA no contexto materno infantil precisa ser melhor elucidado, considerando a regulação em *feedback* negativo dos genes *FKBP5* e *NR3C1* (ARNETT *et al.*, 2016).

O presente estudo apresenta algumas limitações a serem consideradas. Uma delas é o tipo de tecido utilizado para análise de metilação do DNA, derivadas do epitélio bucal. Devido a impossibilidade de se avaliar a metilação do DNA diretamente de amostras *post mortem* de cérebros humanos, tecidos periféricos como sangue e epitélio bucal são predominantes nessa avaliação (BINDER, 2009; BOWERS; YEHUDA, 2015; KLENGEL *et al.*, 2013; TYRKA; RIDOUT; PARADE, 2016). Em adição, células de epitélio bucal e do cérebro são derivadas da mesma origem embrionária (ectodérmica) durante o desenvolvimento, o que sugere que células epiteliais são consideradas mais compatíveis com os padrões de metilação do DNA no cérebro do que em sangue periférico (LOWE *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2015).

Além disso, embora os indivíduos avaliados no presente estudo sejam um grupo raro, considerando todo o levantamento clínico e o contexto de diagnóstico

psiquiátrico, o número amostral do estudo é pequeno. Outro ponto que deve ser destacado, é que nosso estudo avaliou a metilação do DNA de apenas um sítio CpG para cada região, porém estas regiões analisadas estão localizadas em regiões regulatórias importantes dos genes supracitados, e podem contribuir com os novos achados na literatura científica a respeito da MDD infantil. O conhecimento sobre como e quais genes estão envolvidos na etiologia de transtornos psiquiátricos é contraditório na literatura. Estudos de associação de genes no contexto de transtornos psiquiátricos costumam ser complexos e discordantes devido à heterogeneidade clínica dos indivíduos (HOEHE; MORRIS-ROSENDAHL, 2018; SULLIVAN, P.F; GESCHWIND, 2019).

Estudo anterior do nosso grupo de estudo relatou um padrão diferencial de metilação do DNA do gene *SLC6A4* nesse mesmo grupo amostral. Nos binômios mãe-filho com MDD foi observado um perfil de menores níveis de metilação do DNA em relação ao grupo sem MDD (MENDONÇA *et al.*, 2019). Essas alterações somadas aos resultados encontrados no presente estudo, na qual demonstra um perfil de ganho de metilação do DNA em binômios mãe-filho com MDD, sugere que a exposição a fatores de estresse, principalmente no início da vida, gera um padrão alterado de metilação do DNA num contexto *multilocus*. Dessa forma, esses resultados devem se somar a novos estudos que visem outros genes envolvidos na resposta ao estresse e na fisiologia da MDD.

Pode-se perceber que há contradições na associação da depressão e o padrão de metilação do DNA nesses genes. Sabe-se que a desregulação do eixo HPA tanto a hiper regulação quanto a deficiência na produção de GC podem gerar prejuízos à saúde humana em diferentes aspectos (JURUENA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021). Tanto a hipo quanto a hipermetilação de genes que participam da resposta ao estresse estão associados a má adaptação e alteração do *feedback* negativo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças (ARNETT *et al.*, 2016; LEE, K. Y. *et al.*, 2014). Os resultados do presente estudo sugerem que a alteração de metilação do DNA em regiões regulatórias do *FKBP5*, associados a locais de ligação de GC e a metilação do DNA no *NR3C1* representam um possível alvo de estudos para a melhor compreensão da etiologia e avanços para o prognóstico e tratamento futuro da depressão.

## 6. CONCLUSÃO

Foi observado que a metilação do DNA do gene *NR3C1* está relacionado a um perfil de ganho de metilação do DNA em crianças com MDD e crianças expostas a MDD materna em comparação com controles sem exposição ao mesmo. A correlação da metilação do DNA no promotor do *NR3C1* em pares mãe-filho com depressão indica um possível efeito intergeracional da exposição da MDD materna na prole. Em adição, foi relatado uma tendência a aumento dos níveis de metilação do DNA no *NR3C1* nas crianças quando comparado às respectivas mães (dentro dos grupos G1A e G1B), sugerindo uma possível assinatura molecular associadas às alterações epigenéticas na MDD em crianças expostas a MDD materna.

Em relação às regiões intrônicas do gene *FKBP5*, foi observado uma diminuição na metilação do DNA no íntron 7 em crianças expostas a MDD materna durante a gravidez e uma correlação da metilação do DNA entre mães e filhos expostos a MDD materna. Nos íntrons 2 e 5 não foi observado nenhum efeito na metilação do DNA em relação a exposição a MDD materna. No entanto, alterações de metilação do DNA entre grupos de risco e controle, demonstraram um padrão gene e geração específicos.

Em suma, comparando os resultados prévios do nosso grupo de pesquisa aos resultados do presente estudo, pode-se concluir que há alterações na metilação do DNA nos genes *FKBP5* e *NR3C1* subjacentes à etiologia da MDD no contexto materno-infantil. Essa combinação de alterações no padrão de metilação do DNA em um contexto *multilocus* (nos genes *NR3C1/SLC6A4* nos filhos; no gene *FKBP5* nas mães) poderia estar associada à ocorrência de depressão em expostas a MDD materna.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HUSSEIN, Ayah *et al.* Early life risk and resiliency factors and their influences on developmental outcomes and disease pathways: A rapid evidence review of systematic reviews and meta-analyses. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 357–372, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S2040174420000689>

ARGENTIERI, M. Austin *et al.* Epigenetic Pathways in Human Disease: The Impact of DNA Methylation on Stress-Related Pathogenesis and Current Challenges in Biomarker Development. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 18, p. 327–350, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.044>

ARISTIZABAL, Maria J. *et al.* Biological embedding of experience: A primer on epigenetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 117, n. 38, p. 23261–23269, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1820838116>

ARNETT, Melinda G. *et al.* Genetic Approaches to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 245–260, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2015.215>

ASSARY, Elham *et al.* future directions. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.016>

ASWEGEN, Tanya Van *et al.* Epigenetics in families: Covariance between mother and child methylation patterns. **Brain Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/brainsci11020190>

BABENKO, Olena; KOVALCHUK, Igor; METZ, Gerlinde A S. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 48, p. 1–22, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.013>

BAKUSIC, Jelena *et al.* Increased methylation of NR3C1 and SLC6A4 is associated with blunted cortisol reactivity to stress in major depression. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 13, p. 100272, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100272>

BIANCO-MIOTTO, T. *et al.* Epigenetics and DOHaD: From basics to birth and beyond. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 513–519, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S2040174417000733>

BIERER, Linda M. *et al.* Intergenerational effects of maternal holocaust exposure on FKBP5 methylation. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 177, n. 8, p. 744–753, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2019.19060618>

BINDER, Elisabeth B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 34, n. SUPPL. 1, p. 186–195, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.021>

BORÇOI, Aline Ribeiro *et al.* Risk factors for depression in adults: NR3C1 DNA methylation and lifestyle association. **Journal of Psychiatric Research**, [s. l.], v. 121, p. 24–30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.10.011>

BOWERS, Mallory E; YEHUDA, Rachel. Intergenerational Transmission of Stress in Humans. [s. l.], v. 41, n. 1, p. 232–244, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2015.247>

BROWN, Amanda; FIORI, Laura M; TURECKI, Gustavo. **Bridging basic and clinical research in early life adversity, DNA methylation, and major depressive disorder.** [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00229>

BROWN, Seth J.; STOILOV, Peter; XING, Yi. Chromatin and epigenetic regulation of pre-mrna processing. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 21, n. R1, p. 90–96, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hmg/dds353>

BUSCHDORF, Jan P.; MEANEY, Michael J. Epigenetics/programming in the HPA axis. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 87–110, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphy.c140027>

BUSTAMANTE, Angela C. *et al.* FKBP5 DNA methylation does not mediate the association between childhood maltreatment and depression symptom severity in the Detroit Neighborhood Health Study. **Journal of Psychiatric Research**, [s. l.], v. 96, p. 39–48, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.09.016>

BUSTAMANTE, Angela C. *et al.* Glucocorticoid receptor DNA methylation, childhood maltreatment and major depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 206, p. 181–188, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.07.038>

CAO-LEI, L. *et al.* Prenatal stress and epigenetics. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 117, p. 198–210, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.016>

CASTRO-VALE, Ivone; CARVALHO, Davide. The pathways between cortisol-related regulation genes and ptsd psychotherapy. **Healthcare (Switzerland)**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/healthcare8040376>

CATTANEO, A.; RIVA, M. A. Stress-induced mechanisms in mental illness: A role for glucocorticoid signalling. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 160, p. 169–174, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.021>

CHEN, Dongmei *et al.* A review of DNA methylation in depression. **Journal of Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 43, p. 39–46, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.05.022>

CHIARELLA, Julian *et al.* DNA methylation differences in stress-related genes, functional connectivity and gray matter volume in depressed and healthy adolescents. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 271, n. April, p. 160–168, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.03.062>

CRESPI, Bernard J. Evolutionary and genetic insights for clinical psychology. **Clinical Psychology Review**, [s. l.], v. 78, n. September 2019, p. 101857, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2020.101857>

CRIADO-MARRERO, Marangélie *et al.* Hsp90 and FKBP51: Complex regulators of psychiatric diseases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 373, n. 1738, p. 1–9, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0532>

CRIADO-MARRERO, Marangélie *et al.* Hsp90 and FKBP51: Complex regulators of psychiatric diseases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 373, n. 1738, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0532>

DARBY, Miranda M.; SABUNCIYAN, Sarven. **Repetitive elements and epigenetic marks in behavior and psychiatric disease**. [S. l.]: Elsevier, 2014. ISSN 00652660.v. 86 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800222-3.00009-7>

DASKALAKIS, Nikolaos P.; YEHUDA, Rachel. Site-specific methylation changes in the glucocorticoid receptor exon 1F promoter in relation to life adversity: Systematic Review of contributing factors. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. OCT, p. 1–8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00369>

DI SANTE, Jessica *et al.* Peripheral DNA methylation of HPA axis-related genes in humans: Cross-tissue convergence, two-year stability and behavioural and neural correlates. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 97, n. December 2017, p. 196–205, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.019>

DUIS, Jessica *et al.* Effect of Genotype and Maternal Affective Disorder on Intronic Methylation of FK506 Binding Protein 5 in Cord Blood DNA. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 9, n. December, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00648>

EFSTATHOPOULOS, Paschalis *et al.* NR3C1 hypermethylation in depressed and bullied adolescents. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0169-8>

ERICKSON, Nora; JULIAN, Megan; MUZIK, Maria. Perinatal depression, PTSD, and trauma: Impact on mother–infant attachment and interventions to mitigate the transmission of risk. **International Review of Psychiatry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 245–263, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09540261.2018.1563529>

EWALD, Erin R. *et al.* Alterations in DNA methylation of *Fkbp5* as a determinant of blood-brain correlation of glucocorticoid exposure. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 44, p. 112–122, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.003>

FARRELL, Chloë *et al.* DNA methylation differences at the glucocorticoid receptor gene in depression are related to functional alterations in hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity and to early life emotional abuse. **Psychiatry Research**, [s. l.], v. 265, n. November 2017, p. 341–348, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.04.064>

FLINT, Jonathan; KENDLER, Kenneth S. The Genetics of Major Depression. **Cell Press Neuron Review**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 484–503, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.027>

GALBALLY, Megan *et al.* The role of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor DNA methylation in antenatal depression and infant stress regulation. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 115, n. May 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104611>

GATTA, Eleonora *et al.* Epigenetic landscape of stress surfeit disorders: Key role for DNA methylation dynamics. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 156, n. 12, p. 127–183, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2020.08.002>. Epigenetic

GILBERT, Ruth *et al.* Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. **The Lancet**, [s. l.], v. 373, n. 9657, p. 68–81, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61706-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61706-7)

GOMES, M V *et al.* Methylation Pattern at the KvDMR in a Child With Beckwith – Wiedemann Syndrome Conceived by ICSI. [s. l.], v. 629, p. 625–629, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a>

GRÄFF, Johannes *et al.* Epigenetic Regulation of Gene Expression in Physiological and Pathological Brain Processes. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 603–649, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2010>



GRASSO, Damion J. *et al.* Adverse childhood experiences, posttraumatic stress, and FKBP5 methylation patterns in postpartum women and their newborn infants. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 114, n. December 2019, p. 104604, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104604>

GUO, W Y *et al.* Relationship between 5-HTTLPR polymorphism and post-stroke depression. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1676–5680, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4238/gmr.15017460>

HAN, Kyu Man *et al.* Influence of FKBP5 polymorphism and DNA methylation on structural changes of the brain in major depressive disorder. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. January, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42621>

HOEHE, M.R; MORRIS-ROSENDAHL, D.J. The role of genetics and genomics in clinical psychiatry. **Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 169–178, 2018. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.31887/DCNS.2018.20.3/mhoehe>

HÖHNE, Nina *et al.* FKBP5 genotype-dependent DNA methylation and mRNA regulation after psychosocial stress in remitted depression and healthy controls. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu087>

**Institute for Health Metrics and Evaluation**, 2020. GBD Compare. IHME, University of Washington, Seattle, WA.

JANUAR, Vania; SAFFERY, Richard; RYAN, Joanne. Epigenetics and depressive disorders: A review of current progress and future directions. **International Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 1364–1387, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ije/dyu273>

JC, O` Leary *et al.* The Role of FKBP5 in Mood Disorders: Action of FKBP5 on Steroid Hormone Receptors Leads to Questions About its Evolutionary Importance. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [s. l.], v. 999, n. 999, p. 11–12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/187152731131200121>

JIANG, Shui *et al.* Epigenetic Modifications in Stress Response Genes Associated With Childhood Trauma. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 10, n. November, p. 1–19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00808>

JURUENA, Mario F. *et al.* Atypical depression and non-atypical depression: Is HPA axis function a biomarker? A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 233, p. 45–67, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.09.052>

JUSZCZAK, Grzegorz R.; STANKIEWICZ, Adrian M. Glucocorticoids, genes and brain function. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 82, n. June 2017, p. 136–168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.11.020>

KESSLER, Ronald C. *et al.* Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of. **Arch Gen Psychiatry**, [s. l.], v. 62, n. June, p. 593–602, 2005. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1001/archpsyc.62.6.593>

KLENGEL, Torsten *et al.* Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 33–41, 2013a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn.3275>

KLENGEL, Torsten; BINDER, Elisabeth B. Allele-specific epigenetic modification: A molecular mechanism for gene-environment interactions in stress-related psychiatric disorders? **Epigenomics**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 109–112, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/epi.13.11>

KLENGEL, Torsten; BINDER, Elisabeth B. FKBP5 Allele-Specific Epigenetic Modification in Gene by Environment Interaction. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 244–246, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2014.208>

KLINGER-KÖNIG, Johanna *et al.* Methylation of the FKBP5 gene in association with FKBP5 genotypes, childhood maltreatment and depression. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 930–938, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0319-6>

KOFINK, Daniel *et al.* Epigenetic dynamics in psychiatric disorders: Environmental programming of neurodevelopmental processes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 831–845, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.03.020>

KRONTIRA, Anthi C.; CRUCEANU, Cristiana; BINDER, Elisabeth B. Glucocorticoids as Mediators of Adverse Outcomes of Prenatal Stress. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 394–405, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.03.008>

KUNDAKOVIC, Marija; JARIC, Ivana. The epigenetic link between prenatal adverse environments and neurodevelopmental disorders. **Genes**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes8030104>

KWONG, Alex S.F. *et al.* Genetic and Environmental Risk Factors Associated with Trajectories of Depression Symptoms from Adolescence to Young Adulthood. **JAMA Network Open**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.6587>

LABONTE, Benoit *et al.* Differential glucocorticoid receptor exon 1 B, 1 C, and 1 H expression and methylation in suicide completers with a history of childhood abuse. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 41–48, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.01.034>

LANE, Wendy G.; DUBOWITZ, Howard. Social determinants of health, personalized medicine, and child maltreatment. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 368–376, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01290-9>

LEE, Kyu Young *et al.* Genetic role of BDNF Val66Met and 5-HTTLPR polymorphisms on depressive disorder. **Psychiatry Investigation**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 192–199, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4306/pi.2014.11.2.192>

LEE, Richard; SAWA, Akira; SCIENCES, Behavioral. Environmental stressors and epigenetic control of the HPA-axis. [s. l.], v. 100, n. 4, p. 278–287, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000369585.Environmental>

LEMOULT, Joelle *et al.* Meta-analysis: Exposure to Early Life Stress and Risk for Depression in Childhood and Adolescence. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 842–855, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2019.10.011>

LI, Ming *et al.* Effect of Early Life Stress on the Epigenetic Profiles in Depression. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, n. October, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00867>

LIMA-OJEDA, Juan M.; RUPPRECHT, Rainer; BAGHAI, Thomas C. **Neurobiology of depression: A neurodevelopmental approach**. [S. l.]: Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1289240>

LIU, Patrick Z.; NUSSLOCK, Robin. How Stress Gets Under the Skin: Early Life Adversity and Glucocorticoid Receptor Epigenetic Regulation. **Current Genomics**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 653–664, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389202919666171228164350>

LOPIZZO, Nicola *et al.* Gene-environment interaction in major depression: Focus on experience-dependent biological systems. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 6, n. MAY, p. 1–12, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00068>

LOWE, Robert *et al.* Buccals are likely to be a more informative surrogate tissue than blood for epigenome-wide association studies. **Epigenetics**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 445–454, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/epi.24362>

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

MATHERS, Colin *et al.* **Global Burden of Disease**. Second Edied. [S. l.]: Elsevier, 2017. v. 3 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00175-2>

MATOSIN, Natalie; HALLDORSOTTIR, Thorhildur; BINDER, Elisabeth B. Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 83, n. 10, p. 821–830, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.01.021>

MCGOWAN, Patrick O. *et al.* Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 342–348, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn.2270>

MENDONÇA, M S *et al.* Journal of Affective Disorders Epigenetic variation at the SLC6A4 gene promoter in mother – child pairs with major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 245, n. November 2018, p. 716–723, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.10.369>

MENDONÇA, M S; MANGIAVACCHI, P M; RIOS, A F L. **Genetic and epigenetics of the SLC6A4 gene in depression.** [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817935-2.00004-0>

MENKE, Andreas. Is the HPA axis as target for depression outdated, or is there a new hope? **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 10, n. FEB, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00101>

MURGATROYD, C. *et al.* Effects of prenatal and postnatal depression, and maternal stroking, at the glucocorticoid receptor gene. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. e560-5, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/tp.2014.140>

NA, Kyoung Sae *et al.* Association between glucocorticoid receptor methylation and hippocampal subfields in major depressive disorder. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085425>

NANNI, Valentina; UHER, Rudolf; DANESE, Andrea. Childhood maltreatment predicts unfavorable course of illness and treatment outcome in depression: A meta-analysis. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 169, n. 2, p. 141–151, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2011.11020335>

NANTHARAT, M. *et al.* Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) promoter is hypermethylated in Thai females with major depressive disorder. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 19071–19079, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4238/2015.December.29.15>

NEMODA, Zsofia; SZYF, Moshe. Epigenetic Alterations and Prenatal Maternal Depression. **Birth Defects Research**, [s. l.], v. 109, n. 12, p. 888–897, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bdr2.1081>

NESTLER, Eric J. Transgenerational Epigenetic Contributions to Stress Responses: Fact or Fiction? **PLoS Biology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 1–7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002426>

OBERLANDER, Tim *et al.* Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. **Epigenetics**, [s. l.], v. 3, n. April, p. 97–106, 2008.

OLERUP, Ole; ZETTERQUIST, Henrik. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 225–235, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1992.tb01940.x>

OPEL, Nils *et al.* Mediation of the influence of childhood maltreatment on depression relapse by cortical structure: a 2-year longitudinal observational study. **The Lancet Psychiatry**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 318–326, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30044-6](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30044-6)

OTTE, Christian *et al.* Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, n. Mdd, p. 1–21, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>

PALMA-GUDIÉL, Helena *et al.* Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 55, p. 520–535, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.05.016>

RADTKE, K. M. *et al.* Epigenetic modifications of the glucocorticoid receptor gene are associated with the vulnerability to psychopathology in childhood maltreatment. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 1–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/tp.2015.63>

RAMO-FERNÁNDEZ, Laura *et al.* The effects of childhood maltreatment on epigenetic regulation of stress-response associated genes: an intergenerational approach. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36689-2>

ROY, B; SHLETON, R.C; DWIVEDI, Y. DNA methylation and expression of stress related genes in PBMC of MDD patients with and without serious suicidal ideation. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 115–124, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.02.005>.DNA

SAITO, Taku *et al.* Effect of interaction between a specific subtype of child abuse and the FKBP5 rs1360780 SNP on DNA methylation among patients with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 272, n. April, p. 417–422, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.03.120>

SILVA, Rosana Carvalho *et al.* Biological correlates of early life stressful events in major depressive disorder. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 125, n. September 2020, p. 105103, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.105103>

SMITH, Alicia K. *et al.* DNA Extracted From Saliva for Methylation Studies of Psychiatric Traits: Evidence Tissue Specificity and Relatedness to Brain. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 36–44, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0224>.Loss

STANKIEWICZ, Adrian M.; SWIERGIEL, Artur H.; LISOWSKI, Pawel. Epigenetics of stress adaptations in the brain. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 98, p. 76–92, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.07.003>

SULLIVAN, P.F; GESCHWIND, D.H. Defining the Genetic, Genomic, Cellular, and Diagnostic Architectures of Psychiatric Disorders. **HHS Public Access**, [s. l.], v. 177, n. 1, p. 162–183, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.015>.Defining

SULLIVAN, Patrick F; NEALE, Michael C; KENDLER, Kenneth S. **Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis**. [S. l.: s. n.], 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>

TALAROWSKA, Monika. Epigenetic Mechanisms in the Neurodevelopmental Theory of Depression. **Depression Research and Treatment**, [s. l.], v. 2020, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/6357873>

TAMMEN, Stephanie A.; FRISO, Simonetta; CHOI, Sang Woon. Epigenetics: The link between nature and nurture. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 753–764, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.018>

THAPAR, Anita; RIGLIN, Lucy. The importance of a developmental perspective in Psychiatry: what do recent genetic-epidemiological findings show? **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1631–1639, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0648-1>

TORRES-BERRÍO, Angélica *et al.* Unraveling the epigenetic landscape of depression: Focus on early life stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 341–357, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.4/enestler>

TOZZI, Leonardo *et al.* Epigenetic Changes of FKBP5 as a Link Connecting Genetic and Environmental Risk Factors with Structural and Functional Brain Changes in Major Depression. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 1138–1145, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2017.290>

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, Kostas A; IKONOMOPOULOS, Ioannis; BANNISTER, Andrew J. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. **Epigenetics & chromatin**, [s. l.], v. 9, p. 31, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0081-5>

TROUBAT, Romain *et al.* Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 151–171, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ejn.14720>



TYRKA, Audrey R.; RIDOUT, Kathryn K.; PARADE, Stephanie H. Childhood adversity and epigenetic regulation of glucocorticoid signaling genes: Associations in children and adults. **Development and Psychopathology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 1319–1331, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0954579416000870>

VUKOJEVIC, Vanja *et al.* Epigenetic modification of the glucocorticoid receptor gene is linked to traumatic memory and post-traumatic stress disorder risk in genocide survivors. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 31, p. 10274–10284, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1526-14.2014>

WEAVER, Ian C.G. *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 847–854, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn1276>

WEAVER, Ian C.G.; MEANEY, Michael J.; SZYF, Moshe. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 103, n. 9, p. 3480–3485, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0507526103>

WEN, Lu; TANG, Fuchou. Genomic distribution and possible functions of DNA hydroxymethylation in the brain. **Genomics**, [s. l.], v. 104, n. 5, p. 341–346, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.020>

WIKENIUS, Ellen *et al.* Prenatal maternal depressive symptoms and infant DNA methylation: a longitudinal epigenome-wide study. **Nordic Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 73, n. 4–5, p. 257–263, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08039488.2019.1613446>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Media centre: Depression. **Depression Fact Sheet**, [s. l.], n. April, p. 4–7, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/index.html>

YEHUDA R, DASKALAKIS NP, LEHRNER A, *et al.* Influences of maternal and paternal PTSD on epigenetic gene in Holocaust survivor offspring. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 171, n. 8, p. 872–880, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.13121571.Influences>

ZANNAS, Anthony S. *et al.* Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 261–274, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2015.235>

## 8. ANEXO 1

### 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<sup>a</sup>. Professora  
Ana Vilela Mendes Fontoura

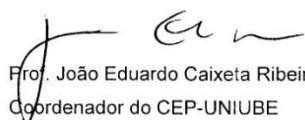
**Assunto:** Encaminha parecer 0041/06-CEP-UNIUBE sobre o protocolo de Cuidados primários à Saúde: Depressão materna e aspectos comportamentais de crianças em idade escolar” – CAAE nº 0039.0.227.000-06.

Prezada Professora

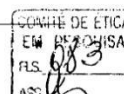
Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEP-UNIUBE na reunião de 13/06/06, tendo sido tendo sido **aprovado**.

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



## 9. ANEXO 2

### Trabalhos Científicos

1. (Submitted) **Mendonça MS**, Mangiavacchi PM, Mendes AV, Loureiro SR, Rocio MS, Gloria LS, Junior WM, De Marco SPG, Kanashiro, MM, Hallak, JEC, Crippa JAS, Rios AFL. **DNA methylation in regulatory elements of the FKBP5 and NR3C1 gene in mother-child binomials with depression.** Submitted to Human Molecular Genetics.
2. **Mendonça MS**, Mangiavacchi PM, Rios AFL. **Regulatory functions of FKBP5 intronic regions associated with psychiatric disorders.** Submitted to Journal of Psychiatric Research.
3. **Mendonça MS**, Mangiavacchi PM, Rios AFL. **Genetic and epigenetic aspects of postpartum depression. Postpartum Depression: A Clinical and Research Update.** Chapter 2. 2021. ISBN: 978-1-53618-768-7.
4. **Mendonça MS**, Mangiavacchi PM, Rios AFL. **Genetics and epigenetics of the SLC6A4 gene in depression. The Neuroscience of Depression.** Chapter 4. 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817935-2.00004-0>
5. **Mendonça MS**, Mangiavacchi PM, De Sousa PF, Crippa JAS, Mendes AV, Loureiro SR, Martín-Santos R, Quirino CR, Kanashiro MM, Rios AFL. **Epigenetic variation at the SLC6A4 gene promoter in mother-child pairs with major depressive disorder.** Journal of Affective Disorder. 2019. DOI: 10.1016/j.jad.2018.10.369