

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**NEUROBIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE EM ADOLESCENTES:
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
E DO METILOMA DO DNA AO LONGO DO TEMPO**

Andressa Bortoluzzi

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Gus Manfro

Porto Alegre, maio de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**NEUROBIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE EM ADOLESCENTES:
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
E DO METILOMA DO DNA AO LONGO DO TEMPO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Andressa Bortoluzzi

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Gus Manfro

Porto Alegre, maio de 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Gisele Gus Manfro, por nortear a minha pós-graduação de maneira sublime. Agradeço pela dedicação, inteligência, parceria, confiança, disponibilidade, proteção, dinamismo e entusiasmo pela pesquisa. Obrigada pelo incentivo e pela disposição em procurar estratégias para contornar quaisquer adversidades.

Ao Prof. Giovanni Abrahão Salum pelo dinamismo, brilhantismo e incentivo na pesquisa. Agradeço pela confiança depositada em mim, pela competência e pela contribuição intelectual.

À Prof^a. Carolina Blaya, pelas valiosas contribuições nas discussões científicas e pelo incentivo.

Ao Prof. Marino Bianchin, pelo apoio e entusiasmo em ampliar as condições de pesquisa.

À Prof^a. Patrícia Pelufo, pelo exemplo de competência e ousadia nas questões científicas.

À Prof^a. Sandra Leistner-Segal, pela parceria em pesquisa e receptividade.

Ao Prof. Mauro A. Castro, pela competência, inteligência, serenidade e disposição em sanar dúvidas e contribuir com o trabalho.

À Edenir Palmero e à Lidia Rebolho, pelo apoio na validação do experimento e pela parceria científica.

À Eduarda Rosa, pelo companheirismo nos experimentos e pela diversão (essencial) no laboratório. Obrigada por ter sido uma Iniciação Científica dedicada.

Aos colegas do laboratório BRAIN pelo crescimento acadêmico e pessoal. Em especial, agradeço à querida amiga Isabel Bandeira pela força e pela sensação de “não estar sozinha nesse barco”. Obrigada Soraia Poloni, Aline Bochernitsan, Ágata Mantese, Jéssica Dick, Taciane Borsatto, Fernanda Sperb, Gabriel Furtado e demais colegas, por contribuírem para o meu enriquecimento pessoal e intelectual.

Às colegas de pesquisa Amanda Brondani, Tania Diniz Machado, Roberta Dalle Molle, Roberta Sena e Daniela Laureano, pela parceria científica.

Ao Protáia, pelo aprendizado. É um orgulho participar de um grupo altamente promissor e competente. Agradeço aos companheiros de pesquisa Cristiano Tschiedel, Danitsa Rodrigues, Mariana Costa, Lidiane Borba, Rafaela Jarros, Diogo Araújo Desousa, Natasha Fonseca, Suzielle Flores, Felipe Schuch e Natan Gosmann, pelo exemplo na ciência.

À Rudineia Toazza, pelo companheirismo na pós-graduação em Neurociências (nossa desafiadora escolha). Obrigada pelo inesquecível incentivo e pela amizade nessa jornada científica.

Ao “Everaldinho Almeida”, pelo exemplo de profissionalismo e disposição em facilitar a vida na pesquisa. Obrigada pela amizade!

À Ana Carolina Barazzutti, Camila Beskow, Gláucia Chiyoko, Angélica Baumont (agora minha querida companheira no mundo da pesquisa), Cintia Tusset, Suélen Merlo e Flávia Pilecco, pela amizade. Sou grata pelos nossos momentos compartilhados!

À CAPES, pela bolsa de estudos que viabilizou a condução dos experimentos e a conclusão do doutorado.

Aos participantes do estudo (adolescentes e suas famílias) e escolas, por contribuírem com a pesquisa nacional.

Aos meus pais, Cleusa e Renato, pelo apoio incondicional e suporte para alcançar os meus objetivos. Agradeço pela paciência e respeito frente às minhas decisões (nem sempre compreendidas).

Ao Luigi (sobrinho amado), por me proporcionar o melhor da vida: momentos de felicidade.

Ao meu amorzinho, Manlio Neto, por entrar na minha vida de uma maneira “providencial”. Obrigada por ter sido o responsável pelas minhas alterações neuroquímicas (inéditas) e por ter amenizado as minhas “crises existenciais”.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a conclusão dessa etapa.

“The feeling of awed Wonder that science can give us is one of the highest experiences of which the human psyche is capable. It is a deep aesthetic passion to rank with the finest that music and poetry can deliver. It is truly one of the things that make life worth living and it does so, if anything, more effectively if it convinces us that the time we have for living is quite finite”. (Richard Dawkins, *Unweaving the rainbow: Science, Delusion and the Appetite for Wonder*. London - 1998)

“O deslumbramento que a ciência pode nos proporcionar é uma das mais elevadas experiências pelas quais a psique humana é capaz. É uma profunda paixão estética ao par do que a música e a poesia podem oferecer de melhor. É, realmente, uma das coisas pelas quais vale a pena viver, ainda mais se nos convence de que esse tempo é bastante limitado”. (Richard Dawkins, *Desvendando o arco-íris: Ciência, Ilusão e Encantamento*. Londres - 1998)

RESUMO

Introdução: A neurobiologia dos transtornos de ansiedade (TA) é complexa e envolve interações ambientais e genéticas ainda não conhecidas. Esses transtornos, comumente, iniciam durante a infância e adolescência, persistindo ao longo da vida. O comprometimento da resposta biológica frente ao estímulo estressor, encontrado em muitos pacientes com TA, sugere a influência do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) nestes transtornos e, portanto, os polimorfismos associados ao eixo HHA poderiam ser estudados em genes candidatos. Os estudos que almejam entender a etiologia dos TA devem, também, explorar as alterações epigenéticas (incluindo a metilação do DNA) decorrentes das influências ambientais.

Objetivos: Estudar, em adolescentes, polimorfismos genéticos funcionais do eixo HHA, interações Gene x Ambiente (G x A) e metiloma do DNA, considerando as diferentes trajetórias dos TA.

Métodos: Foi realizada a extração de DNA das células do epitélio bucal de 228 adolescentes (131 casos e 97 controles para os TA) e foram genotipados, por PCR em tempo real, polimorfismos funcionais envolvidos com o eixo HHA (*FKBP5*: rs3800373, rs9296158, rs1360780, rs9470080 e rs4713916; *NR3C1*: rs6198; *NR3C2*: rs2070951; *CRHR1*: rs878886 e *SERPINA6*: rs746530). Os participantes responderam à escala auto-aplicativa SCARED (*Screen for Children Anxiety Related Emotional Disorder – Children rated*) e realizaram entrevistas semiestruturadas para avaliação diagnóstica utilizando o K-SADS-PL (*Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime*). O questionário CTQ (*Childhood Trauma Questionnaire*) foi aplicado em 90 adolescentes (54 casos e 36 controles para os TA) para avaliar a interação entre o trauma emocional e o polimorfismo do gene *NR3C2* nos níveis séricos de BDNF. Uma subamostra de adolescentes (n=47) foi reavaliada, cinco anos após a primeira coleta, através das mesmas entrevistas

psiquiátricas e nova extração de DNA salivar. Alguns participantes, na última avaliação, responderam ao MINI (*Mini International Neuropsychiatric Interview*) apropriado para a idade atual. A amostra foi organizada em 4 grupos, conforme o diagnóstico dos TA e o ano da coleta de saliva (anos de 2008 e 2013): (1) Desenvolvimento típico da adolescência (Controle; n=14); (2) Incidentes para os TA (ITA; n=11); (3) Persistentes para os TA (Caso; n=14) e (4) Remitentes para os TA (RTA; n=08). O metiloma do DNA foi analisado com o *Infinium HumanMethylation 450 BeadChip* da *Illumina*.

Resultados: Não foi encontrada associação entre os polimorfismos estudados e os TA. Em relação à interação G x A, sugere-se que o polimorfismo rs2070951 do gene *NR3C2* modera a associação entre negligência física e os níveis séricos de BDNF. Do ponto de vista epigenético, foi observada, nos grupos ITA e RTA, vias biológicas com padrão homogêneo e relacionadas ao sistema nervoso. Já nos grupos casos e controles para os TA, foram evidenciadas vias biológicas com padrão mais heterogêneo. Um perfil de hipometilação do DNA foi predominante nas vias encontradas. Na análise transversal, nós encontramos padrões opostos de metilação do DNA, conforme o período desenvolvimental avaliado: hipometilação no início da adolescência e hipermetilação em jovens adultos.

Conclusão: Esse estudo abordou, em uma amostra de adolescentes, aspectos genéticos (genes candidatos envolvidos com o eixo HHA), ambientais (trauma emocional) e epigenéticos (metiloma do DNA) dos TA. Os achados sugerem que, embora sem associações entre os TA e genes envolvidos no eixo HHA, existe uma interação entre a presença de trauma emocional, polimorfismo genético do eixo HHA e marcadores biológicos. Os achados do metiloma do DNA sugerem, também, influências epigenéticas no curso dos TA. Novos estudos devem ser delineados para corroborar as influências genéticas e ambientais neste transtorno.

Palavras-chave: Transtorno de Ansiedade; eixo HHA; metiloma do DNA; Adolescência; longitudinal

ABSTRACT

Background: The neurobiology of Anxiety Disorders (AD) is complex and involves environmental and genetic interactions understood. These disorders may have their onset during childhood and adolescence, persisting throughout life. The impairment of biological response against the stressor stimulus, described in many patients with AD, suggests a possible role of genetic polymorphisms of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in these individuals. Studies that aim to understand the etiology of AD should also explore the epigenetic changes (including DNA methylation) arising from environmental influences.

Objective: To study, in adolescents, functional genetic polymorphisms of HPA axis, Gene x Environment (G x E) interactions and DNA methylome, considering different AD outcomes.

Methods: Saliva DNA was extracted from 228 adolescents (131 cases and 97 controls to AD) and we genotyped, by real time PCR, the functional polymorphisms involved with HPA axis (*FKBP5*: rs3800373, rs9296158, rs1360780, rs9470080 and rs4713916; *NR3C1*: rs6198; *NR3C2*: rs2070951; *CRHR1*: rs878886 and *SERPINA6*: rs746530). Participants responded to the scale self-applied Screen for Children Anxiety Related Emotional Disorder – Children rated (SCARED) and were diagnosed according to the Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime (K-SADS-PL). The Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) was applied in 90 adolescents (54 cases e 36 controls to AD) to evaluate the interaction between emotional trauma and the *NR3C2* polymorphism in the serum levels of BDNF. A sub-sample of adolescents (n = 47) was reassessed five years after the first evaluation by the same psychiatric semi-structured interviews and new extraction salivary DNA was performed. Some participants in the last evaluation responded to Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI), which is a semi structure interview appropriate for the present age. The sample was organized in four groups according to the

diagnosis of AD and the year of saliva collection (2008 and 2013): (1) Typically Developing Controls (TDC; n = 14); (2) Incident Anxiety Disorder (IAD; n = 11); (3) Persistent Anxiety Disorder (PAD; n = 14); (4) Remittent Anxiety Disorder (RAD; n = 8). DNA methylome was evaluated with Infinium HumanMethylation450 BeadChip.

Results: We did not find any association between the genetic polymorphisms and AD. Considering the G x E interaction we suggest that rs2070951 polymorphism of *NR3C2* gene moderates the association between physical neglect and serum BDNF levels. When we evaluated the DNA methylome, we observed more homogeneous biological pathways and mostly related with nervous system in individuals from IAD and RAD groups. On the other hand, in the TDC and PAD groups, we found biological pathways with a more heterogeneous pattern. A DNA hypomethylation profile was found predominant in the pathways. In a cross-sectional analysis, we found opposite patterns of DNA methylation, as the developmental period assessed: hypomethylation at the beginning of adolescence and hypermethylation in young adults.

Conclusion: This study addressed, in an adolescent sample, genetics (candidate genes linked to HPA axis), environmental (emotional trauma) and epigenetic (DNA methylome) aspects of AD. The findings suggest that although there are no associations between AD and genes involved in HPA axis, there is an interaction between the presence of trauma, genetic polymorphism involved in this axis and biomarkers. The DNA methylome findings also suggest epigenetic influences on the course of TA. Further studies should be designed to corroborate the genetic influences in this disorder.

Keywords: anxiety disorder; HPA axis; DNA methylome; adolescence; longitudinal

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT1A: receptor 1A de serotonina

5-HTT/ *SLC6A4*: transportador de serotonina (do inglês *solute carrier family 6 member 4*)

5-HTTLPR: polimorfismo da região promotora do gene do transportador de serotonina

A: ambiente (quando referido às interações entre gene e ambiente)

ACC: córtex cingulado anterior (do inglês *Anterior cingulate cortex*)

APOE: Apolipoproteína E

ASep: ansiedade de separação

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)

CB1: receptor 1 de canabinóide

CBG: do inglês *corticosteroid binding globulin*

COMT: catecol-o-metiltransferase

CRF: hormônio liberador de Corticotrofina

CRFR2: receptor 2 do fator de liberação de corticotropina

CRHR1: receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNMT1: DNA metiltransferase

DNMT3: família de DNA metiltransferase

DNMT3A: isoforma A pertencente à família de DNA metiltransferase

DNMT3B: isoforma B pertencente à família de DNA metiltransferase

DSM-5: 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EBC: estresse brando crônico

EEP: exposição ao estresse precoce

EZH2: do inglês *Enhancer of Zeste Homolog 2*

FE: fobias específicas

FKBP5: proteína ligante de FK506 de 51 kDa (do inglês *FK506 binding protein 5*)

G: gene (quando referido às interações entre gene e ambiente)

G: guanina (quando referido ao nucleotídeo na explicação do capítulo sobre Epigenética)

GAD1: glutamato descarboxilase 1

GAD2: glutamato descarboxilase 2

GO: ontologia genética (do inglês *Gene Ontology*)

GSEA: análise de enriquecimento de um grupo de genes (do inglês *Gene set enrichment analysis*)

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HHA: (eixo) hipotálamo-hipófise-adrenal

IL: interleucina

IRMf: imagem por ressonância magnética funcional

ISRS: inibidores seletivos da recaptção de serotonina

Kb: quilobase

kDa: quilodalton (medida de massa atômica)

LTP: potenciação de longa duração (do inglês *long-term potentiation*)

MAOA: subtipo A da enzima monoamina oxidase

MeCP2: fator de transcrição inibitório (do inglês *methyl CpG binding protein 2*)

MeDIP: combinação dos métodos de imunoprecipitação de DNA metilado

MSP: reação de cadeia da polimerase envolvendo metilação específica baseada na conversão com bissulfito

MTI: maus-tratos na infância

ncRNAs: ácido ribonucleico não codificante (do inglês *non-coding RNA*)

NEI: negligência emocional na infância

NET: transportador de noradrenalina

NFAT5: fator de transcrição (do inglês *nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive*)

NFkB1: fator de transcrição (do inglês *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*)

NR3C1: receptor de glicocorticóide (do inglês *Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*)

OXTR: receptor de ocitocina

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

PFC: córtex pré-frontal (do inglês *Prefrontal cortex*)

Protaia: Programa de transtornos de ansiedade na infância e adolescência

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

SNC: sistema nervoso central

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês *single nucleotide polymorphism*)

STAT6: fator de transcrição (do inglês *signal transducer and activator of transcription 6*)

TA: transtornos de ansiedade

TAG: transtorno de ansiedade generalizada

TASep: transtorno de ansiedade de separação

TASocial: transtorno de ansiedade social

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático

TP: transtorno do pânico

UTR: região não-traduzida do gene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) integra e medeia a resposta ao estresse frente a adversidades da vida.....	23
Figura 2. Esquema das possíveis diferenças moleculares, dependentes do polimorfismo do gene <i>FKBP5</i> , que levam à ativação de uma retroalimentação negativa “ultra-curta”, reguladora da sensibilidade do GR.....	26
Figura 3. Diagrama da paisagem epigenética de Conrad Waddington..	28
Figura 4. Diagrama de efeitos epigenéticos.	28
Figura 5. Ilustração (simplificada) para um dos mecanismos epigenéticos: a metilação do DNA.	29
Figura 6. Ilustração de uma ilha CpG e suas fronteiras.....	30
Figura 7. Representação de um possível papel do BDNF nos transtornos induzidos pelo estresse.....	109
Figura 8. Esquema de hipóteses envolvendo contrastes longitudinais (ano de 2013 menos o ano de 2008) e transversais (casos menos controles)..	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos diferentes Transtornos de Ansiedade (TA).....	17
Tabela 2. Definições de abuso e negligência.....	21
Tabela 3. Diferenças nos padrões de metilação do DNA nos Transtornos de Ansiedade (TA) com ou sem a presença de trauma emocional.....	34
Tabela 4. Diferenças nos padrões de metilação do DNA, envolvendo trauma emocional ou eventos estressores, SEM considerar os Transtornos de Ansiedade como prioritários.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Transtornos de Ansiedade (TA)	16
1.2. Epidemiologia dos TA	20
1.3. Trauma emocional na infância e TA	20
1.4. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (eixo HHA), resposta ao estresse e TA	22
1.5. Polimorfismos genéticos do eixo HHA, trauma emocional na infância e TA.....	25
1.6. Epigenética.....	27
1.7. Metilação do DNA	30
1.8. Metilação do DNA, TA e Trauma emocional na infância.....	32
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. HIPÓTESES.....	45
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	46
6. ARTIGOS	47
6.1. ARTIGO 1	48
6.2. ARTIGO 2	55
6.3. ARTIGO 3	56
7. DISCUSSÃO.....	100
8. CONCLUSÕES.....	121
9. PERSPECTIVAS	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXO 1.....	136
ANEXO 2.....	137
ANEXO 3.....	139
ANEXO 4.....	140

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtornos de Ansiedade (TA)

A palavra “ansiedade” deriva do latim “*anxietatis*” (desejar, preocupar-se); “*anxi*” (contrair, estreitar); “*anxietas*” (estreitamento); “*anxia*” (ânsia, latim vulgar) e sugere uma experiência somática e psicológica desagradável. Do ponto de vista evolutivo, a ansiedade é considerada uma manifestação fisiológica frente a algum tipo de perigo (real ou imaginário), sendo adaptativa na formação de respostas aos estímulos ameaçadores, a fim de promover a sobrevivência e a segurança do indivíduo (revisões de CROCQ, 2015; PÉREZ-EDGAR; FOX, 2005; ROCKHILL et al., 2010). Quando a gravidade, a frequência e/ou a persistência dos sintomas ansiosos tornam-se inconsistentes com as circunstâncias apresentadas e a reação ansiosa exacerbada interfere negativamente no comportamento, tornando-se disfuncional, caracterizam-se os denominados transtornos de ansiedade (TA) (revisão de HAMM et al., 2016; STEIN; SAREEN, 2015).

O traço de ansiedade, o estado de ansiedade e os TA são diferenciados pelo grau de prejuízo e duração dos sintomas de ansiedade no indivíduo. O estado de ansiedade é definido, normalmente, como uma medida de nível agudo ou intermediário de ansiedade. Já o traço de ansiedade é considerado uma tendência de o indivíduo produzir uma resposta ansiosa aos eventos ambientais. E, por fim, os TA são os mais graves devido ao excesso de preocupação e medo e pela maior duração e complexidade dos sintomas ansiosos, sendo disfuncionais e acompanhados de prejuízos (revisão de PÉREZ-EDGAR; FOX, 2005).

Os problemas internalizantes (isolamento, queixas somáticas, sofrimento emocional) na infância são precursores frequentes para o desenvolvimento de síndromes psiquiátricas, incluindo os TA e a depressão (revisão de ROCKHILL et al., 2010; YOUNG et al., 2003).

Segundo a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de transtornos mentais (DSM-5), os TA (**Tabela 1**) são classificados como: (1) transtorno de ansiedade generalizada (TAG), (2) transtorno do pânico (TP), (3) agorafobia, (4) transtorno de ansiedade de separação (TASep), (5) transtorno de ansiedade social (TASocial) ou fobia social, (6) fobias específicas (FE) e (7) mutismo seletivo (APA, 2013; KUPFER, 2015).

Tabela 1. Caracterização dos diferentes Transtornos de Ansiedade (TA)

TA	Principais características
TAG	Preocupação e ansiedade excessivas sobre diversos eventos da vida em um período mínimo de 6 meses. Há comprometimento da qualidade de vida em diversos âmbitos (escolar, social, econômico e familiar). Pacientes com TAG sentem-se preocupados, tensos ou apreensivos por mais tempo em atividades cotidianas. Os sintomas mais comuns podem incluir fadiga, distúrbios do sono, dores de cabeça, tensão muscular, irritabilidade, dificuldade para relaxar, entre outros (STEIN; SAREEN, 2015).
TP	Envolve a presença de ataques de pânico recorrentes e inesperados. Um ataque de pânico é definido como “um aumento abrupto de medo e desconforto imensos que alcança picos dentro de minutos” e “durante o qual ocorrem quatro (ou mais, de uma lista de 13) sintomas físicos e cognitivos”. No TP, o indivíduo passa a ter “preocupação persistente” (por um mês ou mais) sobre os ataques adicionais de pânico e suas consequências, assim como pode apresentar um comportamento evitativo (revisão de HAMM et al., 2016).
Agorafobia	É definida como medo marcado por dois (ou mais) de cinco grupos de situações. Essas situações caracterizam-se por dificuldade de sair (Ex.: transporte público; lugares fechados; ficar em pé na fila ou estar em meio à multidão) ou por situações em que não há ajuda imediata disponível em casos de emergência (Ex.: estar em espaços abertos ou estar sozinho longe de casa) (revisão de HAMM et al., 2016).
TASep	As manifestações dos sintomas de ansiedade de separação (ASep) apóiam um grau de continuidade entre adaptação fisiológica e psicopatologia, sendo as diferenças entre elas uma questão de intensidade e adequação para idade e contexto. Existem manifestações que devem ser consideradas, tais como: (I) evidente desconforto com a ideia de separação; (II) relutância em dormir separado da figura de afeto; (III) medo de estar sozinho ou sem a figura de afeto. Quando os níveis de ASep são exagerados e descontextualizados são ditos TASep. A duração dos sintomas deve ser de 6 meses ou mais (tanto para crianças quanto para adultos) (APA, 2013; BATTAGLIA, 2015).
TASocial ou Fobia social	Caracteriza-se pela ansiedade social suficientemente alta e/ou recorrente, de tal forma que prejudica as interações sociais do indivíduo, causando estresse. A duração dos sintomas deve

ser de, no mínimo, 6 meses. Os sintomas incluem medo e evitação de situações sociais, o que prejudica a qualidade de vida. Os indivíduos que possuem medo, somente, em situações performáticas (Ex.: falar em frente ao público) parecem representar um subgrupo distinto dos TASoc em termos de etiologia, idade de início, resposta fisiológica e resposta ao tratamento (APA, 2013; revisão de WONG; GREGORY; MCLELLAN, 2016).

FE Caracterizam-se por reações exacerbadas de medo irracional. Os indivíduos com FE evitam lugares, situações ou objetos comuns considerados (por eles) ameaçadores ou perigosos. As FE prejudicam a rotina, limitam a eficiência no trabalho, reduzem a auto-estima e colocam uma pressão nos relacionamentos, visto que as pessoas irão evitar situações desconfortáveis e aterrorizantes de ansiedade fóbica. As fobias, em geral, são focadas em animais, insetos, altura, trovão, transporte público, procedimentos médicos, dentista, elevadores, entre outros. A duração típica dos sintomas é de 6 meses ou mais (retirado do *site* da ADAA, 2016; APA, 2013)

Mutismo seletivo É comumente encontrado na infância. Caracteriza-se por ausência de fala em situações públicas específicas em que é esperada a fala da criança (Ex.: situações sociais e escolares). Em outras ocasiões, a fala é desenvolvida normalmente pela criança. A ausência da fala deve ser evidenciada durante, pelo menos, 1 mês (revisão de MURIS; OLLENDICK, 2015).

Abreviações: TA, transtornos de ansiedade; TAG, transtorno de ansiedade generalizada; TP, transtorno do pânico; TASep, transtorno de ansiedade de separação; TASocial, transtorno de ansiedade social e FE, fobias específicas.

Há evidências de que os TA aumentam em 52% a incidência de doenças cardiovasculares (revisão de BATELAAN et al., 2016) e que a severidade dos sintomas ansiosos esteja envolvida com prejuízo funcional (global, social, ocupacional e físico) (revisão de MCKNIGHT et al., 2015). Além do sofrimento, esses transtornos geram custos diretos e indiretos elevadíssimos para a economia e são considerados uns dos mais comuns e debilitantes transtornos psiquiátricos na vida adulta (revisões de BANDELOW; MICHAELIS, 2015; HOFFMAN; DUKES; WITTCHEN, 2008).

A “complexidade fenotípica” dos TA é um desafio, por exemplo, para a genética psiquiátrica (revisão de SMOLLER; BLOCK; YOUNG, 2009), mas classificações bem definidas tendem a padronizar os estudos e facilitar a compreensão sobre as evidências biológicas associadas a esses transtornos (KUPFER, 2015).

Os indivíduos com TA apresentam um viés atencional ao estímulo ameaçador (independente se o estímulo for consciente ou subliminar), o que aumenta a vulnerabilidade ao estresse (MAOZ et al., 2013). Esses transtornos são considerados “transtornos complexos” porque são influenciados por múltiplos fatores que fogem dos chamados “efeitos determinísticos” dos genes (como em doenças monogênicas) e, portanto, são passíveis de serem modulados por interferências ambientais (ASK et al., 2015; revisões de SALUM et al., 2013; SMOLLER; BLOCK; YOUNG, 2009).

Os estudos com neuroimagem estrutural e funcional revelam que pacientes com TAG, quando comparados a seus controles, apresentam atividade anormal da amígdala e do córtex pré-frontal (PFC, do inglês *Prefrontal cortex*), além de baixa conectividade entre amígdala, córtex cingulado anterior (ACC, do inglês *Anterior cingulate cortex*) e PFC. Também, apresentam volume aumentado da substância cinzenta na amígdala bilateral, em adultos, adolescentes e crianças, e conectividade estrutural diminuída entre essas estruturas (revisão de HILBERT; LUEKEN; BEESDO-BAUM, 2014).

Uma meta-análise, envolvendo gêmeos e suas famílias biológicas, sugere uma herdabilidade em torno de 30 a 40% para os TA, embora genes específicos possam conferir riscos maiores não identificados (revisão de HETTEMA et al., 2001). Já um estudo longitudinal, com relatos dos pais e dos filhos gêmeos sobre os sintomas de ansiedade e depressão durante a infância (8-9 anos), adolescência (13-14; 16-17 anos) e início da idade adulta (19-20 anos), estima uma herdabilidade na faixa de 72% a 89% para esses sintomas combinados. Os resultados desse estudo também demonstram um padrão “dinâmico desenvolvimental”, considerando que há uma atenuação, com o passar dos anos, da influência genética como fator de risco para sintomas ansiosos e depressivos (KENDLER; GARDNER; LICHTENSTEIN, 2008).

Com o avanço de novos métodos bioestatísticos e moleculares, a investigação sobre a etiologia de diversos transtornos complexos, incluindo os TA, torna-se mais capacitada para sugerir mecanismos neurobiológicos envolvidos nesses transtornos mentais, embora se reconheça a complexidade dessa tarefa (revisão de KENDLER, 2013).

1.2. Epidemiologia dos TA

Os TA estão entre os transtornos psiquiátricos mais comuns em jovens, com estudos indicando uma prevalência entre 9% e 32% durante a infância e adolescência (revisão de CRESWELL; WAITE; COOPER, 2014) e uma prevalência global em torno de 7,3% (revisão de BAXTER et al., 2013). No Brasil, foi descrita uma prevalência de 5,2% para qualquer TA em uma amostra de 1.251 escolares (FLEITLICH-BILYK; GOODMAN, 2004).

Embora uma recente revisão sistemática não indique que houve um aumento da prevalência mundial dos sintomas ansiosos na infância, em um período de 15 anos (1998-2013) (GOSMANN et al., 2015), a atenção destinada aos TA deve ser priorizada considerando sua cronicidade e morbidade. Os TA iniciam precocemente e apresentam comorbidades e continuidade, de forma homotípica (continuidade do mesmo transtorno) ou heterotípica (outros transtornos ansiosos), mais prevalente em meninas (COSTELLO et al., 2003).

Contudo, as diferenças metodológicas envolvendo instrumentos de avaliação e traduções, cultura, disparidade das políticas de saúde entre os países, relutância de pacientes e seus pais a procurarem ajuda psiquiátrica, entre outros, podem levar à subestimação das prevalências (revisão de BANDELOW; MICHAELIS, 2015).

1.3. Trauma emocional na infância e TA

O trauma emocional (**Tabela 2**) na infância envolve uma série de maus-tratos, incluindo abusos e negligências. O trauma infantil contribui para o aumento dos problemas de relacionamentos interpessoais, na vida adulta, em pacientes com TA (HUH et al., 2014). Em pacientes com TASocial, os maus-tratos na infância (MTI) aumentam a gravidade dos sintomas, pioram a qualidade de vida, a capacidade de resiliência e a resposta à farmacoterapia (BRUCE et al., 2012; SIMON et al., 2009). Os tipos de MTI, bem como a idade de início do abuso/negligência e a relação de vínculo com quem praticou os maus-tratos, influenciam no desenvolvimento dos diferentes transtornos psiquiátricos (BISHOP et al., 2014).

Tabela 2. Definições de abuso e negligência

Abuso sexual	Contato ou conduta sexual entre uma criança com menos de 18 anos de idade e um adulto mais velho.
Abuso físico	Agressões corporais em uma criança, por parte de um adulto ou pessoa mais velha, que representa risco ou que resultou em injúria.
Abuso emocional	Agressões verbais, afetando o senso de valor ou bem-estar da criança, ou qualquer humilhação ou comportamento degradante, diretamente direcionado à criança, por parte de um adulto ou pessoa mais velha.
Negligência Física	Fracasso dos cuidadores em fornecer as necessidades físicas básicas para uma criança, incluindo comida, abrigo, roupas, segurança e cuidados com a saúde (má supervisão dos pais está incluída nessa definição, se a segurança da criança estiver em risco).
Negligência emocional	Fracasso dos cuidadores em atender as necessidades emocionais e psicológicas básicas da criança, incluindo amor, nutrição e apoio.

Informações extraídas de Bernstein et al. (2003).

Sugere-se que a seqüela neurobiológica dos MTI possua um papel significativo no desenvolvimento e na duração dos transtornos psiquiátricos, em especial os TA (revisões de DVIR et al., 2011; PYNOOS; STEINBERG; PIACENTINI, 1999). As principais consequências encefálicas estruturais e funcionais dos MTI e do estresse precoce incluem a redução do tamanho do corpo caloso e desenvolvimento atenuado do neocórtex esquerdo,

hipocampo e amígdala; o aumento da irritabilidade elétrica de estruturas límbicas e reduzida atividade funcional do vérmis cerebelar (revisão de TEICHER et al., 2003).

Os MTI estão associados com maior volume da substância cinzenta no tálamo esquerdo de adolescentes com TAG (LIAO et al., 2013) e com redução do volume hipocampal em jovens adultos sem transtornos psiquiátricos (TEICHER; ANDERSON; POLCARI, 2012). Em um estudo recente, os pacientes com TAG apresentaram alterações do córtex pré-frontal rostral, refletidas em uma disfunção molecular na formação de neurometabólitos (N-acetil-aspartato, creatina e colina), envolvidas com processamento emocional. Essa disfunção foi atribuída ao impacto do abuso emocional sofrido na infância (RAPARIA et al., 2016).

Os MTI também foram associados à redução do volume da substância cinzenta no hipocampo, ínsula, córtex órbito-frontal, giro cingulado anterior e núcleo caudado, além de hiperresponsividade da amígdala frente a faces ameaçadoras. Essas “cicatrices límbicas” podem ser consideradas mediadoras entre experiências de adversidades na infância e o desenvolvimento de transtornos emocionais (DANNLOWSKI et al., 2012). Há evidências de que as experiências negativas, durante a infância, promovem alterações na rede cortical pré-frontal-insular-motora envolvidas no processamento e responsividade a estímulos aversivos e na adaptabilidade às experiências ruins, mesmo em indivíduos considerados saudáveis para os transtornos psiquiátricos (DUNCAN et al., 2015).

1.4. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (eixo HHA), resposta ao estresse e TA

O estresse psicossocial é comum na vida humana, sendo considerado um estado de desafio ou ameaça pelo qual o organismo, na tentativa de preservar a sua homeostase, reage com respostas adaptativas, mediadas por cascatas neuroendócrinas e neuronais, envolvendo o sistema nervoso autonômico e a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA). As

anormalidades funcionais desse eixo alteram a resposta a eventos estressantes, contribuindo para o desenvolvimento, inclusive, dos TA (revisão de FARAVELLI et al., 2012).

Em termos biológicos, a exposição ao estresse leva a uma rápida ativação do sistema nervoso simpático e, em caso de estresse persistente ou severo, à estimulação do eixo HHA (Figura 1).

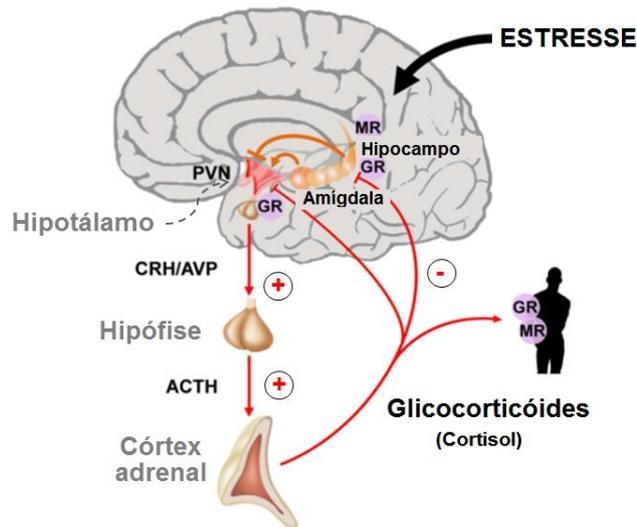


Figura 1. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) integra e medeia a resposta ao estresse frente a adversidades da vida. A percepção de ameaças reais e/ou físicas ou presumidas promove a ativação de eixo HHA. Os estados de ansiedade surgem da ativação da amígdala e ampliam a resposta ao estresse via projeções neuronais para o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. O hipocampo exerce um papel importante na avaliação dos estressores e é um sítio de receptores de glicocorticóides (GR) que medeiam a regulação do eixo HHA por retroalimentação negativa. A liberação de neuropeptídeos hipotalâmicos, hormônio liberador de corticotropina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), promovem a síntese e a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior. O ACTH estimula a liberação de glicocorticóides das glândulas adrenais. Esses hormônios circulam pelo corpo todo e pelo encéfalo, ligando-se a receptores esteróides intracelulares nucleares. Os receptores de mineralocorticóides (MR), presentes no hipocampo, agem no início da resposta ao estresse, enquanto que os GR no hipocampo, PVN e hipófise anterior, agem no final da resposta ao estresse. Adaptado de RAABE; SPENGLER (2013).

Os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular (PVN, do inglês *paraventricular nucleus*) hipotalâmico são estimulados a secretarem neuropeptídeos – hormônio liberador de corticotropina (CRH, do inglês *Corticotropin-releasing hormone*) e arginina-vasopressina (AVP, do inglês *arginine vasopressin*) - no sistema porta hipofisário, ligado ao hipotálamo e à hipófise anterior, onde ativam a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic hormone*). O ACTH é liberado na corrente sanguínea e se liga aos receptores do córtex adrenal para estimular a síntese e

secreção de hormônios esteróides, cortisol em humanos e corticosterona em roedores. Os receptores de glicocorticóides (GR, do inglês *glucocorticoid receptor*), no hipotálamo e na hipófise anterior, são os elementos regulatórios primários do eixo HHA, mediando a inibição da retroalimentação negativa do cortisol no CRH e AVP (a nível hipotalâmico) e no ACTH (a nível da hipófise anterior) (revisões de ISING et al., 2012; PRENDERVILLE et al., 2015; RAABE; SPENGLER, 2013).

Os receptores de glicocorticóides, no encéfalo, são conhecidos como os GR e os receptores de mineralocorticóides como MR (do inglês *Mineralocorticoid receptor*). Acredita-se que o equilíbrio entre os GR e os MR seja fundamental para explicar aspectos específicos da retroalimentação negativa do eixo HHA sob estresse, mas outros efeitos cognitivos são específicos para níveis absolutos de cada receptor, sem interação entre eles (revisão de DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; HARRIS et al., 2013). Os MR estão localizados, principalmente, no hipocampo, amígdala e PFC. Eles iniciam mudanças rápidas no recrutamento de sistemas neurais específicos e facilitam o processamento cognitivo, permitindo uma resposta rápida e adequada à determinada situação. Esses MR possuem uma alta afinidade aos glicocorticóides, sendo amplamente ocupados em situações de baixos níveis de glicocorticóides; os GR, por sua vez, são ocupados apenas em situações em que altos níveis de glicocorticóides circulantes são observados (Ex.: durante o estresse agudo) (revisão de VOGEL et al., 2016).

Na ansiedade aguda, a ativação do eixo HHA é adaptativa, já que o cortisol liberado reduz o medo percebido, através do prejuízo na memória de recuperação de informação emocional. Ao contrário, na ansiedade crônica, o desenvolvimento gradual de uma desconexão entre o estressor e suas conseqüências comportamentais é o principal mecanismo de enfrentamento que permite com que a pessoa funcione normalmente, mesmo com a presença do estímulo estressante que não pode ser evitada. Quando esse mecanismo falha, o

eixo HHA permanece ativado e prejudica os mecanismos de enfrentamento, além de induzir a baixa tolerância ao estresse crônico (revisões de FARAVELLI et al., 2012; PRENDERVILLE et al., 2015).

A cronicidade do estresse possui consequências no processamento cognitivo e emocional e está associada a alterações na plasticidade encefálica, desajuste do sistema imune, risco aumentado para doenças do desenvolvimento, prejuízo na retroalimentação negativa do eixo HHA, diminuição de fatores neurotróficos, entre outros (revisão de PRENDERVILLE et al., 2015)

Muitos estudos consideram os níveis de cortisol salivar uma sugestão para inferir o *status* funcional do eixo HHA. Hek et al. (2013) observaram hipoativação do eixo HHA em adultos mais velhos e com TA crônica (TAG, em especial). Na mesma direção, Dieleman et al. (2015) mostrou que, após uma tarefa estressante (“tarefa aritmética mental”), crianças com TA apresentaram um padrão de hipoativação da função basal do eixo HHA (exceto nas FE), elevada atividade simpática e baixa atividade parassimpática quando comparadas a seus controles para TA da mesma idade. Os estudos com TP sugerem um aumento da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos, mas não disfunção da inibição da retroalimentação negativa do eixo HHA (revisões de GRAEFF, 2007; ISING et al., 2012). Contudo, Vreeburg et al. (2010) sugerem uma maior ativação do eixo HHA em pacientes com TP com agorafobia e pacientes com depressão comórbida em comparação aos controles e pacientes remitentes.

1.5. Polimorfismos genéticos do eixo HHA, trauma emocional na infância e TA

O eixo HHA parece, realmente, relevante para os estudos que envolvem os TA e trauma emocional, embora apresente resultados controversos quanto à sua ativação (hiper ou hipoativação) em transtornos psiquiátricos (revisão de JACOBSON, 2014; TYRKA et al., 2009). Diante disso, polimorfismos genéticos funcionais que possam conferir algum risco

para a adequada regulação do eixo HHA (MINELLI et al., 2013; SHEIKH et al., 2013) são do interesse dessa tese.

O gene *FKBP5* (*FK506 binding protein 51*) codifica uma co-chaperona, de mesmo nome, envolvida com a sensibilidade dos GR ao cortisol. Há evidências de que polimorfismos genéticos funcionais estejam envolvidos com a proteção ou risco para transtornos psiquiátricos (**Figura 2**) (MINELLI et al., 2013). O aumento da co-chaperona FKBP5 confere maior resistência aos GR, originando um ciclo ultra-curto de retroalimentação negativa. O GR inativo, ou com baixa afinidade ao cortisol, é associado ao complexo oligomérico composto pela co-chaperona FKBP5 ligada à chaperona de choque térmico de 90 kDa (Hsp90, do inglês *heat shock protein 90 kDa*) e à fosfoproteína p23 formando o denominado, aqui, “Complexo GR”. Uma vez que o cortisol é ligado ao GR, a FKBP5 é trocada pela FKBP4 que pode, então, ligar-se a membros da família dineína de proteínas motoras. A ligação “FKBP4-dineína” permite a translocação do “complexo GR” para dentro do núcleo, facilitando o seu acesso ao DNA. O GR, nessa situação, ativa a transcrição da FKBP5 e tradução de elementos de resposta via intrônicos (revisão de BINDER, 2009; WOCHNIK et al., 2005).

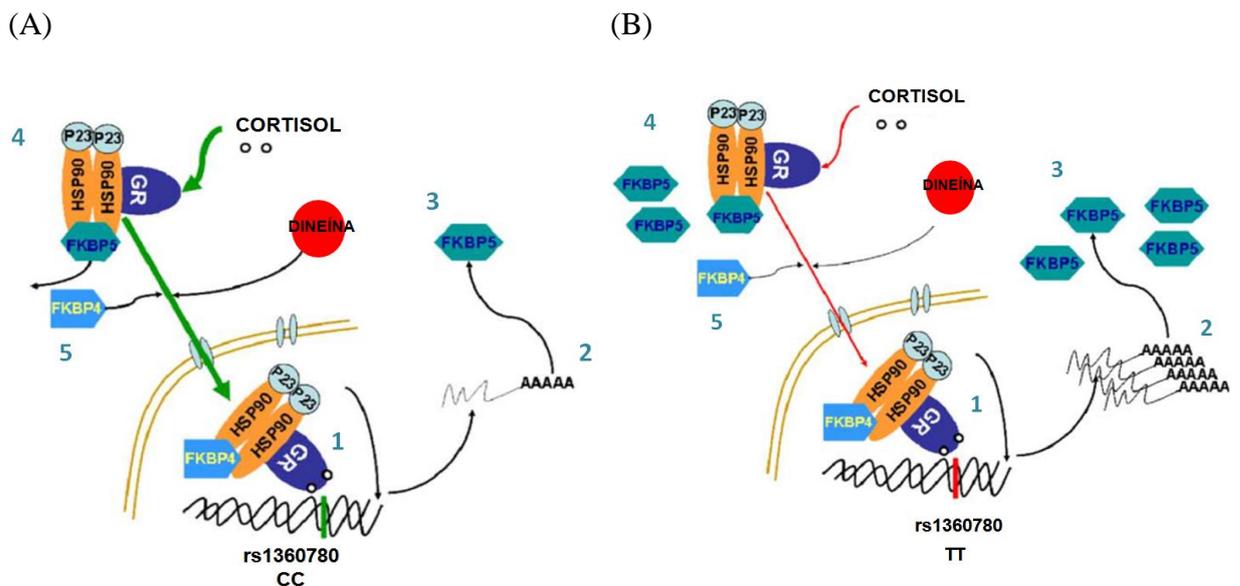


Figura 2. Esquema das possíveis diferenças moleculares, dependentes do polimorfismo do gene *FKBP5*, que levam à ativação de uma retroalimentação negativa “ultra-curta”, reguladora da sensibilidade do GR. O painel (A) representa o mecanismo molecular em um indivíduo homocigoto para alelos associados com baixa

transcrição do gene *FKBP5*, considerado protetor contra transtornos psiquiátricos associados ao estresse. O painel (B) representa o mecanismo em um indivíduo homocigoto para os alelos de risco do gene *FKBP5*. (1) O GR acessa o DNA e leva a menor (Painel A) ou a maior (Painel B) indução de RNAm de *FKBP5*, ou seja, (3) à formação da proteína FKBP5. Se a co-chaperona FKBP5 está presente depois da ativação do GR, o “complexo GR” liga-se mais à co-chaperona FKBP5 e não à FKBP4, disponibilizando mais receptores (4) em um estado com menor afinidade para o cortisol e diminuindo (5) o conteúdo de GR translocado para o núcleo. Adaptado da revisão de Binder (2009).

Seguindo o mesmo raciocínio, há evidências de que variantes no gene *CRHR1* (receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina) estão envolvidas com os MTI (DEYOUNG; CICHETTI; ROGOSCH, 2011; LAUCHT et al., 2013; TYRKA et al., 2009) e com o desenvolvimento de TA em modelos animais (ROGERS et al., 2013) e em humanos (KECK et al., 2008). Já os estudos com polimorfismos do gene que codifica MR (*NR3C2*, do inglês *nuclear receptor subfamily 3 group C member 2*) são mais escassos em estudos envolvendo MTI (ROVARIS et al., 2015; VINKERS et al., 2015) e em transtornos envolvidos com resposta ao estresse (ISING et al., 2008). Também, o gene que codifica GR (*NR3C1*, do inglês *nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*) é considerado um gene candidato em estudos com trauma emocional (ROVARIS et al., 2015) e TA (PANEK et al., 2014). E extremamente raro, mas interessante em estudos psiquiátricos, é a abordagem com as variantes do gene *SERPINA6* (do inglês *serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 6*) que codifica uma proteína alfa-globulina com propriedades de ligação a corticosteróides (HOLLIDAY et al., 2010).

1.6. Epigenética

O termo epigenética (“acima ou além da genética”) foi cunhado, nos anos 40, pelo biólogo inglês Conrad Hal Waddington para descrever os mecanismos de herança que transcendem o padrão genético. Baseando-se em seu experimento com embriões de moscas das frutas, Waddington sugeriu um modelo de diferenciação celular, durante o desenvolvimento embrionário, análogo a bolas rolando superfície abaixo em uma paisagem

com trajetórias estáveis e canalizadas (**Figura 3**). Para ele, o processo de desenvolvimento celular estaria envolvido com uma série de “decisões” representadas por “vales” e “bifurcações” (revisões de BAEDKE, 2013; BOYCE; KOBOR, 2015; NOBLE, 2015).

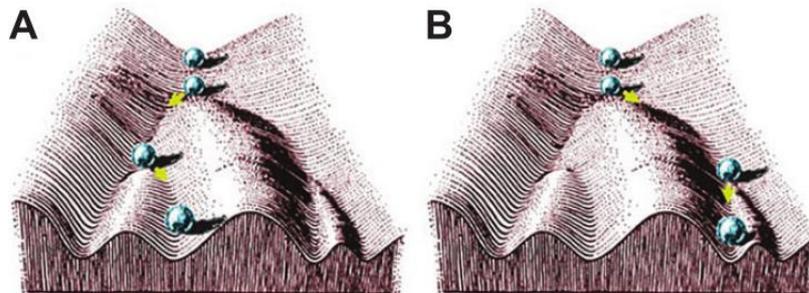


Figura 3. Diagrama da paisagem epigenética de Conrad Waddington. As posições subsequentes das bolas foram adicionadas ao diagrama original de Waddington para melhor ilustrar os pontos de desenvolvimento canalizados em diferentes rotas (A ou B). A plasticidade que permite que isso ocorra já existe na população selvagem dos organismos. Extraído da discussão de NOBLE (2015).

Paradoxalmente, os mesmos processos que garantem a estabilidade ontogenética, no período de diferenciação celular, são os que garantem a variação dinâmica da atividade transcricional dos genes em resposta às condições ambientais. Atualmente, o conceito sobre epigenética é ainda discutido, mas o consenso sugere a ampliação das possibilidades de um mesmo genótipo resultar em diferentes fenótipos dependendo da interferência ambiental. A epigenética, portanto, pode ser comparada à sinapse, sendo as conexões nervosas da sinapse correspondentes, em termos epigenéticos, às interações entre os genes e o ambiente (**Figura 4**). Há muitas evidências, sobretudo em modelos animais e na própria observação da natureza, do papel do ambiente nas mudanças transgeracionais de expressões genéticas em diversos organismos (revisões de BOYCE; KOBOR, 2015; JABLONKA; LAMB, 2002; KNIGHT, 2015).



Figura 4. Diagrama de efeitos epigenéticos. O diagrama mostra o quanto da paisagem epigenética do desenvolvimento celular relaciona-se, através de redes de interações no organismo, a genes individuais. A

combinação dessas influências pode conduzir a mudanças evolucionárias sem a presença de mutações. Adaptado da discussão de NOBLE (2015).

Os mecanismos epigenéticos independem das sequências nucleicas do genoma e interferem, devido às mudanças nas configurações da cromatina, na atividade ou na expressão do gene. As conformações da cromatina são controladas, físico-quimicamente, por "etiquetas" químicas (ou marcadores epigenéticos), tais como grupamentos metil, acetil, fosfato ou ubiquitina, tanto no DNA como nas proteínas histonas (**Figura 5**). Outro componente epigenético é o RNA não codificante (ncRNA), como os microRNAs e os longos ncRNAs, que regulam a tradução e a transcrição de genes, além de controlarem a estabilidade da cromatina (revisão de PROVENÇAL; BINDER, 2015). Em um estado eucromático (cromatina "frouxa"), o acesso físico de enzimas transcricionais ao cromossomo é facilitado e, como consequência, a expressão gênica é aumentada. Já no estado heterocromático (cromatina "condensada"), a expressão gênica é reduzida (revisões de BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; BOYCE; KOBOR, 2015; RAABE; SPENGLER, 2013).

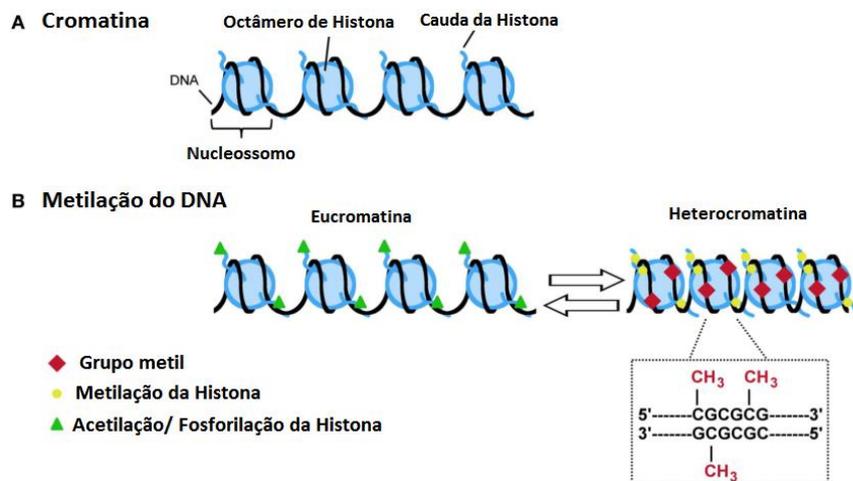


Figura 5. Ilustração (simplificada) para um dos mecanismos epigenéticos: a metilação do DNA. (A) Aproximadamente 147pb de DNA envolvem o nucleossomo que é constituído pelas histonas H2A, H2B, H3 e H4. Os terminais livres das histonas servem como substrato para modificações pós-traducionais (Ex.: acetilação, fosforilação e metilação) que influenciam a configuração da cromatina. Estados eucromáticos (“abertos”) permitem a transcrição, enquanto que os estados heterocromáticos (“fechados”) restringem a maquinaria transcricional. (B) Modificações específicas das histonas e metilação do DNA são mutuamente influenciadas umas pelas outras. O estado eucromático é caracterizado pela acetilação e fosforilação das histonas (triângulos verdes), enquanto que a metilação das histonas (círculos amarelos) é mais encontrada no estado heterocromático. Adaptado de RAABE; SPENGLER (2013).

1.7. Metilação do DNA

A metilação do DNA é um dos maiores mecanismos de regulação epigenética nos mamíferos. Esse mecanismo consiste na modificação covalente do DNA, onde grupamentos metil (CH_3) são acoplados ao carbono 5 do anel de pirimidina da citosina (C) quando essa está separada da guanina (G) pelo fosfato. As chamadas “ilhas CpG” (**Figura 6**) são caracterizadas pelo elevado conteúdo de C+G e de sítios CpG que podem estar ou não metilados (revisão de BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; LIU et al., 2010). A maioria dos sítios CpGs (em média 70-80%) é metilada, porém as ilhas CpGs são, em geral, hipometiladas e encontram-se, com frequência, na região promotora do gene (revisões de BIRD, 2002; ILLINGWORTH; BIRD, 2009). Há evidências de que regiões diferencialmente metiladas tecido-específicas encontram-se, preferencialmente, em regiões pobres em CpGs, ou seja, em regiões fora da ilha (revisão de REDDINGTON; PENNINGS; MEEHAN, 2013; SLIEKER et al., 2013).

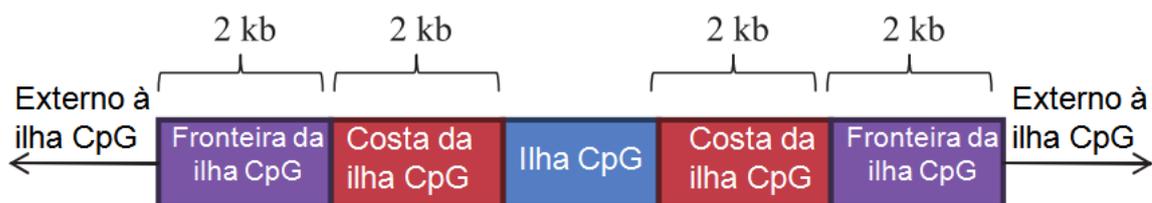


Figura 6. Ilustração de uma ilha CpG e suas fronteiras. As margens circundantes da ilha CpG são consideradas as costas da ilha (tradução livre do inglês *CGI shore*) e as regiões próximas a essas costas são as fronteiras da ilha (tradução livre do inglês *CGI shelf*). Adaptado de VAN DONGEN et al. (2014).

Durante o desenvolvimento celular normal, a metilação do DNA é dinamicamente regulada a fim de estabelecer as características de cada tipo celular, de maneira duradoura e transgeracional (revisões de KLOSE; BIRD, 2006; TOST, 2010), variando, substancialmente, entre os tecidos humanos (SCHULTZ et al., 2015; SLIEKER et al., 2013).

As modificações químicas, promovidas pela metilação do DNA, regulam a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA e interferem na atividade transcricional dos

loci genéticos, conferindo flexibilidade para adaptação às condições ambientais (revisões de ARCHER et al., 2010; BIRD, 2002; YEHUDA; BIERER, 2009). Quando as modificações epigenéticas são, principalmente, em regiões regulatórias (regiões promotoras, por exemplo), elas regulam o estado transcricional do gene: hipermetilação reprime a transcrição enquanto que o estado hipometilado pode levar ao aumento dos níveis de transcrição (revisões de LAIRD, 2003; ZHANG; MEANEY, 2010). Já a metilação no corpo do gene não é, necessariamente, associada com repressão transcricional e pode estar relacionada à regulação do processo de *splicing* (revisões de BOYCE; KOBOR, 2015; JONES, 2012). A repressão gênica, mediada pela metilação do DNA, é essencial, por exemplo, para o *imprinting* genômico e para a inativação do cromossomo X (revisão de REDDINGTON; PENNINGS; MEEHAN, 2013).

Para as inferências de expressão gênica, e na questão da variação entre gêmeos monozigóticos, a posição dos sítios CpGs no gene, bem como a sua localização em relação à ilha CpG devem ser considerados nos estudos (VAN DONGEN et al., 2014). A distância a partir do promotor do gene correlaciona-se com o aumento da variabilidade da metilação do DNA, sugerindo que as regiões promotoras são as mais conservadas do genoma, mas não são isentas de alteração epigenética (CHATTERJEE et al., 2015).

É importante destacar, também, que a metilação do DNA possui um comportamento dinâmico e é alterada com a idade (HEYN et al., 2012). Estudos com gêmeos (monozigóticos e dizigóticos) evidenciam diferenças epigenéticas interindividuais, já nos primeiros meses de vida, atribuídas às influências ambientais não compartilhadas e à variação estocástica (FRAGA et al., 2005; MARTINO et al., 2013; VAN DONGEN et al., 2014; WONG et al., 2010). Além das diferenças de herdabilidade epigenética, entre os gêmeos, os indivíduos mais velhos tendem a possuir maior variabilidade na metilação do DNA (FRAGA et al., 2005; TALENS et al., 2012).

1.8. Metilação do DNA, TA e Trauma emocional na infância

As experiências e as exposições ambientais, especialmente no início da vida ou no período pré-natal, podem resultar no deslocamento (adição ou remoção) de marcadores epigenéticos, regulando o neurodesenvolvimento subjacente ao aprendizado, à memória e a comportamentos de risco para transtornos mentais (revisões de BAGOT; MEANEY, 2010; FRANKLIN; MANSUY, 2010; PTAK; PETRONIS, 2010; ZHANG; MEANEY, 2010).

Os mecanismos epigenéticos podem ser modulados por diversos fatores ambientais como uso de drogas (ex.: cigarro, álcool e drogas de abuso em geral), dieta, obesidade, atividade física, poluição, trabalho noturno e estresse mental, podendo contribuir para o desencadeamento de transtornos psiquiátricos (revisões de ARCHER et al., 2013; KUBOTA; MIYAKE; HIRASAWA, 2012). Alguns aspectos importantes devem ser considerados nessa modulação, tais como: (1) tipo de agente interferente no desenvolvimento encefálico: químico, ativador do sistema imune ou notável pela ausência; (2) a fase do desenvolvimento encefálico em que o agente exerce o efeito: pré-natal, pós-natal, adolescência ou vida adulta; (3) a idade da expressão de anormalidades funcional-estruturais com domínios de comportamentos cotidianos, emocionais e cognitivos e (4) perfis farmacogenômico-farmacogenéticos particulares mediando respostas a terapias medicamentosas (revisão de ARCHER et al., 2013).

Estudos (**Tabela 3 e Tabela 4**) envolvendo diferentes tecidos (Ex.: periférico ou nervoso) e métodos (Ex.: *beadchips*, pirosequenciamento, método de Sanger, espectroscopia de massa, hibridização em microarranjos, entre outros) sugerem diferenças nos padrões de metilação do DNA entre indivíduos com e sem diagnóstico psiquiátrico. Essas diferenças são encontradas tanto em genes candidatos (Ex.: *SLC6A4*, *MAOA*, *NR3C1*) quanto na média

global de metilação do DNA, sendo importante considerarmos a presença ou não de trauma emocional e eventos no início da vida nessa comparação (revisão de KLENGEL et al., 2014).

A exposição ao estresse precoce (EEP), tanto no período intra-uterino quanto após o nascimento, pode envolver mecanismos epigenéticos distintos, comprometendo a resposta ao estresse. Os efeitos da EEP podem perdurar através das gerações (revisão de PROVENÇAL; BINDER, 2015). Estudos com animais evidenciam a transmissão epigenética, ao longo das gerações, do impacto da separação materna, no início da vida, no comportamento depressivo e na resposta ao estímulo ambiental aversivo quando adulto (FRANKLIN et al., 2010).

Tabela 3. Diferenças nos padrões de metilação do DNA nos Transtornos de Ansiedade (TA) com ou sem a presença de trauma emocional

TA ou sintomas de ansiedade	Trauma ou eventos estressores	Genes analisados	Material biológico	Método	Resultados referentes à metilação do DNA
Estudos em humanos					
Transtorno do Pânico (TP) (ESLER et al., 2006)	Não avaliado	<i>NET</i>	Sangue periférico	PCR de metilação específica baseada na conversão com bissulfito (MSP) e sequenciamento	Evidência de hipermetilação do DNA, na região promotora do gene <i>NET</i> , em 9 pacientes (dos 24) com TP, mas não nos controles. O silenciamento do gene, nesse caso, foi observado pelo método da imunoprecipitação de cromatina que demonstrou ligação do Fator de transcrição inibitório <i>methyl CpG binding protein 2</i> (MeCP2) na região promotora do gene. As mutações analisadas, nos indivíduos com TP, não foram associadas com alterações de função no gene <i>NET</i> .
Transtorno do Pânico (TP) (ESLER et al., 2008)	Não avaliado	<i>NET</i>	Sangue periférico	MSP e sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Os pacientes, com TP e/ou hipertensão, apresentaram reduzida recaptção de noradrenalina, sugerindo que a metilação do DNA no gene <i>NET</i> favoreceu o silenciamento do gene. O MeCP2 encontrou-se enriquecido na região promotora do gene <i>NET</i> , o que reforça essa hipótese.
Transtorno do Pânico (TP) (DOMSCHKE et al., 2012)	Avaliação de eventos positivos, neutros e negativos na vida	<i>MAOA</i>	Sangue periférico	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Evidência de hipometilação do gene <i>MAOA</i> em mulheres diagnosticadas com TP em relação aos controles para TP. Nas mulheres, os eventos negativos na vida foram associados com hipometilação, enquanto que os positivos foram associados com aumento na metilação do DNA. Os homens, diagnosticados com TP, não apresentaram nenhuma alteração significativa quando comparados aos indivíduos controles.
Sintomas de ansiedade (TYRKA et al., 2012)	Adversidade na infância (maus-tratos, negligência e ausência	<i>NR3C1</i>	Sangue periférico	Pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Os sintomas de ansiedade e depressão não foram associados com metilação nos sítios CpGs avaliados. Os indivíduos adultos, com histórico de adversidade na infância, apresentaram aumento na metilação do DNA no gene <i>NR3C1</i> . A metilação do DNA foi

	parental)				associada com respostas atenuadas ao cortisol.
Transtorno do Pânico (TP) (BAYLES et al., 2013)	Não avaliado	<i>NET</i>	Sangue periférico	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Não houve diferenças entre os padrões de metilação do DNA no gene <i>NET</i> entre controles e pacientes (adultos) com TP ou Transtorno Depressivo maior. Nenhuma mudança significativa na metilação, na região promotora do gene, foi observada em resposta ao tratamento com antidepressivo.
Transtorno do Pânico (TP) (DOMSCHKE et al., 2013)	Avaliação de eventos positivos, neutros e negativos na vida	<i>GAD1</i> e <i>GAD2</i>	Sangue periférico	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Os pacientes com TP apresentaram hipometilação do DNA no gene <i>GAD1</i> , mas não apresentaram diferenças no <i>GAD2</i> , quando comparados aos controles. A ocorrência de eventos negativos na vida foi correlacionada com hipometilação do DNA no <i>GAD1</i> (na amostra de mulheres, principalmente). O polimorfismo rs3762555 do <i>GAD1</i> contribuiu para a hipometilação em 2 sítios CpGs do gene.
Transtornos de Ansiedade (TA) (PROVENÇAL et al., 2013)	Agressão física na infância e adolescência (entre 6 e 15 anos)	<i>IL-1a, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-8, NFkB1, NFAT5 e STAT6</i>	Sangue periférico	Combinação dos métodos de imunoprecipitação de DNA metilado (MeDIP) e <i>arrays</i> de oligonucleotídeos de alta densidade; validação por pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Os TA não diferiram entre os homens com agressividade física crônica (AFC) na infância e os seus controles para AFC. Contudo, comportamentos de hiperatividade e transtorno opositor desafiante foram diferentes entre os grupos. A AFC, no período da infância e adolescência, foi associada a 48 regiões, do DNA, diferencialmente metiladas. Essas regiões não estavam, necessariamente, nos promotores dos genes.
Transtornos de Ansiedade (TA) (CHAGNON et al., 2015)	Não avaliado	<i>BDNF, OXTR, SLC6A4 e APOE</i>	Saliva	Pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito): <i>BDNF, OXTR e SLC6A4</i> <i>Beadchip</i> da Illumina (não especificado): <i>APOE</i>	As participantes (mulheres com 65 anos ou mais), com TA ou depressão, não diferiram do grupo controle quando considerada a metilação do DNA nos genes <i>SLC6A4</i> e <i>APOE</i> . Contudo, evidenciou-se hipermetilação do DNA no gene <i>BDNF</i> em comparação às controles. Essa diferença foi mais pronunciada nas portadoras do alelo Met para o SNP rs6265 (Val66Met) em comparação às homozigotas do alelo Val. Também, foi evidenciado hipermetilação no gene <i>OXTR</i> , na amostra com TA ou depressão, mas somente nas mulheres que possuíam o genótipo AA do SNP rs53576 desse gene.

Estado e traço de ansiedade materna pré-natal	Não avaliado	Genoma total	Sangue de cordão umbilical	<i>Infinium HumanMethylation450 BeadChip</i>	O genótipo do <i>BDNF</i> , nos recém-nascidos (mas não nas mães), afetou a associação da ansiedade materna pré-natal com o metiloma do DNA. Os recém-nascidos com o genótipo MetMet apresentaram maior número de sítios CpGs associados com o traço e estado de ansiedade materna pré-natal. O volume da amígdala direita dos bebês mostrou maior covariância de metilação nos indivíduos MetMet. Já nos indivíduos ValVal, o volume do hipocampo esquerdo apresentou maior covariância de metilação do DNA quando comparado com os outros genótipos.
Sintomas e transtornos de ansiedade (TA)	Não avaliado	<i>NR3C1</i>	Saliva e sangue periférico	Espectrometria de massa quantitativa	O aumento da metilação em determinados sítios CpGs do exon 1F do gene <i>NR3C1</i> , em crianças e adolescentes, foi associado à gravidade de sintomas internalizantes (ansiedade e depressão) e ao aumento de liberação de cortisol pela manhã. Os sintomas externalizantes não foram associados aos níveis de metilação do DNA.
Sintomas de ansiedade	Não avaliado	<i>DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, EZH2 e IL-6</i>	Sangue periférico	Captura e detecção de anticorpos para citosinas metiladas (quantificadas colorimetricamente)	Os adultos com sintomas de ansiedade apresentaram maiores níveis de metilação global do DNA. A média dos níveis de RNAm dos genes avaliados não diferiu entre os indivíduos com ansiedade e seus controles. Contudo, os níveis de RNAm dos genes <i>DNMT1/3A, EZH2 e IL-6</i> aumentaram com o aumento do escore de gravidade da ansiedade. A expressão do gene <i>IL-6</i> foi fortemente correlacionada com a expressão dos genes <i>DNMT1/3A/3B e EZH2</i> .
Transtorno de Ansiedade Social (TASocial)	Não avaliado	<i>OXTR</i>	Sangue periférico	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	O fenótipo categórico do TASocial (em pacientes adultos) foi associado à hipometilação do DNA no gene <i>OXTR</i> , a aumentos dos escores em escalas de ansiedade, aumento de cortisol salivar em resposta ao <i>Trier Social Stress Test</i> e da responsividade da amígdala durante o processamento da palavra.

Estudos em animais

<p>Temperamento ansioso (ALISCH et al., 2014)</p>	Não avaliado	Genoma total	Encéfalos de macacos <i>rhesus</i>	Sequenciamento de nova geração (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	<p>O temperamento ansioso foi associado a 5489 sítios CpGs (em 1363 genes). Desses sítios, 4766 (87%) foram negativamente correlacionados com o fenótipo ansioso (ex.: níveis de metilação decaindo com o aumento da gravidade do temperamento ansioso) contra 723 sítios (13%) positivamente correlacionados. Os autores sugerem que, em geral, sítios CpGs hipermetilados, no núcleo central da amígdala dos animais, são mais suscetíveis a mudanças em relação à ansiedade. Uma significativa correlação entre transcriptoma e metiloma do DNA, associado ao temperamento ansioso, foi encontrada em 22 genes.</p>
<p>Comportamento relacionado à ansiedade (SOTNIKOV et al., 2014)</p>	Estresse crônico moderado	<i>CRHR1</i>	Encéfalo de camundongos	Pirosequenciamento	<p>O estudo envolveu 4 grupos: camundongos com ansiedade alta (expostos ou não a um ambiente enriquecido) e camundongos com ansiedade baixa (submetidos ou não ao estresse moderado crônico (EMC)). Como esperado, o ambiente enriquecido teve um efeito ansiolítico nos animais muito ansiosos, diminuiu a liberação de corticosterona, reduziu a expressão de <i>CRHR1</i> na amígdala basolateral e aumentou os níveis de metilação na região promotora do gene <i>CRHR1</i>. O EMC teve um efeito oposto nos animais com ansiedade baixa nos aspectos avaliados acima.</p>

Abreviações dos genes: *NET*, Transportador de Noradrenalina; *MAOA*, subtipo A da enzima monoamina oxidase, do inglês *Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1* (receptor de glicocorticóide); *GAD1* e *GAD2*, Glutamato descarboxilases; *IL-1a*, *IL-6*, *IL-4*, *IL-10* e *IL-8*, genes que codificam as interleucinas; *NFkB1*, *NFAT5* e *STAT6*, genes que codificam os três fatores de transcrição; *BDNF*, Fator neurotrófico derivado do encéfalo; *OXTR*, Receptor de Ocitocina; *SLC6A*, Transportador de serotonina; *APOE*, Apolipoproteína E; *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3*, genes que codificam DNA metiltransferases; *EZH2*, do inglês *Enhancer of Zeste Homolog 2*; *CRHR1*, Receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina.

Tabela 4. Diferenças nos padrões de metilação do DNA, envolvendo trauma emocional ou eventos estressores, SEM considerar os Transtornos de Ansiedade como prioritários

Transtornos ou sintomas Psiquiátricos	Trauma ou eventos estressores	Genes analisados	Material biológico	Método	Resultados referentes à metilação do DNA
Estudos em humanos					
Não avaliado (OBERLANDER et al., 2008)	Exposição pré-natal a sintomas de ansiedade e depressão materna	<i>NR3C1</i>	Sangue do cordão umbilical	Pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	A exposição pré-natal aos sintomas de depressão e/ou ansiedade maternos, no 3º trimestre de gravidez, foi associada com o aumento da metilação do DNA, no filho recém-nascido, em determinado sítio do gene <i>NR3C1</i> . A hipermetilação também foi associada com o aumento de cortisol salivar em resposta ao estresse, aos 3 meses, controlando para a exposição à antidepressivo inibidor seletivo de recaptção de serotonina (ISRS) usado pela mãe, idade pós-natal e sintomas de humor da mãe nos períodos pré e pós-natal. A metilação materna não foi associada com o humor da gestante e nem com o <i>status</i> de metilação do filho.
Suicidas com transtornos psiquiátricos não especificados (MCGOWAN et al., 2009)	Histórico de abuso na infância	<i>NR3C1</i>	Hipocampo	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	As vítimas de suicídio, com histórico de maus-tratos na infância, apresentaram metilação aumentada no exon 1F do <i>NR3C1</i> em comparação às vítimas sem abuso na infância ou controles (morte súbita, acidental e sem histórico de abuso na infância).
Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) (UDDIN et al., 2010)	Eventos traumáticos na vida	Genoma total	Sangue periférico	<i>Infinium HumanMethylation27 BeadChip</i> e validação por pirosequenciamento	Os indivíduos com e sem TEPT diferiram no número de genes unicamente não-metilados. Uma assinatura epigenética (desmetilação), envolvida com a ativação do sistema imunológico, foi encontrada nos indivíduos com TEPT. Desses, os que possuíam TAG e/ou depressão maior comórbidos diferiram na metilação em, apenas, 3 genes daqueles que não apresentavam comorbidades (diferença não significativa).

<p>Sintomas de depressão</p> <p>(VAN IJZENDOORN et al., 2010)</p>	<p>Experiências de perdas ou eventos traumáticos</p>	<p><i>SLC6A4</i></p>	<p>Sangue periférico</p>	<p>Espectrometria de massa quantitativa (pós- tratamento do DNA com bissulfito)</p>	<p>Os sintomas de depressão não foram associados com níveis de metilação do gene. Já, os maiores níveis de metilação, em uma ilha CpG do gene <i>SLC6A4</i>, foram associados com o risco aumentado de respostas não adaptativas para perdas ou outros traumas emocionais nos indivíduos com genótipo "LL" para o polimorfismo da região promotora do gene do transportador de serotonina (5-HTTLPR). O genótipo "SS" sugeriu mais experiências de perdas ou trauma “não resolvidos”, mas somente nos casos de baixos níveis de metilação. Na mesma linha, os maiores níveis de metilação naqueles com genótipo "SS" foram associados com diminuição de perda ou trauma “não resolvido”.</p>
<p>TEPT</p> <p>(KOENEN et al., 2011)</p>	<p>Exposição a eventos traumáticos</p>	<p><i>SLC6A4</i></p>	<p>Sangue periférico</p>	<p><i>Infinium HumanMethylation27 BeadChip</i> e validação por pirosequenciamento</p>	<p>Não houve associação entre o genótipo ou metilação do gene <i>SLC6A4</i> e o TEPT. O número de eventos traumáticos foi associado com o risco para TEPT, mas somente para os adultos que apresentaram baixos níveis de metilação do <i>SLC6A4</i>. Já os indivíduos com os maiores níveis de metilação para o <i>SLC6A4</i>, e com mais eventos traumáticos, apresentaram um efeito protetor para o TEPT.</p>
<p>Transtorno de Personalidade Borderline (TPB); depressão (TEPT como comorbidade)</p> <p>(PERROUD et al., 2011)</p>	<p>Histórico de maus tratos na infância</p>	<p><i>NR3C1</i></p>	<p>Sangue periférico</p>	<p>Pirosequenciamento (pós- tratamento do DNA com bissulfito)</p>	<p>Os sujeitos com TPB apresentaram associação entre o abuso sexual na infância, negligência física e hipermetilação no exon 1F do gene <i>NR3C1</i>. A gravidade do abuso sexual contribuiu para o aumento da metilação do DNA. Já o abuso e/ou negligência emocional, bem como o abuso físico, não foram associados ao <i>status</i> de metilação nesses pacientes. De interesse, os pacientes com TPB sem abuso sexual e/ou sem maus-tratos na infância apresentaram maior metilação do gene <i>NR3C1</i> quando comparados aos sujeitos com depressão com relatos de abuso ou negligência infantil.</p>
<p>Não avaliado</p> <p>(NAUMOVA et al., 2012)</p>	<p>Privação de cuidados maternos e paternos e vida em orfanato</p>	<p>Genoma total</p>	<p>Sangue periférico</p>	<p><i>Infinium HumanMethylation27 BeadChip</i></p>	<p>Entre o grupo de crianças institucionalizadas (vivendo em orfanato) e o de crianças vivendo com os pais biológicos foram encontrados 914 sítios CpG diferentemente metilados (em 848 genes). Em crianças institucionalizadas, a maior parte dos sítios</p>

	desde o nascimento				apresentou hipermetilação do DNA em genes relacionados ao controle de sistemas de sinalização celular e de resposta imune.
Não avaliado (TYRKA et al., 2013)	Exposição ao estresse na infância (relatado pelos pais)	Genoma total	Saliva	<i>Infinium HumanMethylation27 BeadChip</i>	Durante a infância, tanto o estresse materno quanto o paterno influenciaram na metilação das meninas (aumentando e diminuindo a metilação, respectivamente). Nos meninos, o estresse materno aumenta a metilação do DNA. No período pré-escolar, o estresse do pai exerce efeito na metilação das meninas, com alguns sítios CpGs sendo mais ou menos metilados.
TEPT e depressão (avaliados, mas não considerados nas análises) (KLENGEL et al., 2013)	Trauma na infância (abuso sexual e físico)	<i>FKBP5</i>	Sangue periférico	Pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Os indivíduos expostos ao abuso infantil, e portadores do alelo de risco para o SNP rs1360780, apresentaram uma diminuição média de 12,3% na metilação do DNA em 3 sítios CpGs do gene <i>FKBP5</i> quando comparados a outros grupos. A metilação do DNA parece estar restrita à experiência de trauma na infância e não foi influenciada por experiências traumáticas na vida adulta, sugerindo um período sensível no desenvolvimento precoce para esses efeitos epigenéticos.
Não avaliado (YANG et al., 2013)	Histórico de maus-tratos na infância	Genoma total	Saliva	<i>Infinium HumanMethylation450Bead Chip</i>	O estudo mostrou diferenças em 2868 sítios CpGs (média de 17% de metilação do DNA) entre crianças que sofreram maus-tratos e seus controles. Um padrão consistente emergiu sugerindo que crianças com histórico de maus-tratos, geralmente, possuem níveis elevados de metilação nos sítios com baixa e média metilação, além de metilação reduzida nos sítios com valores elevados de metilação em relação aos controles.
Não avaliado (NON et al., 2014)	Exposição pré-natal a sintomas de depressão e ansiedade materna ou a ISRS usados pela mãe na	Genoma total	Sangue de cordão umbilical	<i>Infinium HumanMethylation450 BeadChip</i> e validação por pirosequenciamento	Entre os neonatos expostos a sintomas maternos não medicados de depressão e ansiedade e os seus controles foram identificadas diferenças nos níveis de metilação do DNA em 42 sítios CpGs. Nenhuma diferença, após ajustes para múltiplas comparações, foi encontrada entre neonatos expostos a ISRS e seus controles. Em neonatos expostos a

	gravidez				sintomas não medicados de depressão materna ou a ISRS, a vasta maioria dos sítios CpGs apresentou menor metilação do DNA em relação aos controles, mas as diferenças foram muito pequenas.
TEPT (YEHUDA et al., 2014)	Exposição ao trauma da guerra	<i>NR3C1</i>	Sangue periférico	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Os veteranos de Guerra com TEPT apresentaram menor metilação no exon 1F do gene <i>NR3C1</i> quando comparados aos veteranos sem TEPT. A metilação também foi associada com 3 medidas funcionais da atividade de glicocorticóide: inibição da lisozima no teste de supressão de lisozima, declínio de cortisol plasmático no teste de supressão à dexametasona e excreção de cortisol na urina de 24h. Por fim, a metilação do <i>NR3C1</i> foi inversamente correlacionada com marcadores clínicos e sintomas associados ao TEPT.
Indivíduos saudáveis (DUMAN; CANLI, 2015)	Experiências precoces e recentes de estresse	<i>SLC6A4</i>	Sangue periférico	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Não foi encontrada correlação entre a metilação do <i>SL6A4</i> e a liberação de cortisol, em resposta ao estresse, em qualquer genótipo do polimorfismo 5-HTTLR. Os indivíduos com o genótipo LL, em comparação aos carreadores do alelo S (“grupo S”), apresentaram aumento dos níveis de RNAm de <i>SLC6A4</i> e mostraram aumento global da metilação como uma resposta ao estresse precoce na vida e estresse crônico. O grupo S mostrou reduzidos níveis de RNAm de <i>SL6A4</i> e aumento de metilação em resposta aos estresses precoce e crônico, bem como a recentes sintomas depressivos, que se correlacionaram positivamente com a expressão de <i>NR3C1</i> também avaliado.
Não avaliado (TYRKA et al., 2015)	Histórico de maus-tratos na infância	<i>FKBP5</i>	Saliva	Pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	As crianças em idade pré-escolar estudadas, com histórico de maus-tratos, apresentaram níveis mais baixos de metilação em dois sítios CpG de regiões regulatórias do gene <i>FKBP5</i> .

Estudos em animais

Não avaliado	Separação materna	<i>MeCP2</i> , 5-	Esperma de camundongos	Pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com	Os animais submetidos ao estresse precoce apresentaram, na linhagem germinativa,
---------------------	-------------------	-------------------	------------------------	---	--

(FRANKLIN et al., 2010)	combinada com estresse imprevisível	<i>HTIA</i> , <i>MAOA</i> , <i>CBI</i> e <i>CRFR2</i>		bissulfito): esperma qRT Real Time PCR: córtex	hipermetilação do DNA nos genes <i>MeCP2</i> e <i>CBI</i> e hipometilação no gene <i>CRFR2</i> . A metilação do DNA não foi alterada nos genes <i>MAOA</i> e <i>5-HTIA</i> . O estresse pós-natal, em camundongos, induziu o comportamento depressivo (avaliado por teste de nado forçado, consumo de sucrose e suspensão da cauda) nas demais gerações.
Não avaliado (VAN DER DOELEN et al., 2015)	Separação materna repetida e prolongada quando filhotes e, na vida adulta, choques nas patas	<i>CRF</i>	Encéfalo de ratos	Pirosequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito)	Os animais com o genótipo de menor expressão do 5-HTT, e que não sofreram estresse na vida, apresentaram maior nível de metilação do gene <i>CRF</i> , no núcleo central da amígdala (CeA), em relação aos animais de outros genótipos. Já os animais com o genótipo intermediário do 5-HTT, e que sofreram estresse na vida adulta, apresentaram maior nível de metilação em relação aos demais genótipos. Essa diferença no genótipo do 5-HTT foi perdida quando a presença de estresse na vida precoce foi considerada.
Não avaliado (BEERY et al., 2016)	Variação materna, na primeira semana de vida, nas lambidas e cuidados com os filhotes	<i>OXTR</i>	Sangue e encéfalo de ratos	Sequenciamento (pós-tratamento do DNA com bissulfito) e validação com pirosequenciamento	Filhotes machos com baixo “ <i>licking-grooming</i> ” em relação àqueles que receberam mais cuidados das mães mostraram menor metilação do DNA, no sangue, no gene <i>OXTR</i> . Nenhuma diferença, em relação à metilação, foi encontrada no encéfalo (hipotálamo, estriado e hipocampo) dos ratos.

Abreviações: *ISRS*, inibidor seletivo de recaptção de serotonina; *NR3C1*, do inglês *Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1* (receptor de glicocorticóide); *SLC6A4*, Transportador de serotonina; *FKBP5*, do inglês *FK506 binding protein 5*; *MeCP2*, do inglês *methyl CpG binding protein 2* (Fator de transcrição inibitório); *5-HTIA*, receptor 1A de serotonina; *MAOA*, enzima monoamino oxidase A; *CBI*, receptor 1 de canabinoide; *CRFR2*, receptor 2 do fator de liberação de corticotropina; *OXTR*, Receptor de Ocitocina; *CRF*, Hormônio liberador de Corticotrofina.

2. JUSTIFICATIVA

Os transtornos de ansiedade são síndromes complexas ainda não conhecidas por completo. Existem interações entre os genes e o ambiente (G x A), envolvidas nesses transtornos, que conferem uma complexidade digna de investigações aprofundadas, tanto do ponto de vista genético quanto do epigenético. A psiquiatria molecular vem avançando no delineamento de estudos que contribuem para o entendimento da etiologia desses transtornos psiquiátricos. Assim, os estudos de associação com genes candidatos, bem como estudos de interação G x A, considerando o trauma emocional sendo capaz de contribuir para o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento dos transtornos de ansiedade, interessam nessa tese.

Em termos epigenéticos, a abordagem envolvendo a metilação do DNA, explorando o genoma total, pode direcionar futuras pesquisas em sítios genéticos específicos. A busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos transtornos de ansiedade poderá possibilitar que medidas preventivas e de intervenção precoce sejam dirigidas a subgrupos com maior risco para o desenvolvimento desses transtornos psiquiátricos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar, em adolescentes, a neurobiologia dos TA do ponto de vista genético e epigenético.

3.2. Objetivos Específicos

➤ **Artigo 1:** Investigar, em uma amostra comunitária de adolescentes, a associação entre os polimorfismos genéticos funcionais do eixo HHA e o diagnóstico de TA.

➤ **Artigo 2:** Estudar a interação entre o trauma emocional e o polimorfismo do gene do receptor de mineralocorticóide (*NR3C2*) nos níveis séricos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).

➤ **Artigo 3:** Explorar a metilação do DNA, no genoma total, utilizando uma abordagem transversal e longitudinal, a fim de buscar correlações epigenéticas com o desenvolvimento dos TA e sua trajetória.

4. HIPÓTESES

Nossas hipóteses, referentes a cada artigo, são as seguintes:

➤ **Artigo 1:**

▪ Os adolescentes com TA serão carreadores dos alelos que interferem na funcionalidade do eixo HHA.

➤ **Artigo 2:**

▪ O trauma emocional, interagindo com genótipos de risco do eixo HHA, estará associado ao desenvolvimento de TA nos adolescentes.

➤ **Artigo 3:**

▪ Haverá um padrão diferente de metilação do DNA, em diferentes vias biológicas, entre adolescentes com e sem TA.

▪ A trajetória dos TA, nos adolescentes ansiosos (casos incidentes e remitentes), influenciará o padrão de metilação do DNA, em diferentes vias biológicas, e a sua direção (ex. hipometilação em casos incidentes e hipermetilação em remitentes).

▪ Haverá um padrão diferente de metilação do DNA, dependente da idade, em diferentes vias biológicas.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em seus aspectos éticos e metodológicos. O projeto aprovado é identificado pelo número 12.0254.

6. ARTIGOS

A produção científica, durante o período de doutorado, está exposta e dividida da seguinte forma:

Artigo 1: publicado na revista *Trends in Psychiatry and Psychotherapy* doi: 10.1590/2237-6089-2015-0035. (2015) 37 (4): 232-7.

Artigo 2: publicado na revista *Journal Psychiatric Research* (fator de impacto 3.957) doi: 10.1016/j.jpsychires. (2014) 59: 8-13

Artigo 3: a ser submetido à revista *Clinical Epigenetics* (fator de impacto 4.543)

6.1. ARTIGO 1

Artigo publicado na revista *Trends in Psychiatry and Psychotherapy* (acesso livre)
doi: 10.1590/2237-6089-2015-0035. (2015) 37(4): 232-7.

What can HPA axis-linked genes tell us about anxiety disorders in adolescents?

O que os genes associados ao eixo HPA podem nos dizer sobre os transtornos de ansiedade em adolescentes?

Andressa Bortoluzzi,¹ Carolina Blaya,² Eduarda Dias da Rosa,³ Mariana Paim,² Virgínia
Rosa,² Sandra Leistner-Segal,⁴ Gisele Gus Manfro¹

¹ Graduate Program in Neurociences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN Laboratory), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

² Hospital Materno-infantil Presidente Vargas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

³ BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴ Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

6.2. ARTIGO 2

Artigo publicado na revista *Journal Psychiatric Research* (fator de impacto 3.957)
doi: 10.1016/j.jpsychires. (2014) 59: 8-13

Mineralocorticoid receptor genotype moderates the association between physical neglect and serum BDNF

Andressa Bortoluzzi^{a,b,g}, Giovanni Abrahão Salum^{a,c,j}, Carolina Blaya^{a,d}, Patrícia Pelufo Silveira^{b,i}, Rodrigo Grassi-Oliveira^k, Eduarda Dias da Rosa^{a,g}, Bianca Wollenhaupt de Aguiar^f, Laura Stertz^f, Vera Lúcia Bosa^e, Ilaine Schuch^e, Marcelo Goldani^e, Flavio Kapczinski^{c,f}, Sandra Leistner-Segal^h, Gisele Gus Manfro^{a,b,c,g,j,*}

^a Anxiety Disorders Outpatient Program for Children and Adolescents, PROTAIA, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS/Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brazil

^b Post Graduate Program in Neuroscience, Institute of Basic Sciences/Health, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^c Post Graduate Program in Medical Sciences: Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^d Health Sciences Federal University of Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brazil e Center for Child and Adolescent Health Studies (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil

^e Center for Child and Adolescent Health Studies (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil

^f National Institute of Science and Technology Translational Medicine (INCT/CNPq), Porto Alegre, Brazil

^g Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences, BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brazil

^h Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brazil

ⁱ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^j National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents (INPD/ CNPq), Brazil

^k Developmental Cognitive Neuroscience Research Group, Post-Graduate Program in Psychology e Human Cognition, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, PUCR-RS, Porto Alegre, Brazil

* Corresponding Author at:

Hospital de clínicas de Porto alegre (HCPA), Ramiro Barcelos, 2350 e Room 2202, Porto Alegre, RS, 90035 003, Brazil. Tel./fax: + 55 51 3359 8094.

E-mail: andresbt10@yahoo.com.br; gmanfro@gmail.com

6.3. ARTIGO 3

Artigo a ser submetido à revista *Clinical Epigenetics* (fator de impacto 4.543).

DNA methylation signatures in adolescents with anxiety disorder: a 5 year longitudinal study

Andressa Bortoluzzi^{1,2,4} ; Giovanni Abrahão Salum^{1,3} ; Eduarda Dias da Rosa⁴ ; Vinícius de Saraiva Chagas⁵ ; Lidia Maria Rebolho Batista Arantes⁶ ; Edenir Inez Palmero⁶ ; Mauro Antônio Alves Castro⁵ and Gisele Gus Manfro^{1,2,3,4*}

¹ Anxiety Disorders Outpatient Program for Children and Adolescents, PROTAIA, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS/Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brazil

² Post Graduate Program in Neuroscience, Institute of Basic Sciences/Health, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

³ Post Graduate Program in Medical Sciences: Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

⁴ Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences, BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brazil

⁵ Post Graduate Program in Bioinformatics, Federal University of Paraná, UFPR, Curitiba, Brazil.

⁶ Fundação Pio XII - Hospital do Câncer de Barretos

* Corresponding Author at:

Hospital de clínicas de Porto alegre (HCPA), Ramiro Barcelos, 2350-Brain Laboratory
Porto Alegre, RS, Brazil – 90035 003

Phone/Fax: (+55 51) 3359 7971

E-mail: gmanfro@gmail.com; andresbt10@yahoo.com.br

7. DISCUSSÃO

A psiquiatria molecular está podendo, cada vez mais, contribuir para a compreensão da etiologia dos transtornos mentais, visto que busca conciliar recursos modernos de biotecnologia molecular com resultados obtidos do aperfeiçoamento de escalas diagnósticas, neuroimagem funcional, psicoterapias, psicofármacos, entre outros. Contudo, a compreensão de mecanismos biológicos subjacentes ao desenvolvimento dos TA continua desafiadora, já que envolve desfechos atípicos e múltiplos processos biológicos disfuncionais.

A literatura já evidencia o papel do estresse no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos tanto em modelo animal (BRYDGES et al., 2014; revisão de CHOCYK et al., 2013) quanto em humanos (revisão de NOLTE et al., 2011). Nesse contexto, o eixo HHA é considerado um protagonista, visto que alterações no seu funcionamento desencadeiam uma cascata de consequências na resposta adaptativa ao estresse (revisão de MAH; SZABUNIEWICZ; FIOCCO, 2016).

Em se tratando de transtornos complexos, como os TA, os estudos de associação entre polimorfismos de genes candidatos e o diagnóstico psiquiátricos são arriscados porque exigem um tamanho amostral considerável para que possam ter poder estatístico. Além do mais, os TA são comórbidos (FLORES et al., 2014) e possuem vários endofenótipos (revisão de GOTTESMAN; GOULD, 2003) envolvidos com rotas biológicas diferenciadas. Mesmo assim, a ousadia em trabalhar com grupos de genes que possuem uma plausibilidade biológica, ou seja, genes candidatos, ainda é uma estratégia bem-vinda.

Os polimorfismos genéticos (SNPs dos genes *FKBP5*, *CRHR1*, *NR3C1*, *NR3C2* e *SERPINA6*) foram selecionados, no presente trabalho, com base na sua importância funcional para o eixo HHA. A escassez de evidências sobre o envolvimento desses polimorfismos nos TA, na ocasião da seleção, foi uma grande motivação para o experimento, porém nos trouxe o

desafio de interpretação dos resultados. A exposição ao estresse, em um período crítico do desenvolvimento, como a adolescência, pode comprometer a trajetória de maturação neural e favorecer o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (revisão de EILAND; ROMEO, 2013). Um recente estudo sugere que o escore poligênico, associado com o eixo HHA, é um forte preditor das respostas da amígdala e do hipocampo entre indivíduos púberes *versus* pré-púberes. As variantes genéticas (SNPs dos genes *CRHR1*, *NR3C2*, *NR3C1* e *FKBP5*) foram capazes de prever positivamente as respostas para faces de medo entre meninas púberes e as respostas a faces neutras entre meninos púberes (PAGLIACCIO et al., 2015).

Os cinco SNPs do gene *FKBP5* (rs3800373, rs9296158, rs1360780, rs9470080 e rs4713916), escolhidos nessa tese, já foram investigados em estudos com trauma emocional infantil (BUCHMANN et al., 2014), depressão (SZCZEPANKIEWICZ et al., 2014), TEPT (BINDER et al., 2008), transtorno bipolar (WILLOUR et al., 2009), suicídio (BRENT et al., 2010) e transtorno de personalidade borderline (MARTÍN-BLANCO et al., 2015). Os alelos que são considerados de risco para os transtornos vulneráveis ao estresse são os associados à transcrição aumentada da co-chaperona FKBP5. Como visto na introdução, o aumento da co-chaperona FKBP5 confere maior resistência aos GR e, como consequência, aumento dos níveis de cortisol circulante, propiciando um período de recuperação prolongado do eixo HHA, após a exposição ao estressor (revisão de ZANNAS; BINDER, 2014). Minelli et al. (2013) estudaram, em indivíduos depressivos (comórbidos ou não com os TA) e controles saudáveis, o papel do gene *FKBP5* nesses transtornos e nos traços de personalidade. Esses pesquisadores demonstraram que a homozigosidade do alelo T do SNP rs1360780, que confere maior expressão da co-chaperona FKBP5, foi mais frequente em pacientes com TA e depressão comórbidos em comparação àqueles indivíduos com depressão não ansiosos. Além disso, entre os controles saudáveis, o alelo T foi mais frequente em traços de personalidade associados com uma vulnerabilidade aumentada para a ansiedade (MINELLI et al., 2013). O

presente trabalho também mostra que o alelo T é mais frequente em adolescentes com TA quando comparados a controles não ansiosos. Contudo, não encontramos nenhuma associação significativa entre quaisquer SNPs do gene *FKBP5* estudados e os TA. Além dos dados de associação, presentes no “Artigo 1” da tese, vale ressaltar que a nossa amostra não apresentou resultados significativos em relação às interações Gene x Ambiente (G x A) envolvendo os SNPs do *FKBP5* (dados não divulgados através de artigo científico).

Posterior à finalização e publicação do nosso trabalho, felizmente mais estudos foram disponibilizados a respeito dos SNPs do gene *FKBP5* nos TA. Um estudo mostrou que a resposta à Terapia Cognitiva Comportamental (TCC), em crianças com TA, não foi associada com os polimorfismos dos genes *FKBP5* e *NR3C1* ou à porcentagem de metilação do DNA, pré-tratamento, das regiões promotoras desses genes. Contudo, os participantes com um ou dois alelos de risco do gene *FKBP5*, e que apresentaram maior redução na gravidade dos sintomas ansiosos, diminuíram a porcentagem de metilação do DNA do *FKBP5* durante o tratamento. Já os indivíduos com pouca ou nenhuma redução na gravidade dos sintomas aumentaram a metilação do gene *FKBP5*. Nenhuma associação significativa foi encontrada no gene *NR3C1* (ROBERTS et al., 2015). Comasco et al. (2015) estudaram os efeitos da interação entre os eventos adversos na vida e o genótipo do *FKBP5* associados aos sintomas psiquiátricos (ansiedade, depressão, preocupações sexuais, dissociação, raiva e estresse pós-traumático), em duas amostras comunitárias de adolescentes: uma acompanhada do nascimento até os 12 anos de idade e outra com 17 anos de idade. Eles encontraram efeitos da interação G x A de maneira dose-dependente, ou seja, os indivíduos heterozigotos para os alelos de risco do *FKBP5* apresentaram escores intermediários de sintomas psiquiátricos, na presença de eventos estressores, comparados a outros genótipos (COMASCO et al., 2015). Outro recente estudo, com os mesmos polimorfismos da nossa seleção, avaliou a interação entre os SNPs do *FKBP5* e a presença de eventos estressores (relatado pelos pais) em crianças

(3 a 5 anos de idade) com e sem TA e/ou depressão. Assim como nos resultados apresentados no “Artigo 1” dessa tese, os pesquisadores não encontraram nenhuma associação desses polimorfismos com os TA e nem com depressão. Contudo, eles sugerem que as crianças carreadoras do alelo de menor frequência do SNP rs3800373 do gene *FKBP5* possuem risco aumentado para o desenvolvimento de TA e/ou depressão, dependendo do número de eventos moderados a brandos na vida (mas não severos). Já, o risco para os transtornos psiquiátricos, nas crianças homozigotas para o alelo de maior frequência, é independente da exposição a eventos adversos na vida (SCHEUER et al., 2016).

Outro polimorfismo genético estudado, nesse trabalho, foi o SNP rs878886 do gene *CRHR1*. Estudos pré-clínicos sugerem que a persistência da hiperatividade do eixo HHA, após a exposição ao estresse, é mediada, pelo menos em parte, por um “sistema CRHR1” hiperativo (revisão de GILLESPIE et al., 2009). O CRHR1 é um dos principais subtipos de receptores de CRH (considerado o principal mediador da resposta ao estresse), acoplados à proteína G, que possui uma ampla distribuição, no Sistema Nervoso Central (SNC), em regiões corticais, cerebelares e límbicas envolvidas com processamento de informação sensorial e controle motor. Na hipófise anterior, o CRHR1 medeia os efeitos do CRH na liberação de ACTH e, como consequência, a secreção de glicocorticóides. Há evidências, em modelos animais, que o CRHR1 é crucial no mecanismo de resposta ao estresse, induzido pelo eixo HHA, mas não no *baseline* desse sistema (revisões de AGUILERA et al., 2004; LARYEA; ARNETT; MUGLIA, 2012; REUL; HOLSBOER, 2002).

A escolha do SNP rs878886 do gene *CRHR1* foi motivada pela escassez de dados sobre esse polimorfismo em específico e, também, pelos resultados encontrados por Keck et al. (2008). Esses pesquisadores estudaram múltiplos SNPs do *CRHR1*, entre outros genes, em duas amostras independentes de adultos com e sem TP. Eles encontraram, na amostra combinada, uma associação altamente significativa entre esse polimorfismo e os TP (KECK

et al., 2008). O presente trabalho não replicou esse achado, ou seja, nenhuma associação foi observada entre o SNP rs878886 e os TP (6,9% da amostra), e nem com os demais TA.

Considerando que neurocircuitaria associada ao medo está comprometida nos TA (hiperativação do tálamo, amígdala, hipocampo, ACC, estriado, córtex sensório-motor e ínsula e hipoativação do PFC), ou seja, a habilidade em identificar preditores aversivos está descontextualizada em indivíduos ansiosos (revisão de BROOKS; STEIN, 2015), Heitland et al. (2013) avaliaram, em adultos saudáveis, as interações entre o SNP rs878886 do gene *CRHRI* e o 5-HTTLPR na aquisição do medo. Os pesquisadores submeteram os participantes ao paradigma de medo condicionado, com o uso de realidade virtual, considerando o reflexo de sobressalto (pelo piscar dos olhos) como uma medida fisiológica de resposta ao medo. Eles encontraram que carreadores do alelo G do SNP rs878886 não mostraram nenhuma aquisição de resposta ao medo condicionado para a ameaça, na fase sem instrução, ao contrário dos indivíduos homozigotos para o alelo C. Além disso, os carreadores de alelos de risco para ambos os polimorfismos (alelo G no rs878886 e alelo curto “S” no 5-HTTLPR) interagiram no aumento do reflexo de sobressalto durante essa fase (HEITLAND et al., 2013).

Essa tese contempla, também, os dados referentes ao polimorfismo rs6198 (conhecido, também, como A3669G) do gene *NR3C1* (GR), associado com resistência do GR aos glicocorticóides (revisões de DERIJK, 2009; VAN ROSSUM; VAN DEN AKKER, 2011). A importância dos GR na neurobiologia do estresse já é bem estabelecida na literatura (revisão de PRENDERVILLE et al., 2015). O SNP rs6198 já foi associado com depressão (SZCZEPANKIEWICZ et al., 2011) e transtorno bipolar (SPIJKER et al., 2011) e teve sua associação perdida quando estudado os sintomas melancólicos no curso do transtorno bipolar (LESZCZYŃSKA-RODZIEWICZ et al., 2013). Contudo, até a data dessa tese, os resultados apresentados no “Artigo 1” são os únicos que englobam os TA e o SNP rs6198.

O presente trabalho não encontrou nenhuma associação entre o SNP rs6198 do gene *NR3C1* e os TA, bem como qualquer interação entre esse polimorfismo e traumas emocionais na infância, no desenvolvimento dos TA. De interesse indireto para essa tese, um recente estudo brasileiro investigou, em mulheres, o papel da interação entre os genes *NR3C1* e *NR3C2* e a presença de trauma emocional na infância na suscetibilidade para a adição às drogas (crack e cocaína). Os pesquisadores encontraram uma interação entre negligência física na infância e o alelo Val do SNP rs5522 do *NR3C2*, mas não no SNP rs6198 do *NR3C1*, na modulação da suscetibilidade à adição ao crack e/ou cocaína. Nenhuma interação foi encontrada com os outros traumas emocionais. Além disso, eles sugerem que as carreadoras de ambos os alelos G do SNP rs6198 e Val de outro SNP (rs5522 do gene *NR3C2*) possuem menores escores de gravidade de sintomas de abstinência (ansiedade, fadiga, anedonia, hipo ou hiperfagia, irritabilidade, distúrbios do sono, perda de concentração, desejo por carboidratos, bradicardia, paranoia e ideação suicida) em relação aos outros genótipos (ROVARIS et al., 2015).

Chen et al. (2016) estudaram, em ratos adrenalectomizados (com ausência de produção e circulação de glicocorticóides) e em ratos submetidos à cirurgia simulada, os efeitos do estresse brando crônico (EBC) nos comportamentos do tipo depressivo e ansioso. Os pesquisadores sugerem que os efeitos do EBC nos comportamentos do tipo ansioso são independentes da presença de glicocorticóides circulantes, ao contrário dos comportamentos do tipo depressivo. Surpreendentemente, eles não encontraram quaisquer mudanças na expressão de GR ou FKBP5 no hipocampo ou PFC em ratos adrenalectomizados e submetidos ao EBC (CHEN et al., 2016). Frente a esse resultado, talvez a alteração no GR não seja tão decisiva ou impactante para a ansiedade como presumível.

Outro polimorfismo genético selecionado para esse trabalho foi o SNP rs746530 do gene *SERPINA6*, que codifica uma proteína alfa-globulina com propriedades ligantes aos

corticosteróides (CBG, do inglês *corticosteroid binding globulin*), envolvido com o transporte de glicocorticóides e progesterona (HENLEY; LIGHTMAN, 2011). Kumsta et al. (2007) estudaram, em mulheres em uso de contraceptivo oral (com altos níveis de CBG) e homens (com níveis normais de CBG), os efeitos dos níveis de CBG nas respostas hormonais (cortisol e ACTH), após um teste de estresse psicossocial. Eles evidenciaram que, nas mulheres, os níveis de CBG foram negativamente associados com cortisol salivar e ACTH e positivamente associados com os níveis de cortisol total seguido do estresse psicossocial. Já, nos homens, as associações foram positivas entre a CBG e ACTH e níveis de cortisol total seguido do estresse gerado pelo teste. Os resultados sugerem que níveis baixos de CBG parecem não influenciar a disponibilidade de cortisol livre. Contudo, os níveis de CBG exercem um impacto no cortisol sérico e ACTH, tanto nas mulheres quanto nos homens, possivelmente refletindo o potencial de ações regulatórias em longo prazo no eixo HHA modulado pelos níveis de CBG (KUMSTA et al., 2007).

Uma metanálise com estudos de associação entre o genoma total e os níveis de cortisol plasmático pela manhã, com cerca de 12.600 indivíduos, sugere que a principal influência genética no nível de cortisol plasmático é mediada por variações na capacidade de ligação da CBG. Dentre 61 genes candidatos a alterar os níveis de cortisol, apenas o gene *SERPINA6* foi considerado significativo para essa associação (BOLTON et al., 2014).

Parece justificável a escolha de uma variante genética do gene *SERPINA6* no estudo de associação com os TA, considerando que o papel do eixo HHA nos transtornos de humor associados ao estresse é relevante e a CBG faz parte do mecanismo de resposta ao estresse (SIVUKHINA; JIRIKOWSKI, 2014). A carência de dados na literatura sobre o SNP rs746530 foi um dos gatilhos do interesse em estudá-lo, como demonstrado no “Artigo 1”. Essa variante genética foi escolhida por Holliday et al. (2010), em uma coorte prospectiva de adultos, para o estudo de associação entre os sintomas de ansiedade, depressão e dor e 143

polimorfismos genéticos presentes em genes relacionados com o sistema serotoninérgico e com o eixo HHA. Eles encontraram que 7 SNPs do gene *SERPINA6* foram associados com os sintomas somáticos avaliados e que, justamente, o SNP rs746530 foi o polimorfismo responsável por 19% do aumento do número de sintomas somáticos para cada cópia do alelo de menor frequência. Contudo, após o ajuste para a dor, a associação foi perdida (HOLLIDAY et al., 2010). Os resultados dessa tese não contemplam nenhuma associação significativa entre o SNP rs746530 e os TA e nem entre esse polimorfismo e trauma emocional.

Como visto acima, o “Artigo 1” apresentou dados de SNPs de importância funcional para o eixo HHA, nos genes *FKBP5*, *CRHR1*, *NR3C1* e *SERPINA6*, e escassos na literatura. Nenhum desses polimorfismos genéticos foi associado com os TA ou com trauma emocional. Nós acreditamos que o nosso tamanho amostral não foi capaz de detectar possíveis efeitos desses polimorfismos no desfecho diagnóstico. Também, o ideal seria termos quantificado o cortisol salivar liberado, após uma tarefa de estresse, para inferirmos a funcionalidade do eixo HHA. Nenhuma análise envolveu o haplótipo com os 5 SNPs do gene *FKBP5*, o que poderia aumentar o poder de detecção para uma possível associação com os TA. Entretanto, esse trabalho adicionou dados inéditos à literatura e pode direcionar futuros estudos, com uma amostra maior. A revisão dessa discussão sugere que há, ainda, muito a ser explorado em relação às associações de genes vinculados ao eixo HHA e os transtornos complexos. Os diferentes polimorfismos e as diferentes medidas de avaliação de TA, e sua sintomatologia, bem como o uso de medicamentos ou não, podem contribuir para os diferentes resultados. Os dados referentes à atividade (hiper, hipo ou normal) do eixo HHA nos TA, por exemplo, ainda são inconsistentes na literatura (revisão de JACOBSON, 2014).

O “Artigo 2” apresenta os dados referentes ao SNP rs2070951 (conhecido, também, como MR-2G/C) do gene *NR3C2* (MR), trauma emocional e níveis séricos de BDNF

(sBDNF). Nós investigamos, em adolescentes com trauma emocional, com e sem TA, a associação dos TA com esse polimorfismo e com sBDNF, bem como a interação entre trauma emocional e essa variante genética nos níveis sBDNF.

Por décadas, os estudos sobre a resposta ao estresse eram focados nos GR, visto que os MR eram, somente, considerados receptores de alta afinidade aos corticosteróides e, substancialmente, muito ocupados já no repouso (com um papel preponderante no processo cognitivo). Contudo, as recentes descobertas demonstram uma baixa afinidade ao cortisol (nos humanos) por parte de MR associados à membrana, o que sugere uma participação importante dos MR na resposta ao cortisol induzido por estresse (revisão de VOGEL et al., 2016).

Há evidências de que os efeitos do estresse na vida precoce envolvem a sinalização mediada por glicocorticóides, para manter a homeostase, e a sinalização via neurotrofinas, que tem um papel chave no crescimento neuronal, orientação axonal e integridade sináptica. Essas sinalizações coexistem no SNC, particularmente no hipocampo, com elevados níveis de expressão de GR, MR e BDNF e seus receptores. O equilíbrio entre os níveis de glicocorticóides e de BDNF é crucial para o mecanismo de regulação de resposta ao estresse (revisão de DASKALAKIS et al., 2015). O BDNF é um fator neurotrófico derivado do encéfalo, pertencente à superfamília de fatores de crescimento neural, e principal regulador da plasticidade sináptica, possuindo receptores densamente distribuídos no SNC, incluindo o sistema límbico e mesencéfalo. O BDNF é considerado a neurotrofina mais abundante em mamíferos e atua como fator neurotrófico nos neurônios dopaminérgicos e colinérgicos; no controle de crescimento dendrítico e resposta sináptica; na sobrevivência e diferenciação celular, além de exercer um papel fundamental na potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) (revisões de CIRULLI; ALLEVA, 2009; DASKALAKIS et al., 2015). A exposição prolongada aos efeitos do estresse precoce pode diminuir a expressão de BDNF (**Figura 7**) e GR no hipocampo, favorecendo a vulnerabilidade para desenvolver

transtornos associados ao estresse durante a adolescência e vida adulta (revisão de DASKALAKIS et al., 2015). De acordo com estudos em animais, os níveis de BDNF encefálico são altamente correlacionados com os níveis sBDNF (ELFVING; PLOUGMANN; WEGENER, 2010; SARTORIUS et al., 2009). A expressão de BDNF parece depender de ambos os receptores GR e MR (HANSSON et al., 2000).

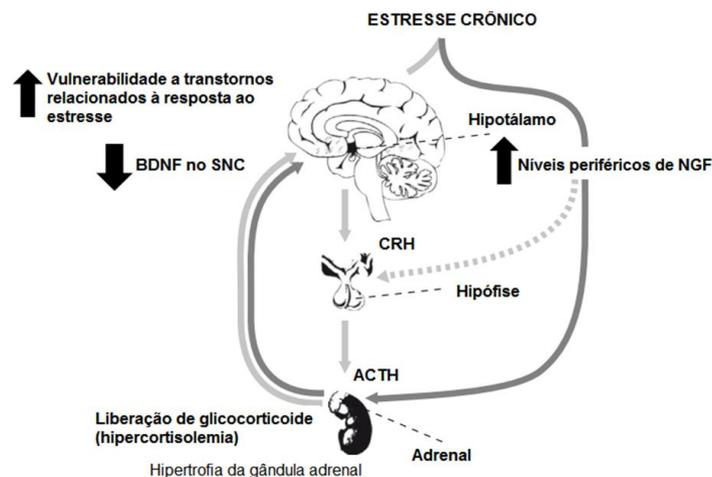


Figura 7. Representação de um possível papel do BDNF nos transtornos induzidos pelo estresse. Seguido de um estímulo estressor crônico, o aumento dos níveis periféricos do fator de crescimento neural (NGF, do inglês *Neurotrophins Nerve Growth Factor*) induz a liberação de cortisol (em humanos), pela glândula adrenal, levando à redução dos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) em estruturas límbicas no Sistema Nervoso Central (SNC). Como consequência, há uma redução da plasticidade encefálica e aumento na vulnerabilidade de transtornos relacionados ao estresse, incluindo os TA. Adaptado da revisão de CIRULLI; ALLEVA (2009).

Na presente tese, nós não encontramos associação entre os TA e o SNP rs2070951 do gene *NR3C2*, bem como entre os TA e os níveis sBDNF. Os estudos com genética e transtornos complexos exigem um tamanho amostral maior do que o apresentado no “Artigo 2”, o que conferiria um poder maior na detecção de associações (HONG; PARK, 2012). Estudos com camundongos sugerem que a superexpressão de MR não confere resiliência à ansiedade, já que os efeitos prejudiciais do estresse precoce não foram observados na ansiedade e no medo contextual nos animais com expressão aumentada de MR no encéfalo (KANATSOU et al., 2016).

Entretanto, encontramos uma associação entre o SNP rs2070951 e os níveis sBDNF, o que é compatível com a lógica sobre as interações entre MR e BDNF. O número de alelos C desse polimorfismo foi significativamente associado com o aumento dos níveis sBDNF. Isso quer dizer que homozigotos para esse alelo foram os que apresentaram maiores níveis sBDNF quando comparados aos outros genótipos. O alelo C é associado a uma atividade transcricional aumentada dos MR quando comparado ao alelo G (VAN LEEUWEN et al., 2010, 2011). Estudos em animais reportam que os glicocorticóides reduzem a expressão de BDNF em regiões encefálicas (HANSSON et al., 2000). Tendo posse dessa informação, podemos inferir ou supor que o alelo C, por aumentar os MR, diminui os glicocorticóides circulantes e, como consequência, aumenta os níveis de BDNF (no caso, BDNF periférico).

Em princípio nós poderíamos hipotetizar que o alelo G seria a variante de risco para o desenvolvimento de transtornos associados ao estresse, visto que está associado a níveis mais elevados de cortisol. A literatura sugere que indivíduos adultos saudáveis, homozigotos para o alelo G do SNP rs207095, possuem maiores níveis de cortisol pela manhã (MUHTZ et al., 2011). Contudo, a associação entre SNPs do gene *NR3C2* (incluindo o rs2070951) e os níveis de cortisol, em uma amostra de adolescentes, foi perdida, após um teste envolvendo estresse (BOUMA et al., 2011).

Além desses dados, o “Artigo 2” mostra que os níveis sBDNF foram associados com a negligência física, mas não com os demais traumas emocionais. Os níveis sBDNF aumentaram gradativamente, conforme o aumento do escore de negligência física. Esse subtipo de trauma engloba questões sobre as necessidades básicas da criança, incluindo nutrição, abrigo, segurança e saúde (BERNSTEIN et al., 2003). A nossa amostra era comunitária e, talvez, a negligência física tenha sido o trauma mais sensível para assumir consequências biológicas. Neumeister et al. (2013) sugerem que os níveis sBDNF

aumentados , após um trauma emocional, podem corresponder a uma resposta compensatória (revisão de NEUMEISTER; CORSI-TRAVALI; GREEN, 2013).

Grassi-Oliveira et al. (2008) encontraram níveis plasmáticos mais baixos de BDNF em brasileiras adultas com depressão em comparação ao grupo saudável para transtornos psiquiátricos. As mulheres com diagnóstico de depressão e com negligência física apresentaram níveis mais baixos de BDNF plasmático em comparação àquelas sem trauma emocional e às controles sem depressão. Eles sugerem, também, que a gravidade da negligência física e o baixo nível plasmático de BDNF podem prever prejuízos na recordação verbal imediata (GRASSI-OLIVEIRA et al., 2008). Apesar de evidências de que o trauma emocional reduz os níveis periféricos de BDNF (ANGELUCCI et al., 2014; KAUER-SANT'ANNA et al., 2007), outro estudo brasileiro foi de acordo com os nossos resultados (HAUCK et al., 2010). Nesse estudo, os autores reportaram, pela primeira vez, elevados níveis sBDNF em pacientes (idade de 14 a 65 anos) com trauma emocional recente (menos de um ano do trauma). Eles compararam os níveis sBDNF em indivíduos com transtorno de estresse agudo ou TEPT a controles sem trauma emocional, sugerindo que os níveis sBDNF são maiores nos pacientes, mas que diminuem conforme o tempo passa (HAUCK et al., 2010). As análises, presentes no “Artigo 2”, não consideraram o tempo decorrido do trauma emocional, mas, como a nossa amostra era de adolescentes com idade pareada, esse viés foi eliminado.

O “Artigo 2” sugere, também, uma interação G x A nos níveis sBDNF. Os resultados, do presente trabalho, mostram que o polimorfismo rs2070951 do gene *NR3C2* modera a associação entre negligência física e os níveis sBDNF, significando que somente os indivíduos com o genótipo CC aumentaram os níveis sBDNF quando os escores de negligência física aumentaram. Mesmo não estudando o mesmo polimorfismo selecionado na presente tese, os resultados do trabalho de Bogdan et al. (2012) também acrescentam

evidências da contribuição dos MR para um possível mecanismo biológico envolvido com o trauma emocional infantil. Os pesquisadores mostraram que, em crianças e adolescentes, o polimorfismo Iso/Val (rs5522) do gene *NR3C2* moderou a associação entre negligência emocional na infância (NEI) e reatividade da amígdala direita. Os pesquisadores utilizaram recursos de imagem por ressonância magnética funcional (IRMf) e um paradigma que envolve faces ameaçadoras para avaliar a reatividade da amígdala. Os resultados demonstraram que o escore aumentado para NEI, bem como ser carreador do alelo Val, agem sozinhos na predição da maior reatividade da amígdala direita frente à ameaça. Já, para os homocigotos do alelo Iso, a reatividade da amígdala frente à ameaça dependeu do escore de NEI (elevada NEI aumentou a reatividade da amígdala e vice-versa). Os carreadores do alelo Val só tiveram a reatividade da amígdala aumentada, em relação aos homocigotos do alelo Iso, quando os escores de NEI eram baixos (BOGDAN; WILLIAMSON; HARIRI, 2012).

O “Artigo 1” e o “Artigo 2” abordaram as análises de associação e de interação G x A referentes aos TA e trauma emocional. O “Artigo 3”, no entanto, visa ampliar o conhecimento, do ponto de vista epigenético, sobre os possíveis mecanismos biológicos subjacentes ao desenvolvimento e trajetória dos TA.

Os estudos de associação genética com os TA são inconsistentes, negativos ou não são claramente replicados (revisão de SHIMADA-SUGIMOTO; OTOWA; HETTEMA, 2015). Já, os estudos com interação G x A, envolvendo o genoma total, são mais robustos porque consideram o ambiente como uma variável importante na suscetibilidade ao transtorno psiquiátrico (revisão de SHARMA et al., 2016). Considerando que a metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos principais dos mamíferos e que é sensível às influências ambientais (revisão de C.G. WEAVER, 2014), nós acreditamos que o metiloma do DNA, nos adolescentes com e sem TA, oferecerá um painel de possíveis rotas biológicas envolvidas com os TA.

Os adolescentes estudados, pelo Programa de Transtornos de Ansiedade na Infância e na Adolescência (Protaia), são provenientes de uma coorte minuciosamente caracterizada para explorar múltiplos aspectos envolvidos com os TA (SALUM et al., 2011). A amostra estudada nessa tese é constituída de uma amostra comunitária e rica em dados sobre a neuropsicologia, nutrição, neurocognição, genética, marcadores inflamatórios, erosão telomérica, neuroimagem funcional, entre outros. A adolescência é um período importante do desenvolvimento encefálico que envolve auto-regulação aumentada e, concomitantemente, impulsividade, o que aumenta a vulnerabilidade a comportamentos de risco à vida e desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (revisão de DAVIDSON et al., 2015). Nós entendemos que a investigação epigenética é mais uma ferramenta complementar, extremamente reveladora, que pode agrupar todos esses dados e correlacioná-los de modo a ter algum significado neurobiológico relevante para o entendimento sobre a etiologia e o curso dos TA.

Nós optamos em explorar o metiloma do DNA, nos adolescentes casos para os TA e nos controles para o diagnóstico, tanto do modo transversal quanto do longitudinal, com um intervalo de 5 anos entre as avaliações. É muito importante ressaltar que, em ambos os anos de 2008 e de 2013, os adolescentes foram avaliados em relação ao diagnóstico psiquiátrico e forneceram uma amostra de saliva para a extração de DNA presentes em células do epitélio bucal. O DNA extraído da saliva é considerado mais representativo, em estudos envolvendo epigenoma, em comparação a qualquer outro tecido periférico, como o sangue, porque é originário do mesmo folheto embrionário (ectoderma) do encéfalo e possui menos heterogeneidade celular (LOWE et al., 2013). Nós tivemos facilidade em coletar o material biológico e obtivemos uma excelente qualidade das amostras de DNA avaliadas nos 3 artigos dessa tese.

Como visto no “Artigo 3”, a nossa estratégia de estudo envolveu a divisão dos adolescentes em quatro grupos: (1) adolescentes com desenvolvimento típico, controles; (2) adolescentes incidentes para os TA; (3) adolescentes com TA persistente, casos e (4) adolescentes remitentes aos TA. Essa divisão considerou as avaliações psiquiátricas realizadas em 2008 e em 2013. Os grupos foram pareados em idade e sexo para que os efeitos dessas variáveis fossem minimizados (BELL et al., 2012; LIU et al., 2010; MARTINO et al., 2011). Em princípio, os resultados esperados (**Figura 8**) envolveriam rotas biológicas diferentes entre casos e controles para os TA ou rotas biológicas coincidentes, mas em direções opostas de metilação do DNA (Ex.: hipermetilação em casos e hipometilação em controles). Também, foi cogitado que o grupo incidente para os TA apresentaria as mesmas rotas biológicas do que o grupo remitente para os TA, mas com direções opostas de metilação. Outra hipótese levantada foi a de que a diferença entre o grupo com desenvolvimento típico (controle) e o grupo de indivíduos com TA persistente (casos) seria semelhante ao contraste transversal entre casos e controles para os TA. Em relação às análises transversais, nós imaginamos que o contraste “caso x controle”, em 2008, seria semelhante ao do ano de 2013.

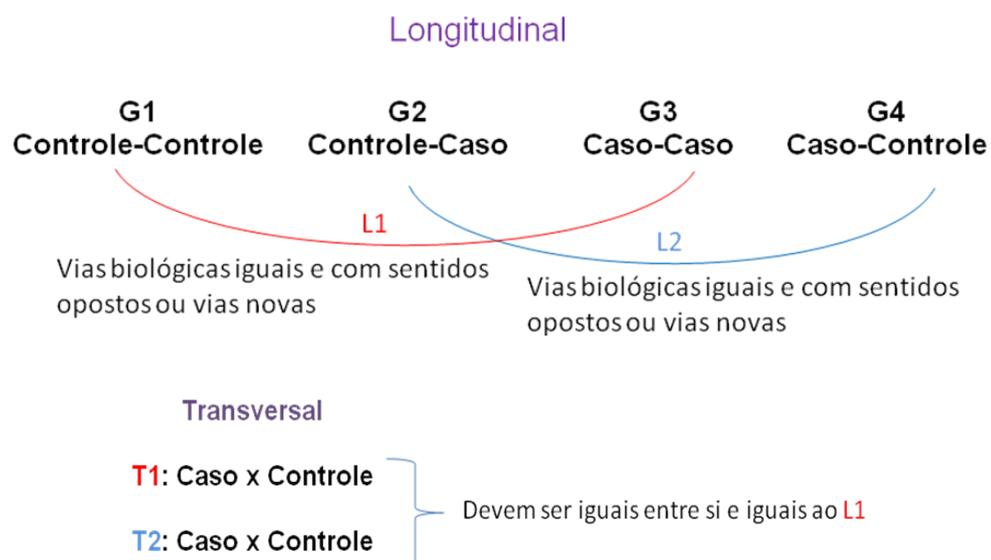


Figura 8. Esquema de hipóteses envolvendo contrastes longitudinais (ano de 2013 menos o ano de 2008) e transversais (casos menos controles). O contraste L1 envolve os indivíduos que sempre foram casos para os TA (G3) e indivíduos que sempre foram controles para os TA (G1). O contraste L2 envolve as diferenças encontradas nos indivíduos remitentes para os TA (G4) e os incidentes para os TA (G2). A análise transversal no

ano de 2008 (T1) deve ser igual ao contraste entre indivíduos casos e controles para os TA no ano de 2013 (T2) e semelhante ao contraste L1.

Nós trabalhamos com ontologias genéticas (GO, do inglês *Gene Ontology*) no “Artigo 3”. As ontologias são úteis em estudos com grande volume de dados, como os que envolvem o genoma total, porque aumentam o poder de detecção de diferenças entre os grupos. As ontologias genéticas possuem 3 domínios principais: (1) *Processo biológico*: envolvido com eventos moleculares com um começo e fim definidos, pertinente ao funcionamento integrado de unidades vitais (células, tecidos, órgãos e organismos); (2) *Função Molecular*: envolvida com atividades bioquímicas dos produtos dos genes em nível molecular (Ex.: catálise); (3) *Componente Celular*: envolvido com as partes das células e seu ambiente extracelular (ASHBURNER et al., 2000). As análises de enriquecimento de um grupo de genes (GSEA, do inglês *Gene set enrichment analysis*) permitem que sejam conhecidos os genes que compartilham funções biológicas envolvidas com determinada via ou ontologia (SUBRAMANIAN et al., 2005).

As GSEA mostraram que os indivíduos pertencentes aos grupos incidentes e remitentes para os TA apresentaram os termos das ontologias (chamaremos, aqui, de “vias”) com um padrão homogêneo e associado ao sistema nervoso (Ex.: geração de neurônios, desenvolvimento do sistema nervoso, neurogênese e diferenciação dos neurônios). Em geral, as vias apresentaram, no intervalo de 5 anos, um padrão de hipometilação do DNA. Uma das vias, envolvida com desenvolvimento neuronal, estava associada com hipermetilação do DNA no grupo incidente e hipometilação do DNA no grupo remitente. O que pode ser discutido é que os indivíduos que tiveram o diagnóstico de TA na vida (atual ou não) são mais suscetíveis a alterações epigenéticas em vias associadas com o sistema nervoso, o que faz sentido com a plausibilidade biológica conhecida até o momento. Infelizmente, essa é uma questão delicada de se interpretar, em um primeiro momento, porque exige uma investigação sobre os genes que contribuíram para o enriquecimento de cada via e as regiões metiladas. Até a data dessa

tese, nós nos limitamos a apresentar os dados mais gerais como uma tentativa de gerar hipóteses.

Além disso, as GSEA, nos indivíduos dos grupos que nunca mudaram o *status* em relação aos TA (casos nos 2 momentos - persistentes ou controles nos 2 momentos – grupo controle), resultaram em vias com um padrão heterogêneo e, em sua maioria, sem associação com o sistema nervoso central (Ex.: regulação dos processos metabólicos celulares e transdução de sinal). Também, foi observado um predomínio do padrão de hipometilação do DNA. Uma questão interessante é que nós encontramos uma direção oposta de metilação de DNA nas vias relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso e ao desenvolvimento do SNC (hipometilação em controles e hipermetilação em casos). Outra vez, não podemos inferir muito sobre esses dados porque, até a data dessa tese, nós não investigamos os genes que estão contribuindo para essas vias.

O “Artigo 3” mostrou que, na análise longitudinal, a maioria das vias biológicas apresentaram hipometilação do DNA. Ainda não há consenso, na literatura, sobre essa questão de o DNA hipermetilar ou hipometilar com o passar dos anos. Martino et al. (2013) evidenciaram mudanças no metiloma do DNA, do nascimento aos 18 meses de idade, em gêmeos monozigóticos e dizigóticos. As ontologias que diferiram com a idade estavam enriquecidas por genes associados ao desenvolvimento e, cerca de 90% delas, apresentavam um padrão de hipermetilação do DNA (MARTINO et al., 2013). Já Heyn et al. (2012) observaram uma diminuição do DNA associada à idade quando comparados metilomas do DNA de recém-nascidos e de pessoas centenárias (HEYN et al., 2012).

As análises transversais com as GSEA, envolvendo as diferenças entre casos e controles para os TA, tanto no ano de 2008 quanto no de 2013, apresentaram um resultado instigante. O começo da adolescência apresentou um padrão de hipometilação do DNA, enquanto que os jovens adultos apresentaram um padrão, predominantemente, de

hipermetilação do DNA. Esses resultados sugerem que o fator “tempo” possa ser mais importante que o próprio diagnóstico de TA nas alterações epigenéticas envolvendo esse importante período desenvolvimental. A literatura já evidenciou que o tempo influencia nas variações intraindividuais, relacionadas à metilação do DNA, já nos primeiros dias de vida (MARTINO et al., 2011; WANG et al., 2012) e que essas mudanças não seguem um padrão linear, sendo maiores em crianças em comparação aos adultos (ALISCH et al., 2012).

As tabelas 3 e 4 dessa tese apresentam uma série de estudos com metilação *loci* específica e TA e/ou trauma emocional. Contudo, vale ressaltar que os estudos com metiloma do DNA e os TA (ou sintomas de ansiedade) são raros. Conforme o nosso conhecimento e até a data dessa tese, apenas um estudo em humanos (CHEN et al., 2015) e um em animais (ALISCH et al., 2014) investigou dados sobre ansiedade e metilação envolvendo o genoma total. Chen et al. (2015), como visto na tabela 3 dessa tese, estudaram a interação entre a influência da ansiedade materna (estado e traço de ansiedade) e o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* no metiloma do DNA de bebês (DNA extraído do sangue de cordão umbilical), bem como o reflexo dessa interação em estruturas encefálicas (usando IRMf). Os pesquisadores encontraram que os recém-nascidos com o genótipo MetMet apresentaram maior número de sítios CpGs associados com o traço e estado de ansiedade materna pré-natal. Também, nos bebês com genótipo MetMet, os níveis de metilação do DNA mostraram maior covariância com o volume da amígdala direita. Os indivíduos ValVal, por outro lado, apresentaram maior covariância entre os níveis de metilação do DNA e o volume do hipocampo esquerdo, quando comparado com os outros genótipos (CHEN et al., 2015). Alisch et al. (2014) investigaram o temperamento ansioso de macacos rhesus jovens e o metiloma do DNA no núcleo central da amígdala desses animais. Eles sugerem que sítios CpGs hipermetilados, na amígdala, são mais suscetíveis a mudanças em relação à ansiedade. Além disso, os pesquisadores apresentaram alguns genes associados com o temperamento

ansioso através da comparação do metiloma do DNA e do transcriptoma (ALISCH et al., 2014).

Da mesma forma que consideramos a interação entre trauma e/ou eventos estressores e metilação do DNA na suscetibilidade aos TA, a interação com algum evento considerado benéfico aos sintomas de ansiedade, também deve ser explorado do ponto de vista epigenético. Coleman et al. (2016) realizaram o primeiro estudo com metiloma do DNA e TCC, em crianças e adolescentes com TA, no intuito de identificar variantes capazes de prever mudanças na severidade dos sintomas de ansiedade em resposta à TCC. Os pesquisadores avaliaram a gravidade dos sintomas ansiosos antes, imediatamente depois e 3 a 12 meses após o final da TCC, mas não encontraram nenhuma diferença de metilação associada à TCC. Esse estudo teve limitações que incluem o pequeno tamanho amostral e a ausência de indivíduos controles para os TA (COLEMAN et al., 2016).

Shimada-Sugimoto et al. (2015) evidenciaram, em estudo caso e controle para o TP, uma associação entre o TP e vias relacionadas ao sistema imune, incluindo o polimorfismo do gene complexo principal de histocompatibilidade (*HLA-A*). Esses pesquisadores basearam-se em resultados prévios obtidos de estudos com associação de genoma total para focarem as suas investigações no gene *HLA* (SHIMADA-SUGIMOTO et al., 2015). Uma recente metanálise envolvendo 9 amostras de 7 coortes, com 18.000 indivíduos não relacionados, e estudos de associação com genoma total e TA, identificou novas variantes genéticas que contribuem para a suscetibilidade do transtorno. Esse é o maior estudo que incorpora comorbidades, comuns entre os TA, capazes de prever efeitos de SNPs no desfecho diagnóstico para os TA (OTOWA et al., 2016).

Lotan et al. (2014) testaram, sistematicamente, o grau de compartilhamento genético nos TA, transtorno bipolar, transtorno de espectro autista, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia e depressão. Eles usaram 180 genes, extraídos de dados

publicados em estudos de associação com genoma total, análises de enriquecimento e ontologias. Os pesquisadores encontraram que 22% dos genes são compartilhados em dois ou mais transtornos psiquiátricos. Os principais subgrupos de genes compartilhados, na maioria dos transtornos, incluíram genes implicados na densidade pós-sináptica, expressos em tecidos imunes e co-expressos no encéfalo humano em desenvolvimento. Eles aprofundaram a pesquisa utilizando camundongos e detectaram dois componentes genéticos distintos presentes em cada transtorno: (1) componente envolvido com desenvolvimento do SNC, projeções neurais e transmissão sináptica e (2) componente envolvido com organelas citoplasmáticas e processos celulares. Somados, esses componentes correspondem a 20-30% da responsabilidade genética para o transtorno psiquiátrico (LOTAN et al., 2014).

O presente trabalho não realizou, até o momento, nenhuma análise sobre o metiloma do DNA e o ambiente familiar dos adolescentes com TA. Contudo, nossas futuras análises deverão incluir dados dos pais, disponibilizados ao longo dos anos. Naumova et al. (2016) descreveram o primeiro estudo investigando o papel moderador do metiloma do DNA e as mudanças de percepções do filho em relação à mãe, e vice-versa, no ajustamento psicossocial (problemas internalizantes, hiperatividade e/ou déficit de atenção, sintomas emocionais, ajustamento pessoal) do filho na vida adulta. Os pesquisadores avaliaram, em uma coorte de jovens adultos, a percepção dos filhos em relação a suas mães (afeto, conforto, hostilidade, agressão, negligência, indiferença e rejeição) em um período de 15 anos (3 intervalos de 5 anos cada, abrangendo a infância, adolescência e começo da vida adulta) e a percepção das mães sobre o seu próprio estresse. As mudanças de percepção de rejeição parental ao longo do tempo foram relacionadas com hipermetilação do DNA de genes, em geral, envolvidos com sinalização celular (NAUMOVA et al., 2016). Ao contrário do nosso estudo longitudinal, o trabalho de Naumova et al. (2016) usou o DNA coletado, somente, na vida adulta, o que não é aconselhável.

Por fim, essa tese confirma a complexidade dos mecanismos biológicos e comportamentais envolvidos com o desenvolvimento dos TA. A literatura já admite que existam padrões neurofisiológicos distintos, que dependem do perfil sintomático do indivíduo com ansiedade, e muitas vezes envolvem áreas de processamento de informação disfuncionais (GEREZ et al., 2016). Nós adicionamos novos dados à literatura que devem ser considerados em análises mais aprofundadas no futuro.

8. CONCLUSÕES

O presente estudo reportou a ausência de associação entre os genótipos avaliados, em adolescentes, no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e os Transtornos de Ansiedade. Contudo, quando consideradas as interações ambientais, foi encontrada uma interação entre a negligência física e o polimorfismo do gene *NR3C2* (receptor de mineralocorticoide, rs2070951) nos níveis séricos de BDNF. A interação deveu-se ao fato de que a exposição à alta e à intermediária negligência física, na infância, foi associada ao aumento dos níveis séricos de BDNF, somente, em sujeitos com o genótipo CC para o polimorfismo MR-2G/C do gene *NR3C2*, mas não em indivíduos com outros genótipos.

Em relação ao metiloma do DNA, utilizando uma abordagem longitudinal e transversal, acrescentamos informações relevantes à literatura científica, considerando que aspectos epigenéticos podem estar envolvidos em diferentes vias biológicas nos transtornos de ansiedade. Nossos achados são originais e geradores de hipóteses.

Por fim, essa tese procurou rastrear, no âmbito molecular, pistas sobre os mecanismos envolvidos com os transtornos de ansiedade em adolescentes. Dentro das possibilidades de trabalhar com genética e psiquiatria, utilizou-se dos delineamentos e métodos disponíveis, através de uma abordagem caso-controle, estudo de interações Gene x Ambiente e epigenética. Para tanto, foram selecionados genes candidatos com base na sua influência na resposta ao estresse; o trauma emocional como um fator ambiental relevante no desenvolvimento dos transtornos mentais e a metilação do DNA como um mecanismo epigenético modulado por interferências ambientais. Os achados, desse estudo, sugerem importante influência genética e ambiental no desenvolvimento e trajetória deste transtorno complexo.

9. PERSPECTIVAS

As perspectivas em relação aos dados gerados pelo metiloma do DNA, em nossa amostra de adolescentes, são amplas. Para aprofundarmos nossas discussões, nós iremos investigar, em um futuro breve, quais genes que contribuíram para o enriquecimento de cada via (ontologia); o local de metilação em relação à ilha CpG (dentro ou fora da ilha); o local da metilação em relação ao gene (corpo do gene, éxon, 3'UTR, 5'UTR, região intergênica); e a metilação em regiões regulatórias (promotor, *enhancer*). Nós iremos validar o experimento, por pirosequenciamento, com base no ranqueamento do valor beta gerado no metiloma do DNA, para que possamos trabalhar com genes ou sítios CpGs específicos de nosso interesse.

Nós possuímos um banco de dados muito rico e extenso que, baseado em hipóteses derivadas do que já se encontra descrito na literatura, deverá ser explorado em busca de associações, correlações e interações entre as diversas variáveis, tanto comportamentais, neurocognitivas quanto biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAA. Specific Phobias. **Anxiety and Depression Association of America**, Acesso em 8 de março de 2016, p. <http://www.adaa.org/understanding-anxiety/specific>, 2015.

AGUILERA, G. et al. Corticotropin releasing hormone receptors: Two decades later. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 319–329, 2004.

ALISCH, R. S. et al. Age-associated DNA methylation in pediatric populations. **Genome Research**, v. 22, n. 4, p. 623–632, 2012.

ALISCH, R. S. et al. Differentially Methylated Plasticity Genes in the Amygdala of Young Primates Are Linked to Anxious Temperament, an at Risk Phenotype for Anxiety and Depressive Disorders. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 47, p. 15548–15556, 2014.

ANGELUCCI, F. et al. BDNF serum levels in subjects developing or not post-traumatic stress disorder after trauma exposure. **Brain and Cognition**, v. 84, n. 1, p. 118–122, 2014.

APA. Highlights of Changes from DSM-IV-TR to DSM-5. **American Journal Psychiatric**, p. 1–19, 2013.

ARCHER, T. et al. Epigenetics and Biomarkers in the Staging of Neuropsychiatric Disorders. **Neurotoxicity Research**, v. 18, n. 3-4, p. 347–366, 2010.

ARCHER, T. et al. Epigenetic Modulation of Mood Disorders. **Journal of genetic syndrome & gene therapy**, v. 4, n. 120, p. 1–13, 2013.

ASHBURNER, M. et al. The Gene Ontology Consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nat. Genet.**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

ASK, H. et al. Common Etiological Sources of Anxiety, Depression, and Somatic Complaints in Adolescents: A Multiple Rater twin Study. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 44, n. 101-114, 2015.

BAEDKE, J. The epigenetic landscape in the course of time: Conrad Hal Waddington's methodological impact on the life sciences. **Studies in History and Philosophy of Science Part C :Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 756–773, 2013.

BAGOT, R. C.; MEANEY, M. J. Epigenetics and the Biological Basis of Gene × Environment Interactions. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 8, p. 752–771, ago. 2010.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–335, 2015.

BATELAAN, N. M. et al. Anxiety and new onset of cardiovascular disease: critical review and meta-analysis. **The British Journal of Psychiatry**, v. 208, n. 3, p. 223–231, 2016.

BATTAGLIA, M. Separation anxiety: At the neurobiological crossroads of adaptation and illness. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 277–285, 2015.

BAXTER, A. J. et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological Medicine**, n. July 2012, p. 897–910, 2013.

- BAYLES, R. et al. Methylation of the SLC6a2 Gene Promoter in Major Depression and Panic Disorder. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83223, 2013.
- BEERY, A. K. et al. Natural variation in maternal care and cross-tissue patterns of oxytocin receptor gene methylation in rats. **Hormones and behavior**, v. 77, p. 42–52, 2016.
- BELL, J. T. et al. Epigenome-Wide Scans Identify Differentially Methylated Regions for Age and Age-Related Phenotypes in a Healthy Ageing Population. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 4, p. e1002629, 2012.
- BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The Mammalian Epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669–681, 2007.
- BERNSTEIN, D. P. et al. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. **Child Abuse & Neglect**, v. 27, n. 2, p. 169–190, 2003.
- BINDER, E. B. et al. Association of FKBP5 Polymorphisms and Childhood Abuse With Risk of Posttraumatic Stress Disorder Symptoms in Adults. **JAMA**, v. 299, n. 11, p. 1291–1305, 2008.
- BINDER, E. B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34 Suppl 1, p. S186–95, 2009.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes and Development**, v. 16, p.6-21, 2002.
- BISHOP, M. et al. An analysis of early developmental trauma in social anxiety disorder and posttraumatic stress disorder. **Annals of General Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 16, 2014.
- BOGDAN, R.; WILLIAMSON, D. E.; HARIRI, A. R. Mineralocorticoid receptor Iso/Val (rs5522) genotype moderates the association between previous childhood emotional neglect and amygdala reactivity. **American Journal of Psychiatry**, v. 169, n. 5, p. 515–522, 2012.
- BOLTON, J. L. et al. Genome Wide Association Identifies Common Variants at the SERPINA6/SERPINA1 Locus Influencing Plasma Cortisol and Corticosteroid Binding Globulin. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 7, p. e1004474, 2014.
- BOUMA, E. M. C. et al. No Associations Between Single Nucleotide Polymorphisms in Corticoid Receptor Genes and Heart Rate and Cortisol Responses to a Standardized Social Stress Test in Adolescents: The TRAILS Study. **Behavior Genetics**, v. 41, n. 2, p. 253–261, 2011.
- BOYCE, W. T.; KOBOR, M. S. Development and the epigenome: the “synapse” of gene-environment interplay. **Developmental science**, v. 18, n. 1, p. 1–23, 2015.
- BRENT, D. et al. Association of FKBP5 polymorphisms with suicidal events in the Treatment of Resistant Depression in Adolescents (TORDIA) study. **The American journal of psychiatry**, v. 167, n. 2, p. 190–7, 2010.
- BROOKS, S. J.; STEIN, D. J. A systematic review of the neural bases of psychotherapy for anxiety and related disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 261–279, 2015.
- BRUCE, L. C. et al. Childhood maltreatment and social anxiety disorder: implications for symptom severity and response to pharmacotherapy. **Depress Anxiety**, v. 29, n. 2, p. 132–139, 2012.
- BRYDGES, N. M. et al. Juvenile stress enhances anxiety and alters corticosteroid receptor expression in adulthood. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 1, p. 4–13, 2014.

BUCHMANN, A. F. et al. Moderating role of FKBP5 genotype in the impact of childhood adversity on cortisol stress response during adulthood. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 6, p. 837–45, 2014.

C.G. WEAVER, I. Epigenetics: Integrating Genetic Programs, Brain Development and Emergent Phenotypes. **Cell & Developmental Biology**, v. 03, n. 01, p. 1–11, 2014.

CHAGNON, Y. C. et al. DNA methylation and single nucleotide variants in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and oxytocin receptor (OXTR) genes are associated with anxiety/depression in older women. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. June, p. 1–9, 2015.

CHATTERJEE, A. et al. Genome-wide DNA methylation map of human neutrophils reveals widespread inter-individual epigenetic variation. **Nature Publishing Group**, n. October, p. 1–16, 2015.

CHEN, J. et al. Effects of chronic mild stress on behavioral and neurobiological parameters - Role of glucocorticoid. **Hormones and Behavior**, v. 78, p. 150–159, 2016.

CHEN, L. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism influences the association of the methylome with maternal anxiety and neonatal brain volumes. **Development and Psychopathology**, v. 27, n. 01, p. 137–150, 2015.

CHOCYK, A. et al. Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions—a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1462–1470, 2013.

CIRULLI, F.; ALLEVA, E. The NGF saga: From animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 379–395, 2009.

COLEMAN, J. R. I. et al. Genome-wide association study of response to cognitive-behavioural therapy in children with anxiety disorders. **The British Journal of Psychiatry**, v. 7309727, n. Epub ahead of print, p. 1–8, 2016.

COMASCO, E. et al. Psychiatric symptoms in adolescents: FKBP5 genotype—early life adversity interaction effects. **European Child and Adolescent Psychiatry**, v. 24, n. 12, p. 1473–1483, 2015.

COSTELLO, E. J. et al. Prevalence and Development of Psychiatric Disorders in Childhood and Adolescence. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 837, ago. 2003.

CRESWELL, C.; WAITE, P.; COOPER, P. J. Assessment and management of anxiety disorders in children and adolescents. **Archives of Disease in Childhood**, v. 99, n. 7, p. 674–678, 2014.

CROCQ, M.-A. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 319–325, 2015.

DADDS, M. R. et al. Individual Differences in Childhood Behavior Disorders Associated With Epigenetic Modulation of the Cortisol Receptor Gene. **Child Development**, v. 86, n. 5, p. 1311–1320, 2015.

DANNLOWSKI, U. et al. Limbic scars: Long-term consequences of childhood maltreatment revealed by functional and structural magnetic resonance imaging. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 4, p. 286–293, 2012.

DASKALAKIS, N. P. et al. Early Life Stress Effects on Glucocorticoid—BDNF Interplay in the Hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. November, p. 68, 2015.

DAVIDSON, L. L. et al. A focus on adolescence to reduce neurological, mental health and substance-use disability. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. S161–S166, 2015.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

DERIJK, R. H. Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 5, p. 340–352, 2009.

DEYOUNG, C. G.; CICCETTI, D.; ROGOSCH, F. A. Moderation of the association between childhood maltreatment and neuroticism by the corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 52, n. 8, p. 898–906, 2011.

DIELEMAN, G. C. et al. Alterations in HPA-axis and autonomic nervous system functioning in childhood anxiety disorders point to a chronic stress hypothesis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 135–150, 2015.

DOMSCHKE, K. et al. Monoamine oxidase A gene DNA hypomethylation - a risk factor for panic disorder? **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 15, n. 9, p. 1217–28, 2012.

DOMSCHKE, K. et al. Epigenetic signature of panic disorder: A role of glutamate decarboxylase 1 (GAD1) DNA hypomethylation? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 189–196, 2013.

DUMAN, E. A.; CANLI, T. Influence of life stress, 5-HTTLPR genotype, and SLC6A4 methylation on gene expression and stress response in healthy Caucasian males. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 5, n. 1, p. 2, 2015.

DUNCAN, N. W. et al. Negative childhood experiences alter a prefrontal-insular-motor cortical network in healthy adults: A preliminary multimodal rsfMRI-fMRI-MRS-dMRI study. **Human Brain Mapping**, v. 4637, n. August, p. 4622–4637, 2015.

DVIR, Y. et al. Childhood maltreatment, emotional dysregulation, and psychiatric comorbidities. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 18, n. 3, p. 283–287, 2011.

EILAND, L.; ROMEO, R. D. Stress and the developing adolescent brain. **Neuroscience**, v. 249, p. 162–171, 2013.

ELFVING, B.; PLOUGMANN, P. H.; WEGENER, G. Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: Pitfalls and solutions. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 187, n. 1, p. 73–77, 2010.

ESLER, M. et al. The neuronal noradrenaline transporter, anxiety and cardiovascular disease. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 20, n. 4 Suppl, p. 60–66, 2006.

ESLER, M. et al. Parallel Influences of Stress and Epigenetics in Essential Hypertension and Panic Disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, n. 1, p. 338–348, 2008.

FARAVELLI, C. et al. The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 5663–5674, 2012.

FLEITLICH-BILYK, B.; GOODMAN, R. Prevalence of Child and Adolescent Psychiatric Disorders in Southeast Brazil. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 43, n. 6, p. 727–734, 2004.

- FLORES, S. M. et al. Dysfunctional family environments and childhood psychopathology: the role of psychiatric comorbidity. **Trends Psychiatry Psychother**, v. 36, n. 3, p. 147–151, 2014.
- FRAGA, M. F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10604–10609, 2005.
- FRANKLIN, T. B. et al. Epigenetic Transmission of the Impact of Early Stress Across Generations. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 5, p. 408–415, 2010.
- FRANKLIN, T. B.; MANSUY, I. M. The prevalence of epigenetic mechanisms in the regulation of cognitive functions and behaviour. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 4, p. 441–449, 2010.
- GEREZ, M. et al. The crossroads of anxiety: distinct neurophysiological maps for different symptomatic groups. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p. 159–175, 2016.
- GILLESPIE, C. F. et al. Risk and resilience: Genetic and environmental influences on development of the stress response. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 11, p. 984–992, 2009.
- GOSMANN, N. P. et al. Anxiety in childhood across the globe: findings from meta-regression analyses of the past 15 years (1998–2013). **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. Epub ahead, 2015.
- GOTTESMAN, I. I.; GOULD, T. D. The endophenotype concept in psychiatry: Etymology and strategic intentions. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 4, p. 636–645, 2003.
- GRAEFF, F. G. Ansiedade , pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 55 16, p. 3–6, 2007.
- GRASSI-OLIVEIRA, R. et al. Low Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor and Childhood Physical Neglect Are Associated with Verbal Memory Impairment in Major Depression—A Preliminary Report. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 281–285, 2008.
- HAMM, A. O. et al. Panic disorder with agoraphobia from a behavioral neuroscience perspective: Applying the research principles formulated by the Research Domain Criteria (RDoC) initiative. **Psychophysiology**, v. 53, n. 3, p. 312–322, 2016.
- HANSSON, A. C. et al. Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 2918–2934, 2000.
- HARRIS, A. P. et al. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 5, p. 648–658, 2013.
- HAUCK, S. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 3, p. 459–462, 2010.
- HEITLAND, I. et al. Human Fear Acquisition Deficits in Relation to Genetic Variants of the Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1 and the Serotonin Transporter. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2013.
- HEK, K. et al. Anxiety disorders and salivary cortisol levels in older adults : a population-based study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 2, p. 300–305, 2013.
- HENLEY, D. E.; LIGHTMAN, S. L. New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. **Neuroscience**, v. 180, p. 1–8, 2011.

HETTEMA, J. M. et al. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. **The American journal of psychiatry**, v. 158, n. 10, p. 1568–78, 2001.

HEYN, H. et al. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 10522–10527, 2012.

HILBERT, K.; LUEKEN, U.; BEESDO-BAUM, K. Neural structures, functioning and connectivity in Generalized Anxiety Disorder and interaction with neuroendocrine systems: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 158, p. 114–126, 2014.

HOFFMAN, D. L.; DUKES, E. M.; WITTCHEN, H.-U. HUMAN AND ECONOMIC BURDEN OF GENERALIZED ANXIETY DISORDER. **Depression and Anxiety**, v. 25, n. 72, p. 72–90, 2008.

HOLLIDAY, K. L. et al. Genetic variation in neuroendocrine genes associates with somatic symptoms in the general population: Results from the EPIFUND study. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 68, n. 5, p. 469–474, 2010.

HONG, E. P.; PARK, J. W. Sample Size and Statistical Power Calculation in Genetic Association Studies. **Genomics & Informatics**, v. 10, n. 2, p. 117, 2012.

HUH, H. J. et al. Childhood trauma and adult interpersonal relationship problems in patients with depression and anxiety disorders. **Annals of General Psychiatry**, v. 13, p. 26, 2014.

ILLINGWORTH, R. S.; BIRD, A. P. CpG islands—“A rough guide”. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1713–1720, 2009.

ISING, M. et al. Polymorphisms in the FKBP5 gene region modulate recovery from psychosocial stress in healthy controls. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 389–398, 2008.

ISING, M. et al. Stress response regulation in panic disorder. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 35, p. 5675–5684, 2012.

JABLONKA, E. V. A.; LAMB, M. J. The Changing Concept of Epigenetics. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 981, p. 82–96, 2002.

JACOBSON, L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: Neuropsychiatric aspects. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 2, p. 715–738, 2014.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–92, 2012.

KANATSOU, S. et al. Effects of Mineralocorticoid Receptor Overexpression on Anxiety and Memory after Early Life Stress in Female Mice. v. 9, n. January, p. 1–10, 2016.

KAUER-SANT’ANNA, M. et al. Traumatic life events in bipolar disorder: Impact on BDNF levels and psychopathology. **Bipolar Disorders, Supplement**, v. 9, n. 1, p. 128–135, 2007.

KECK, M. E. et al. Combined effects of exonic polymorphisms in CRHR1 and AVPR1B genes in a case/control study for panic disorder. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 147B, n. 7, p. 1196–1204, 2008.

KENDLER, K. S. What psychiatric genetics has taught us about the nature of psychiatric illness and what is left to learn. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 10, p. 1058–1066, 2013.

KENDLER, K. S.; GARDNER, C. O.; LICHTENSTEIN, P. A developmental twin study of symptoms

of anxiety and depression: evidence for genetic innovation and attenuation. **Psychological medicine**, v. 38, n. 11, p. 1567–75, 2008.

KLENGEL, T. et al. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 33–41, 2013.

KLENGEL, T. et al. The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders. **Neuropharmacology**, v. 80, p. 115–132, 2014.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 89–97, 2006.

KNIGHT, K. Inside JEB highlights the key developments in The Journal of Experimental Biology. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 1–5, 2015.

KOENEN, K. C. et al. SLC6A4 methylation modifies the effect of the number of traumatic events on risk for posttraumatic stress disorder. **Depression and anxiety**, v. 28, n. 8, p. 639–47, ago. 2011.

KUBOTA, T.; MIYAKE, K.; HIRASAWA, T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. **Clinical Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 1, 2012.

KUMSTA, R. et al. Cortisol and ACTH responses to psychosocial stress are modulated by corticosteroid binding globulin levels. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 8-10, p. 1153–1157, 2007.

KUPFER, D. J. Anxiety and DSM-5. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 245–246, 2015.

LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 4, p. 253–266, 2003.

LARYEA, G.; ARNETT, M. G.; MUGLIA, L. J. Behavioral Studies and Genetic Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Neurocircuitry: Insights into Human Psychiatric Disorders. **Behavioral Sciences**, v. 2, p. 135–171, 2012.

LAUCHT, M. et al. Interactive effects of corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene and childhood adversity on depressive symptoms in young adults: Findings from a longitudinal study. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 358–367, 2013.

LESZCZYŃSKA-RODZIEWICZ, A. et al. No association between polymorphisms and haplotypes of the AVPR1b, CRHR1 and NR3C1 genes and depression with melancholic features in the course of bipolar disorder. **Psychiatry Research**, v. 207, n. 1-2, p. 140–142, 2013.

LIAO, M. et al. Childhood Maltreatment Is Associated with Larger Left Thalamic Gray Matter Volume in Adolescents with Generalized Anxiety Disorder. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–8, 2013.

LIU, J. et al. A Study of the Influence of Sex on Genome Wide Methylation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10028, 2010.

LOTAN, A. et al. Neuroinformatic analyses of common and distinct genetic components associated with major neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. OCT, p. 1–15, 2014.

LOWE, R. et al. Buccals are likely to be a more informative surrogate tissue than blood for epigenome-wide association studies. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 4, p. 445–54, 2013.

- MAH, L.; SZABUNIEWICZ, C.; FIOCCO, A. J. Can anxiety damage the brain? **Curr Opin Psychiatry**, v. 29, n. 1, p. 56–63, 2016.
- MAOZ, K. et al. Subliminal attention bias modification training in socially anxious individuals. **Frontiers in human neuroscience**, v. 7, n. July, p. 389, 2013.
- MARTÍN-BLANCO, A. et al. An exploratory association study of the influence of noradrenergic genes and childhood trauma in Borderline Personality Disorder. **Psychiatry Research**, v. 229, n. 1-2 Epub ahead of print, p. 589–592, 2015.
- MARTINO, D. et al. Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance. **Genome biology**, v. 14, n. 5, p. R42, 2013.
- MARTINO, D. J. et al. Evidence for age-related and individual-specific changes in DNA methylation profile of mononuclear cells during early immune development in humans. **Epigenetics**, v. 6, n. 9, p. 1085–1094, 2011.
- MCGOWAN, P. O. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342–348, 2009.
- MCKNIGHT, P. E. et al. Anxiety Symptoms and Functional Impairment: A Systematic Review of the Correlation between the Two Measures. **Clinical Psychology Review**, v. Epub ahead, 2015.
- MINELLI, A. et al. Role of Allelic Variants of Fk506-Binding Protein 51 (Fkbp5) Gene in the Development of Anxiety Disorders. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 12, p. 1170–1176, 2013.
- MUHTZ, C. et al. Association of a common mineralocorticoid receptor gene polymorphism with salivary cortisol in healthy adults. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 2, p. 298–301, 2011.
- MURIS, P.; OLLENDICK, T. H. Children Who are Anxious in Silence: A Review on Selective Mutism, the New Anxiety Disorder in DSM-5. **Clinical Child and Family Psychology Review**, v. 18, n. 2, p. 151–169, 2015.
- MURPHY, T. M. et al. Anxiety is associated with higher levels of global DNA methylation and altered expression of epigenetic and interleukin-6 genes. **Psychiatric Genetics**, v. 25, n. 2, p. 71–78, 2015.
- NAUMOVA, O. Y. et al. Differential patterns of whole-genome DNA methylation in institutionalized children and children raised by their biological parents. **Development and Psychopathology**, v. 24, n. 01, p. 143–155, 2012.
- NAUMOVA, O. Y. et al. Epigenetic Patterns Modulate the Connection Between Developmental Dynamics of Parenting and Offspring Psychosocial Adjustment. **Child development**, v. 87, n. 1, p. 98–110, 2016.
- NEUMEISTER, A.; CORSI-TRAVALI, S.; GREEN, C. R. The Role of BDNF-TrkB Signaling in the Pathogenesis of PTSD. **Journal of Depression and Anxiety**, v. 006, n. S4, p. 1–6, 2013.
- NOBLE, D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 6, p. 816–818, 2015.
- NOLTE, T. et al. Interpersonal Stress Regulation and the Development of Anxiety Disorders: An Attachment-Based Developmental Framework. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, n. September, p. 1–21, 2011.

- NON, A. L. et al. Genome-wide DNA methylation in neonates exposed to maternal depression, anxiety, or SSRI medication during pregnancy. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 9, n. 7, p. 964–72, 2014.
- OBERLANDER, T. F. et al. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. **Epigenetics**, v. 3, n. 2, p. 97–106, 2008.
- OTOWA, T. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of anxiety disorders. **Molecular Psychiatry**, n. October 2015, p. 1–9, 2016.
- PAGLIACCIO, D. et al. HPA axis genetic variation, pubertal status, and sex interact to predict amygdala and hippocampus responses to negative emotional faces in school-age children. **NeuroImage**, v. 109, p. 1–11, 2015.
- PANEK, M. et al. Association analysis of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) haplotypes (ER22/23EK, N363S, BclI) with mood and anxiety disorders in patients with asthma. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, n. 2, p. 662–670, 2014.
- PÉREZ-EDGAR, K.; FOX, N. A. Temperament and Anxiety Disorders. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 14, n. 4, p. 681–706, 2005.
- PERROUD, N. et al. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. **Translational Psychiatry**, v. 1, n. 12, p. e59, 2011.
- PRENDERVILLE, J. A. et al. Adding fuel to the fire: The impact of stress on the ageing brain. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 1, p. 13–25, 2015.
- PROVENÇAL, N. et al. Differential DNA Methylation Regions in Cytokine and Transcription Factor Genomic Loci Associate with Childhood Physical Aggression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71691, 2013.
- PROVENÇAL, N.; BINDER, E. B. The effects of early life stress on the epigenome: From the womb to adulthood and even before. **Experimental Neurology**, v. 268, p. 10–20, 2015.
- PTAK, C.; PETRONIS, A. Epigenetic approaches to psychiatric disorders. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 25–35, 2010.
- PYNOOS, R. S.; STEINBERG, A. M.; PIACENTINI, J. C. A Developmental Psychopathology Model of Childhood Traumatic Stress and Intersection with Anxiety Disorders. **Society of Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1542–1554, 1999.
- RAABE, F. J.; SPENGLER, D. Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. **Frontiers in psychiatry**, v. 4, n. August, p. 80, 2013.
- RAPARIA, E. et al. Impact of childhood emotional abuse on neocortical neurometabolites and complex emotional processing in patients with generalized anxiety disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 190, p. 414–423, 2016.
- REDDINGTON, J. P.; PENNINGS, S.; MEEHAN, R. R. Non-canonical functions of the DNA methylome in gene regulation. **The Biochemical journal**, v. 451, p. 13–23, 2013.
- REUL, J. M. H. M.; HOLSBOER, F. On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 31–46, 2002.

- ROBERTS, S. et al. HPA axis related genes and response to psychological therapies: Genetics and Epigenetics. **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 12, p. 861–870, 2015.
- ROCKHILL, C. et al. Anxiety Disorders in Children and Adolescents. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 40, n. 4, p. 66–99, 2010.
- ROGERS, J. et al. CRHR1 genotypes, neural circuits and the diathesis for anxiety and depression. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 700–707, 2013.
- ROVARIS, D. L. et al. Corticosteroid receptor genes and childhood neglect influence susceptibility to crack/cocaine addiction and response to detoxification treatment. **Journal of psychiatric research**, v. 68, p. 83–90, 2015.
- SALUM, G. A. et al. The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 33, n. 2, p. 181–195, 2011.
- SALUM, G. A. A. et al. Pediatric anxiety disorders: from neuroscience to evidence-based clinical practice. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL. 1, p. S03–S21, 2013.
- SARTORIUS, A. et al. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. **Pharmacopsychiatry**, v. 42, n. 6, p. 270–276, 2009.
- SCHUEUR, S. et al. FKBP5 polymorphisms moderate the influence of adverse life events on the risk of anxiety and depressive disorders in preschool children. **Journal of Psychiatric Research**, v. 72, p. 30–36, 2016.
- SCHULTZ, M. D. et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 212–6, 2015.
- SHARMA, S. et al. Gene × Environment Determinants of Stress- and Anxiety-Related Disorders. **Annual Review of Psychology**, v. 67, n. 1, p. 239–261, 2016.
- SHEIKH, H. I. et al. Corticotropin-releasing hormone system polymorphisms are associated with children's cortisol reactivity. **Neuroscience**, v. 229, p. 1–11, 2013.
- SHIMADA-SUGIMOTO, M. et al. Immune-related pathways including HLA-DRB1*13:02 are associated with panic disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 46, n. January, p. 96–103, 2015.
- SHIMADA-SUGIMOTO, M.; OTOWA, T.; HETTEMA, J. M. Genetics of anxiety disorders: Genetic epidemiological and molecular studies in humans. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 69, n. 7, p. 388–401, 2015.
- SIMON, N. M. et al. Childhood maltreatment linked to greater symptom severity and poorer quality of life and function in social anxiety disorder. **Depress Anxiety**, v. 26, n. 11, p. 1027–1032, 2009.
- SIVUKHINA, E. V.; JIRIKOWSKI, G. F. Adrenal steroids in the brain: Role of the intrinsic expression of corticosteroid-binding globulin (CBG) in the stress response. **Steroids**, v. 81, p. 70–73, 2014.
- SLIEKER, R. C. et al. Identification and systematic annotation of tissue-specific differentially methylated regions using the Illumina 450k array. **Epigenetics & chromatin**, v. 6, n. 1, p. 26, 2013.
- SMOLLER, J. W.; BLOCK, S. R.; YOUNG, M. M. Genetics of anxiety disorders: The complex road from DSM to DNA. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 11, p. 965–975, 2009.

SOTNIKOV, S. V et al. Bidirectional rescue of extreme genetic predispositions to anxiety: impact of CRH receptor 1 as epigenetic plasticity gene in the amygdala. **Translational Psychiatry**, v. 4, n. 2, p. e359, 2014.

SPIJKER, A. T. et al. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor polymorphisms and clinical characteristics in bipolar disorder patients. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 10, p. 1460–1469, 2011.

STEIN, M. B.; SAREEN, J. Generalized Anxiety Disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 21, p. 2059–2068, 2015.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–50, 2005.

SZCZEPANKIEWICZ, A. et al. Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 134, n. 1-3, p. 138–144, 2011.

SZCZEPANKIEWICZ, A. et al. FKBP5 polymorphism is associated with major depression but not with bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 164, p. 33–7, 2014.

TALENS, R. P. et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: Cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, p. 694–703, 2012.

TEICHER, M. H. et al. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 33–44, 2003.

TEICHER, M. H.; ANDERSON, C. M.; POLCARI, A. Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 9, p. E563–72, 2012.

TOST, J. DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. **Molecular Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 71–81, 2010.

TYRKA, A. R. et al. Interaction of Childhood Maltreatment with the Corticotropin- Releasing Hormone Receptor Gene: Effects on HPA Axis Reactivity. **Biol Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 681–685, 2009.

TYRKA, A. R. et al. Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults. **PLoS one**, v. 7, n. 1, p. e30148, 2012.

TYRKA, A. R. et al. Epigenetic Vestiges of Early Developmental Adversity: Childhood Stress Exposure and DNA Methylation in Adolescence. **Child Dev.**, v. 84, n. 1, p. 58–75, 2013.

TYRKA, A. R. et al. Childhood maltreatment and methylation of FK506 binding protein 5 gene (FKBP5). **Development and Psychopathology**, v. 27, n. 4pt2, p. 1637–1645, 2015.

UDDIN, M. et al. Epigenetic and immune function profiles associated with posttraumatic stress disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9470–9475, 2010.

VAN DER DOELEN, R. H. A. et al. Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact to affect DNA methylation of the corticotropin-releasing factor gene promoter region in the adult rat brain. **Development and Psychopathology**, v. 27, n. 01, p. 123–135, 2015.

VAN DONGEN, J. et al. Epigenetic variation in monozygotic twins: A genome-wide analysis of DNA

methylation in buccal cells. **Genes**, v. 5, n. 2, p. 347–365, 2014.

VAN IJZENDOORN, M. H. et al. Methylation Matters: Interaction Between Methylation Density and Serotonin Transporter Genotype Predicts Unresolved Loss or Trauma. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 5, p. 405–407, 2010.

VAN LEEUWEN, N. et al. Functional mineralocorticoid receptor (MR) gene variation influences the cortisol awakening response after dexamethasone. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 339–349, 2010.

VAN LEEUWEN, N. et al. Human mineralocorticoid receptor (MR) gene haplotypes modulate MR expression and transactivation: Implication for the stress response. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 5, p. 699–709, 2011.

VAN ROSSUM, E. F. C.; VAN DEN AKKER, E. L. T. Glucocorticoid resistance. **Endocrine Development**, v. 20, n. March, p. 127–136, 2011.

VINKERS, C. H. et al. Mineralocorticoid receptor haplotypes sex-dependently moderate depression susceptibility following childhood maltreatment. **Psychoneuroendocrinology**, v. 54, p. 90–102, 2015.

VOGEL, S. et al. Cognitive Adaptation under Stress: A Case for the Mineralocorticoid Receptor. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 20, n. 3, p. 192–203, 2016.

VREEBURG, S. A. et al. Salivary Cortisol Levels in Persons With and Without Different Anxiety Disorders. **Psychosomatic Medicine**, v. 72, p. 340–347, 2010.

WANG, D. et al. Individual variation and longitudinal pattern of genome-wide DNA methylation from birth to the first two years of life. **Epigenetics**, v. 7, n. 6, p. 594–605, 2012.

WILLOUR, V. L. et al. Family-based association of FKBP5 in bipolar disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 3, p. 261–268, 2009.

WOCHNIK, G. M. et al. FK506-binding Proteins 51 and 52 Differentially Regulate Dynein Interaction and Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor in Mammalian Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4609–4616, 2005.

WONG, C. C. Y. et al. A longitudinal study of epigenetic variation in twins. **Epigenetics**, v. 5, n. 6, p. 516–526, 2010.

WONG, Q. J. J.; GREGORY, B.; MCLELLAN, L. F. A Review of Scales to Measure Social Anxiety Disorder in Clinical and Epidemiological Studies. **Curr Psychiatry**, v. In Process, 2016.

YANG, B.-Z. et al. Child abuse and epigenetic mechanisms of disease risk. **American journal of preventive medicine**, v. 44, n. 2, p. 101–7, 2013.

YEHUDA, R. et al. Lower Methylation of Glucocorticoid Receptor Gene Promoter 1F in Peripheral Blood of Veterans with Posttraumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 4, p. 356–364, 2014.

YEHUDA, R.; BIERER, L. M. The Relevance of Epigenetics to PTSD: Implications for the DSM-V. **Journal of traumatic stress**, v. 22, n. 5, p. 427–434, 2009.

YOUNG, S. E. et al. Sibling-based association analyses of the serotonin transporter polymorphism and internalizing behavior problems in children. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 44, n. 7, p. 961–7, out. 2003.

ZANNAS, A. S.; BINDER, E. B. Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: Sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. **Genes, Brain and Behavior**, v. 13, n. 1, p. 25–37, 2014.

ZHANG, T.-Y.; MEANEY, M. J. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. **Annual review of psychology**, v. 61, p. 439–466, C1–C3, 2010.

ZIEGLER, C. et al. Oxytocin Receptor Gene Methylation: Converging Multilevel Evidence for a Role in Social Anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 6, p. 1528–1538, 2015.

ANEXO 1



ANEXO 2

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos publicados:

- **Mineralocorticoid receptor genotype moderates the association between physical neglect and serum BDNF**

Autores: Andressa Bortoluzzi; Giovanni Abrahão Salum; Carolina Blaya; Patrícia Pelufo Silveira; Rodrigo Grassi-Oliveira; Eduarda Dias da Rosa; Bianca Wollenhaupt de Aguiar; Laura Stertz; Vera Lúcia Bosa; Ilaine Schuch; Marcelo Goldani; Flavio Kapczinski; Sandra Leistner-Segal e Gisele Gus Manfro

Revista: *Journal of Psychiatric Research*, v. 59, p. 8-13

Ano de publicação: 2014

- **What the HPA axis-linked genes tell us about Anxiety Disorders in adolescents?**

Autores: Andressa Bortoluzzi; Carolina Blaya; Eduarda Dias da Rosa; Mariana Paim; Virgínia Rosa; Sandra Leistner-Segal e Gisele Gus Manfro

Revista: *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, v. 37(4), p. 232-237

Ano de publicação: 2015

- **Impulsivity-based thrifty eating phenotype and the protective role of n-3 PUFAs intake in adolescents.**

Autores: Roberta Sena Reis, Roberta Dalle Molle, Tânia Diniz Machado, Amanda Brondani Mucellini, Danitsa Marcos Rodrigues, Andressa Bortoluzzi, Solange Mara Bigonha, Rudineia Toazza, Giovanni Abrahão Salum, Luciano Minuzzi, Augusto Buchweitz, Alexandre Franco, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio, Gisele Gus Manfro e Patrícia Pelufo Silveira

Revista: *Translational Psychiatry*

Ano de publicação: 2016

Artigos submetidos:

- **Increased levels of il-6 in panic disorder: evidence for a dose-response relationship**

Autores: Cristiano Tschiedel Belem da Silva, Marianna Costa, Andressa Bortoluzzi, Bianca Pfaffenseller, Flávia Vedana, Flávio Kapczinski e Gisele Gus Manfro

Revista: *Psychosomatic Medicine*

Ano de submissão: 2015

- **Interaction between stress responsiveness and insulin sensitivity on eating behavior in adolescents**

Autores: Natasha Kim Fonseca; Tania Machado; Roberta Dalle Molle; Roberta S. Reis; Amanda Brondani Mucelini; Danitsa M.Rodrigues; Rudineia Toazza; Andressa Bortoluzzi; Gisele Gus Manfro e Patrícia Pelufo Silveira

Revista: *Stress and Health*

Ano de submissão: 2016

- **Intrauterine growth programming of adolescent feeding behavior and related brain mechanisms**

Autores: Roberta Dalle Molle; Luciano Minuzzi; Tania Diniz Machado; Roberta Sena Reis; Danitsa Marcos Rodrigues; Amanda Brondani Mucellini; Alexandre Rosa Franco; Augusto Buchweitz; Andressa Bortoluzzi; Gisele Gus Manfro e Patrícia Pelufo Silveira

Revista: *Nature Neuroscience*

Ano de submissão: 2015

ANEXO 3

**CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL
DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 120254

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadoras:

GISELE GUS MANFRO
PATRICIA PELUFO SILVEIRA
GIOVANNI ABRAHAO SALUM JUNIOR
ROBERTA DALLI MOLLE
RAFAELA BEHS JARROB
VERA LUCIA BOSA
ANDRESSA BORTOLUZZI
DIOGO ARAÚJO DE SOUSA
NATAN PEREIRA GOSMANN

Título: Restrição do crescimento intra-uterino e trajetória desenvolvimental de adolescentes e adultos com e sem transtorno de ansiedade: desfechos em saúde mental, nutricional, epigenéticos, biomarcadores e de neuroimagem funcional

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 08 de novembro de 2012.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES DO PROJETO ORIGINAL (12.0254)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(OBRIGATÓRIO PARA PESQUISAS CIENTÍFICAS EM SERES HUMANOS - RESOLUÇÃO Nº 196 - CNS)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:..... TELEFONE:(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

“Restrição do crescimento intra-uterino e trajetória desenvolvimental de adolescentes e adultos com e sem transtorno de ansiedade: desfechos em saúde mental, nutricional, epigenéticos, biomarcadores e de neuroimagem funcional”

2. Pesquisadores responsáveis: Gisele Gus Manfro e Patrícia Pelufo Silveira

CARGO/FUNÇÃO: Professora da Faculdade de Medicina/ Professora da Faculdade de Medicina

UNIDADE: Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenadora do PROTAIA/Departamento de Pediatria e Puericultura

Pesquisadores executantes: Andressa Bortoluzzi, Diogo Souza, Giovanni Abrahão Salum Júnior, Rafaela Behs Jarros, Roberta Dalle Molle, Rudineia Toazza e Natan Pereira Gosmann

3. Avaliação do risco da pesquisa: () risco mínimo (x) risco baixo () risco médio () risco maior

4. Duração da pesquisa: A duração total deste projeto é prevista em 1,5 anos.

5. Justificativa e objetivos

Os transtornos de ansiedade são transtornos com início na infância, com curso crônico e grave e podem estar associados aos hábitos alimentares. Considerando a alta prevalência de restrição de crescimento intra-uterino na nossa população (10-15%) e a maior susceptibilidade a doenças tanto metabólicas quanto psiquiátricas nestes indivíduos, há

necessidade de maior entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos nas alterações de comportamento alimentar e desenvolvimento/curso de alguns transtornos psiquiátricos e também na relação entre ambos, a fim de propiciar tanto um manejo mais eficiente dessas patologias, quanto potenciais propostas de prevenção através de intervenções precoces. O objetivo desse trabalho é investigar se a restrição do crescimento intra-uterino está associada a desvios na trajetória desenvolvimental de adolescentes e adultos com ou sem transtorno de ansiedade investigando associações com: (1) curso dos transtornos de ansiedade; (2) curso do comportamento alimentar e dos indicadores de composição corporal; (3) modificações no padrão de metilação do DNA e (4) desfechos em neuroimagem funcional.

6. Procedimentos

Procedimentos para seleção de sujeitos que vão entrar na pesquisa:

Se você der sua autorização para participar da pesquisa juntamente com seu filho vocês serão convidados a participar de:

(1) Avaliação diagnóstica psiquiátrica: com duração de 1h30min, vocês irão preencher alguns questionários sobre os próprios sentimentos e comportamentos no dia-a-dia e a forma como sua família se relaciona. É possível que vocês se sintam cansados constrangidos por ter que responder coisas sobre aspectos emocionais.

(2) Avaliação Neuropsicológica: você realizará algumas atividades como contar números e completar figuras, ou seja, atividades escolares comuns.

(3) Avaliação Nutricional: será feita uma avaliação antropométrica e avaliação do comportamento alimentar ou seja, serão feitos questionamentos sobre seus hábitos alimentares, você será pesado, medido e avaliado quanto a sua composição corporal.

(4) Extração de DNA: será feita uma coleta de saliva para que possamos avaliar marcadores biológicos ou seja, marcadores no seu organismo que possam ter alguma associação com os transtornos de ansiedade.

(5) Avaliação com neuroimagem funcional: você fará um exame em uma máquina de ressonância magnética funcional onde você ficará por aproximadamente 40 minutos e realizará algumas tarefas simples dentro dela

7. Riscos e inconveniências

As tarefas a serem realizadas para a conclusão deste projeto possuem alguns riscos e inconveniências para o participante.

Lembramos que os participantes podem ficar cansados com o preenchimento dos diversos questionários, já que são diversos questionários. Também podem se sentir ansiosos ou constrangidos por responderem perguntas sobre os próprios sentimentos e comportamentos no dia-a-dia, pois os conteúdos envolvem emoções, hábitos alimentares e de atividade física que podem ser desagradáveis. Tentaremos minimizar estes possíveis efeitos utilizando avaliadores treinados e instrumentos curtos. As tagagens não oferecem nenhum risco para você ou seu filho. O exame de neuroimagem funcional é um exame que não oferece riscos, porém é um pouco barulhento, pode ser que você se incomode com os ruídos e se sinta desconfortável em ficar deitado no tempo do exame. Você terá que se deslocar de sua casa por duas ou três vezes para que as coletas e o exame possam ser feitos.

8. Potenciais benefícios

- Avaliação clínica e neuropsicológica estruturada dos participantes incluídos;
- Maior conhecimento acerca dos transtornos de ansiedade na infância e adolescência;
- Maior conhecimento acerca do seu consumo alimentar bem como sua composição corporal;
- Maior conhecimento de como seu cérebro funciona durante a realização de algumas tarefas.

Gostaríamos ainda de deixá-lo ciente dos seguintes direito que você terá:

- a) **Garantia do uso dos dados colhidos apenas para a finalidade especificada nesse estudo:** Os dados obtidos somente serão usados para o fim previsto neste projeto de pesquisa e qualquer outro uso terá que se solicitar o seu consentimento.
- b) **Sigilo e privacidade:** As informações produzidas nesta tarefa serão mantidas em lugar seguro, codificadas e a identificação só poderá ser realizada pelo pessoal envolvido diretamente com o projeto. Caso o material venha a ser utilizado para publicação científica ou atividades didáticas, não serão utilizados nomes que possam vir a identificá-lo.
- c) **Direito a informação:** Em qualquer momento do estudo você poderá obter mais informações com a Prof. Dra. **Gisele Gus Manfro** e/ou Prof. Dra. **Patrícia Pelufo** pelo telefone (0XX51) 3358-8983 ou (0XX51) 3359-8019, que estarão aptas a solucionar suas dúvidas. Você poderá solicitar informações de qualquer conhecimento significativo descoberto durante este projeto.
- d) **Direito de informação sobre aspectos éticos da pesquisa:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – localizado no Hospital de Clínicas, no 2º andar, sala 2227, com horário de atendimento das 8h às 17h, Fone/Fax: 51 3359-7640
- e) **Despesas e compensações:** Não há despesas pessoais, ou seja, não será cobrado nada do participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira ou qualquer tipo de pagamento relacionado à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será custeada pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

- f) **Direito a assistência em caso de intercorrências e durante o estudo:** durante todo o estudo e após o seu término você poderá comunicar e pedir assistência por danos relacionados ao estudo, ficando a sua disposição os pesquisadores executantes para qualquer eventualidade. Podendo entrar em contato pelo telefone (0XX51) 3358-8983.
- g) **Direito a não participar ou interromper sua participação no estudo:** Você tem liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- h) **Garantia de assistência e de continuidade do tratamento:** Você será devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de sua participação no projeto, bem como será encaminhado para a rede de assistência a saúde na ocasião de necessidade de cuidados adicionais.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Restrição do crescimento intra-uterino e trajetória desenvolvimental de adolescentes e adultos com e sem transtorno de ansiedade: desfechos em saúde mental, nutricional, epigenéticos, biomarcadores e de neuroimagem funcional”

Eu discuti com a Prof. Dra. **Gisele Gus Manfro** e/ou Prof. Dra. **Patrícia Pelufo Silveira** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente na minha participação e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente (criança – caso mesmo possa fazê-la)

Data ____/____/____

Data ____/____/____

Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____