

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**AÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 SOBRE A  
FUNÇÃO EXECUTIVA – IDENTIFICANDO SUSCETIBILIDADES COM BASE  
NO AMBIENTE PERINATAL E NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA**

Danitsa Marcos Rodrigues

Porto Alegre, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

AÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 SOBRE A  
FUNÇÃO EXECUTIVA– IDENTIFICANDO SUSCETIBILIDADES COM BASE NO  
AMBIENTE PERINATAL E NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Aluna: Danitsa Marcos Rodrigues  
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pelufo Silveira  
Co-orientadora: Profa. Dra. Gisele Gus Manfro

Porto Alegre, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

AÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 SOBRE A  
FUNÇÃO EXECUTIVA– IDENTIFICANDO SUSCETIBILIDADES COM BASE NO  
AMBIENTE PERINATAL E NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Aluna: Danitsa Marcos Rodrigues  
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pelufo Silveira  
Co-orientadora: Profa. Dra. Gisele Gus Manfro

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM: 03 de abril de 2020

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

A minha família, pela estrutura.

As minhas orientadoras e professores, pelo aprendizado.

A esta Universidade, pela oportunidade.

Aos órgãos financiadores de pesquisa, pelo suporte.

***“A experiência mais bela e profunda que um homem pode ter é o sentido do mistério. Ele é o princípio fundamental da religião, bem como de todo esforço sério em termos de arte e ciência. Parece-me que aquele que nunca teve essa experiência, se não está morto, pelo menos está cego.”***

***Albert Einstein***

Dedico esta tese a minha mãe,  
meu irmão,  
também ao meu pai e ao meu marido Paulo (*in memoriam*)  
e a minha filha Luiza.

***“The group consisting of mother, father, and child is the main  
educational agency of the mankind.”***

***Martin Luther King***

## RESUMO

A suscetibilidade diferencial genética sugere que indivíduos podem reagir de forma diversa aos ambientes, exibindo desde respostas não adaptativas quando expostos à adversidade, até um padrão fenotípico adaptativo quando em ambiente considerado benéfico. O sistema dopaminérgico tem sido associado à modulação da plasticidade de respostas frente à variação na qualidade ambiental. Os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3 PUFAs) modulam a neurotransmissão dopaminérgica, alterando a sensibilidade para recompensas no estriado, e o controle inibitório e a impulsividade no córtex pré-frontal, efeitos significativos em indivíduos expostos a adversidades precoces. As variantes genéticas humanas que participam da biossíntese e metabolismo dos n-3 PUFAs estão fortemente associadas a desfechos cardiometabólicos e neuropsiquiátricos. *PLIN4* é uma proteína da família PAT que atua no armazenamento de gotículas de lipídios. Uma de suas isoformas, codificada pelo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs8887, interage com os n-3 PUFAs, conferindo proteção sobre a obesidade para os portadores do alelo A desta variante. O gene *FADS1* também parece estar particularmente implicado em efeitos sobre os sistemas cardiovascular e neuropsiquiátrico, sendo algumas de suas variantes associadas ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) apenas em crianças expostas a insultos precoces. Neste trabalho, exploramos interações gene-ambiente através: 1- de uma revisão teórica da associação entre o consumo de n-3 PUFAs e exposição ao estresse precoce e seus efeitos sobre o neurodesenvolvimento, contido no capítulo 1; 2 - da análise da interação entre uma variante do gene *PLIN4* e a qualidade do ambiente fetal, representado pelo peso ao nascer, sobre o controle inibitório, em uma amostra de crianças (capítulo 2); 3 - da elaboração de escores de expressão poligênica da rede do gene *FADS1* e medidas de variação da qualidade do ambiente perinatal sobre fenótipos ligados ao controle de impulsos em duas coortes de crianças (capítulo 3).

**Objetivo geral:** Avaliar a interação entre fatores ambientais perinatais e genes envolvidos com a capacidade biossintética e com resposta celular e tecidual aos PUFAs sobre desfechos em saúde mental na infância. **Métodos: Capítulo 1** – Realizamos uma revisão não sistemática da literatura envolvendo o consumo de n-3 PUFAs, exposição ao estresse precoce e seus efeitos sobre o neurodesenvolvimento. **Capítulo 2** - Analisamos o genótipo e as respostas ao *Stop-Signal Reaction Time* (SSRT), que quantifica o controle inibitório, de 254 crianças de cinco anos de idade provenientes da coorte canadense intitulada *Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment* (MAVAN). **Capítulo 3**- Neste trabalho, utilizamos dados de duas coortes prospectivas de nascimentos. A partir da coorte principal MAVAN, analisamos dados de genotipagem e resultados do *Child behavior check list* (CBCL) e do *Information Sampling Task* (IST) de uma amostra de 135 crianças de 5 anos de idade. A coorte de comparação foi proveniente do projeto *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC), de onde extraímos a genotipagem e dados do *Strengths and Difficulties Questionnaire* (SDQ) de um total de 4223 crianças de 9 anos. Criamos um índice cumulativo de eventos pós-natais que incluiu muitos preditores estabelecidos de saúde e desenvolvimento infantil, incluindo risco para psicopatologia tardia. A exposição à adversidade e suporte pós-natal foram computados nas duas coortes comunitárias de nascimento, usando informações sobre saúde durante a gravidez, peso ao nascer, idade gestacional, renda, violência doméstica / abuso sexual, tensão conjugal, além de tabagismo, ansiedade e depressão maternas. Construímos também um escore genético baseado em genes co-expressos ao *FADS1* no córtex pré-frontal com ênfase em SNPs funcionalmente relevantes durante um determinado período etário. **Resultados: Capítulo 2**- Não houve diferenças significativas entre os indivíduos portadores do alelo A comparados aos não

carreadores quanto aos principais confundidores (peso ao nascer, idade gestacional, duração da amamentação, sexo, escolaridade e renda maternas, tabagismo na gestação e ingestão de n-3 PUFAs na infância). Houve uma interação significativa entre peso ao nascer e o SNP rs8887 do gene *PLIN4* na tarefa SSRT ( $p = 0,014$ ), em que baixo peso ao nascer associou-se com menor controle inibitório apenas nos indivíduos não carreadores do alelo A deste SNP ( $B = - 586,81$ ,  $\beta = -1,452$ ,  $t = 2,019$ ,  $p = 0,045$ ). **Capítulo 3-** Após controlar para comparações múltiplas, encontramos interações entre o escore genético e adversidade pós-natal para o domínio que avaliava TDAH no CBCL e impulsividade reflexiva no IST da coorte MAVAN e para o domínio hiperatividade no SDQ da coorte ALSPAC. **Conclusão:** Nossos achados demonstraram que tanto influências ambientais quanto genéticas participam na neuroplasticidade, através de efeitos interativos entre adversidades precoces e variantes ou redes gênicas relacionadas aos n-3 PUFAs atuando sobre a função executiva. Especificamente pudemos demonstrar que uma variante do gene *PLIN4* interage com o peso ao nascer predizendo variações no controle inibitório em crianças. Além disso, utilizando preditores mais robustos em duas populações diferentes, encontramos interações gene-ambiente semelhantes, onde escores que combinaram exposições adversas pós-natais interagiram com o contexto genético, predizendo risco para psicopatologia relacionada ao TDAH. A partir destes resultados, sugere-se a implementação de medidas preventivas e psicoeducacionais focadas na qualidade do ambiente e do vínculo, através do estímulo do consumo de alimentos ricos em n-3 PUFAs e do favorecimento de programas de promoção da saúde da criança e da família.

**Palavras-chave:** n-3 PUFAs, restrição de crescimento intrauterino, controle inibitório, impulsividade, escore genético poligênico baseado em expressão, escore ambiental



## ABSTRACT

Genetic differential susceptibility suggests that individuals can react differently to environments, ranging from non-adaptive responses when exposed to adversity to an adaptive phenotypic pattern when raised in a considered positive environment. The dopaminergic system has been associated with this plasticity in response to environmental quality. Omega 3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) modulate dopaminergic neurotransmission, altering the sensitivity for rewards in the striatal region and impulsivity and inhibitory control in the prefrontal cortex (PFC), particularly in individuals exposed to early life adversity. Interestingly, human genetic variants that participate in n-3 PUFA biosynthesis and metabolism are strongly associated with cardiometabolic and neuropsychiatric outcomes. *PLIN4* is a protein belonging to the PAT family that acts in the storage of lipid droplets. One of the isoforms of human protein *PLIN4*, encoded by the rs8887 single nucleotide polymorphism (SNP), interacts with n-3 PUFAs conferring a protective effect on obesity. This interaction is dependent on the presence of the A allele of the rs8887 SNP of the *PLIN4* gene. The *FADS1* gene also appears to be implicated in effects on the cardiovascular and neuropsychiatric system, with some of its variants associated with the attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) only for individuals exposed to perinatal insults. Here, we explore gene-environment interactions through: **Chapter 1**- a review of the association between n-3 PUFA consumption, stress exposure and its effects on neurodevelopment; **Chapter 2** - the analysis of the interaction between a *PLIN4* gene variant and the quality of the early environment on inhibitory control in a children sample; **Chapter 3**- the elaboration of polygenic co-expression score of the *FADS1* gene network and measures of variation in the quality of the perinatal environment on impulse control-related phenotypes in two samples. **General Objective:** To evaluate the interaction between perinatal environmental factors and genes involved with biosynthetic capacity and with cellular and tissue response to PUFAs on childhood mental health outcomes. **Methods:** Chapter 1 – We performed a non-systematic literature review involving the consumption of n-3 PUFAs, exposure to early stress and its effects on neurodevelopment. Chapter 2 - We analyzed the genotype and responses to the *Stop-Signal Reaction Time* (SSRT) task, which quantifies the inhibitory control, of 254 five-year-old children from the Canadian cohort entitled *Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment* (MAVAN). Chapter 3- In this work, we used data from two prospective birth cohorts. From the main MAVAN cohort, we analyzed genotyping data and results from the *Child behavior check list* (CBCL) and the *Information Sampling Task* (IST) from a sample of 135 five-year-old children. The comparison cohort came from the *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* project (ALSPAC), from which we extracted the genotyping and data from the *Strengths and Difficulties Questionnaire* (SDQ) of a total of 4223 nine-year-old children. We created a cumulative index of postnatal events that included many established individual predictors of child health and development, including the risk of later psychopathology. Exposure to adversity and postnatal support were computed in the two community birth cohorts, using information on health during pregnancy, birth weight, gestational age, income, domestic violence / sexual abuse, marital tension, in addition to smoking, anxiety and maternal depression. We also constructed a genetic score based on co-expressed to *FADS1* genes in the prefrontal cortex with an emphasis on functionally relevant SNPs during a given age period. **Results:** Chapter 2- There were no significant differences between carriers compared to non-carriers of the allele A in the main confounders (birth weight, gestational age, breastfeeding duration, sex, education and

maternal income, smoking during pregnancy and n-3 PUFAs in childhood). There was a significant interaction between birth weight and SNP rs8887 of the *PLIN4* gene in the SSRTs task ( $p = 0.014$ ), in which low birth weight was associated with less inhibitory control only in non-A allele-carriers individuals of this SNP ( $B = -586.81$ ,  $\beta = -1.452$ ,  $t = 2.019$ ,  $p = 0.045$ ), which have lower tissue sensitivity to n-3 PUFAs. Chapter 3- After controlling for multiple comparisons, we found interactions between genetic score and postnatal adversity for the domain that evaluated ADHD in the CBCL and reflexive impulsivity in the IST of the MAVAN cohort and for the hyperactivity domain in the SDQ of the ALSPAC cohort. Conclusion: Our findings demonstrated that both environmental and genetic influences participate in neuroplasticity, through interactive effects between early adversities and gene networks related to n-3 PUFAs acting on the executive function. Specifically, we were able to demonstrate that a variant of the *PLIN4* gene interacts with birth weight, predicting variations in inhibitory control in children. In addition, using more robust predictors in two different populations, we found similar gene-environment interactions, where scores that combined adverse postnatal exposures interacted with the genetic context, predicting risk for ADHD-related psychopathology. Based on these results, we suggest preventive and psychoeducational measures focused on the quality of the environment and the bond, encouraging the consumption of foods rich in n-3 PUFAs and favoring programs to promote the health of the child and the family.

**Keywords:** n-3 PUFAs, intrauterine growth restriction, inhibitory control, impulsivity, expression based-polygenic genetic score, environmental score

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC: Córtex cingulado anterior

ADHD: Attention deficit hyperactivity disorder

ALA: Ácido  $\alpha$ -linolênico

ALSPAC: *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children*

APOE: Apolipoproteína E

ARA: Ácido araquidônico

ARC: Núcleo arqueado

BDI: Inventário de Depressão de Beck

BHE: Barreira hemato-encefálica

BWR: *Birth weight ratio*

CANTAB: Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery

CBCL: *Child behavior check list*

CCA: Córtex cingulado anterior

COF: Córtex órbito-frontal

CPF: Córtex pré-frontal

CPFvl: Córtex pré-frontal ventro-lateral

CPFvm: Córtex pré-frontal ventro-medial

DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis

DHA: Ácido docosaenoico

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DOHaD: Origens Desenvolvimentais da Saúde e da Doença (do inglês, *developmental origins of health and disease*)

ePRS: escore genético poligênico baseado em expressão (do inglês, *expression based-polygenic genetic score*)

EFA: Ácido graxo essencial (do inglês, *essential fatty acids*)

EP: Erro padrão da média

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FA: Ácido graxo (do inglês, *Fatty acids*)

EPDS: *Edinburgh Postnatal Depression Scale*

FAD: *Family Assessment Device*

FADS 1-2: Gene da dessaturase do ácido graxo (do inglês, *Fatty acid desaturase gene 1-2*)

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FE: Função executiva

G X A: Interações entre gene e ambiente

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

GPCR: Receptor acoplado à proteína G

GWAS: Estudo de associação de varredura genômica ampla (do inglês, *genome-wide associations study*)

HHA: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

IFN - $\gamma$ : Interferon gama

IL -1: Interleucina 1

IL-1AR: Antagonista do receptor de interleucina 1

IL-1 $\beta$ : Interleucina beta

IL: Interleucina

IST: *Information Sampling Task*

Kb: Quilobase

LA: Ácido linoleico

LC-PUFA: Ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (do inglês, *Long chain Polyunsaturated fatty acid*)

MAVAN: *Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment*

MSDD: Moléculas de sinalização derivadas da dieta

NAc: Núcleo accumbens

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

Nur77: Fator de crescimento neural 1B

Nurr1: Proteína 1 relacionada ao receptor nuclear

PRS: Escore de risco poligênico (do inglês, *polygenic risk score*)

PSRP: *Preschool Separation – Reunion Procedure*

PUFA: Ácido graxo poli-insaturado (do inglês, *Polyunsaturated fatty acid*)

RCIU: Restrição de crescimento intrauterino

RNA: Ácido ribonucleico

RTCA: Resposta transcricional conservada à adversidade

SDQ: *Strengths and Difficulties Questionnaire*

SNC: Sistema nervoso central

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

SNS: Sistema nervoso simpático

SSRT: *Stop-signal reaction time*

STAI: *State-Trait Anxiety Inventory*

TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TGs: Triglicérides

TNF: Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

TPH2: Triptofano hidroxilase 2

VLDL: Proteína de muito baixa densidade (do inglês, *very low density lipid*)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação dos domínios iniciais do desenvolvimento .....	22
Figura 2. Estrutura química de dois importantes n-3 PUFAs, ácido docosaexaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA).....	25
Figura 3: Ação do EPA e DHA nas células.....	30
Figura 4. Síntese de PUFAs no fígado.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recomendações de ingestão de ácidos graxos durante a gravidez e amamentação segundo a FAO/WHO .....	26
Tabela 2. Recomendações de ingestão de ácidos graxos para lactentes (0-24 meses) e crianças e adolescentes (02-18 anos) .....	27
Tabela 3. Áreas Cerebrais envolvidas no comportamento social.....	34
Tabela 4. Áreas cerebrais envolvidas em funções cognitivas.....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Mecanismos de vulnerabilidade durante neurodesenvolvimento.....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Ambiente precoce: apego e cuidado.....	23
2.1.2 Ambiente precoce: ácidos graxos na gestação e lactação e os efeitos sobre o lactente.....	25
2.1.3 Ambiente precoce: ácidos graxos e o efeito no sistema nervoso central.....	27
<b>2.2 Metabolismo de ácidos graxos.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Biossíntese de ácidos graxos.....	31
2.2.2 Ácidos Graxos e genética.....	32
<b>2.3 Funções executivas.....</b>	<b>34</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
4.2.1 Capítulo 1- Artigo 1.....	37
4.2.2 Capítulo 2- Artigo 2.....	37
4.2.3 Capítulo 3- Estudo 3.....	37
<b>5 HIPÓTESES.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 HIPÓTESE GERAL.....</b>	<b>38</b>
5.2 Capítulo 1- Artigo 1.....	38
5.3 Capítulo 2- Artigo 2.....	38
5.4 Capítulo 3- Estudo 3.....	38



<b>6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>39</b>
<b>7 MÉTODOS E RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>7.1 Capítulo 1- Artigo 1.....</b>	<b>41</b>
<i>Neurodevelopmental and Behavioral Effects of Variations in Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Levels in Vulnerable Populations</i>	
<b>7.2 Capítulo 2- Artigo 2.....</b>	<b>69</b>
<i>Moderating Effect of Plin4 Genetic Variant on Impulsivity Traits in 5-Year-Old-Children Born Small for Gestational Age</i>	
<b>7.3 Capítulo 3- Estudo 3.....</b>	<b>94</b>
<i>Escore poligênico baseado na expressão gênica, qualidade ambiental precoce e impulsividade/TDAH na infância</i>	
<b>8 DISCUSSÃO.....</b>	<b>128</b>
<b>9 CONCLUSÃO.....</b>	<b>137</b>
<b>10 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>138</b>
<b>11 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Evidências crescentes sugerem que vários transtornos mentais, embora mostrem uma predisposição genética subjacente (1), são provavelmente a resultante de interações entre suscetibilidade genética e fatores ambientais (2), dos quais uma nutrição inadequada pode ser um dos componentes (3, 4). Entre os nutrientes que têm demonstrado consistentemente relação com a saúde mental e com diferentes distúrbios neuropsiquiátricos, estão os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3 PUFAs) (5). Conceitualmente, distúrbios complexos refletem interações heterogêneas entre múltiplas influências genéticas e ambientais. Polimorfismos do complexo dos genes *FADS*, funcionalmente associados a diferenças no metabolismo lipídico, predizem desfechos comportamentais em crianças (6), podendo apresentar efeitos interativos com o ambiente. Também a qualidade do desenvolvimento fetal informa sobre o risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), evidenciado através dos efeitos da restrição de crescimento intrauterino (RCIU) ao longo da vida (7-11). Assim, tanto variantes genéticas quanto componentes ambientais contribuem para o risco de doenças, de forma isolada ou associada, sendo um desafio identificar a participação e a interação destes diferentes fatores.

O período de pico de crescimento encefálico ocorre durante o último trimestre da gravidez (12, 13), quando também ocorre um rápido acúmulo de n-3 PUFAs nos tecidos neurais (14, 15). Nesta fase, há um intenso crescimento dos lobos frontais e do hipocampo, áreas responsáveis por habilidades cognitivas conhecidas como funções executivas (12, 13, 16). Os PUFAs, tanto ômega 3 quanto ômega 6, são componentes indispensáveis das membranas neuronais e modulam a integridade, a fluidez e a função das proteínas de membrana. Além disso, os PUFAs também atuam como segundos mensageiros nas vias de sinalização intracelular, regulam a transcrição e expressão gênica, participam da neurogênese, neuroproteção e neurotransmissão, servindo também como precursores na síntese de eicosanoides e docosanoïdes (17). Estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram uma relação entre o conteúdo tecidual de PUFAs com o desenvolvimento cognitivo e motor e, conseqüentemente, com a saúde mental (18-20). Evidências a partir de modelos experimentais e clínicos também mostraram que a redução da ingestão materna de n-3 PUFAs levou ao desenvolvimento e funcionamento aberrantes do sistema nervoso central (SNC), com redução na concentração neural tecidual de ácido docosaenoico (DHA) e déficits em tarefas cognitivas (12, 16, 21). Outras pesquisas evidenciaram que uma combinação entre

deficiência nutricional e determinadas formas de insultos precoces são preditores de modificações cognitivo-comportamentais na infância e alterações metabólicas na idade adulta (22), sugerindo que estressores ambientais atuam de forma aditiva e cumulativa sobre a matriz do desenvolvimento. Estudos que utilizaram o modelo de RCIU como marcador de estresse metabólico crônico reforçaram os achados da associação entre desinibição comportamental e baixo peso ao nascer (23-25). Interessantemente, a ingestão espontânea de n-3 PUFAs em indivíduos expostos à RCIU revelou um efeito protetor sobre preferências alimentares (26, 27), sugerindo a existência de mecanismos regulatórios centrais implicados na tomada de decisão. A partir destes dados, é possível inferir que estressores precoces aumentem a vulnerabilidade neurocomportamental e metabólica à deficiência dos n-3 PUFAs durante o desenvolvimento.

Uma vez que tanto sinais do ambiente perinatal quanto aspectos intrínsecos individuais parecem atuar sobre o crescimento fetal, modulando a diferenciação e o crescimento tecidual e predispondo a desfechos tardios, buscamos neste trabalho estudar a interação entre eventos ambientais precoces e fatores genéticos ligados aos PUFAs sobre fenótipos intermediários de impulsividade e controle inibitório. Partindo desta abordagem que integra a combinação entre fatores intrínsecos (neurobiológicos) e ambientais (psicossociais) como variáveis que participam na produção de fenótipos e na formação do chamado cérebro social, este trabalho pretende explorar interações entre o ambiente intrauterino, o ambiente pós-natal precoce e componentes genéticos (gene candidatos e escores genéticos) relacionados com os n-3 PUFAs sobre desfechos em função executiva.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Estudos vem apontando para a importância do desenvolvimento inicial sobre a capacidade de adaptação, resposta ao estresse e saúde mental, com implicações em desfechos ao longo da vida (28-32). Os modelos recentes de adaptação, vulnerabilidade e resiliência se concentraram não apenas nos mecanismos de regulação do estresse, mas também nos processos de plasticidade cerebral ao longo do tempo, nos quais a doença pode ser interpretada como falha na capacidade de reparo e homeostase (33). O modelo de investigação integrado denominado Origens Desenvolvimentais da Saúde e da Doença (do inglês, *developmental origins of health and disease*, DOHaD) (34) sugere que a adaptação fetal a um ambiente intrauterino prejudicial leva a alterações na estrutura e função do sistema nervoso, com impactos ao longo da vida; a Figura 1 representa esquematicamente as interações interdimensionais deste modelo. Um dos pressupostos fundamentais é que sistemas biológicos sofrem rápidas mudanças durante o desenvolvimento, sendo especialmente vulneráveis às influências organizadoras e desorganizadoras ao longo do tempo. A extensa trajetória neurodesenvolvimental implica em que experiências precoces potencialmente modelem a estrutura e a atividade cerebral, em um processo interativo entre genética, ambiente e função celular. O ajuste sincrônico e direcional dos processos de neurogênese, diferenciação neuronal, migração, apoptose, sinaptogênese, mielinização e poda sináptica são críticos para a organização e funcionamento do sistema nervoso em formação (35). Além disso, a qualidade da interação emocional e o contexto das relações de apego esculpem o desenvolvimento, atuando sobre a matriz neuropsicossocial (35-37). Esta fase inicial do crescimento é de rápida organização neural e é o período em que são estabelecidas as vias subjacentes às funções psicológicas essenciais (16). A adversidade e o trauma na infância, incluindo maus-tratos e/ou relações vinculares disruptivas, são fatores de risco durante o neurodesenvolvimento e aumentam a vulnerabilidade para uma série de transtornos neuropsiquiátricos ao longo da vida (38).

A hipótese de programação fetal (7, 39, 40) propõe que um estímulo ambiental adverso em um período crítico do desenvolvimento fetal induz a mudanças adaptativas, estruturais e funcionais em órgãos e sistemas chave, podendo afetar o indivíduo de maneira persistente ao longo da vida. O conceito de neurovulnerabilidade ao transtorno mental concentra-se na interação do risco em vários níveis (do nível molecular gênico no espaço intrauterino, durante etapas perinatais, através de processos epigenéticos levam às

experiências infantis), sendo um aspecto importante para o estudo das origens de traços comuns complexos e transtornos relacionados à saúde mental. O desenvolvimento de vias neurais, sinapses e funcionamento neurológico emergente se desenvolve em relação à sensibilidade direta, em um processo descrito como sendo "dependente da experiência"(37). As relações parentais e de apego representam o contexto social do neurodesenvolvimento inicial, participando de processos como regulação do estresse através do funcionamento do eixo HHA, mediando risco e vulnerabilidade contínuos (41). O entendimento teórico atual vem concentrando-se na integração de múltiplos domínios do desenvolvimento, incluindo modelos neurológicos e psicossociais. O desenvolvimento humano tem sido compreendido como dependente da experiência social, afastando-se de modelos anteriores unicamente focados em estágios fixos de desenvolvimento (42, 43). As novas abordagens de neurodesenvolvimento também sugerem a contribuição direta da criança sobre a função relacional e sua capacidade de influenciar as respostas ambientais. Os estudos de Sameroff (44, 45), por exemplo, descreveram a inter-relação entre a criança e as experiências sociais sobre o neurodesenvolvimento. Esse tipo de modelagem vem influenciando grande parte das pesquisas em desenvolvimento infantil, que descrevem a evolução de trajetórias adaptativas e desadaptativas e os fatores individuais do grupo familiar contribuem para os desfechos (46). Estudos associaram a teoria do apego aos distúrbios da interação social e suas implicações sobre desenvolvimento neurológico e psicológico, com um foco crescente no impacto potencial do estresse relacional e trauma sobre o neurodesenvolvimento (47, 48), com autores do campo da neuropsicanálise que têm investigado o impacto do trauma relacional sobre fatores de risco intrínsecos e ambiente social (49). A psicopatologia do desenvolvimento enfoca tanto a compreensão e o impacto do distúrbio sobre desenvolvimento quanto a maneira pela qual os distúrbios se manifestam em diferentes estágios do ciclo vital. Estas abordagens vem permitindo uma compreensão mais abrangente e complexa sobre o desenvolvimento de transtornos específicos, incluindo condições neuropsiquiátricas (50). Estudos sobre um modelo complexo de vulnerabilidade vem ampliando o exame detalhado das interações disruptivas e experiências traumáticas na infância e a maneira pela qual os padrões de relacionamento podem ser transmitidos através das gerações (51-53).

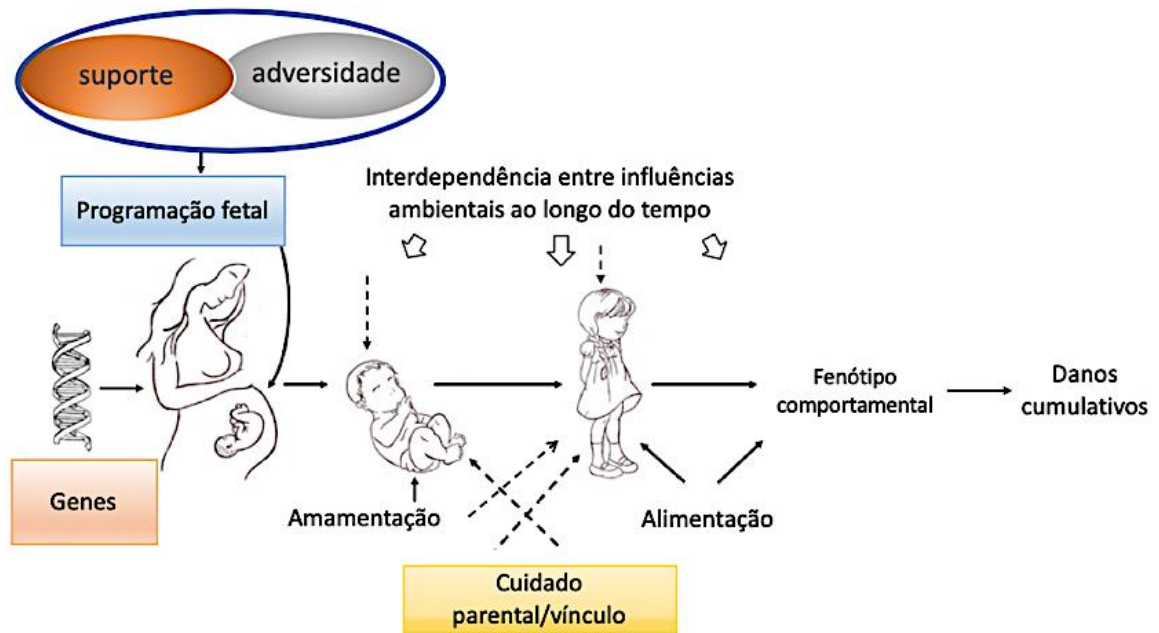


Figura 1. Interação entre domínios iniciais do desenvolvimento: qualquer desfecho fenotípico é a resultante de uma cascata de influências que operam ao longo do tempo e com o potencial de influenciar a sensibilidade às condições subsequentes. A variação ocorre como uma função do fenótipo e interações ambientais, sendo o fenótipo em qualquer ponto no tempo definido pela interação gene-ambiente durante a história do desenvolvimento do indivíduo. Além disso, evidências apontam para a interdependência entre influências ambientais ao longo do tempo. Assim, a relação entre a qualidade da parentalidade e do apego sobre o desenvolvimento infantil é substancialmente mais impactante para crianças com história de adversidade do que para aquelas que experimentam um ambiente suportivo. Adaptado de Dalle Molle *et al.*, 2015 (54).

## **2.1 Mecanismos de vulnerabilidade durante o neurodesenvolvimento**

### **2.1.1 Ambiente precoce: apego e cuidado**

Os mecanismos subjacentes à associação entre adversidade precoce e desfechos do desenvolvimento ainda não estão totalmente esclarecidos, mas já se sabe que vários mecanismos atuam sobre a programação fetal, incluindo alterações na função do eixo HHA e na resposta imunológica (55), com impacto direto nas estruturas cerebrais e no comportamento (56, 57). Estes fatores de vulnerabilidade podem ser amplificados ou tamponados no contexto da experiência, particularmente através capacidade parental em apoiar e auxiliar na regulação de estados emocionais infantis. Experiências de adversidade precoce, incluindo exposição a maus-tratos, baixo suporte social e/ou presença de transtorno mental nos progenitores, são fatores de risco sobre o desenvolvimento da criança, incluindo sintomatologia internalizante e externalizante, além de outros danos psicopatológicos que se manifestam tardiamente (58, 59). Nas últimas décadas, evidências demonstraram que adversidades na infância apresentam influências duradoura no adulto, participando na programação de DCNT, como doenças cardiovasculares, diabetes, artrite e alguns tipos de câncer (7, 10, 39, 60, 61). Modificações epigenéticas da região promotora do gene do receptor de glicocorticoide (GR) foram descritas pela primeira vez em ratas como um mecanismo pelo qual variações nas interações entre genitor e prole influenciavam o eixo HHA e respostas comportamentais ao estresse (62, 63), onde o cuidado materno mostrou regular o estado de metilação do promotor GR do exon 1-7 no hipocampo (62, 64). Estudos subsequentes em humanos mostraram que a adversidades na infância associavam-se à maior metilação do promotor do GR e menor expressão do GR no hipocampo, aumentando as respostas do eixo HHA ao estresse através da diminuição dos mecanismos de retroalimentação negativa (65).

Miller *et al.* (2011) desenvolveram o modelo conhecido como resposta transcricional conservada à adversidade (RTCA) que investiga os mecanismos neurobiológicos subjacentes à incorporação da adversidade (60). Este modelo surgiu a partir de teorias anteriores de programação ambiental, como a teoria da origem fetal (7), os modelos de curso de vida (66, 67), a epigenética (68) e a imunologia comportamental (69) que estudam os processos envolvidos na transmissão de experiências sociais e contextuais sobre atividades fisiológicas bem como seus danos cumulativos na saúde do indivíduo. O estudo da RTCA propôs que a experiência de adversidade precoce é programada em células do sistema imune (monócitos e macrófagos), respondendo através

de um fenótipo pró-inflamatório a estímulos de forma desregulada, contribuindo para a inflamação crônica de baixo grau, implicada no desenvolvimento e progressão de doenças (70, 71). Além disso, o modelo de incorporação biológica sugeriu também que indivíduos afetados apresentariam risco aumentado para este fenótipo pró-inflamatório, através dos efeitos cumulativos relacionados aos estressores interpessoais associados a comportamentos prejudiciais. Por exemplo, crianças vivendo sob condições adversas são frequentemente expostas a dificuldades no vínculo parental, a presença de estressores imprevisíveis e a um precário suporte social, situações que atuam aditiva e cumulativamente sobre vias corticolímbicas e corticostriatais, áreas estas que estão envolvidas na autorregulação, no processamento de informações sociais e na detecção de ameaças e recompensas (72). Indivíduos vulneráveis podem desenvolver déficits autorregulatórios, viés de atribuição hostil [tendência de interpretar o comportamento de outras pessoas como tendo uma intenção de hostilidade, mesmo quando o comportamento é ambíguo ou benigno (73)] e maior vigilância a ameaças (74), levando a comportamentos disruptivos, como uso de substâncias psicoativas, interações conflituosas e de baixa qualidade social ao longo do desenvolvimento (60, 75). Assim, a combinação de adversidade precoce e estresse contínuo criam um ciclo de retroalimentação no qual estressores sociais em curso podem operar como mediadores ou moderadores entre adversidade precoce e processos pró-inflamatórios, amplificando os efeitos da exposição a estressores no início da vida (76).

Duas vias fisiológicas são responsáveis pela conversão da adversidade socioambiental em programação transcricional pró-inflamatória. A primeira via envolve o sistema nervoso simpático (SNS), e a segunda envolve o eixo HHA (77). Desta forma, adversidades precoces (negligência, abuso ou disfunção doméstica crônica) associam-se tanto ao comprometimento na função imunológica quanto a desregulação do eixo HHA na idade adulta (78, 79). A inflamação desempenha um papel importante na sinalização e na proteção do organismo a insultos. Nos leucócitos, diversos tipos de adversidades evocam uma resposta transcricional conservada comum à adversidade, caracterizada pelo aumento da expressão de genes pró-inflamatórios e diminuição da expressão de genes envolvidos nas respostas antivirais inatas e na síntese de anticorpos (80). A ativação de monócitos e macrófagos iniciam e sustentam as respostas inflamatórias (69, 81, 82), através da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas [interleucina (IL-1 $\beta$ ), antagonista do receptor de interleucina (IL-1AR), interleucina 1 (IL -1), fator de necrose tumoral (TNF - $\alpha$ ) e interferon (IFN - $\gamma$ )], consideradas os principais mediadores da



resposta inflamatória, demonstraram comunicar-se com o cérebro, afetando a neurotransmissão, a atividade neuroendócrina, a estrutura e as funções neurais, induzindo mudanças emocionais, cognitivas e comportamentais (76). Os ambientes sociais podem influenciar a expressão gênica humana através de processos físico-químicos (por exemplo, toxinas e poluentes) e processos psicológicos (por exemplo, experiências de ameaça ou incerteza), desencadeando respostas neurais e endócrinas. Em ambos os casos, mediadores bioquímicos envolvem sistemas de receptores celulares, que ativam vias de transdução de sinal intracelular, culminando na ativação (ou repressão) de fatores de transcrição reguladores de elementos de resposta inflamatória. A rede de genes reguladores que direcionam sinais bioquímicos para respostas específicas de expressão gênica representa uma programação evolutiva adaptativa em condições ancestrais, mas que poderá mostrar-se mal adaptativa nos ambientes sociais muito distintos da vida humana contemporânea (83).

### **2.1.2 Ambiente precoce: ácidos graxos na gestação e lactação e os efeitos sobre o lactente**

Os PUFAs de cadeia longa (LC-PUFAs) ômega 3 derivados de fontes marinhas, o DHA e o ácido eicosapentaenoico (EPA), desempenham um papel importante na performance cognitiva e em outras funções intelectuais e de controle executivo do sistema nervoso (Figura 2). O DHA é o ômega 3 de LC-PUFA dominante no cérebro (84) e se acumula em áreas associadas ao aprendizado e à memória, como o córtex cerebral e o hipocampo (85, 86).

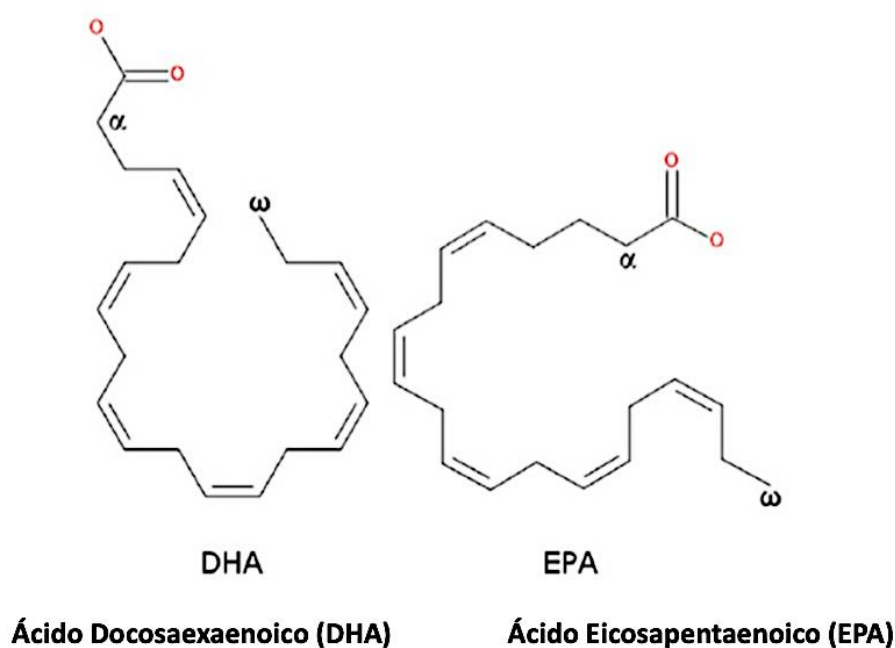


Figura 2. Estrutura química de dois importantes n-3 PUFAs, o ácido docosaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA). Devido às muitas ligações duplas, os PUFAs são mais volumosos que os ácidos graxos saturados.

Em gestantes, o DHA atua diminuindo a resistência à insulina e o risco para diabetes gestacional, além de estar implicado na redução do risco de transtornos mentais, como por exemplo, a depressão pós-parto; para o bebê, o DHA relaciona-se com acuidade visual, aprendizado, memória e desenvolvimento psicomotor, reduzindo a incidência de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (87-89).

Os ácidos graxos trans, provenientes de óleos vegetais parcialmente hidrogenados, são transmitidos da mãe para o feto durante a gravidez e a amamentação (90, 91). Eles foram associados a vários resultados negativos relacionados à concepção, ao crescimento e desenvolvimento fetal (92). A vulnerabilidade da dupla mãe-bebê sugere que os ácidos graxos trans de origem industrial devam ser reduzidos ou usados com cautela em mulheres grávidas e lactantes. A tabela 1 apresenta as disposições da *Food and Agriculture Organization* (FAO) com as doses recomendadas de PUFAs para gestantes e lactantes.

Tabela 1. Recomendações de ingestão de ácidos graxos durante a gravidez e amamentação segundo a FAO/WHO

Ácido Graxo	Ingestão diária- PUFAs totais
DHA	200mg
DHA+EPA	300mg
AA	800mg (máximo)

Adaptado de FAO/WHO, 2014.

Durante a lactação, o feto é exposto aos ácidos graxos (FAs- do inglês, *fatty acid*) através de sua secreção no leite materno. O tecido mamário sintetiza FAs intracelularmente a partir de um suprimento de substratos extraídos do plasma materno, que podem ser extraídos dos lipídios plasmáticos circulantes. Nesse sentido, as triglicérides (TL) maternos transportados em quilomícrons e proteínas de muito baixa densidade (do inglês, *very low density lipid*, VLDLs) são a principal fonte plasmática de FAs. Além disso, os FAs não esterificados maternos produzidos a partir de TLs no tecido mamário pela enzima lipase lipoproteica são importantes durante o estado de jejum (93). As gotas lipídicas formadas nas células epiteliais mamárias são secretadas no leite por exocitose ou em associação com a bicamada da membrana plasmática (94).

Assim, a condição nutricional materna e a composição de FAs da dieta durante a gravidez e/ou lactação são fatores críticos fortemente associados ao desenvolvimento fetal e pós-natal normal e também parecem influenciar a programação fetal, alterando o risco individual para alterações metabólicas ao longo da vida. Na tabela 2 encontram-se as recomendações da ingestão de PUFAs da FAO para bebês, crianças e adolescentes.

Tabela 2. Recomendações de ingestão de ácidos graxos para lactentes (0-24 meses) e crianças e adolescentes (02-18 anos), segundo a FAO/WHO

	Ácido Graxo	Grupo etário	Ingestão
<b>n-6 PUFA</b>	Ácido araquidônico	0-6 meses	0.2-0.3% VCT (leite materno)
	Ácido linoleico	0-6 meses	Composição do leite materno
		6-12 meses	3-4,5% VCT
		12-24 meses	3-4,5% VCT
<b>n-3 PUFA</b>	Ácido $\alpha$ -linolênico	0-6 meses	0.2% VCT
		6-12 meses	0.4-0.6% VCT
	DHA	0-6 meses	0.1-0.18% VCT
		6-24 meses	10-12mg/kg
	EPA+DHA	2-4 anos	100-150 mg
4-6 anos		150-200 mg	
6-10 anos		200-250 mg	
	Ácido graxo trans	2-18 anos	< 1% VCT

VCT: valor calórico total. Adaptado de FAO/WHO, 2014.

### 2.1.3 Ambiente precoce: ácidos graxos e o efeito no sistema nervoso central

Os n-3 LC-PUFAs desempenham um importante papel no desenvolvimento e no funcionamento neural (95-97), sendo essenciais na regulação de aspectos neuroquímicos e comportamentais relacionados com a resposta ao estresse, à modulação do humor (96, 98), e a reações de agressividade e impulsividade (99, 100). Eles atuam sobre sistemas de neurotransmissão, tais como vias dopaminérgicas mesocorticolímbicas (101, 102), além de atuarem em rotas metabólicas, diminuindo o risco para doenças cardiovasculares e outros distúrbios crônicos (96).

O envolvimento do PUFA na função do SNC pode ser avaliado usando manipulação dietética em modelos animais. Já foi demonstrado que a deficiência alimentar crônica de ácido  $\alpha$ -linolênico em roedores afeta muito a composição de ácidos graxos da membrana cerebral dos fosfolípidios (103-107). As principais mudanças incluem redução nos níveis de DHA e aumento compensatório nos níveis de n-6 PUFA,

especialmente do ácido docosapentaenoico (DPA, 22: 5 n-6). A análise de regiões cerebrais específicas mostrou que em ratos e que consomem uma dieta balanceada em n-6 e n-3 PUFA, a quantidade de DHA foi significativamente maior no córtex frontal do que em outras regiões, como estriado, hipocampo e cerebelo (108, 109). Além disso, o córtex frontal demonstrou ser mais afetado pela deficiência de ácido  $\alpha$ -linolênico do que outras regiões (108-110). Além dessas alterações bioquímicas, a deficiência do ácido  $\alpha$ -linolênico prejudicou o desempenho em uma variedade de tarefas de aprendizagem (104-106, 111). Essas respostas comportamentais prejudicadas geralmente envolvem capacidade de aprendizado sensorial, motor ou de processos motivacionais. Em particular, o aumento de respostas a vários fatores de reforço e extinção mais lenta observada em ratos privados de n-3 PUFA podem ser interpretados como alterações na motivação. Assim, todas estas evidências experimentais revelaram os n-3 PUFAs como um dos principais agentes que garantem o desenvolvimento cerebral adequado no início da vida pós-natal (112). Mais ainda, foi demonstrado que a suplementação de n-3 PUFA protege da perda neuronal e diminuição da neurogênese no córtex cerebral e no hipocampo de recém-nascidos, considerando ainda que esse efeito poderia ser duradouro e também mostrar benefícios adicionais na função neurocognitiva posteriormente na idade adulta (112). Um estudo em humanos, demonstrou um maior índice de desenvolvimento psicomotor em lactentes de mães que foram submetidas à administração de DHA (200mg / d) por um período de 4 meses, com benefícios na motricidade olho-mão e na acuidade visual (113).

Sabe-se que o DHA é incorporado nos fosfolípides da membrana neuronal, onde regula inúmeros processos celulares neuronais e gliais, incluindo neurogênese, neuroplasticidade, crescimento de neuritos, sinaptogênese e fluidez da membrana, impactando a velocidade de transdução e transmissão de sinal (114-118). Além disso, o DHA melhora o tônus vascular, resultando em aumento do fluxo sanguíneo cerebral durante tarefas cognitivas (119) e regulando o transporte e absorção de glicose pelas células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE), (117). O DHA é ligante natural para vários receptores nucleares, que regulam a expressão gênica e também são precursores de neuroprotectinas e resolvinas, que neutralizam neuroinflamação e o estresse oxidativo, aumentando a sobrevivência neuronal (114, 118, 120). O EPA e o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, um n-3 PUFA derivado dos vegetais), também atravessam a BHE, mas mais que 99% desses FAs são  $\beta$ -oxidados e alguns EPA são desesterificados a partir de fosfolípides (121). Ambos ALA e EPA podem contribuir para a função cerebral,

atuando sobre o metabolismo energético cerebral através da cetogênese, particularmente durante o envelhecimento (122). Além disso, o EPA não esterificado também pode contribuir para a função cognitiva através da síntese de eicosanoides que compensam a neuroinflamação e melhoram o fluxo sanguíneo cerebral devido às suas propriedades antitrombóticas e vasodilatadoras (117).

Apesar do corpo de evidências existente mostrando a relação dos LC-PUFAs no SNC, até o momento, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes ao envolvimento dos n-3 PUFAs sobre os sistemas monoaminérgicos, particularmente o da dopamina. Neste sentido, um estudo revelou que a presença de DHA na membrana acelera a taxa de oligomerização do receptor D2 de dopamina e receptor A2A de adenosina, sendo maior quando o conteúdo de DHA na membrana é do "tipo saudável" em comparação com o "tipo doente". Esse efeito é mediado pelo aumento da mobilidade lateral dos receptores e também pela interação favorável entre DHA e proteínas e entre as caudas de DHA e o restante dos lipídios da membrana. Portanto, o aumento da difusão e da concentração de proteínas nesses domínios aumenta as chances de interações proteína-proteína e acelera a oligomerização, revelando que os n-3 PUFAs de membrana desempenham um papel fundamental sobre o receptor acoplado à proteína G (GPCR), sugerindo implicações importantes em condições neuropsiquiátricas (123). Evidências recentes sugeriram que o DHA exerça efeitos neuroprotetores através da redução dos efeitos inflamatórios na micróglia (124, 125). A Figura 3 abaixo representa as algumas das funções dos principais n-3 PUFAs nas células neurais.

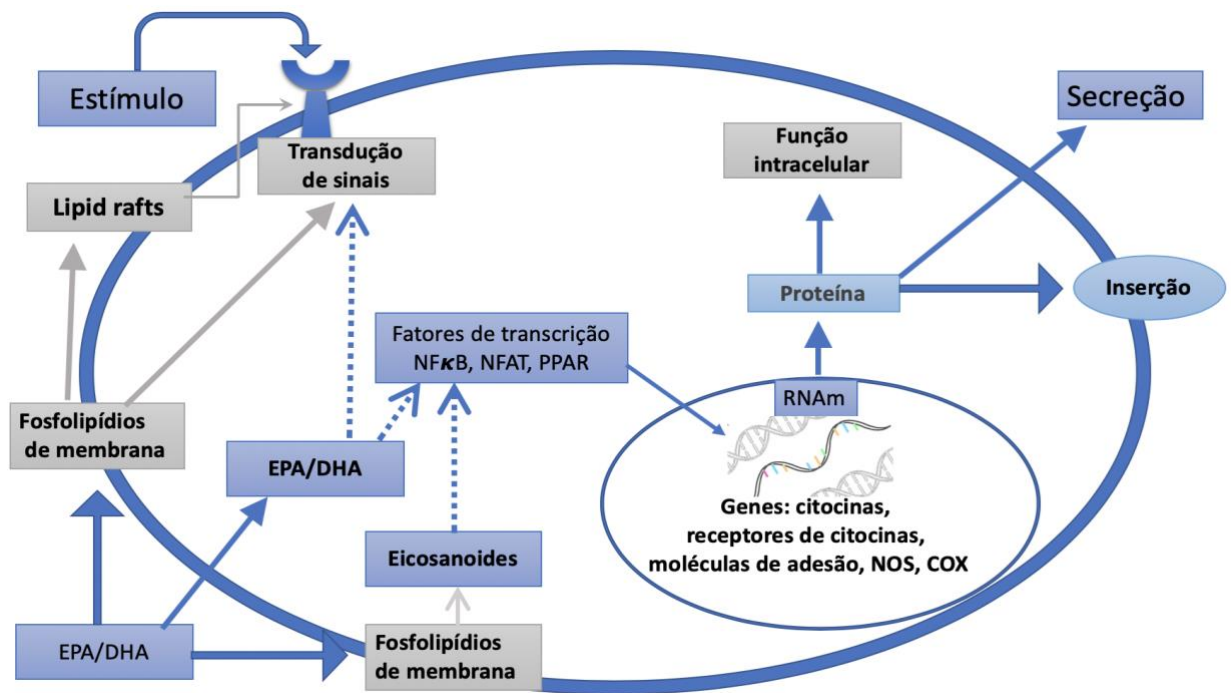


Figura 3: Ação do EPA e DHA nas células neuronais: EPA e DHA podem ser incorporados na membrana celular como fosfolípídios e atuar através de *lipid rafts* (126), bem como podem influenciar na transdução de sinais, na ativação e inibição de fatores de transcrição e na modulação da síntese de eicosanoides. *Lipid rafts*, em uma tradução aproximada do inglês significa, "jangadas lipídicas", que são micro domínios enriquecidos de colesterol e esfingolípídios contidos na membrana plasmática. Os *lipid rafts* têm sido implicados em muitos processos celulares, incluindo transdução de sinal, tráfego de membranas, organização do citoesqueleto e entrada de patógenos na célula (126). Adaptado de Serhan *et al.*, 2008 (127).

## 2.2 Metabolismo de ácidos graxos

Os PUFAs são classificados como ômega 3 (n-3) ou ômega 6 (n-6), dependendo da localização da última ligação dupla em relação ao grupo metil terminal na cadeia do carbono. Os precursores essenciais de PUFA, ácido linoleico (LA, 18: 2 n-6) e ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, 18: 3 n-3) são metabolizados por alongamento e dessaturação em LC-PUFAs (> 20 átomos de carbono) como o ácido araquidônico (AA, 20: 4n-6), EPA, (20: 5n-3) e DHA (22: 6n-3). A capacidade metabólica da via biossintética dos PUFAs difere entre indivíduos e populações, sugerindo que variações genéticas e epigenéticas estejam associadas com os seus níveis séricos, teciduais e celulares (128). Avanços na nutrigenômica permitiram identificar três fatores envolvidos na regulação da conversão de ALA e LA em n-3 e n-6 PUFAs, tais como (i) diferenças na ingestão de PUFA na dieta, (ii) regulação epigenética acentuada e (iii) alta herdabilidade da capacidade biossintética (129).

### 2.2.1 Biossíntese de ácidos graxos

Os seres humanos não produzem ALA (18: 3 n-3) nem LA (18: 2 n-6), sendo, por isso considerados ácidos graxos essenciais, que devem ser supridos através da dieta. As plantas são as principais fontes desses FAs, que, ao contrário dos animais, possuem capacidade de inserir ligações duplas entre carbono 9 existente na extremidade metil do ácido oleico (130). Óleos vegetais comestíveis como girassol, óleo de milho ou amendoim, constituem uma das principais fontes de ALA. Além disso, vários óleos vegetais também fornecem LA, como por exemplo, o óleo de soja (8%) e óleo de nozes (13%) (130). As fontes alimentares de EPA e DHA são peixes, mariscos e carne de mamíferos marinhos, sendo o corpo humano incapaz de sintetizar DHA e EPA de novo, podendo produzi-los a partir do ALA (figura 4). No entanto, essa capacidade é limitada e, além disso, sujeita a variações nos genes que codificam as enzimas envolvidas e diferenças de gênero (131). Os PUFAs ômega 3 e ômega 6 compartilham e competem pelas mesmas enzimas em sua biossíntese, onde há pelo menos duas enzimas-chave nesse processo, que são a  $\Delta$  5 dessaturase (*FADS1*) e a  $\Delta$  6 dessaturase (*FADS2*) (132). Dois haplótipos comuns nos genes *FADS* diferem dramaticamente em sua capacidade de gerar LC-PUFA: o haplótipo D está associado ao aumento da atividade do complexo *FADS* (*FADS1-2*) e a uma maior taxa de conversão de precursores de LA e ALA a LC-PUFA (EPA, GLA, DHA e AA) (133). Esses polimorfismos *FADS* são relativamente comuns na população e podem explicar até 30% da variabilidade nas concentrações sanguíneas dos PUFAs entre os indivíduos (131). Além do mais, verificou-se que a atividade das enzimas dessaturases pode ser alterada por fatores como tabagismo, consumo de álcool, diabetes, estresse, ingestão elevada de gorduras *trans*, e, principalmente, pelo envelhecimento (130).

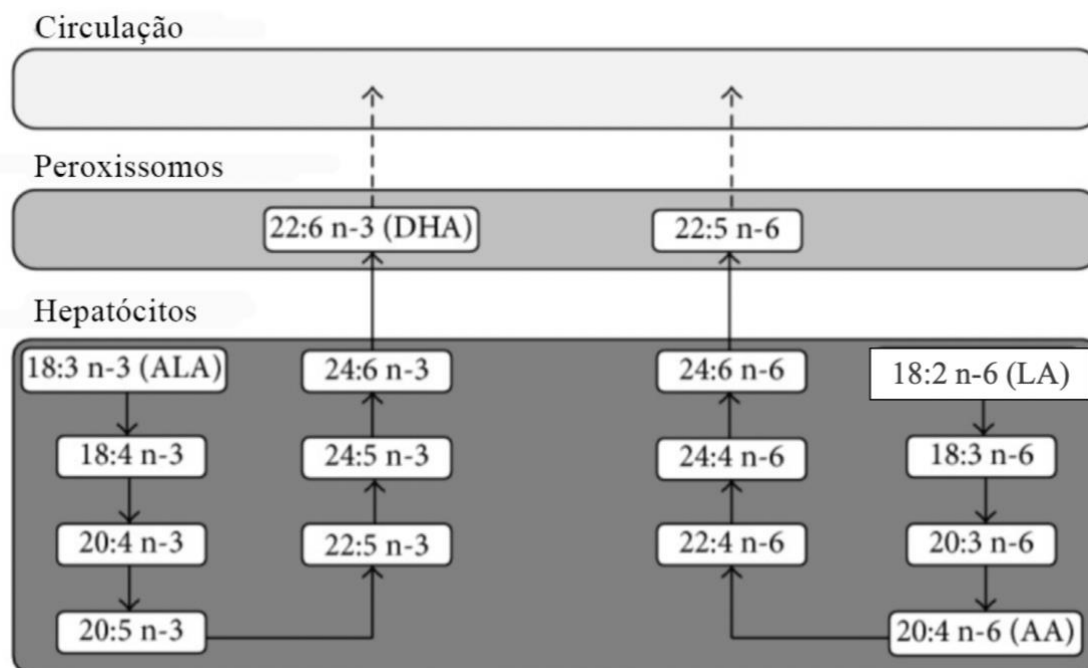


Figura 4. Síntese de PUFAs no fígado. Os precursores de ácido graxo poli-insaturado ômega 3 e ômega 6 (n-3 e n-6 PUFAs)  $\alpha$ -linolênico (ALA; 18: 3 n-3) e ácido linoleico (LA; 18: 2 n-6) podem ser dessaturados e alongados. Isso leva à síntese de PUFAs de cadeia longa, incluindo ácido docosaexaenoico (DHA; 22: 6 n-3), mas também ácido araquidônico (AA; 20: 4 n-6), que são transportados para o sangue como formas livres ou lipoproteínas. Ambos PUFAs n-3 e n-6 de cadeia longa competem por sua síntese (dessaturação e alongamento), significando que também a ingestão de PUFAs afeta significativamente seu nível de incorporação cerebral. Adaptado de Madore *et al.*, 2016 (134)

### 2.2.2 Ácidos graxos e genética

Além dos efeitos de variantes gênicas sobre a biossíntese de PUFAs, estudos demonstram uma ação modulatória direta dos FAs sobre genes implicados na inflamação e na carcinogênese, sugerindo que variantes que codificam enzimas das vias metabólicas dos PUFAs desempenhem um efeito sobre o risco para doenças. A associação de câncer de próstata e n-3 LC-PUFA foi descrito em indivíduos portadores de uma mutação do gene *COX 2* (135).

No capítulo 2 deste trabalho, apresentamos a interação entre um gene candidato (*PLIN4*) que aumenta a sensibilidade aos PUFAs e o peso ao nascer, avaliando desfechos sobre o controle inibitório; no capítulo 3, abordamos interações gene- ambiente, a partir de um escore poligênico baseado na co-expressão gênica da rede *FADS1* e de um escore ambiental.



### 2.3 Funções executivas

A função executiva (FE) pode ser definida como a habilidade cognitiva necessária para realizar comportamentos complexos dirigidos a objetivos e à adaptação às diversas demandas e variações ambientais. Tradicionalmente, a FE refere-se a capacidade de iniciação, planejamento, seguimento e monitoramento de comportamentos e condutas dirigidos a um fim, sendo composta pelos processos autorregulatórios de flexibilidade cognitiva, memória de trabalho e controle inibitório (136). A inibição sustenta o autocontrole e a gratificação tardia, e na primeira infância, é positivamente associada a desfechos em desempenho acadêmico, saúde, risco, felicidade e status socioeconômico (137, 138); ao contrário, déficits nas FEs têm sido relacionados a alterações no funcionamento do córtex frontal (139). A tabela 3 mostra áreas cerebrais envolvidas no comportamento social. A tabela 4 apresenta áreas cerebrais envolvidas em funções cognitivas.

As funções executivas, incluindo atenção e controle inibitório, memória de trabalho e alternância flexível de tarefas, provavelmente constituem aspectos importantes para a sensibilidade dos pais às necessidades dos filhos. O CPF dorsolateral e ventrolateral estão envolvidos na flexibilidade cognitiva e o estriado está envolvido no controle da inibição (140). Déficits na flexibilidade cognitiva e na memória de trabalho espacial têm sido associados à baixa sensibilidade materna às indicações de bebês que não solicitam durante estados de estresse (141). Mães que apresentaram apego desorganizado responderam com maior latência a palavras de valência negativa (por exemplo, abandonar, rejeitar) durante a tarefa *stroop*, que é um teste neuropsicológico utilizado para avaliar a capacidade de inibir a interferência cognitiva que ocorre quando o processamento de um estímulo específico impede o processamento simultâneo de um segundo atributo de estímulo, conhecido como Efeito Stroop; tais achados sugerem que associações negativas a estímulos de apego podem contribuir para dificuldades contínuas durante as interações mãe-bebê (142). O aumento na sensibilidade atencional aos sinais de angústia dos bebês no final da gravidez também mostrou associação com pontuações melhores em questionários investigando vínculo parental; este mesmo trabalho mostrou maior sensibilidade ao sofrimento do lactente para mães que amamentam com leite materno (143).

Tabela 3. Áreas Cerebrais envolvidas no comportamento social

<b>Função</b>	<b>Área cerebral em primatas</b>
<b>Motivação social</b>	CPFvm, estriado ventral, amígdala
<b>Reconhecimento social/memória</b>	CPF medial, CPFdm
<b>Hierarquia social</b>	CPF medial, CPF lateral, estriado ventral, Amígdala
<b>Cérebro social</b>	Sulco temporal superior posterior, Junção temporo-parietal, Córtex temporal anterior, Giro frontal inferior, CPFvm, CCA, área facial fusiforme superior, Amígdala

CCA, córtex cingulado anterior; CPFvm, córtex pré-frontal ventro-medial; CPFdm, córtex pré-frontal dorso-medial. Adaptado de Sakurai & Gamo, 2018 (144).

A impulsividade é um construto multidimensional, que abrange uma gama de aspectos psicopatológicos, de etiologia relacionada a fatores genéticos e ambientais (145). Atualmente, a impulsividade refere-se a um conjunto de domínios principais: inabilidade para avaliar evidências sensoriais (impulsividade atencional), falha na inibição motora (incapacidade de inibir uma resposta prepotente em tarefas experimentais), tendência a aceitar pequenas recompensas imediatas versus grandes recompensas atrasadas ou improváveis (escolhas impulsivas ou impulsividade não planejada) e comportamento de risco no contexto da tomada de decisão (146, 147). Embora conceitualmente relacionadas, essas formas de impulsividade são qualitativa e quantitativamente distintas (145). Por exemplo, impulsividade aumentada e o controle inibitório ineficiente são fenótipos de risco associados à alimentação não saudável em crianças (148). Traços de impulsividade são endofenótipos ligados a transtornos psiquiátricos que envolvem desinibição, incluindo comportamentos antissocial e agressividade, jogo patológico e TDAH (145, 149, 150). A definição de diferentes formas de impulsividade auxilia na compreensão das bases neurobiológicas de doenças, tendo sido desenvolvidos múltiplos testes laboratoriais comportamentais e medidas auto reportadas para acessar diferentes componentes psicobiológicos da impulsividade (151).

Tabela 4. Áreas cerebrais envolvidas em funções cognitivas

Função	Área cerebral em primatas
<b><i>Deteção de saliência</i></b>	ínsula anterior, CCA dorsal
<b><i>Atenção</i></b>	Rede de atenção dorsal (sulco infraparietal, campo órbito-frontal)
<b><i>Memória de trabalho</i></b>	Rede de controle executivo (CPFvl, CPFvm, córtex pre-motor, córtex parietal)
<b><i>Inibição cognitiva</i></b>	CPFvl, ínsula anterior, junção frontal inferior
<b><i>Flexibilidade cognitiva</i></b>	CPFvm, CPFvl, córtex parietal, CCA, ínsula anterior direita, córtex pré-motor, córtex temporal inferior, córtex occipital, junção inferior frontal, caudado, tálamo
<b><i>Impulsividade</i></b>	córtex infralímbico, ínsula, hipocampo, córtex cingulado, núcleo do NAc, estriado dorsal (resposta prematura) -Amígdala basolateral, hipocampo e córtex orbito-frontal: delay discounting -COF médio, amígdala: impulsividade baseada em risco

CCA, córtex cingulado anterior; CPFvl, córtex pré-frontal ventro-lateral; CPFvm, córtex pré-frontal ventro-medial; NAc, Núcleo accumbens; COF, córtex órbito-frontal. Adaptado de Sakurai & Gamo, 2018 (144).

Assumindo que desfechos funcionais associados à vulnerabilidade são definidos pelas interações gene-ambiente e determinados pela qualidade das condições ambientais subsequentes, buscamos neste trabalho compreender como componentes nutricionais se associam com redes genéticas e interagem com aspectos ambientais, desencadeando modificações fenotípicas. O processamento cognitivo envolve redes neurais que atuam através de inúmeras vias bioquímicas e enzimas associadas. Muitas dessas enzimas requerem micronutrientes, vitaminas essenciais e minerais como cofatores para uma função ideal. Postula-se que a função alterada relacionada a variações em componentes nutricionais possa afetar negativamente funções proteicas e enzimáticas envolvidas na atividade neural. Vários fatores ambientais, incluindo inadequação de micronutrientes, exercício, inflamação, estresse e trauma emocional influenciam a rede de neurotransmissão, levando a alterações no comportamento. Este trabalho pretende analisar a partir de um modelo de interação gene-ambiente, os efeitos modulatórios dos PUFA sobre o controle inibitório e impulsividade.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Considerando achados prévios que demonstraram que os n-3 PUFAs, e em especial o DHA, se associavam a um padrão fenotípico mais saudável em indivíduos expostos à adversidade precoce, este estudo investiga se variações periféricas e centrais nos níveis dos n-3 PUFAs, inferidas através de variantes genéticas, interagem com aspectos ambientais, influenciando na função executiva. A escolha deste tema baseou-se na alta prevalência mundial de RCIU (14.6%) (152) e também nas evidências mostrando que os distúrbios neuropsiquiátricos são os principais contribuintes para morbidade, incapacidade, lesão, mortalidade prematura e aumento de riscos para outras condições (153). Assim, nesta pesquisa buscamos compreender os mecanismos neurofisiopatológicos e identificar fenótipos intermediários e endofenótipos que possibilitem medidas preventivas e de intervenção precoce.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a interação de genes envolvidos com a capacidade biossintética e resposta celular aos PUFAs com fatores ambientais sobre desfechos de saúde mental na infância.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **4.2.1 Capítulo 1- Artigo 1**

Revisar aspectos do metabolismo e função dos PUFAs no sistema nervoso, bem como investigar seu papel e efeitos durante períodos críticos do neurodesenvolvimento. Analisar, através de evidências de estudos clínicos e experimentais recentes, as indicações terapêuticas atuais dos n- 3 PUFAs nos transtornos neuropsiquiátricos.

#### **4.2.2 Capítulo 2- Artigo 2**

Investigar a interação entre uma variante genética relacionada com a sensibilidade celular aos n-3 PUFAs e o ambiente inicial, representado pelo peso ao nascer, sobre o controle inibitório em uma amostra de crianças.

#### **4.2.3 Capítulo 3- Estudo 3**

Explorar as interações entre o genoma e o ambiente precoce sobre fenótipos ligados ao controle de impulsos em crianças, desenvolvendo escores de expressão poligênica e de variação do ambiente perinatal, através dos dados da coorte canadense *Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment* (MAVAN), comparando com dados da coorte *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC).

## **5 HIPÓTESES**

### **5.1 HIPÓTESE GERAL**

A hipótese geral deste trabalho é que indivíduos expostos à adversidade precoce e com maior sensibilidade, conferida pela genética, aos n-3 PUFAs, apresentarão um efeito protetor sobre aspectos da função executiva. Para uma melhor abordagem e compreensão, esta hipótese gerou três capítulos, conforme descrito a seguir.

#### **5.1.1 Capítulo 1- Artigo de revisão 1**

A exposição precoce a evento adverso está associada à maior impulsividade na infância, sendo esta associação relacionada aos níveis teciduais de n-3 PUFAs durante o neurodesenvolvimento.

#### **5.1.2 Capítulo 2- Artigo 2**

Diferenças alélicas de um gene candidato entre indivíduos nascidos pequenos para idade gestacional modificam a sensibilidade aos n-3 PUFAs, atuando sobre o controle inibitório nesta população.

#### **5.1.3 Capítulo 3- Estudo 3**

A expressão gênica da rede do gene *FADS1* no CPF interage com o ambiente precoce, predizendo a expressão de endofenótipos ligados ao controle de impulsos e ao TDAH em crianças.

## 6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os estudos apresentados nos capítulos 2 e 3 dessa tese utilizaram dados da coorte *Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment* (MAVAN) que contava com a aprovação dos hospitais e das Universidades envolvidas: comitês de ética da *McGill University*, *Université de Montréal*, *Royal Victoria Hospital*, *Jewish General Hospital*, *Centre hospitalier de l'Université de Montréal*, *Hôpital Maisonneuve-Rosemount*, *St Joseph's Hospital* e *McMaster University*. A aprovação ética do estudo *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC) cujo banco de dados foi utilizado no capítulo 3 foi obtida no Comitê de Ética e Direito da ALSPAC (IRB nº 00003312) e nos comitês locais de ética em pesquisa (*Bristol e Weston Health Authority*, *Southmead Health Authority e Frenchay Health Authority*). O consentimento informado para o uso dos dados foi obtido dos participantes, seguindo as recomendações do Comitê de Ética e Direito de cada uma das coortes pesquisadas.

## 7 MÉTODOS E RESULTADOS

Esta tese deu origem a duas publicações que são apresentados como artigos, identificados como capítulo 1 e 2, além de um trabalho ainda não publicado descrito no capítulo 3, que traz resultados adicionais ainda não publicados. O artigo 2 (apresentado no Capítulo 2) foi realizado em colaboração com a *McGill University, University of Toronto e McMaster University*, que visitei durante o mês de agosto/2016, período em que foram examinados os dados apresentados no artigo publicado. Este estudo integra o corpo de resultados da coorte canadense prospectiva MAVAN. Detalhes sobre esta coorte podem ser encontrados em outra publicação (11). A amostra do capítulo 2 incluiu 254 crianças (5 anos de idade) selecionadas a partir do projeto MAVAN.

O estudo apresentado no capítulo 3 foi realizado também em colaboração com a *McGill University, University of Toronto e McMaster University*. Durante os meses de julho/2018 e julho/2019 visitei o serviço do *Ludmer Center*, período em que trabalhei na construção de escores poligênicos baseados na expressão e em análises de interação gene-ambiente. Os dados para estas análises provêm do banco da coorte principal MAVAN, cuja amostra incluiu 135 crianças de 5 anos de idade, que foram comparados com resultados de dados provenientes de 4223 participantes de 9 anos de idade da coorte ALSPAC. O projeto ALSPAC é um estudo prospectivo transgeracional que investiga influências na saúde e no desenvolvimento ao longo da vida, considerando múltiplas exposições genéticas, epigenéticas, biológicas, psicológicas, sociais e outras exposições ambientais em relação a outros contextos de saúde, sociais e de desenvolvimento (154).

A seguir, seguem os resumos em português de cada um dos dois estudos publicados.



## **7.1 Capítulo 1- Artigo 1**

O capítulo “*Neurodevelopmental and Behavioral Effects of Variations in Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Levels in Vulnerable Populations*” foi publicado no livro “Omega 3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health”, Watson RR, De Meester F, SECOND edition, Elsevier, publicado em junho de 2019.

DOI 101016/B978-0-12-815238-6.00019-5

### ***Efeito das Variações nos Níveis de Ácidos Graxos Poli-insaturados no Comportamento e Neurodesenvolvimento em Populações Vulneráveis***

Variações na disponibilidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) plasmática e tecidual alteram o desenvolvimento cerebral modificando desfechos neuropsicológicos. Os PUFAs influenciam no metabolismo, na regulação e na resposta celular e tecidual da sinalização neuro-humoral. Estudos experimentais demonstraram que a diminuição nos níveis de PUFAs durante o neurodesenvolvimento leva a prejuízos na neurogênese, no metabolismo dos neurotransmissores, no processo de aprendizagem e na função visual. Ensaios clínicos e estudos epidemiológicos demonstraram que a diminuição plasmática do ácido docosaenoico (DHA) foi associada com o risco aumentado para deficiências no desenvolvimento neural e visual em bebês e crianças, especialmente para aqueles expostos a adversidades (por exemplo, pequenos para idade gestacional e/ou prematuros). Este estudo revisará os principais aspectos do metabolismo e da função dos PUFAs no sistema nervoso de populações vulneráveis, discutindo também sua atuação nas várias etapas do ciclo vital e seu papel na prevenção e tratamento de transtornos neuropsiquiátricos.

## 7.2 Capítulo 2 - Artigo 2

Artigo “*Moderating effect of PLIN4 genetic variant on impulsivity traits in 5-year-old-children born small for gestational age*” foi publicado na revista *Prostaglandins, Leukotriens and Essencial Fatty Acids*, 2018; 137: 19-25.

PMID: 30293593 DOI: 10.1016/j.plefa.2018.07.013

### ***Variante do gene da PLIN4 e redução da impulsividade em crianças nascidas pequenas para idade gestacional***

PLIN4 é uma proteína pertencente à família PAT que atua no armazenamento de gotículas de lipídios. Uma das isoformas da proteína humana PLIN4, codificada pelo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs8887, interage com os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (n-3 PUFAs), conferindo efeito protetor sobre a obesidade. Esta interação é dependente da presença do alelo A do SNP rs8887. Curiosamente, indivíduos que apresentam restrição de crescimento intrauterino (RCIU) também são mais sensíveis aos efeitos da dieta com n-3 PUFAs. Embora apresentem preferência para alimentos palatáveis e menor controle inibitório para um lanche apetitivo, crianças nascidas com RCIU apresentam menos *food fussiness* e alimentação externa quando expostas a uma dieta com n-3 PUFAs, sugerindo que, nesta população, a dieta com ômega-3 se associa a padrões de comportamento mais adaptativos. A hipótese deste estudo é que a presença do alelo A do SNP rs8887 interage com o peso ao nascer, influenciando no controle inibitório. Utilizamos dados do genótipo e de comportamento neuropsicológico de uma amostra de 254 crianças de cinco anos de idade da coorte MAVAN, proveniente do Canadá. Caracterizamos o crescimento fetal através da razão do peso ao nascer (BWR). Não encontramos diferenças significativas entre os grupos dos carreadores do alelo A comparados aos não carreadores quanto aos principais confundidores (peso ao nascer, idade gestacional, duração da amamentação, sexo, escolaridade materna e renda, tabagismo durante a gestação e ingestão de n-3 PUFAs na infância). Houve uma interação significativa entre o BWR e a presença do alelo A na tarefa que avaliou controle inibitório, em que menor peso ao nascer estava associado com baixo controle inibitório apenas nos indivíduos não carreadores. No grupo dos carreadores do alelo A que apresentam maior sensibilidade aos n-3 PUFAs da dieta, o efeito da RCIU foi abolido. Os n-3 PUFAs parecem ser importantes fatores que participam na associação entre baixo peso ao nascer e controle de impulsos em crianças, com implicações em prevenção primária de várias condições associadas a déficits em comportamentos inibitórios, tais como transtornos hipercinéticos e alterações do comportamento alimentar.

### 7.3 Capítulo 3- Estudo 3

#### *Escore poligênico baseado na co-expressão gênica, qualidade ambiental precoce e impulsividade/ TDAH na infância*

##### **Resumo**

Sabe-se que os PUFAs modulam a neurotransmissão dopaminérgica, aumentando a sensibilidade à recompensa no estriado e diminuindo a impulsividade no córtex pré-frontal. Esses efeitos parecem particularmente intensos em indivíduos expostos à adversidade precoce. Pesquisas de interações gene-ambiente (GXA) investigam não apenas a sensibilidade genética a influências ambientais, mas também se estas variações refletem o modelo de diátese-estresse clássico e orientado para a patologia ou o modelo de susceptibilidade diferencial inspirado na adaptação evolutiva. Enquanto o primeiro estipula que alguns indivíduos são desproporcionalmente vulneráveis aos efeitos negativos da adversidade contextual, o segundo sugere que indivíduos suscetíveis às condições ambientais negativas são desproporcionalmente beneficiados por um ambiente de apoio. Na tentativa de ampliar a capacidade de prever fatores ambientais e genéticos associados a doenças comuns complexas, criamos: a) um escore de risco poligênico baseado na co-expressão com um gene de interesse - ePRS - como uma ferramenta de predição que considera que os genes operam em redes e que possuem funções biológicas coerentes; b) um escore ambiental que mede tanto adversidade como suporte ambiental. Para conferir robustez, os achados da coorte principal foram comparados com outra coorte. Nossa hipótese é de que redes de genes situadas no córtex pré-frontal (CPF), envolvidas na resposta celular aos PUFAs, moderam a associação entre fatores ambientais e desfechos na saúde mental infantil e de que estes indivíduos vulneráveis apresentam um benefício desproporcional quando em ambientes de suporte. Selecionamos o gene *FADS1*, que participa do metabolismo dos PUFAs e está associado ao TDAH e criamos um escore baseado na co-expressão poligênica ao *FADS1* no CPF. Também elaboramos um escore de adversidade-suporte ambiental, que chamamos de escore C, calculado com base em medidas consideradas de risco ou proteção no período pós-natal. Estes escores foram calculados a partir de dados amostrais de crianças das coortes MAVAN e ALSPAC. Os resultados da interação gene-ambiente na coorte MAVAN evidenciaram que em um ambiente adverso, crianças com escores que refletem uma menor expressão gênica dos genes que compõem a rede *FADS1* no CPF apresentavam maior impulsividade reflexiva e pontuação para sintomatologia de TDAH, de acordo com o modelo de diátese de estresse. Na coorte ALSPAC, os resultados

das interações entre escore genético e ambiental mostraram predominância do efeito do ambiente precoce sobre a base genética, corroborando com a hipótese de que áreas que maturam tardiamente são mais sensíveis ao meio. Conforme nossos dados demonstraram, indivíduos expostos a adversidades pós-natais apresentam maior vulnerabilidade, no córtex pré-frontal, a variações na expressão gênica de redes envolvidas com a biossíntese de PUFAs, evidenciando pior desempenho em funções executivas. A medida que o tempo passa, o córtex pré-frontal torna-se mais sensível ao fator ambiental, sugerindo uma programação diferencial, uma estratégia adaptativa que amplifica repertórios comportamentais de uma região conhecida como “cérebro social”. Assim, tanto mecanismos genéticos que regulam aspectos nutricionais (PUFAs), quanto variações no ambiente precoce (distúrbios no cuidado parental), são elementos de neuroplasticidade dinâmicos. Nossos dados levantam questões importantes para estratégias de prevenção e tratamento em transtornos neuropsiquiátricos e também para investigação envolvendo plasticidade biológica diferencial.

**Palavras-chave:** escore de risco poligênico baseado na expressão (ePRS); adversidade precoce; n-3 PUFAs; impulsividade; TDAH

## 1 Introdução

Os genes interagem com o ambiente influenciando o desenvolvimento infantil e o risco para doenças ao longo da vida. Evidências crescentes sugerem que déficits de ácidos graxos ômega-3 (n-3 PUFAs) podem alterar funções executivas durante o neurodesenvolvimento, modificando a expressão de fenótipos de impulsividade e controle inibitório, como no transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (1).

O TDAH está entre os transtornos do neurodesenvolvimento mais comumente diagnosticados, afetando aproximadamente 8% a 12% das crianças em todo o mundo, com até 65% dos indivíduos apresentando sintomas e prejuízos neuropsicológicos na idade adulta (2). Variação em correlatos neurais, diversidade em perfis cognitivos-comportamentais e de trajetórias de desenvolvimento revelam a natureza etiológica heterogênea complexa desse transtorno (3). Pesquisas sugerem que variantes genéticas e fatores de risco pré e pós-natais estão relacionados à manifestação de sintomas de TDAH e parecem estar associados a vários outros desfechos neurodesenvolvimentais e psiquiátricos (4). Os fatores de risco ambiental, incluindo riscos relacionados à saúde materna, complicações na gravidez e no nascimento, lesões cerebrais traumáticas e outros fatores relacionados a estilo de vida foram associados ao TDAH (5), assim como a interação destes fatores com a genética (6).

Os n-3 PUFAs modulam a neurotransmissão dopaminérgica, aumentando a sensibilidade para recompensas no estriado e regulando a impulsividade e o controle inibitório no córtex pré-frontal (CPF)(7), tendo sido demonstrado que indivíduos expostos à adversidade precoce parecem mais sensíveis a variações dos ômega 3 (8). Um estudo experimental demonstrou que estresse precoce aliado à deficiência nutricional de n-3 PUFAs, levaram a alterações metabólicas e comportamentais (9), sugerindo que adversidades modificam a sensibilidade aos n-3 PUFAs e que esta associação modela desfechos neurofisiológicos. Outro estudo mostrou que a associação entre restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e controle inibitório deficiente modificava-se através dos n-3 PUFAs presentes na dieta (10).

O ácido docosaenoico (DHA), um ácido graxo ômega-3 de cadeia longa (n-3 LC-PUFA), fornecido pela dieta ou através da biossíntese endógena a partir do ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), acumula-se principalmente no hipocampo e no córtex pré-frontal durante o pico de crescimento cerebral perinatal. O DHA desempenha um importante papel no desenvolvimento e no funcionamento do sistema nervoso (11-13), sendo

essencial na regulação de aspectos neuropsicológicos e metabólicos, na modulação do humor, do comportamento e do metabolismo energético (12, 14-17). Estudos longitudinais demonstraram que tanto a suplementação quanto a ingestão dietética precoce de DHA associavam-se a melhora na função cognitiva (18-20). No entanto, ainda não foi possível diferenciar se estes resultados se associaram unicamente ao DHA ou também a fatores como amamentação, dieta saudável e status socioeconômico, por exemplo. Conseqüentemente, os efeitos específicos da dieta e da suplementação com DHA na primeira infância precisam ser investigados.

Variantes genéticas alteram a capacidade de sintetizar ou de utilizar os LC-PUFAs no cérebro. Os genes *FADS* (do inglês, *fatty acids desaturases*) estão localizados em um aglomerado 100 quilobases no braço longo do cromossomo humano 11 (HSA11q12-13.1) (21) e codificam enzimas dessaturases, responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos insaturados. Variantes gênicas no complexo *FADS* influenciam a disponibilidade plasmática, tecidual e celular de PUFAs a curto, médio e longo prazo (22-24), tendo sido implicadas na redução da biossíntese de LC-PUFA (25). Um estudo de varredura genômica (GWAS) identificou alguns *loci* dos genes do complexo *FADS1-2* que associavam-se a níveis mais altos de ALA, um n-3 PUFA e de ácido linoleico (LA), um n-6 PUFA e níveis mais baixos de EPA e de DHA (26), sugerindo que a concentração sérica de PUFAs possui um importante componente de herdabilidade. Outras duas pesquisas descreveram uma associação entre variantes genéticas do agrupamento de genes *FADS1-2* e os níveis plasmáticos maternos de LC-PUFA (27, 28) sobre habilidades sociais em crianças (29). Rzehak *et al.* (24), através de coortes de nascimentos de base populacional, demonstraram que a composição plasmática de PUFAs em crianças era fortemente controlada pelo complexo de genes *FADS*. O TDAH esteve associado a polimorfismos dos genes *FADS* em um estudo de ligação e em outro estudo de gene candidato (30, 31). Neste último trabalho, somente o grupo com a variante do gene *FADS1* exposto à adversidade apresentou associação com TDAH (30, 31). Estes estudos demonstraram que variantes do complexo *FADS* influenciam a disponibilidade plasmática e tecidual de curto, médio e longo prazo dos PUFAs, estando associadas a variações nos níveis de LC-PUFA e a fenótipos humanos complexos (22, 24, 25, 32-34).

Variantes genéticas atuam sobre os ácidos graxos da dieta, contribuindo de maneira diferencial na estruturação e funcionamento do sistema nervoso central desde os estágios precoces, programando variados desfechos clínicos (23, 25, 33, 35). A dieta ocidental moderna tem contribuído para o início e a progressão de doenças crônicas uma

vez que componentes dietéticos mal adaptativos estão associados à obesidade e a interações patológicas entre dieta e gene (35). A dieta ocidental aumentou em pelo menos três vezes a quantidade de LA, através da adição de óleos vegetais e alimentos processados, aumento que tem sido associado a um impacto significativo na saúde (36). Estudos demonstraram que variantes relacionadas à via biossintética dos LC-PUFA, especialmente no grupo dos genes *FADS*, estão associadas a variações nos níveis de PUFAs circulantes e teciduais e a vários biomarcadores e parâmetros clínicos inflamatórios e cardiovasculares (37, 38). Por exemplo, um estudo mostrou que variantes genéticas dos genes *FADS1-2* conferiram suscetibilidade a distúrbios inflamatórios em crianças (39). Outra pesquisa descreveu que variantes do cluster *FADS* se associavam a doenças inflamatórias e função cerebral, agindo através de produtos moleculares intermediários sobre níveis cerebrais de PUFAs (40).

Múltiplas formas de adversidade precoce predizem o risco de psicopatologia ao longo da vida (41-45). Estudos do *Kaiser Center for Disease Control* mostraram que o número de experiências adversas na infância prediz uma ampla gama de desfechos, como depressão e uso de substâncias, doenças cardiovasculares e risco de suicídio e agressão (46-50). Nestes estudos, várias formas de eventos adversos foram consideradas de maneira aditiva e o índice cumulativo de adversidade foi usado como preditor de desfechos ao longo da vida, evidenciando a correlação entre exposição a inúmeros estressores durante diferentes períodos do desenvolvimento (51). A maioria das pesquisas investiga separadamente adversidades extremas; embora tais estressores sejam mais comuns do que se pensava inicialmente, a intensidade da exposição em toda a população pode ser mais branda, com pouca variação nos componentes discretos dessas pontuações e o risco de um desfecho negativo provavelmente dependerá de outras adversidades sutis (52). Além disso, sabe-se que os indivíduos apresentam sensibilidade heterogênea para experiências traumáticas precoces e exposições ambientais (53), refletindo ou (i) o modelo clássico de diátese-estresse, que postula que algumas pessoas são desproporcionalmente vulneráveis aos efeitos negativos da adversidade contextual (54) ou (ii) o modelo da suscetibilidade diferencial, que propõe que estes mesmos indivíduos também se beneficiariam desproporcionalmente de suporte e enriquecimento contextual (55-57). Apesar da ênfase de modelos GXA em exposições ambientais adversas e favoráveis, a maioria das pesquisas observacionais que estudam a suscetibilidade diferencial se concentrou na presença ou ausência de adversidade, o que poderia enviesar os resultados. A partir de metodologias rigorosas que avaliaram a natureza de interações

GXA (58-60), propomos um modelo de plasticidade fenotípica a partir de uma ampla variação entre ambientes altamente negativo ao altamente positivo (55, 61). Neste trabalho, utilizamos uma escala que parametriza escores ambientais, com base nas mesmas medidas, para mensurar a variação ambiental num dado momento, escalonando adversidade versus suporte. Usando dados de dois estudos longitudinais de coortes de nascimentos, calculamos um escore cumulativo de adversidade e de suporte com base no número de condições pós-natais.

Estudos de *GWAS* (do inglês, *genome-wide associations study*) e de escores de risco poligênico (do inglês, *polygenic risk score*, PRS) identificam associações estatisticamente significativas de polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphism*, SNPs) e uma determinada condição ou característica, mas ignoram o fato de que os genes operam em redes e codificam funções biológicas precisas em tecidos específicos. A fim de criar um biomarcador que reflita a fisiopatogenia multidimensional das doenças complexas, elaboramos uma ferramenta de avaliação que considera redes gênicas produzindo funções biológicas coerentes e adaptativas (escore poligênico baseado em expressão, do inglês *expression.-based polygenic risk score*, ePRS). Através de uma nova abordagem genômica que cria pontuações poligênicas que representam a função de redes genéticas em áreas cerebrais específicas e um escore que reflete amplas variações de contexto ambiental, o objetivo deste trabalho é investigar: 1- a força e a amplitude de associações entre a medida cumulativa de adversidade e suporte pós-natais e os desfechos de impulsividade e sintomas de TDAH; 2- o efeito da associação entre a variação da expressão gênica da rede do *FADS1* no CPF (envolvida no metabolismo dos PUFAs) e o ambiente pós-natal (adversidade e suporte) sobre desfechos de impulsividade e TDAH; 3- o modelo de plasticidade fenotípica resultante da GXA.

## **2 Métodos**

### **2.1 Participantes**

Utilizamos dados de duas coortes prospectivas de nascimentos, uma baseada no Canadá, a coorte principal, *Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment* (MAVAN) (62), e outra coorte baseada em Bristol, o chamado projeto *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children- ALSPAC* (63).



### **Coorte principal- MAVAN**

MAVAN é uma coorte comunitária formada por mães canadenses e seus filhos, na qual as então gestantes com mais de 18 anos foram recrutadas em Montreal (Quebec) e Hamilton (Ontário), Canadá. A aprovação para o projeto MAVAN foi obtida nas Universidades McGill, McMaster e na Universidade de Montreal e nos hospitais Royal Victoria, Geral Judaico, Maisonneuve-Rosemount, St. Joseph's, além do Centro Hospitalar da Universidade de Montreal. Um total de 135 crianças de ambos os sexos apresentaram dados completos [registros de nascimento, genótipo e tarefa *informational sampling task* (IST), da bateria CANTAB] aos 5 anos de idade e foram incluídos neste estudo.

### **Coorte de comparação - ALSPAC**

ALSPAC é um estudo observacional prospectivo transgeracional que investiga influências na saúde e no desenvolvimento ao longo da vida. Ele considera múltiplas exposições genéticas, epigenéticas, biológicas, psicológicas, sociais e outras exposições ambientais em relação a uma gama igualmente diversificada de resultados de saúde, sociais e de desenvolvimento. 14541 gestantes com idade mínima de 18 anos foram recrutadas para acompanhamento entre o período de 1990–92. O projeto envolveu a coleta de uma ampla gama de medidas fenotípicas e ambientais, além de amostras biológicas. Foram coletadas várias medidas de IMC, composição corporal, glicose e insulina ao longo do tempo, bem como preferência e comportamento alimentar, além de avaliações psicométricas. A aprovação ética do estudo foi obtida no Comitê de Ética e Direito da ALSPAC (IRB nº 00003312) e nos comitês locais de ética em pesquisa (Bristol e Weston Health Authority, Southmead Health Authority e Frenchay Health Authority). O consentimento informado para o uso dos dados coletados por meio de questionários e clínicas foi obtido dos participantes, seguindo as recomendações do Comitê de Ética e Direito da coorte ALSPAC. Os dados ALSPAC utilizados neste projeto foram adquiridos através do financiamento de pesquisa do *Canadian Institutes of Health Research* (CIHR) de acordo com o ALSPAC *access policy*, disponível em [http://www.bristol.ac.uk/media-library/sites/alspac/documents/researchers/data-access/ALSPAC\\_Access\\_Policy.pdf](http://www.bristol.ac.uk/media-library/sites/alspac/documents/researchers/data-access/ALSPAC_Access_Policy.pdf) .

## 2.2 Preditores

### 2.2.1 Escore poligênico baseado na expressão- ePRS

Selecionamos o gene *FADS1* – relacionado à biossíntese dos PUFA. Utilizando um protocolo previamente descrito (64, 65), genes co-expressos e co-repressos ao *FADS1* no CPF foram extraídos ( $r > \pm 0.5$ ) na plataforma *BrainEAC* (*Brain eQTL Almanac*: <http://www.braineac.org/>). No atlas *BRAINSPAN* (Atlas do Cérebro Humano em Desenvolvimento, <https://www.brainspan.org/>) (66), filtramos genes 1.5 vezes superexpressos no CPF regulados por idade, do nascimento aos 11 anos. Após mergir as duas listas, utilizamos os resultantes 241 genes co-expressos ao *FADS1* e mais expressos no período selecionado da infância para buscar as respectivas variantes genéticas no banco online do *National Center for Biotechnology Information* (NCIB: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/>). Usando a expressão genotípica tecidual [(GTEx) <https://www.gtexportal.org/home/>] (67), os SNPs coletados foram então ponderados usando dados da expressão gênica de acordo com o genótipo das crianças do MAVAN (68) e ALSPAC (69), agregando em uma pontuação por indivíduo. A partir desse procedimento, foi possível calcular a mediana do escore genético, classificando os indivíduos entre a alta e baixa expressão gênica da rede *FADS1*-CPF. A figura 1 representa as etapas de elaboração do escore genético.

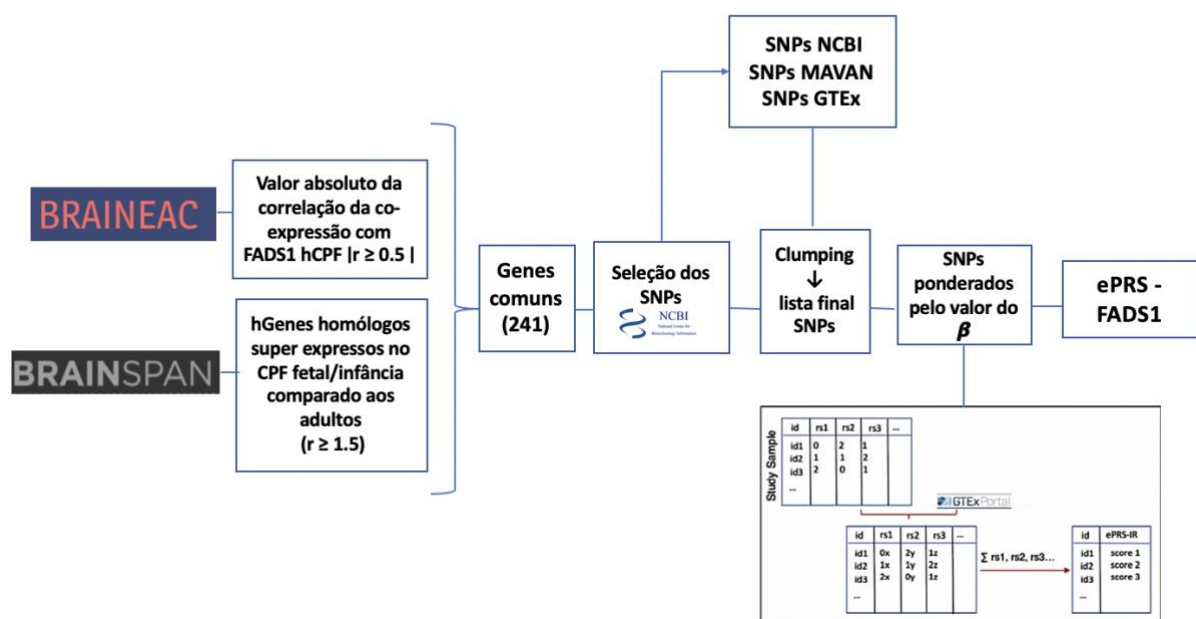


Figura 1. Fluxograma das etapas envolvidas na criação do escore de risco poligênico baseado nos genes co-expressos ao *FADS1* no córtex pré-frontal (ePRS *FADS1*- CPF).

### 2.2.2 Escore ambiental C

O escore ambiental pós-natal utilizou medidas de adversidade e de suporte do ambiente, a partir de dados de estudos prévios (65, 68, 70). A tabela 1 apresenta variáveis e pontos de corte que foram usados para os cálculos em ambas as coortes. Esta pontuação considerou aspectos adversos e também condições positivas ambientais. A presença de cada componente positivo estabelecido pelo seu ponto de corte recebeu 1 ponto. A pontuação total foi representada pela soma dos pontos. Os percentis de peso ao nascer e a renda bruta da família foram calculados usando referências locais (71). As informações de saúde mental materna foram extraídas de diferentes questionários: Inventário de Depressão de Beck (BDI), um inventário autoaplicável de 21 perguntas e múltipla escolha que avalia gravidade de sintomas depressivos (72); *Edinburgh Postnatal Depression Scale* (EPDS), uma escala de autorrelato de 10 itens projetada para rastrear a depressão pós-parto (73) e o *State-Trait Anxiety Inventory* (STAI), escala autoaplicável de duas versões de 20 itens cada usados para medir traços e estados de ansiedade (74). Para medir os tipos de estilos de apego em crianças em idade pré-escolar, foi utilizado *Preschool Separation – Reunion Procedure* (PSRP) (75), tendo uma interação de base seguida por dois episódios de separação e reunião com duração de 5 minutos gravados e pontuados através de vídeo (confiabilidade  $k = 0,83$ ). O *Family Assessment Device* (FAD), um instrumento de autorrelato de 60 itens, foi usado para avaliar diferentes domínios do funcionamento da família (76). A escala de tensão conjugal de Pearlin e Schooler foi usada para avaliar o estresse crônico com o parceiro (77). Por fim, um questionário de autorrelato de amamentação (78) foi usado para investigar a idade em que o bebê (em semanas) foi alimentado pela primeira vez com algo diferente de leite materno e a idade do bebê (em semanas) quando as mães interromperam a amamentação.

Tabela 1. Variáveis e pontos de corte usados para criar pontuações de adversidade e suporte para o escore ambiental C pós-natal nas coortes MAVAN e ALSPAC

Escore C	Coorte		
	MAVAN	ALSPAC	
Adversidade	Hospitalização nos primeiros 6 meses de vida	Hospitalização nos primeiros 6 meses de vida	
	Percentil do tamanho de nascimento <10 ou > 90	Percentil do tamanho de nascimento <10 ou > 90	
	Idade gestacional $\leq$ 37 semanas	Idade gestacional $\leq$ 37 semanas	
	Fumo durante a gestação.	Fumo durante a gestação.	
	Renda bruta total < 30.000 \$	Índice de densidade domiciliar pós-natal > 1	
	Problemas financeiros > 7	Problemas financeiros > 7	
	Violência doméstica/abuso sexual	Violência doméstica/abuso sexual	
	Apego inseguro		
	Função familiar deficiente FAD $\geq$ 2,00		
	Escore de tensão conjugal > 3,32		
	Saúde mental materna: BDI > 14, EPDS > 9 ou STAI > 92	Saúde mental materna: BDI > 14, EPDS > 9 ou STAI > 92	
	Suporte	Tamanho no nascimento $\geq$ 40% e $\leq$ 70%	Tamanho no nascimento $\geq$ 40% e $\leq$ 70%
		Idade gestacional 39- 40 semanas	Idade gestacional 39- 40 semanas
		Renda bruta total > 80.000 \$	Índice de densidade domiciliar pós-natal < 0,56
Amamentação > 3 meses		Amamentação > 3 meses	
Apego seguro			
Boa função familiar FAD $\leq$ 1,15			
Tensão conjugal < 1,45			

*Postnatal Depression Scale* (EPDS), Inventário de Depressão de Beck (BDI), Family Assessment Device (FAD)

## 2.3 Desfechos utilizados na coorte MAVAN

**2.3.1 Information Sampling Task (IST)** da bateria CANTAB, foi projetado para medir a impulsividade de reflexão e tomada de decisões (79) e foi aplicada aos 72 meses de idade dos participantes do MAVAN. O IST mede a impulsividade de reflexão calculando a probabilidade em selecionar a resposta correta após a tomada de decisão com base nas informações previamente coletadas. Em cada tentativa, as crianças são apresentadas a uma matriz  $5 \times 5$  de caixas cinza e dois painéis coloridos em uma tela de computador (Figura 2). Os participantes são informados de que é um jogo de pontos, vencido pela escolha correta da cor sob a maioria de caixas cinza. Ao tocar em uma caixa cinza, imediatamente abre essa caixa para revelar uma das duas cores exibidas na parte inferior da tela. Os participantes podem abrir caixas por vontade própria sem limite de tempo antes de decidir entre uma das duas cores, indicando sua decisão tocando em um dos dois

painéis na parte inferior da tela. Quando o fazem, as caixas restantes são descobertas e uma mensagem é exibida para informá-las se estão ou não corretas. A principal medida de resultado de desempenho é a probabilidade média de estar correto no ponto de decisão (*P Correct*). Assim, *P Correct* é a probabilidade de que a cor escolhida no ponto de decisão esteja correta, com base apenas na evidência disponível para o sujeito no momento da tarefa, dependendo da quantidade de informações utilizadas (80-82).

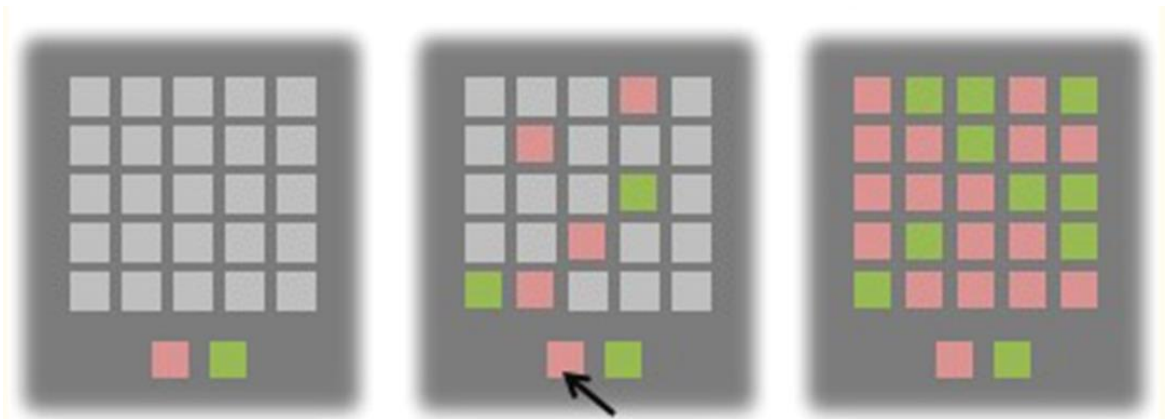


Figura 2. *Information Sampling Task* (83)

**2.3.2 *Child behavior check list -CBCL* (84)** preenchido aos 48 e 60 meses. O CBCL é um instrumento amplamente usado para avaliar problemas sócio emocionais e comportamentais em crianças. O CBCL é um formulário respondido pelos pais no qual a pontuação é baseada em domínios comportamentais reunidos em subescalas. A versão para crianças com idade entre 6 meses e 5 anos é composta por 99 itens a serem respondidos pelos responsáveis da criança. Os itens avaliam sete escalas de síndromes: emocionalmente reativo; ansioso-deprimido; queixas somáticas; retraído; problemas do sono; problemas de atenção e hiperatividade; comportamento agressivo. Os quatro primeiros domínios constituem os problemas internalizantes e os dois últimos formam os problemas externalizantes. As sete escalas de síndrome juntas expressam os problemas emocionais e comportamentais totais. Cada avaliação é classificada como “normal”, “limítrofe” ou “clínica”. Além do resultado que indica as escalas da síndrome, o CBCL também avalia estressores gerados orientados conforme Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – IV.

## **2.4 Desfecho utilizado na coorte ALSPAC**

**2.4.1 *Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ)***: é um instrumento para triagem de problemas em saúde mental criado por Robert Goodman na década de 1990. Desde então, tem sido amplamente utilizado em pesquisa científica e no contexto clínico para identificar transtornos mentais, avaliar a gravidade dos sintomas e / ou o impacto da psicopatologia em crianças e adolescentes (85).

## **2.5 Análises de enriquecimento /Validação da rede de co-expressão *FADSI*- CPF**

### **2.5.1 Análise de enriquecimento de ontologia genética**

O projeto *Gene Ontology* fornece uma fonte abrangente de genômica funcional. O projeto é um esforço colaborativo que cria anotações baseadas em evidências para descrever os papéis biológicos de produtos genômicos individuais (por exemplo, genes, proteínas, complexos), classificando-os usando as ontologias descritas conforme Ashburner *et al.*, 2000 (86). O termo ontologia genética (OG) pode ser usado para descrever três tipos de produtos de genes, inclusive o processo biológico no qual eles estão implicados, sua função molecular e localização subcelular (87). análise de enriquecimento das ontologias funcionais dos genes incluídos no ePRS-*FADSI* foi realizada usando o MetaCore™ (Clarivate Analytics: <https://portal.genego.com>) e está ilustrado no material suplementar, nas figuras 1,2,3 e 4. A análise dos processos biológicos foi realizada no sistema de classificação Panther™ (do inglês, *protein analysis through evolutionary relationships*) (88), conforme demonstrado em material suplementar. Este sistema de classificação é um grande banco de dados biológico de famílias de genes e proteínas e suas subfamílias relacionadas funcionalmente que podem ser usadas para classificar e identificar a função de produtos genéticos.

### **2.5.2 Análise de redes de interação proteína-proteína:**

As redes de interação proteína-proteína são componentes importantes para a compreensão do nível sistêmico dos processos celulares. Essas redes podem ser usadas para filtrar e avaliar dados genômicos funcionais e para fornecer uma plataforma intuitiva para anotar propriedades estruturais, funcionais e evolutivas de proteínas. A exploração das redes de interação preditas pode sugerir novas direções para futuras pesquisas experimentais e fornecer previsões entre espécies para um mapeamento eficiente da interação (89). O banco de dados STRING™ (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*: <https://string-db.org>) foi usado para analisar interações funcionais entre a proteína correspondente da nossa lista de genes co-expressos *FADSI* (241 genes) e os 241 genes principais selecionados, associados aos SNPs do GWAS para TDAH (41), conforme apresentado no material suplementar.

### **2.6 Análise Estatística**

Os dados foram analisados usando o *Statistical Package for the Social Sciences* versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) e do programa R. Os níveis de significância para todas as medidas foram estabelecidos em  $\alpha = 0,05$ . O teste t de Student foi realizado para comparar os dados contínuos das características da amostra. Testes de Chi quadrado foram realizados para analisar as variáveis categóricas das características da amostra. Utilizamos de regressões lineares para examinar o efeito da interação entre o escore genético (divisão mediana para ePRS baixo e alto) e o escore C pós-natal. Os resultados obtidos a partir das regressões foram submetidos a análises post hoc, para identificar diferenças. As análises de enriquecimento de rede de genes, a construção da rede de interação proteína-proteína e de seus processos biológicos foram realizados usando o MetaCore™, o banco de dados STRING™ e o sistema de classificação PANTHER™, respectivamente.

### 3 Resultados

Não encontramos diferenças significativas entre os dois grupos de escores genéticos considerando as principais variáveis de base analisadas, conforme demonstrado na Tabela 2. Utilizamos variáveis bem estabelecidas que podem afetar o neurodesenvolvimento infantil como possíveis confundidores: peso ao nascer e idade gestacional, idade materna, status socioeconômico e nível de escolaridade materna.

Tabela 2. Características amostrais na coorte MAVAN

Características amostrais	Total (N = 135)	baixo <i>FADSI</i> (N = 58)	alto <i>FADSI</i> (N = 77)	p
Gênero (M) <sup>b</sup>	48.9% (66)	50.0% (29)	48.1% (37)	0.823
Idade materna (anos) <sup>a</sup>	30.73 (4.65)	31.41 (4.96)	30.21 (4.37)	0.141
Idade gestacional (semanas) <sup>a</sup>	39.18 (1.23)	38.98 (1.18)	39.32 (1.25)	0.109
Peso ao nascer (gramas) <sup>a</sup>	3310 (460)	3301 (388)	3316 (510)	0.850
Amamentação (meses) <sup>a</sup>	7.37 (4.87)	7.59 (4.72)	7.21 (5.00)	0.655
Tabagismo na gestação <sup>b</sup>	12.6% (17)	8.6% (5)	15.6% (12)	0.227
Educação materna <sup>b</sup>	57.0% (77)	56.9% (33)	57.1% (44)	0.977
Baixa renda (60 meses) <sup>b</sup>	14.2% (19)	12.3% (7)	15.6% (12)	0.588

<sup>a</sup> teste t Student; <sup>b</sup>teste de Chi quadrado. Dados expressos em médias±SEM ou proporções (percentual)

Os resultados da coorte MAVAN evidenciaram uma interação significativa entre o escore C pós-natal e a baixa expressão da rede de gene *FADSI*, no questionário que avalia sintomas de TDAH ( $\beta=388.3$ ,  $p=0.003$ ). A análise *post hoc* indicou que em um ambiente adverso, a baixa expressão da rede do gene *FADSI*- CPF prediz sintomas de TDAH ( $\beta=-0.48$ ,  $p<0.00$ ), conforme o gráfico da Figura 3. Também observamos um efeito de interação estatisticamente significativo entre o escore C pós-natal e a baixa expressão da rede do gene *FADSI*-CPF na tarefa do IST ( $\beta=9.07$   $p=0.037$ ). A análise *post hoc* revelou que adversidade pós-natal estava associada a um pior desempenho na tarefa que avaliou impulsividade reflexiva, à medida que a expressão gênica da rede do *FADSI*-CPF diminuía ( $\beta=0.02$ ,  $p= 0.0005$ ; Figura 4), no grupo de crianças de 5 anos da coorte MAVAN. A análise das interações dos gráficos das Figuras 3 e 4 revelou estar em



acordo com o modelo de diátese-estresse, segundo o método de Roisman *et al.*, (2012) (60); os dados foram agrupados por desvio padrão, para fins de visualização.

Ao analisar os resultados da coorte ALSPAC, evidenciamos interações significativas entre o escore genético da expressão da rede do *FADS1*-CPF e o escore ambiental C, no desfecho que avaliou hiperatividade em crianças aos 9 anos, conforme  $\beta=-141.82$ ,  $p=0.02$ . A análise *post hoc* indicou efeitos significativos tanto para o grupo de baixa expressão gênica ( $\beta=-0.13$ ,  $p=0.00$ ) quanto para o grupo de alta expressão da rede do gene *FADS1*, com  $\beta=-0.23$  e  $p=0.00$ , sugerindo que, nesta situação, o ambiente adverso pós-natal desempenhe um papel preponderante na interação, principalmente para o grupo baixa expressão ( $\beta=-0.13$ ,  $p=0.00$ ). A análise da interação da expressão gênica representado no gráfico da figura 5 evidenciou o efeito compatível com suscetibilidade diferencial.

Tabela 3. Características amostrais na coorte ALSPAC

Características amostrais	Total (N = 4223)	baixo <i>FADS1</i> (N = 2116)	alto <i>FADS1</i> (N = 2107)	<i>p</i>
Gênero (M) <sup>b</sup>	50.4% (2129)	50.6% (1070)	50.3% (1059)	0.842
Idade materna (anos) <sup>a</sup>	39.76 (1.26)	39.76 (1.28)	39.77 (1.24)	0.724
Peso ao nascer (gramas) <sup>a</sup>	3503 (460)	3507 (469)	3500 (451)	0.597
Amamentação (meses) <sup>a</sup>	51.1% (2158)	51.9% (1099)	50.3% (1059)	0.276
Tabagismo na gestação <sup>b</sup>	18.5% (782)	17.5% (370)	19.6% (412)	0.084
Indicador de renda- (crowding index)	40.3% (1577)	40.2% (790)	40.4% (787)	0.900

<sup>a</sup> teste t Student; <sup>b</sup> teste de Chi quadrado. Dados expressos em médias $\pm$ SEM ou proporções (percentual)

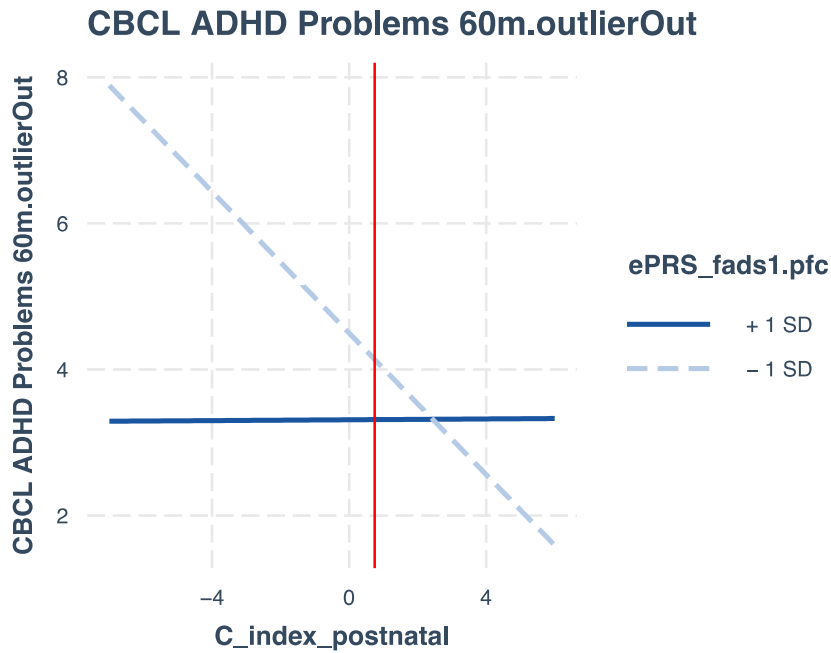


Figura 3. *Child behavior check list -CBCL ADHD problems* (MAVAN). O gráfico evidenciou uma interação significativa entre a expressão gênica da rede do gene *FADS1* no CPF e o escore ambiental C no questionário que avalia TDAH, em crianças de 5 anos da coorte MAVAN

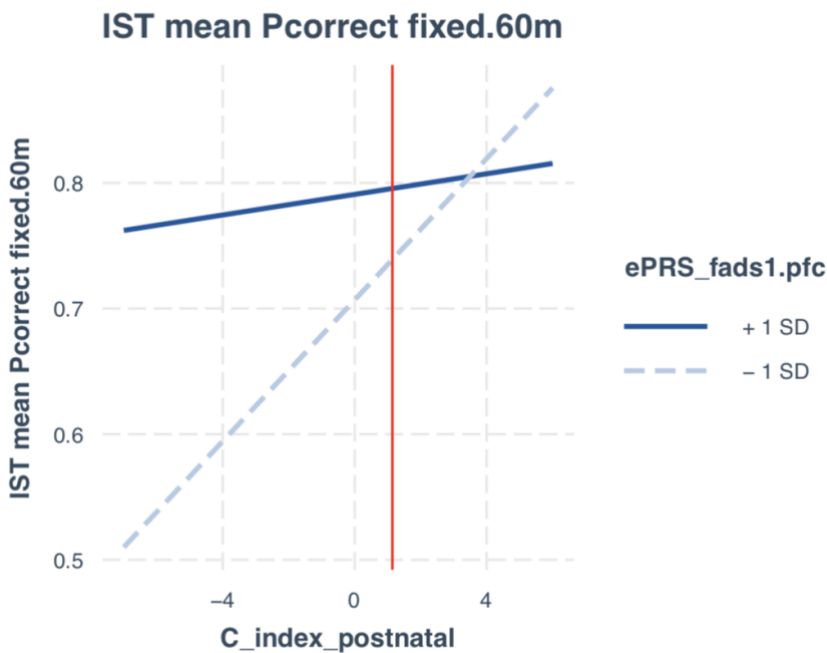


Figura 4. *Information Sampling Task - mean P correct score, win condition fixed*, (CANTAB, MAVAN): Quanto menor a pontuação representada no eixo y, mais impulsiva era a criança. O gráfico apresentou uma interação significativa entre a baixa expressão da rede do gene *FADS1* no CPF e o ambiente pós-natal nos primeiros 5 anos de vida nos escores de impulsividade, onde adversidade se relacionou a escores mais baixos (aumento da impulsividade de reflexão) nas crianças da coorte MAVAN.

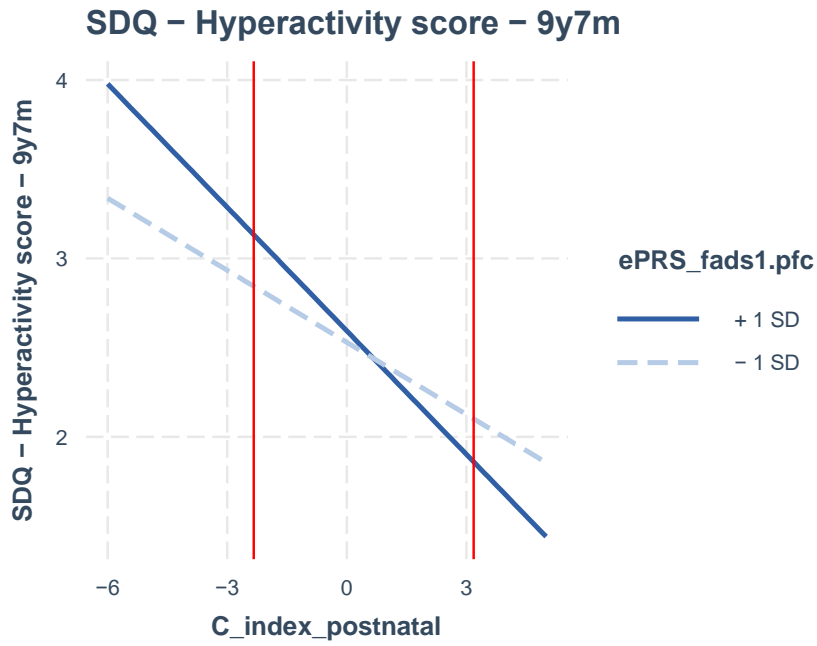


Figura 5. *Strengths and Difficulties Questionnaire for hiperactivity* (ALSPAC): Este gráfico mostrou uma interação significativa entre a expressão da rede do gene *FADS1* no CPF e o ambiente pós-natal nos primeiros 9 anos de vida para hiperatividade, onde a adversidade se relacionou a escores mais altos nesta população.

## 4 Discussão

Neste trabalho, através de uma nova ferramenta de bioinformática, demonstramos que a associação entre adversidade precoce e função executiva na infância foi moderada pela expressão da rede de genes *FADSI* específica do CPF. Através de um escore que mediu tanto adversidade quanto suporte ambiental, demonstramos que adversidade precoce e o ePRS estavam associados a comportamentos impulsivos e a sintomas de TDAH em crianças de 5 anos, na coorte MAVAN. Nossos achados evidenciaram que a baixa expressão da rede do gene *FADSI* no CPF predisse impulsividade reflexiva e comportamentos relacionados ao TDAH, em crianças expostas à adversidade pós-natal. A análise dos resultados também foi capaz de distinguir a natureza da relação entre as variáveis como modelo de duplo risco ou diátese-estresse. Os resultados da interação gene- ambiente para os participantes da coorte ALSPAC expostos a adversidades precoces mostrou que tanto alta quanto baixa expressão gênica da rede do *FADSI* no CPF, se associaram a pior desempenho na avaliação para hiperatividade, com predominância de efeito da baixa expressão gênica. Neste caso, a natureza do efeito moderador encontrado foi de suscetibilidade diferencial genética.

O TDAH pode ser compreendido como uma desordem global da função executiva (FE) (90). A FE é conceitualmente compreendida como a capacidade de orientar ativamente comportamentos com base nas representações do mundo interior e exterior, através da coordenação de um conjunto heterogêneo de funções mediadas pelo CPF, como controle inibitório, monitoramento de desempenho e memória de trabalho (91). O processamento de informações e a resposta a desafios ambientais permite ao córtex pré-frontal desenvolver mecanismos plásticos ligados a habilidades sociais e cognitivas, auxiliando o indivíduo a funcionar e se relacionar socialmente. Insultos genéticos e ambientais podem afetar muitos processos sinápticos, que são modulados por alterações na expressão, reciclagem, segmentação e degradação de moléculas sinápticas. Estes desarranjos atuam sobre redes neurais que podem levar ao aparecimento de transtornos neuropsiquiátricos (92, 93). Compreender os mecanismos de modulação da plasticidade quando o CPF é particularmente vulnerável permite auxiliar no desenvolvimento adequado de estratégias de prevenção e de tratamento.

Estudos têm ligado os n-3 PUFAs ao TDAH (18, 94-96) a partir de resultados de pesquisas em animais expostos a deficiências de ácidos graxos que apresentaram prejuízos cognitivos-comportamentais e também sobre a modulação do sistema

dopaminérgico. Além disso, pesquisas com pacientes que apresentavam transtornos neurodesenvolvimentais tiveram boa resposta de desempenho de funções cognitivas após a suplementação de DHA. Sabe-se que os genes *FADS* estão implicados com variações nos níveis de PUFAs teciduais, tendo sido demonstrado que algumas variantes modificam as concentrações de LC-PUFA no leite materno (16, 17), sendo responsáveis, em parte, por efeitos sobre cognição (quociente de inteligência), emoção e comportamento. Um estudo identificou que variantes *FADS1* estavam associadas ao TDAH apenas no grupo com história de adversidade precoce (31). Outro estudo relatou influências de polimorfismos dos genes *FADS* sobre concentrações de n-3 PUFAs no eritrócito materno, com interrupção do fornecimento de DHA para o bebê durante a gestação (97). Estudos em animais também demonstraram que alterações irreversíveis e persistentes na composição fosfolipídica hipotalâmica resultaram de uma relação n-6: n-3 anormalmente alta no início da vida, o mesmo resultado disfuncional causado pelas dessaturases sobre a conversão de ALA em DHA (98). Além disso, os genes *FADS1-2* estão também envolvidos na regulação dos níveis de eicosanóides pró e anti-inflamatórios (99), substâncias que contribuem para as propriedades físico-químicas da membrana (100-102). Assim, pesquisas que ligaram deficiências de n-3 PUFAs, variantes do gene *FADS1* e alteração em função executiva estão em consonância com nossos resultados da coorte MAVAN, o que sugere a existência de uma alteração na rede genética local do *FADS1*.

A partir dos resultados encontrados na coorte MAVAN, é possível supor alterações moleculares ligando a biossíntese de DHA com a transmissão dopaminérgica. O DHA é um dos vários ligantes do receptor nuclear RXR (103) e, como tal, a ingestão alimentar de DHA pode desempenhar um papel na regulação do RXR. A família RXR consiste em três isotipos principais: RXR- $\alpha$ , RXR- $\beta$  e RXR- $\gamma$ . RXR- $\alpha$  é expresso no fígado, rim, baço placentar, epiderme e tecido visceral; RXR- $\beta$  é expresso em quase todos os tecidos do corpo; RXR- $\gamma$  é expresso principalmente no tecido muscular e cerebral. Os papéis fisiológicos do RXR são complexos e não completamente compreendidos, mas sabe-se que as isoformas do RXR estão envolvidas no metabolismo muscular, resistência à insulina, aterosclerose e metabolismo do colesterol, apoptose e uma variedade de processos de diferenciação, incluindo o desenvolvimento neuronal (104). No sistema dopaminérgico, o RXR é um fator crucial de desenvolvimento e sobrevivência neuronal e atua em conjunto com os receptores NR4A1, proteína 1 relacionada ao receptor nuclear (Nurr1) e fator de crescimento neural 1B (Nur77) (105). O RXR forma heterodímeros com muitos outros receptores nucleares, implicando-o em várias vias de transcrição. Em

particular, o RXR heterodimeriza com Nurr1 e Nur77. Nurr1 é crucial para o desenvolvimento neuronal dopaminérgico, bem como a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (106). Nurr1 é expresso principalmente na substância negra, na área tegmentar ventral e nas áreas límbicas, onde a dopamina desempenha um papel vital. A expressão dessas proteínas atinge o pico no embrião, mas permanece alta nos neurônios dopaminérgicos durante toda a vida útil, como o Nurr1 expresso em 96% dos neurônios da substância negra do adulto (107-109). O Nurr1 regula a transcrição da tirosina hidroxilase e do transportador de dopamina pela ligação ao de elemento de resposta do fator de crescimento neural 1B (NBRE) na região não traduzida 5' e se liga ao RXR. O heterodímero resultante desempenha um papel importante no desenvolvimento dos neurônios (110, 111). Os campos terminais dopaminérgicos expressam as isoformas RXR- $\beta$  e RXR- $\gamma$ . Camundongos deficientes desses receptores têm função motora prejudicada e diminuição da transcrição de RNAm dos receptores D1 e D2 no estriado (112). Verificou-se também que animais knockout para RXR-  $\gamma$  apresentam anormalidades na plasticidade sináptica e no aprendizado (104). Embora o papel específico dos n-3 PUFAs nos efeitos mediados por RXR no sistema dopaminérgico ainda não esteja totalmente elucidado, é provável que esses ácidos graxos influenciem o desenvolvimento e sobrevivência neuronal dopaminérgica através destes mecanismos.

Muitas evidências sustentam a associação entre adversidade precoce e risco para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos (41, 113-115). Os estudos apontam para modelos onde adversidades programam alterações fisiológicas, cognitivas e afetivas, induzindo, por exemplo, alterações na atividade dopaminérgica central, levando a mudanças na função cerebral que promove desinibição comportamental e conduta de risco (114). Sabe-se que alterações adaptativas na estrutura e função do CPF durante períodos críticos do desenvolvimento são o resultado da capacidade plástica cerebral. Os períodos pré e perinatal são descritos como fases de maior vulnerabilidade a insultos, podendo ser afetados por fatores genéticos e ambientais, este último incluindo exposição à inflamação no útero, complicações obstétricas e estresse precoce (116, 117). O estresse perinatal afeta níveis de expressão das moléculas envolvidas no eixo HHA e nas vias inflamatórias, causando alterações persistentes (118, 119) na maturação do CPF (120). Alterações nos sistemas neuromoduladores como o da dopamina podem afetar a maturação e integração de neurônios inibitórios no circuito local do CPF (121). Estas alterações inibitórias de redes locais afetariam conjuntos neurais na atividade de rede do CPF (122). Sistemas neuromoduladores também podem afetar o limiar sensorial e a

relação sinal/ruído nos circuitos (123), afetando o controle *top-down* de comportamento e motivação (124). Além disso, os efeitos da adversidade nos oligodendrócitos e mielinização pode afetar a conectividade e a sincronia entre o cérebro e outras áreas (125). Um estudo recente demonstrou que múltiplas adversidades na infância estavam associadas a alterações na composição da microbiota intestinal durante a gestação materna. A pesquisa sugeriu que essas alterações contribuiriam para ativação da resposta inflamatória e do estresse: mulheres com alto nível de estressores e alta ingestão de n-3 PUFAs tiveram resposta inflamatória atenuada ao estresse agudo, com efeitos potencialmente protetores dos ômega-3 nesta população. Pesquisas vem apontado o CPF como a região cerebral menos restrita à programação genética e mais sensível ao ambiente e às experiências, uma vez que é a última área a amadurecer (126, 127), onde variantes que codificam proteínas da via dopaminérgica mostraram alta sensibilidade ao ambiente (128). Todas estas evidências apontam para um papel chave dos n-3 PUFAs como mediador das respostas ao estresse e inflamação ativados por adversidades, sustentando nossos achados tanto na coorte principal MAVAN quanto na coorte ALSPAC.

Os resultados encontrados para as coortes MAVAN e ALSPAC não são replicações porque comparamos períodos etários e dados de desfecho diferentes. Apesar disso, os resultados descritos para as duas coortes forneceram um panorama temporal do neurodesenvolvimento, que aponta para um processo biológico dinâmico, demonstrando o caráter cumulativo da adversidade, e indicando uma plasticidade diferencial da região pré-frontal. No MAVAN, o efeito preditor do escore genético foi do tipo diátese-estresse; no estudo ALSPAC, encontramos um efeito de suscetibilidade diferencial para o grupo de baixa expressão gênica, para os quais a experiência em um ambiente de suporte trouxe benefícios desproporcionalmente altos, sugerindo uma alta sensibilidade ambiental.

Estudos demonstraram que variações genéticas nos genes que codificam proteínas das vias dopaminérgica são altamente responsivas à variação ambiental (128, 129), e classicamente ligadas aos efeitos de “suscetibilidade diferencial”, tornando os indivíduos mais sensíveis tanto à adversidade quanto às influências ambientais positivas (56, 61). O CPF é a última região encefálica a finalizar o processo de neurodesenvolvimento (130-133). Hipóteses recentes afirmaram que esta diferença poderia ser explicada através da complexidade funcional da região, que recebe estímulos internos e externos que devem ser ajustados e modulados em conjunto com o ambiente (127). Assim, conforme o tempo passa, o córtex pré-frontal torna-se mais sensível ao fator ambiental, sugerindo um tipo

de plasticidade diferencial, uma estratégia adaptativa para garantir flexibilidade e variabilidade de repertórios comportamentais em uma região conhecida como “cérebro social”(127). Desta forma, tanto mecanismos genéticos que regulam aspectos nutricionais (PUFAs) quanto variações no ambiente precoce (distúrbios no cuidado parental) são elementos de neuroplasticidade dinâmicos. Nossos dados levantam questões importantes para abordagens preventivas e terapêuticas em transtornos neuropsiquiátricos e também para a pesquisa.

O método ePRS é uma abordagem robusta que vai além da busca de associações entre variantes e fenótipos genéticos dispersos, já que captura informações sobre toda a rede de genes e sua função em regiões cerebrais específicas, descrevendo processos biológicos (65, 68). Nossa análise de enriquecimento para a rede *FADSI* incluiu o desenvolvimento do sistema nervoso, o que está de acordo com a escolha de genes superexpressos durante a infância, a partir do *BrainSpan*. O enriquecimento de localizações extracelulares e intracelulares associa-se com a função da rede de genes *FADSI* e também às funções do DHA, ligando assim neurogênese, composição celular e vias de sinalização dopaminérgica (7, 40, 134-137). À medida que os *GWAS* se tornam ferramentas mais poderosas e específicas na detecção de associações de traços fenotípicos e /ou doenças em amostras clínicas, eles também são progressivamente menos sensíveis para capturar o espectro biológico e os endofenótipos - portanto, menos relevantes para amostras da comunidade e para aplicação em larga escala de medidas preventivas. O conceito de que os genes codificam processos biológicos e não doenças, e trabalham em redes e não isoladamente, é a ideia básica deste nosso método. Nossa abordagem inovadora aplicou a tecnologia *GWAS* ao entendimento das respostas adaptativas e da plasticidade às variações ambientais e de desenvolvimento.

As limitações desse estudo incluem a ausência de uma coorte de replicação e de medidas séricas de PUFAs. Além disso, os questionários foram respondidos pelos pais e não pelas crianças, diminuindo a acurácia dos resultados.



## **5 Conclusão**

A baixa expressão da rede do gene *FADS1* no córtex pré-frontal associou-se à impulsividade de reflexão, predizendo sintomas de TDAH em crianças de 5 anos expostas à adversidade pós-natal. Os achados reforçam a associação entre n-3 PUFAs, adversidade e alterações em função executiva. Nossos achados sustentam a ação de medidas preventivas direcionadas ao aumento no consumo de alimentos ricos em n-3 PUFAs e ao estímulo à criação e manutenção de programas de promoção da saúde que abrangem a família.

## 6 Referências Bibliográficas

1. L. J. Stevens *et al.*, Essential fatty acid metabolism in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr* **62**, 761-768 (1995).
2. G. V. Polanczyk, G. A. Salum, L. S. Sugaya, A. Caye, L. A. Rohde, Annual research review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *J Child Psychol Psychiatry* **56**, 345-365 (2015).
3. T. G. Costa Dias *et al.*, Characterizing heterogeneity in children with and without ADHD based on reward system connectivity. *Dev Cogn Neurosci* **11**, 155-174 (2015).
4. C. Bonvicini, S. V. Faraone, C. Scassellati, Common and specific genes and peripheral biomarkers in children and adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *World J Biol Psychiatry* **19**, 80-100 (2018).
5. B. B. Lahey, B. M. D'Onofrio, I. D. Waldman, Using epidemiologic methods to test hypotheses regarding causal influences on child and adolescent mental disorders. *J Child Psychol Psychiatry* **50**, 53-62 (2009).
6. J. Nigg, M. Nikolas, S. A. Burt, Measured gene-by-environment interaction in relation to attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **49**, 863-873 (2010).
7. M. Healy-Stoffel, B. Levant, N-3 (Omega-3) Fatty Acids: Effects on Brain Dopamine Systems and Potential Role in the Etiology and Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **17**, 216-232 (2018).
8. R. S. Reis *et al.*, Impulsivity-based thrifty eating phenotype and the protective role of n-3 PUFAs intake in adolescents. *Transl Psychiatry* **6**, e755 (2016).
9. J. R. Bernardi *et al.*, Early life stress interacts with the diet deficiency of omega-3 fatty acids during the life course increasing the metabolic vulnerability in adult rats. *PLoS One* **8**, e62031 (2013).
10. R. S. Reis *et al.*, Poor infant inhibitory control predicts food fussiness in childhood - A possible protective role of n-3 PUFAs for vulnerable children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **97**, 21-25 (2015).
11. A. Wiktorowska-Owczarek, M. Berezinska, J. Z. Nowak, PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med* **24**, 931-941 (2015).
12. V. Balanza-Martinez *et al.*, Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* **11**, 1029-1047 (2011).
13. C. Agostoni *et al.*, in *Int J Mol Sci.* (2017), vol. 18.
14. T. Larrieu, M. L. Hilal, V. De Smedt-Peyrusse, N. Sans, S. Laye, Nutritional Omega-3 Deficiency Alters Glucocorticoid Receptor-Signaling Pathway and Neuronal Morphology in Regionally Distinct Brain Structures Associated with Emotional Deficits. *Neural Plast* **2016**, 8574830 (2016).
15. S. J. Long, D. Benton, A double-blind trial of the effect of docosahexaenoic acid and vitamin and mineral supplementation on aggression, impulsivity, and stress. *Hum Psychopharmacol* **28**, 238-247 (2013).
16. C. W. Huang *et al.*, Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).

17. A. P. Simopoulos, Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* **70**, 560s-569s (1999).
18. A. J. Richardson, J. R. Burton, R. P. Sewell, T. F. Spreckelsen, P. Montgomery, Docosaehaenoic acid for reading, cognition and behavior in children aged 7-9 years: a randomized, controlled trial (the DOLAB Study). *PLoS One* **7**, e43909 (2012).
19. W. Stonehouse, in *Nutrients*. (2014), vol. 6, pp. 2730-2758.
20. J. F. Gould, M. Makrides, J. Colombo, L. G. Smithers, in *Am J Clin Nutr.* (2014), vol. 99, pp. 851-859.
21. A. Marquardt, H. Stohr, K. White, B. H. Weber, cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* **66**, 175-183 (2000).
22. E. Lattka, T. Illig, B. Koletzko, J. Heinrich, Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* **21**, 64-69 (2010).
23. M. Standl *et al.*, FADS1 FADS2 gene cluster, PUFA intake and blood lipids in children: results from the GINIplus and LISAPLUS studies. *PLoS One* **7**, e37780 (2012).
24. P. Rzehak *et al.*, Variants of the FADS1 FADS2 gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. *PLoS One* **5**, e13261 (2010).
25. A. Zak *et al.*, [Desaturases of fatty acids (FADS) and their physiological and clinical implication]. *Cas Lek Cesk* **155**, 15-21 (2016).
26. R. N. Lemaitre *et al.*, Genetic loci associated with plasma phospholipid n-3 fatty acids: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium. *PLoS Genet* **7**, e1002193 (2011).
27. J. Y. Bernard *et al.*, Long-chain polyunsaturated fatty acids, gestation duration, and birth size: a Mendelian randomization study using fatty acid desaturase variants. *Am J Clin Nutr* **108**, 92-100 (2018).
28. I. Gonzalez-Casanova *et al.*, Maternal single nucleotide polymorphisms in the fatty acid desaturase 1 and 2 coding regions modify the impact of prenatal supplementation with DHA on birth weight. *Am J Clin Nutr* **103**, 1171-1178 (2016).
29. K. R. Andersen *et al.*, A study of associations between early DHA status and fatty acid desaturase (FADS) SNP and developmental outcomes in children of obese mothers. *Br J Nutr* **117**, 278-286 (2017).
30. M. Arcos-Burgos *et al.*, Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet* **75**, 998-1014 (2004).
31. K. J. Brookes, W. Chen, X. Xu, E. Taylor, P. Asherson, Association of fatty acid desaturase genes with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* **60**, 1053-1061 (2006).
32. L. B. Harslof *et al.*, FADS genotype and diet are important determinants of DHA status: a cross-sectional study in Danish infants. *Am J Clin Nutr* **97**, 1403-1410 (2013).
33. H. A. Jensen *et al.*, FADS single-nucleotide polymorphisms are associated with behavioral outcomes in children, and the effect varies between sexes and is dependent on PPAR genotype. *Am J Clin Nutr* **100**, 826-832 (2014).

34. D. Mozaffarian *et al.*, Genetic loci associated with circulating phospholipid trans fatty acids: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium. *Am J Clin Nutr* **101**, 398-406 (2015).
35. F. H. Chilton *et al.*, Diet-gene interactions and PUFA metabolism: a potential contributor to health disparities and human diseases. *Nutrients* **6**, 1993-2022 (2014).
36. T. L. Blasbalg, J. R. Hibbeln, C. E. Ramsden, S. F. Majchrzak, R. R. Rawlings, Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr* **93**, 950-962 (2011).
37. J. H. Kwak *et al.*, FADS gene polymorphisms in Koreans: association with omega6 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids, lipid peroxides, and coronary artery disease. *Atherosclerosis* **214**, 94-100 (2011).
38. J. Juan *et al.*, Joint effects of fatty acid desaturase 1 polymorphisms and dietary polyunsaturated fatty acid intake on circulating fatty acid proportions. *Am J Clin Nutr* **107**, 826-833 (2018).
39. I. Costea *et al.*, Interactions between the dietary polyunsaturated fatty acid ratio and genetic factors determine susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Gastroenterology* **146**, 929-931 (2014).
40. L. M. Reynolds *et al.*, Tissue-specific impact of FADS cluster variants on FADS1 and FADS2 gene expression. *PLoS One* **13**, e0194610 (2018).
41. K. J. O'Donnell, M. J. Meaney, Fetal Origins of Mental Health: The Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis. *Am J Psychiatry* **174**, 319-328 (2017).
42. J. P. Shonkoff, W. T. Boyce, B. S. McEwen, Neuroscience, molecular biology, and the childhood roots of health disparities: building a new framework for health promotion and disease prevention. *Jama* **301**, 2252-2259 (2009).
43. R. C. Kessler, C. G. Davis, K. S. Kendler, Childhood adversity and adult psychiatric disorder in the US National Comorbidity Survey. *Psychol Med* **27**, 1101-1119 (1997).
44. M. Gunnar, K. Quevedo, The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol* **58**, 145-173 (2007).
45. D. Cicchetti, S. L. Toth, A developmental psychopathology perspective on child abuse and neglect. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **34**, 541-565 (1995).
46. D. P. Chapman *et al.*, Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *J Affect Disord* **82**, 217-225 (2004).
47. R. F. Anda *et al.*, Adverse childhood experiences and smoking during adolescence and adulthood. *Jama* **282**, 1652-1658 (1999).
48. M. Dong *et al.*, Insights into causal pathways for ischemic heart disease: adverse childhood experiences study. *Circulation* **110**, 1761-1766 (2004).
49. K. A. Ports, D. C. Ford, M. T. Merrick, Adverse childhood experiences and sexual victimization in adulthood. *Child Abuse Negl* **51**, 313-322 (2016).
50. S. R. Dube *et al.*, Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. *Jama* **286**, 3089-3096 (2001).
51. M. Dong *et al.*, The interrelatedness of multiple forms of childhood abuse, neglect, and household dysfunction. *Child Abuse Negl* **28**, 771-784 (2004).
52. D. A. Christakis, Focusing on the Smaller Adverse Childhood Experiences: The Overlooked Importance of Aces. *JAMA Pediatr* **170**, 725-726 (2016).

53. A. Caspi *et al.*, Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science* **297**, 851-854 (2002).
54. Z. M, Vulnerability to Psychopathology: A Biosocial Model. (1999).
55. J. Belsky, M. Pluess, The Nature (and Nurture?) of Plasticity in Early Human Development. *Perspect Psychol Sci* **4**, 345-351 (2009).
56. B. J. Ellis, W. T. Boyce, J. Belsky, M. J. Bakermans-Kranenburg, M. H. van Ijzendoorn, Differential susceptibility to the environment: an evolutionary--neurodevelopmental theory. *Dev Psychopathol* **23**, 7-28 (2011).
57. J. Belsky, M. Pluess, Beyond risk, resilience, and dysregulation: phenotypic plasticity and human development. *Dev Psychopathol* **25**, 1243-1261 (2013).
58. K. F. Widaman *et al.*, Distinguishing ordinal and disordinal interactions. *Psychol Methods* **17**, 615-622 (2012).
59. J. Belsky, K. Widaman, Editorial Perspective: Integrating exploratory and competitive-confirmatory approaches to testing person x environment interactions. *J Child Psychol Psychiatry* **59**, 296-298 (2018).
60. G. I. Roisman *et al.*, Distinguishing differential susceptibility from diathesis-stress: recommendations for evaluating interaction effects. *Dev Psychopathol* **24**, 389-409 (2012).
61. J. Belsky, M. Pluess, Beyond diathesis stress: differential susceptibility to environmental influences. *Psychol Bull* **135**, 885-908 (2009).
62. K. A. O'Donnell *et al.*, The maternal adversity, vulnerability and neurodevelopment project: theory and methodology. *Can J Psychiatry* **59**, 497-508 (2014).
63. J. Golding, M. Pembrey, R. Jones, ALSPAC--the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. I. Study methodology. *Paediatr Perinat Epidemiol* **15**, 74-87 (2001).
64. P. M. Miguel *et al.*, Prefrontal Cortex Dopamine Transporter Gene Network Moderates the Effect of Perinatal Hypoxic-Ischemic Conditions on Cognitive Flexibility and Brain Gray Matter Density in Children. *Biol Psychiatry*, (2019).
65. S. A. Hari Dass *et al.*, A biologically-informed polygenic score identifies endophenotypes and clinical conditions associated with the insulin receptor function on specific brain regions. *EBioMedicine* **42**, 188-202 (2019).
66. J. A. Miller *et al.*, Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature* **508**, 199-206 (2014).
67. J. Lonsdale *et al.*, The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics* **45**, 580-585 (2013).
68. P. P. Silveira *et al.*, Cumulative prenatal exposure to adversity reveals associations with a broad range of neurodevelopmental outcomes that are moderated by a novel, biologically informed polygenetic score based on the serotonin transporter solute carrier family C6, member 4 (SLC6A4) gene expression. *Dev Psychopathol* **29**, 1601-1617 (2017).
69. M. Taylor, A. J. Simpkin, P. C. Haycock, F. Dudbridge, L. Zuccolo, Exploration of a Polygenic Risk Score for Alcohol Consumption: A Longitudinal Analysis from the ALSPAC Cohort. *PLoS One* **11**, e0167360 (2016).
70. P. Silveira *et al.*, in *PNAS*. (with reviewers, 2019).
71. M. S. Kramer *et al.*, A new and improved population-based Canadian reference for birth weight for gestational age. *Pediatrics* **108**, E35 (2001).

72. A. T. Beck, C. H. Ward, M. Mendelson, J. Mock, J. Erbaugh, An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* **4**, 561-571 (1961).
73. J. L. Cox, J. M. Holden, R. Sagovsky, Detection of postnatal depression. Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. *Br J Psychiatry* **150**, 782-786 (1987).
74. C. G. Spielberger, R. C. P. Press., Ed. (1983).
75. J. Cassidy, R. D. Parke, L. Butkovsky, J. M. Braungart, Family-peer connections: the roles of emotional expressiveness within the family and children's understanding of emotions. *Child Dev* **63**, 603-618 (1992).
76. N. B. Epstein, L.M. Baldwin, and D.S. Bishop, THE McMASTER FAMILY ASSESSMENT DEVICE\* - Epstein - 1983 - Journal of Marital and Family Therapy - Wiley Online Library. *Journal of marital family therapy* **9**, 171-180. (1983).
77. L. I. Pearlin, C. Schooler, The structure of coping. *J Health Soc Behav* **19**, 2-21 (1978).
78. D. A. Adedinsowo, A. S. Fleming, M. Steiner, M. J. Meaney, A. W. Girard, Maternal anxiety and breastfeeding: findings from the MAVAN (Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment) Study. *J Hum Lact* **30**, 102-109 (2014).
79. M. Luciana, C. A. Nelson, Assessment of neuropsychological function through use of the Cambridge Neuropsychological Testing Automated Battery: performance in 4- to 12-year-old children. *Dev Neuropsychol* **22**, 595-624 (2002).
80. D. Bennett *et al.*, Systematic Overestimation of Reflection Impulsivity in the Information Sampling Task. *Biol Psychiatry* **82**, e29-e30 (2017).
81. L. Clark, T. W. Robbins, Reply to: Systematic Overestimation of Reflection Impulsivity in the Information Sampling Task. *Biol Psychiatry* **82**, e31 (2017).
82. I. Pokhvisneva, E. Leger, M. J. Meaney, P. P. Silveira, Systematic Overestimation of Reflection Impulsivity in the Information Sampling Task: Age Dependency in Children. *Biol Psychiatry* **83**, e33-e34 (2018).
83. P. P. Silveira *et al.*, Birth weight and catch up growth are associated with childhood impulsivity in two independent cohorts. *Scientific Reports* **8**, 1-10 (2018).
84. T. M. Achenbach, T. M. Ruffle, The Child Behavior Checklist and related forms for assessing behavioral/emotional problems and competencies. *Pediatr Rev* **21**, 265-271 (2000).
85. R. Goodman, H. Meltzer, V. Bailey, The Strengths and Difficulties Questionnaire: a pilot study on the validity of the self-report version. *Int Rev Psychiatry* **15**, 173-177 (2003).
86. M. Ashburner *et al.*, Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* **25**, 25-29 (2000).
87. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* **43**, D1049-1056 (2015).
88. P. D. Thomas *et al.*, PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* **31**, 334-341 (2003).
89. D. Szklarczyk *et al.*, in *Nucleic Acids Res.* (2011), vol. 39, pp. D561-568.

90. J. H. Satterfield, M. E. Dawson, Electrodermal correlates of hyperactivity in children. *Psychophysiology* **8**, 191-197 (1971).
91. T. Sakurai, N. J. Gamo, Cognitive functions associated with developing prefrontal cortex during adolescence and developmental neuropsychiatric disorders. *Neurobiol Dis* **131**, 104322 (2019).
92. D. Demontis *et al.*, Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet* **51**, 63-75 (2019).
93. A. M. Momany, J. M. Kamradt, M. A. Nikolas, A Meta-Analysis of the Association Between Birth Weight and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *J Abnorm Child Psychol*, (2017).
94. A. J. Richardson, Omega-3 fatty acids in ADHD and related neurodevelopmental disorders. *Int Rev Psychiatry* **18**, 155-172 (2006).
95. M. M. Pusceddu, P. Kelly, C. Stanton, J. F. Cryan, T. G. Dinan, N-3 Polyunsaturated Fatty Acids through the Lifespan: Implication for Psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol* **19**, (2016).
96. P. Montgomery, T. F. Spreckelsen, A. Burton, J. R. Burton, A. J. Richardson, Docosahexaenoic acid for reading, working memory and behavior in UK children aged 7-9: A randomized controlled trial for replication (the DOLAB II study). *PLoS One* **13**, e0192909 (2018).
97. B. Koletzko, E. Lattka, S. Zeilinger, T. Illig, C. Steer, Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Am J Clin Nutr* **93**, 211-219 (2011).
98. D. Li *et al.*, Omega 6 to omega 3 fatty acid imbalance early in life leads to persistent reductions in DHA levels in glycerophospholipids in rat hypothalamus even after long-term omega 3 fatty acid repletion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **74**, 391-399 (2006).
99. F. Tosi, F. Sartori, P. Guarini, O. Olivieri, N. Martinelli, Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. *Adv Exp Med Biol* **824**, 61-81 (2014).
100. N. Salem, Jr., B. Litman, H. Y. Kim, K. Gawrisch, Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* **36**, 945-959 (2001).
101. W. Stillwell, S. R. Shaikh, M. Zerouga, R. Siddiqui, S. R. Wassall, Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* **45**, 559-579 (2005).
102. S. R. Shaikh, J. J. Kinnun, X. Leng, J. A. Williams, S. R. Wassall, How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: insight from NMR studies of model systems. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 211-219 (2015).
103. J. Lengqvist *et al.*, Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* **3**, 692-703 (2004).
104. A. Szanto *et al.*, Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* **11 Suppl 2**, S126-143 (2004).
105. D. Lévesque, C. Rouillard, Nur77 and retinoid X receptors: critical factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci* **30**, 22-30 (2007).

106. E. P. Murphy, O. M. Conneely, Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* **11**, 39-47 (1997).
107. C. Backman, T. Perlmann, A. Wallen, B. J. Hoffer, M. Morales, A selective group of dopaminergic neurons express Nurr1 in the adult mouse brain. *Brain Res* **851**, 125-132 (1999).
108. W. Le *et al.*, Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice. *Exp Neurol* **159**, 451-458 (1999).
109. R. H. Zetterstrom *et al.*, Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250 (1997).
110. J. J. Schimmel, L. Crews, S. Roffler-Tarlov, D. M. Chikaraishi, 4.5 kb of the rat tyrosine hydroxylase 5' flanking sequence directs tissue specific expression during development and contains consensus sites for multiple transcription factors. *Brain Res Mol Brain Res* **74**, 1-14 (1999).
111. P. Sacchetti, H. Dwornik, P. Formstecher, C. Rachez, P. Lefebvre, Requirements for heterodimerization between the orphan nuclear receptor Nurr1 and retinoid X receptors. *J Biol Chem* **277**, 35088-35096 (2002).
112. W. Krezel *et al.*, Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* **279**, 863-867 (1998).
113. E. Bjorkenstam, B. Burstrom, B. Vinnerljung, K. Kosidou, Childhood adversity and psychiatric disorder in young adulthood: An analysis of 107,704 Swedes. *J Psychiatr Res* **77**, 67-75 (2016).
114. W. R. Lovallo, Early life adversity reduces stress reactivity and enhances impulsive behavior: implications for health behaviors. *Int J Psychophysiol* **90**, 8-16 (2013).
115. W. Schlotz, D. I. Phillips, Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun* **23**, 905-916 (2009).
116. A. S. Brown, The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol* **93**, 23-58 (2011).
117. J. L. Cameron, K. L. Eagleson, N. A. Fox, T. K. Hensch, P. Levitt, Social Origins of Developmental Risk for Mental and Physical Illness. (2017).
118. D. Liu *et al.*, Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**, 1659-1662 (1997).
119. C. Madore *et al.*, Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. *Neural Plast* **2016**, (2016).
120. B. S. McEwen, Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* **583**, 174-185 (2008).
121. K. Y. Tseng, P. O'Donnell, Dopamine modulation of prefrontal cortical interneurons changes during adolescence. *Cereb Cortex* **17**, 1235-1240 (2007).
122. G. Gonzalez-Burgos, R. Y. Cho, D. A. Lewis, Alterations in cortical network oscillations and parvalbumin neurons in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **77**, 1031-1040 (2015).
123. A. F. Arnsten, M. J. Wang, C. D. Paspalas, Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* **76**, 223-239 (2012).



124. O. D. Howes, R. McCutcheon, M. J. Owen, R. M. Murray, The Role of Genes, Stress, and Dopamine in the Development of Schizophrenia. *Biol Psychiatry* **81**, 9-20 (2017).
125. N. Takahashi, T. Sakurai, K. L. Davis, J. D. Buxbaum, Linking oligodendrocyte and myelin dysfunction to neurocircuitry abnormalities in schizophrenia. *Prog Neurobiol* **93**, 13-24 (2011).
126. W. J. Nauta, The problem of the frontal lobe: a reinterpretation. *J Psychiatr Res* **8**, 167-187 (1971).
127. R. M. Sapolsky, *Behave: The Biology of Humans at Our Best and Worst*. (Penguin Books, New York, 2017), pp. 154-249.
128. Y. S. Nikolova, R. E. Ferrell, S. B. Manuck, A. R. Hariri, Multilocus genetic profile for dopamine signaling predicts ventral striatum reactivity. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1940-1947 (2011).
129. E. Stice, S. Yokum, K. Burger, L. Epstein, A. Smolen, Multilocus genetic composite reflecting dopamine signaling capacity predicts reward circuitry responsivity. *J Neurosci* **32**, 10093-10100 (2012).
130. R. C. Paolicelli, C. T. Gross, Microglia in development: linking brain wiring to brain environment. *Neuron Glia Biol* **7**, 77-83 (2011).
131. R. C. Paolicelli *et al.*, Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**, 1456-1458 (2011).
132. C. Y. Kuan, K. A. Roth, R. A. Flavell, P. Rakic, Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* **23**, 291-297 (2000).
133. R. R. Buss, W. Sun, R. W. Oppenheim, Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* **29**, 1-35 (2006).
134. L. R. Miller *et al.*, Alterations in Levels and Ratios of n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Temporal Cortex and Liver of Vervet Monkeys from Birth to Early Adulthood. *Physiol Behav* **156**, 71-78 (2016).
135. J. Catalan *et al.*, Cognitive deficits in docosaheptaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* **116**, 1022-1031 (2002).
136. L. Lauritzen *et al.*, DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients* **8**, (2016).
137. V. L. Darcey, G. A. McQuaid, D. H. Fishbein, J. W. VanMeter, Dietary Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Are Related to Impulse Control and Anterior Cingulate Function in Adolescents. *Front Neurosci* **12**, 1012 (2018).

## MATERIAL SUPLEMENTAR: ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO

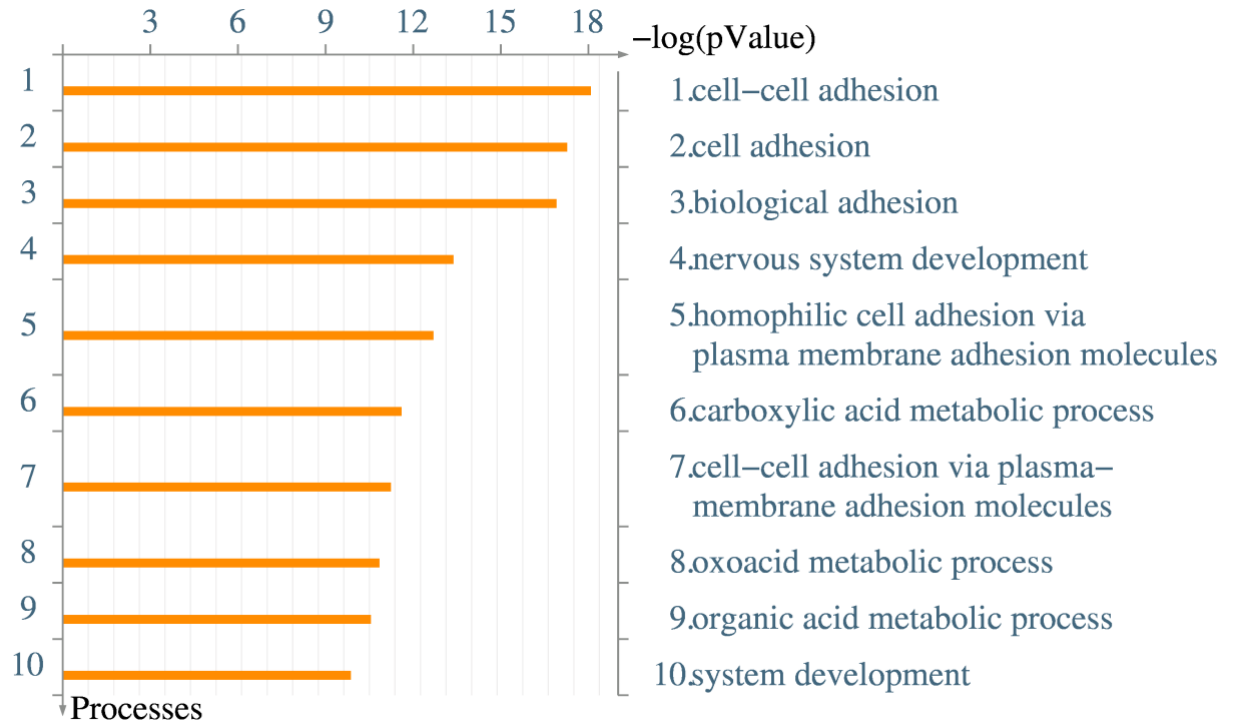
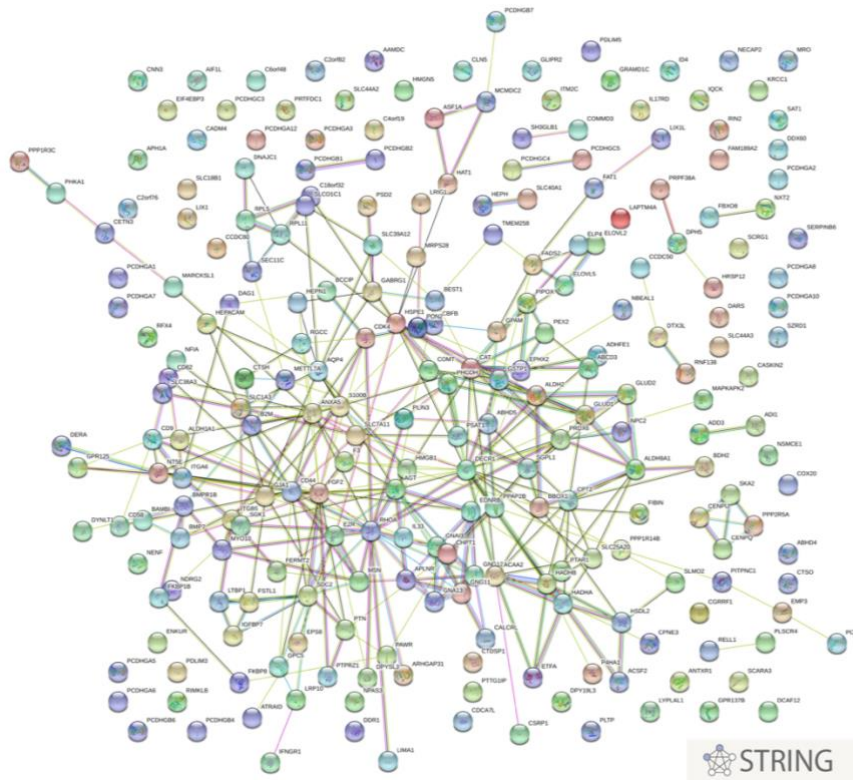
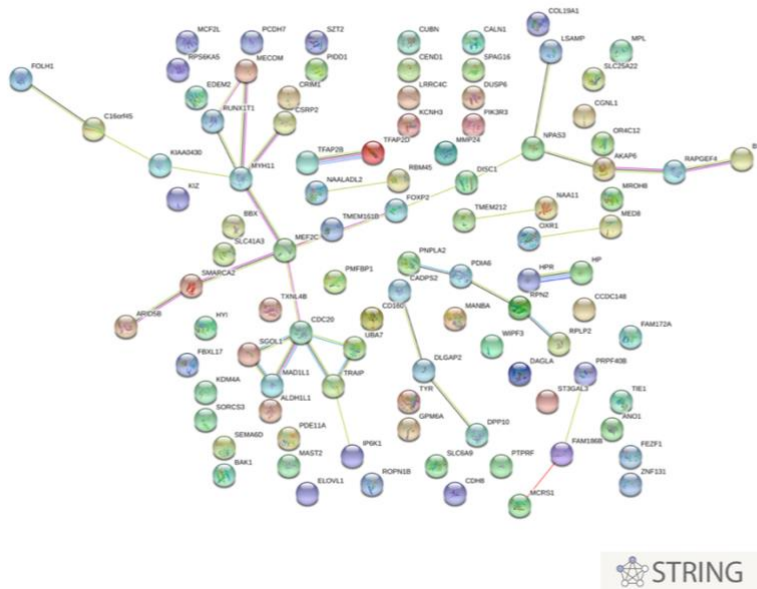


Figura 1. Análise de enriquecimento de ontologia genética de genes co-expressos por FADS1 usando a plataforma MetaCore™.

## Rede de proteínas ePRS -*FADS1*- CPF (241 genes)



## Rede de proteínas dos 241 principais genes do GWAS para TDAH



Figuras 2 e 3. Rede de proteínas ePRS *FADS1* córtex pré-frontal utilizando os 241 genes selecionados em comparação com a rede de proteínas dos 241 principais genes do estudo de Demontis et al. (2019) (155); String database <sup>TM</sup>.

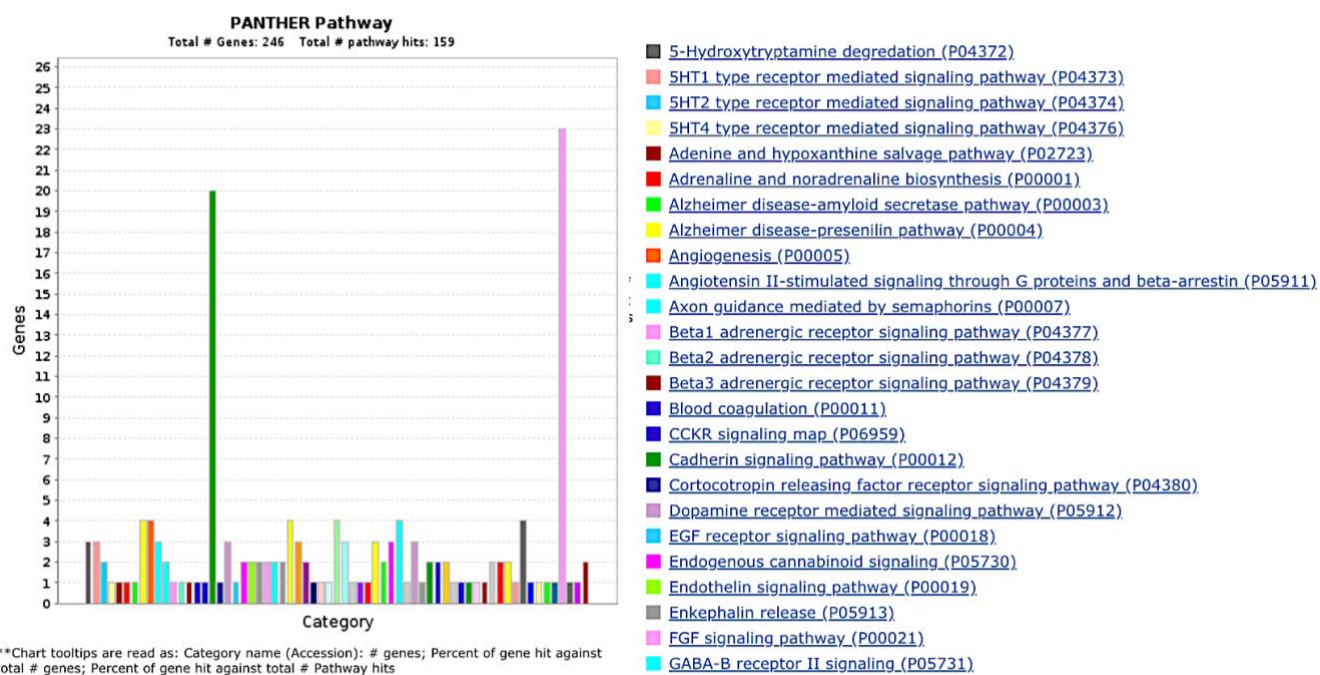


Figura 4. Análise de proteínas através de relacionamentos evolutivos: rotas ePRS-*FADSI*- sistema de classificação PANTHER™.

## 8 DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstramos interações entre variáveis genéticas relacionadas aos níveis de n-3 PUFAs e variações ambientais sobre desfechos em função executiva. Partindo de evidências anteriores que mostraram o efeito dos PUFAs sobre fenótipos antropométricos, metabólicos e comportamentais (26, 27) combinado com o modelo de doença comum complexa, encontramos associações entre um gene candidato envolvido com a sensibilidade tecidual sistêmica dos n-3 PUFAs e um marcador de exposição de estresse metabólico crônico fetal sobre o controle inibitório de crianças aos 5 anos. Além disso, apresentamos e descrevemos a criação de duas ferramentas robustas para a investigação de processos biológicos, o escore baseado na expressão gênica e o escore ambiental C. A partir destas ferramentas, evidenciamos interações entre o escore genético baseado na co- expressão da rede do *FADS1* (envolvido na biossíntese de n-3 PUFAs) e o escore ambiental perinatal sobre o processamento de informações e tomada de decisão.

No artigo de revisão apresentado no capítulo 1, verificamos importância da dieta sobre o neurodesenvolvimento, revisando as principais funções dos ácidos graxos poli-insaturados no sistema nervoso desde o período fetal até a infância. Descrevemos a participação dos PUFAs nas vias de sinalização e redes reguladoras de genes durante o neurodesenvolvimento. Dentro dessas vias e redes interdependentes, várias formas de PUFAs combinam-se para produzir respostas emergentes de expressão gênica adaptativa necessárias para a produção de fenótipos. Os estudos revisados demonstraram que níveis séricos e teciduais e também a qualidade dos PUFAs interferem na programação fetal, atuando sobre o neurodesenvolvimento e influenciando em desfechos metabólicos, cardiovasculares e neuropsiquiátricos ao longo da vida (17, 89, 101, 156-158). Além disso, mostramos como os n-3 PUFAs, em especial o DHA, participa diretamente sobre funcionamento do sistema nervoso (88, 96, 159), sendo essencial na regulação de aspectos neuropsicológicos e metabólicos, participando nas vias de resposta ao estresse, de modulação do humor e comportamento e também do metabolismo energético (96, 100, 160-162). Dadas as múltiplas vias neuroquímicas de participação dos n-3 PUFAs (inflamação, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, neuroproteção, sistemas monoaminérgico e glutamatérgico, microbiota intestinal) (163) e às diferenças na capacidade metabólica biossintética, selecionamos para análise neste trabalho, aspectos da regulação genética que atuam na síntese e metabolismo dos PUFAs.

No capítulo 2, investigamos a interação entre variantes do gene *PLIN4* relacionadas com a sensibilidade celular aos n-3 PUFA e o peso ao nascer sobre o controle inibitório em uma amostra de crianças. No capítulo 3, apresentamos e descrevemos duas novas ferramentas de predição, o escore de expressão poligênica de risco (ePRS) e a medida de variação do ambiente pós-natal (escore ambiental C). Ambos escores foram utilizados para avaliar interações gene-ambiente em desfechos da função executiva em crianças provenientes das coortes MAVAN e ALSPAC. Discutimos, a seguir, nossos achados, levando em consideração: 1- a repercussão de variações de DHA sobre os mecanismos moleculares cerebrais e seus desfechos sobre a função executiva; 2- a criação de escores de predição gênica e ambiental; 3- perspectivas terapêuticas e nutricionais.

O desenvolvimento da substância cinzenta cortical segue um padrão de maturação não linear regional específico, pelo qual o volume de substância cinzenta geralmente aumenta na infância, atinge um pico no final da infância e também no início da adolescência e se reduz na idade adulta (164-166). O adelgaçamento da substância cinzenta durante a adolescência reflete, pelo menos em parte, a poda e o refinamento sinápticos (167) e está associado a melhorias na função e no comportamento cognitivo (168). Dentro do CPF esses processos dinâmicos de desenvolvimento ocorrem rapidamente durante a adolescência e acredita-se que estejam subjacentes a melhorias na função executiva, incluindo o controle de impulsos (169, 170). A inibição da resposta ou a capacidade do indivíduo inibir suas ações é um aspecto essencial da função executiva sobre o desenvolvimento da habilidade de retardar gratificações (171) – fator decisivo para realizações de longo prazo (172). A capacidade para inibição da resposta gradualmente vai se aprimorando indo da infância, passando pela adolescência até idade adulta (173). Esse processo maturacional é suportado por mudanças regionais de ativação no CPF (169, 174) e seu prolongado desenvolvimento pode refletir um período de vulnerabilidade a vários fatores ambientais e biológicos. A variação dietética de DHA influi diretamente na variação do conteúdo de DHA dos fosfolipídios tanto de tecidos periféricos quanto do SNC (175-177), onde se distribui principalmente nas membranas neurais do CPF (178). O DHA acumula-se rapidamente no CPF desde o período perinatal até os primeiros 18 anos de vida, com pouco aumento no conteúdo de DHA desta região após a segunda década de vida (179), sugerindo que a adolescência faz parte de um período crucial para o acúmulo adequado de DHA no CPF.

Variantes genéticas podem alterar os níveis séricos e teciduais dos ácidos graxos provenientes da dieta, contribuindo de maneira diferencial na estruturação e funcionamento do SNC desde estágios precoces, programando desfechos neurocomportamentais (180-182). De acordo com achados de diferentes estudos, diferenças na atividade enzimática da biossíntese de LC-PUFA podem estar relacionadas a menores concentrações de metabólitos de FAs (132, 183, 184), influenciando a disponibilidade plasmática de curto, médio e longo prazo dos PUFAs (184, 185) e estando associados a fenótipos complexos. Por exemplo, exigências de fornecimento de DHA à prole durante a prenhez e lactação de ratas podem depletar os n-3 PUFAs e estudos experimentais indicaram que déficits dietéticos de n-3 PUFAs afetavam a composição tecidual cerebral de ácidos graxos na ninhada, provocando também alterações cognitivas tardias (186-188). Conforme anteriormente citado, os fosfolípidios da substância cinzenta do cérebro e da retina contêm altas concentrações de DHA e de ácido araquidônico (AA), o que torna a membrana mais fluida. Neste caso, o comportamento de fase de uma membrana (alteração da mobilidade pela temperatura) é deslocado, tornando-se mais fluido, enquanto que a compressibilidade elástica (alteração da espessura volumétrica em resposta ao estresse), a permeabilidade (difusão passiva de moléculas), a fusão (união de duas membranas), o movimento *flip-flop* (difusão transversal dos constituintes membranares) e as atividades proteicas, aumentam (189). A incorporação de n-3 PUFAs nas membranas celulares também leva à reorganização da formação de "jangadas lipídicas" (*lipid rafts*), que são domínios de membrana que contêm aglomerados de receptores e proteínas envolvidos na transdução de sinal. Portanto, todos esses mecanismos afetam a função das proteínas da membrana- receptores, enzimas ligadas à membrana, proteínas G e canais iônicos- modulando, assim, as vias de sinalização (190, 191). Através destes mecanismos, os n-3 PUFAs participam do neurodesenvolvimento tanto em seu aspecto anatômico quanto funcional, atuando principalmente na modulação e manutenção de vias dopaminérgicas (ver discussão do capítulo 3) (192) e serotoninérgicas (193). Sabe-se que a deficiência de n-3 PUFAs afeta a estruturação do cérebro em desenvolvimento, estando associada a uma diminuição da neurogênese, arborização dendrítica, sinaptogênese, poda seletiva e mielinização (115, 194). Do ponto de vista funcional, um trabalho mostrou que a ingestão reduzida de EPA e DHA durante o neurodesenvolvimento resultou em diminuição da síntese, armazenamento, liberação e função do receptor de serotonina (115). Outro estudo experimental evidenciou que a deficiência perinatal de ômega-3 em ratos resultou na redução de 65% dos níveis de

serotonina e também na diminuição de 29% na expressão do RNAm da enzima triptofano hidroxilase 2 (TPH2) no CPF (195). Estes animais submetidos à deficiência de DHA apresentaram menores níveis de dopamina e serotonina e seus metabólitos no CPF (193), com evidências de aumento na degradação de monoaminas no CPF (195) e também redução no número de vesículas dopaminérgicas nos terminais pré-sinápticos (102). Estudos de microdiálise *in vivo* revelaram que a deficiência de DHA reduziu os níveis extracelulares de dopamina basal no CPF, mas aumentou no NAc; em compensação, houve aumento dos níveis extracelulares de metabólitos dopaminérgicos no CPF e diminuído no NAc, sugerindo que a deficiência crônica de n-3 PUFAs pode levar a modificações na internalização da dopamina durante seu armazenamento no CPF (196). Nas mesmas condições de deficiência crônica de DHA, a resposta dopaminérgica induzida por anfetamina apresentou-se significativamente reduzida no CPF e no NAc (197). Interessantemente, animais com deficiência alimentar de DHA evidenciaram um aumento nos receptores dopaminérgicos D2- mas não os D1, no NAc (101, 102), sugerindo que a capacidade de resposta nas principais regiões de processamento do valor emocional e de recompensa aos estímulos externos e cognitivos nessas condições encontra-se alterada, uma vez que o desequilíbrio entre receptores D1 e D2 no NAc pode afetar crucialmente o processamento de estímulos salientes. Um estudo com uma amostra de adolescentes avaliou o efeito dos ácidos graxos ômega-3 da dieta no controle dos impulsos em vias de desenvolvimento normativo através de tarefas de inibição, encontrando uma associação entre deficiências de n-3 PUFAs e déficits em controle comportamental inibitório (198). Em síntese, a maior parte dos resultados de pesquisa vem demonstrando que adaptações no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico podem desempenhar um papel importante na desregulação emocional induzida pela deficiência de DHA. As evidências apresentadas sugerem que processos psicobiológicos combinados e atuando ao longo do tempo contribuem para neuroplasticidade, embasando nossos resultados. No capítulo 2, mostramos o papel preditor de uma variante gênica ligada à sensibilidade tecidual aos PUFAs sobre o controle inibitório em crianças nascidas pequenas para a idade gestacional. No capítulo 3 desta tese, através de um modelo sofisticado que envolveu a análise de um processo biológico, evidenciamos a interação entre uma rede de genes co- expressos ao *FADS1* e o ambiente precoce sobre desfechos de hiperatividade e déficit de atenção em crianças provenientes de duas coortes diferentes. Assim, mecanismos celulares e moleculares mediados pelos n-3 PUFAs no CPF associados a experiências precoces, participam na modelagem de muitos fenótipos



cognitivo-comportamentais, em processos onde cognição social e função cognitiva geral estão intimamente ligados. Ao longo das etapas de estruturação e amadurecimento da cognição, que vão desde o período fetal até a idade adulta, há um aumento constante na habilidade cognitiva, orientando, através de experiências acumuladas, a discriminação e a tomada de decisões envolvidas nas atividades sociais (199). Durante esse processo, as capacidades de análise e decisão conjuntamente com aspectos motivacionais continuam a se desenvolver associados a aquisição de outras habilidades cognitivas e emocionais (200, 201). Sabe-se que variantes genéticas que participam de vias monoaminérgicas são altamente responsivas à variação ambiental (202, 203), tornando os indivíduos mais sensíveis à adversidade e às influências ambientais positivas, efeito descrito como “susceptibilidade diferencial” (204, 205). O CPF é a última região encefálica a finalizar o processo de neurodesenvolvimento (206-209), garantindo maior plasticidade, sugerindo maior flexibilidade cognitiva aos estímulos ambientais (210). Desta forma, sugere-se que a medida que o tempo passa, o CPF torna-se menos sensível à genética e mais suscetível ao ambiente, sugerindo um tipo de programação diferencial, uma estratégia adaptativa que enriquece os repertórios comportamentais de uma região conhecida como “cérebro social” (210). Desta forma, tanto mecanismos genéticos que regulam aspectos nutricionais (PUFAs), quanto variações no ambiente precoce (distúrbios no cuidado parental) são elementos de neuroplasticidade dinâmicos. Todas estas evidências apontam para um papel chave dos n-3 PUFAs como mediador das respostas ao estresse e inflamação ativadas por adversidades, sustentando nossos achados. Nossos dados levantam questões importantes relativas a estratégias de prevenção e tratamento em transtornos neuropsiquiátricos e também para pesquisa envolvendo dimensões de plasticidade biológica diferencial.

Além da ação direta das variantes gênicas sobre os níveis de PUFAs, também a própria experiência de adversidade pode estar associada à ativação de vias inflamatórias ligadas a fenótipos pró-inflamatórios tardios. Os n-3 PUFAs são biotransformados em eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, bem como endocanabinoides e outras substâncias sinalizadoras de inflamação e resposta imune. Os eicosanoides derivados dos n-3 PUFA, como a prostaciclina I3 e o tromboxano A3, são considerados anti-inflamatórios, antitrombóticos, vasodilatadores e antineoplásicos. Os efeitos anti-inflamatórios do n-3 PUFAS provavelmente contribuem para seus efeitos neuroprotetores em várias condições neuropsiquiátricas (211). Por exemplo, um trabalho mostrou que a adversidade no início da vida estava associada a maiores chances de exibir

um fenótipo pró-inflamatório caracterizado por respostas relativamente maiores à interleucina-6 e relativamente menor sensibilidade aos glicocorticoides (212). Outra pesquisa sugeriu que a microbiota intestinal esteja associada a insultos ambientais na infância e distúrbios do desenvolvimento neurológico, sugerindo que deficiências de n-3 PUFAs se associam a um estado inflamatório crônico e alterações na microbiota no transtorno do espectro autista (134). Estas evidências sugerem vias mecânicas que poderiam explicar, pelo menos em parte, nossos achados descritos no capítulo 3, no qual baixa expressão gênica da rede do *FADS1* associava-se a piores desfechos em domínios de função executiva em crianças expostas a adversidades precoces.

Conforme descrevemos até aqui, variações nos níveis de PUFAs podem estar ligadas a modificações genéticas e/ou decorrentes da própria dieta. As mudanças no tipo (qualidade) e quantidade de alimentos encontrados na dieta ocidental moderna foram amplamente impulsionadas por mudanças tecnológicas na produção e processamento de alimentos para fornecer alimentos com alto teor calórico e sabor (açúcares, grãos refinados e óleos) às grandes cidades (213). Há evidências acumuladas de que muitas dessas mudanças levaram a aumentos na prevalência de obesidade e nas interações gene-dieta, sendo responsáveis por um estado inflamatório localizado e sistêmico (214-217). Esta inflamação contribuiria para uma ampla gama de doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, asma, alergias, distúrbios digestivos e da pele, demência e doença de Alzheimer (218-222). Neste sentido, três décadas de pesquisa mostraram que a alta ingestão de carboidratos refinados, a adição de açúcares e a mudança radical na natureza das gorduras ingeridas, assim como na qualidade dos alimentos de origem animal, aumentaram dramaticamente a prevalência mundial de obesidade (213). No que diz respeito às gorduras, a criação de animais levou à produção de carne com gordura intersticial profundamente anormal e deficiência generalizada de n-3 PUFA. A nutriepigenômica é uma área recente que estuda as relações entre nutrição e epigenética e, nos últimos anos, tem contribuído com vários estudos que descrevem diferentes componentes da dieta que poderiam contribuir em processos epigenéticos e, conseqüentemente, modular a expressão gênica e as respostas metabólicas. Essas modificações epigenéticas podem estar associadas à suscetibilidade às DCNT relacionadas com a interação gene-dieta, tais como obesidade, distúrbios lipídicos, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer (223). A nutrição materna adequada com suplementação de ácidos graxos ou mesmo

ingestão de uma dieta rica em n-3 PUFA é fundamental para a transferência de DHA para o bebê antes e após o nascimento, com implicações de curto, médio e longo prazo sobre o neurodesenvolvimento. As diretrizes de suplementação de PUFA em transtornos neuropsiquiátricos, provenientes de estudos clínicos e ensaios clínicos controlados, apresentaram resultados muitas vezes contraditórias ou inconsistentes, problemas atribuídos no geral por questões metodológicas (224). Apesar disso, muitos estudos revelaram efeitos positivos sobre desempenho cognitivo, déficits atencionais e transtornos do espectro autista (88, 158, 163, 225). Assim, pelas características diferenciadas de baixas taxas de conversão e participação em vários processos neurais (neurotransmissão, neurogênese e proteção contra o estresse oxidativo), o DHA é um dos principais nutrientes capaz de atuar na programação neural, maximizando o neurodesenvolvimento e minimizando a neurodegeneração, podendo melhorar a transdução de sinais monoaminérgicos através de diferentes mecanismos (192, 193).

Através de ferramentas de bioinformática, mostramos associações entre ambiente e função executiva na infância moderada por variantes genéticas em uma rede de genes *FADS1* específicos do CPF. A adversidade precoce medida pelo score C pós-natal relacionou-se à impulsividade e sintomas gerais de TDAH apenas em crianças com antecedentes genéticos que refletiam menor atividade da rede de genes *FADS1* no CPF (baixo ePRS-*FADS1*). Esse resultado foi observado na comparação com a coorte ALSPAC, revelando, para as crianças do MAVAN, o modelo clássico de diátese-estresse, que postula que algumas pessoas são desproporcionalmente vulneráveis aos efeitos negativos da adversidade contextual (226). Conforme descrito, os resultados com o score ambiental C mostraram divergência nas expectativas entre as duas coortes. Na coorte ALSPAC, evidências a favor da suscetibilidade diferencial sobre a diátese-estresse surgiram quando o preditor ambiental variou de positivo a negativo.

Nossas descobertas estendem investigações de variantes únicas, mostrando que uma rede de genes baseada na co-expressão do gene *FADS1* no PFC moderou o impacto das condições perinatais conhecidas por aumentar o risco de TDAH e de outros déficits de função executiva na infância. Esses achados são consistentes com a diretriz que postula que a análise de conjuntos de genes definidos por vias funcionais mostra-se uma abordagem promissora na investigação da relação entre genótipos e fenótipos (227, 228). Através das análises de enriquecimento exibidas no capítulo 3, sustentamos a

funcionalidade da rede *FADSI* em processos biológicos envolvidos com desenvolvimento do sistema nervoso central (MetaCore™) e em rotas de sinalização monoaminérgicas (PANTHER™). Além disso, a análise da rede de interação proteína-proteína resultante do ePRS-*FADSI* mostrou proteínas mais coesas e com mais conexões comparativamente à rede de proteínas resultante do mesmo número de genes principais extraídos do último *GWAS* para o TDAH (155). Nossa análise de enriquecimento da rede *FADSI* incluiu o desenvolvimento do sistema nervoso, o que está em acordo com a escolha de genes superexpressos durante os períodos fetal- pós-natal inicial, filtrados a partir do *BrainSpan*. O método ePRS é uma abordagem robusta que vai além da busca de associações entre variantes e fenótipos genéticos dispersos e captura informações sobre os processos biológicos dinâmicos (227-229).

Assim, a função cognitiva é codificada genomicamente e modificada pela epigenética e transcriptômica para produzir programas transcricionais complexos que são sensíveis a moléculas de sinalização do ambiente. Estudos sobre o impacto positivo de moléculas bioativas como os PUFAs na função cerebral são fundamentais, mas de difícil execução muitas vezes pela falta de marcadores fenotípicos robustos que possam ser usados para medir com precisão e replicabilidade. Além disso, o estudo do efeito dos PUFAs sobre a saúde ainda é um desafio porque a disponibilidade, síntese e rotas metabólicas em que participam são variadas e complexas e não estão ainda totalmente compreendidas, envolvendo interações entre fatores intrínsecos e extrínsecos. Nossa abordagem ao longo de toda a pesquisa foi buscar compreender como o ambiente, através de sua ação sobre os genes, esculpe o desenvolvimento e programa desfechos de vulnerabilidade/resiliência em saúde mental, elegendo os n-3 PUFAs como moléculas de sinalização derivadas da dieta. Pesquisas sobre a necessidade e as quantidades de n-3 PUFAs adequados para o desenvolvimento e função ideais do cérebro poderão auxiliar na compreensão das condições da dieta e nas interações entre gene-dieta ou entre dieta-doença e riscos sobre o neurodesenvolvimento e sobre a saúde.

Pesquisas sobre a neurobiologia do apego infantil têm revelado que o cérebro do bebê está preparado para aprender sobre o mundo de uma maneira que promove o vínculo ao cuidador. Esse viés de apego traz benefícios imediatos, mas consequências duradouras, devido à capacidade do cuidador e de experiências de vida de moldar o cérebro infantil em rápido desenvolvimento. Cuidadores sensíveis, particularmente aqueles que estão em

sincronia as necessidades do bebê, atuam sobre a programação das estruturas cerebrais no início da vida, importante para aspectos neuroafetivos e comportamentais ao longo da vida, predizendo vulnerabilidade ou resiliência para psicopatologia (61, 230). A adversidade sobre o sistema de apego tem um impacto duradouro nas áreas do cérebro subjacentes à emoção, à regulação emocional e à modulação do comportamento. Pesquisas sugerem que existe um período sensível para a contribuição parental sobre desenvolvimento emocional no início da vida, considerando também que a parentalidade media outros aspectos do ambiente (231), embora sejam necessárias mais pesquisas para compreender a complexidade que envolve a interação de inúmeras variáveis que atuam na formação de vínculos e colaboram na programação da saúde ao longo do tempo.

As limitações deste trabalho incluem tamanhos menores de amostra, o que se explica pela necessidade de fenotipagem extensa e a carga resultante aos participantes. Além disso, as amostras das coortes MAVAN e ALSPAC são amplamente baseadas em uma amostra caucasiana, a primeira oriunda do Canadá e a segunda amostra de participantes do Reino Unido. Assim, generalizações dos resultados apresentados para outras amostras devem ser abordadas com cautela.

## 9 CONCLUSÃO

A abordagem multinível, focada na interação de processos genéticos e a variação das experiências ambientais ao longo do tempo, contribui de forma inovadora, através do exame da suscetibilidade a transtornos mentais e através da compreensão de mecanismos neurobiológicos associados a sintomas e também a prognósticos. A expansão deste modelo de investigação translacional que integra a neurobiologia com a psiquiatria clínica pretende tanto trazer resultados imediatos para a saúde quanto propor novas aplicações clínicas e recomendações para pesquisas futuras. Este trabalho reuniu resultados de interação entre gene candidato, redes de gene baseadas na expressão e ambiente adverso/suportivo, mostrando evidências de que tanto a matriz genética quanto aspectos da dieta, das relações parentais e do ambiente geral são fatores determinantes sobre a base da saúde da criança. O consumo adequado de n-3 PUFAs pode contribuir para proteção de indivíduos vulneráveis em déficits em função executiva, além de outros problemas do neurodesenvolvimento. Por fim, sabendo que: a) O cuidado materno humano é sensível a redes cerebrais plásticas; b) As redes cerebrais maternas integram emoção e recompensa com controle cognitivo; c) O cérebro materno humano se adapta ao vínculo mãe-bebê; d) O cérebro da criança responde tanto à adversidade quanto com o suporte (232), é necessário planejar e incluir nas estratégias de cuidados básicos programas de em saúde que estimulem e promovam um ambiente tanto nutricional quanto emocionalmente seguro para infância.

## 10 PERSPECTIVAS

Como clínica e também pesquisadora pretendo seguir investigando linhas que envolvam as áreas de neuropsicobiologia do comportamento e da tomada de decisão, com o objetivo maior de buscar compreender como a subjetividade e os aspectos mentais se traduzem em fenômenos afetivos e comportamentais observáveis no fenótipo. Assim, dando continuidade a este trabalho de pesquisa, pretendo publicar os dados apresentados no capítulo 3. Em seguida, usarei informações de outros seis ePRS de genes relacionados com a função e/ou biossíntese de PUFA's que criei durante o período que visitei o *Ludmer Center*. A partir destes elementos, pretendo expandir as análises preliminares de cada uma destas redes com dados provenientes da coorte principal MAVAN e com outras 3 coortes de replicação [ALSPAC, *Growing Up in Singapore Towards healthy Outcomes* (GUSTO) e *Basale Invloeden op de Baby's Ontwikkeling'* -em inglês: *Basal Influences on Infant's Development* (BIBO)]. Além disso, gostaria de desenvolver outro projeto que integre estas sete diferentes redes de genes envolvidas na resposta celular do PUFA's no SNC, criando um multi ePRS, para analisar as interações gene-ambiente em desfechos de saúde mental em crianças. Mais ainda, planejo avaliar isoladamente associações do escore ambiental sobre resultados neuropsiquiátricos das crianças das 4 coortes, buscando compreender os efeitos dos modelos de diátese de estresse e suscetibilidade diferencial. Dentro dessa perspectiva, tenho a intenção de ampliar o escopo de conhecimentos nesta área, além de integrar novos métodos de pesquisa que contribuam para promoção da saúde.

## 11 REFERÊNCIAS

1. E. Sciberras, M. Mulraney, D. Silva, D. Coghill, Prenatal Risk Factors and the Etiology of ADHD-Review of Existing Evidence. *Curr Psychiatry Rep* **19**, 1 (2017).
2. J. Nigg, M. Nikolas, S. A. Burt, Measured gene-by-environment interaction in relation to attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **49**, 863-873 (2010).
3. J. Sarris *et al.*, Nutritional medicine as mainstream in psychiatry. *Lancet Psychiatry* **2**, 271-274 (2015).
4. X. Yan, X. Zhao, J. Li, L. He, M. Xu, Effects of early-life malnutrition on neurodevelopment and neuropsychiatric disorders and the potential mechanisms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **83**, 64-75 (2018).
5. R. V. Gow, J. R. Hibbeln, Omega-3 fatty acid and nutrient deficits in adverse neurodevelopment and childhood behaviors. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* **23**, 555-590 (2014).
6. K. R. Andersen *et al.*, A study of associations between early DHA status and fatty acid desaturase (FADS) SNP and developmental outcomes in children of obese mothers. *Br J Nutr* **117**, 278-286 (2017).
7. D. J. Barker, The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* **301**, 1111 (1990).
8. A. C. Ravelli, J. H. van Der Meulen, C. Osmond, D. J. Barker, O. P. Bleker, Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *The American journal of clinical nutrition* **70**, 811-816 (1999).
9. A. C. Ravelli *et al.*, Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* **351**, 173-177 (1998).
10. D. J. Barker, P. D. Winter, C. Osmond, B. Margetts, S. J. Simmonds, Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* **2**, 577-580 (1989).
11. K. A. O'Donnell *et al.*, The maternal adversity, vulnerability and neurodevelopment project: theory and methodology. *Can J Psychiatry* **59**, 497-508 (2014).
12. Volpe JJ, *Neuronal proliferation, migration, organization, and myelination*. e. N. o. t. n. b. ed In: Volpe JJ, Ed., (Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 1987:33-68., ed. 2nd, 1987).
13. R. K. McNamara, J. J. Vannest, C. J. Valentine, Role of perinatal long-chain omega-3 fatty acids in cortical circuit maturation: Mechanisms and implications for psychopathology. *World J Psychiatry* **5**, 15-34 (2015).
14. M. T. Clandinin *et al.*, Extrauterine fatty acid accretion in infant brain: implications for fatty acid requirements. *Early human development* **4**, 131-138 (1980).
15. M. Martinez, Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *The Journal of pediatrics* **120**, S129-138 (1992).
16. J. Dobbing, J. Sands, Quantitative growth and development of human brain. *Archives of disease in childhood* **48**, 757-767 (1973).
17. R. P. Bazinet, S. Laye, Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**, 771-785 (2014).



18. C. Joffre, A. Nadjar, M. Lebbadi, F. Calon, S. Laye, n-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **91**, 1-20 (2014).
19. C. Glaser, E. Lattka, P. Rzehak, C. Steer, B. Koletzko, Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern Child Nutr* **7 Suppl 2**, 27-40 (2011).
20. N. L. Tintle *et al.*, A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **94**, 65-72 (2015).
21. R. J. Pawlosky, Y. Denkins, G. Ward, N. Salem, Jr., Retinal and brain accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in developing felines: the effects of corn oil-based maternal diets. *The American journal of clinical nutrition* **65**, 465-472 (1997).
22. J. R. Bernardi *et al.*, Early life stress interacts with the diet deficiency of omega-3 fatty acids during the life course increasing the metabolic vulnerability in adult rats. *PLoS One* **8**, e62031 (2013).
23. P. P. Silveira *et al.*, Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. *Pediatric research* **71**, 293-298 (2012).
24. W. R. Lovallo, Early life adversity reduces stress reactivity and enhances impulsive behavior: implications for health behaviors. *Int J Psychophysiol* **90**, 8-16 (2013).
25. P. P. Silveira *et al.*, Birth weight and catch up growth are associated with childhood impulsivity in two independent cohorts. *Scientific Reports* **8**, 1-10 (2018).
26. R. S. Reis *et al.*, Impulsivity-based thrifty eating phenotype and the protective role of n-3 PUFAs intake in adolescents. *Transl Psychiatry* **6**, e755 (2016).
27. R. S. Reis *et al.*, Poor infant inhibitory control predicts food fussiness in childhood - A possible protective role of n-3 PUFAs for vulnerable children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **97**, 21-25 (2015).
28. K. J. O'Donnell, M. J. Meaney, Fetal Origins of Mental Health: The Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis. *Am J Psychiatry* **174**, 319-328 (2017).
29. B. R. Van den Bergh, Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. *Dev Med Child Neurol* **53 Suppl 4**, 19-23 (2011).
30. E. M. Widen *et al.*, Prepregnancy overweight and obesity are associated with impaired child neurodevelopment. *Matern Child Nutr* **14**, (2018).
31. W. Schlotz, D. I. Phillips, Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun* **23**, 905-916 (2009).
32. L. Newman *et al.*, Early origins of mental disorder - risk factors in the perinatal and infant period. *BMC Psychiatry* **16**, 270 (2016).
33. S. J. Russo, J. W. Murrough, M. H. Han, D. S. Charney, E. J. Nestler, Neurobiology of resilience. *Nat Neurosci* **15**, 1475-1484 (2012).
34. P. D. Gluckman, M. A. Hanson, M. D. Mitchell, in *Genome Med.* (England, 2010), vol. 2, pp. 14.
35. A. Schore, The experience-dependent maturation of a regulatory system in the orbital prefrontal cortex and the origin of developmental

- psychopathology | Development and Psychopathology | Cambridge Core.  
*Development and Psychopathology* **8**, 59-87 (1996).
36. J. Panksepp, *Affective Neuroscience: The foundations of human and animal emotions*. (Oxford University Press, USA, 1998).
  37. D. J. Siegel, *The Developing Mind: Toward a neurobiology of interpersonal experience*, (Guilford Press, New York, 1999).
  38. A. N. Schore, *Affect Regulation and the Origin of the Self: The Neurobiology of Emotional Development*. (Routledge, New York, ed. 1st Edition, 2003), pp. 752.
  39. D. J. Barker, The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* **93**, 26-33 (2004).
  40. P. D. Gluckman, M. A. Hanson, Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* **305**, 1733-1736 (2004).
  41. M. J. Essex *et al.*, Epigenetic vestiges of early developmental adversity: childhood stress exposure and DNA methylation in adolescence. *Child Dev* **84**, 58-75 (2013).
  42. E. R. Kandel, Biology and the future of psychoanalysis: a new intellectual framework for psychiatry revisited. *Am J Psychiatry* **156**, 505-524 (1999).
  43. D. Francis, J. Diorio, D. Liu, M. J. Meaney, Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* **286**, 1155-1158 (1999).
  44. A. J. Sameroff, *EARLY INFLUENCES ON DEVELOPMENT: FACT OR FANCY?*, Merrill-Palmer Quarterly of Behavior and Development (Wayne State University Press, 1975), vol. 21, pp. 267-294.
  45. A. J. Sameroff, R. Seifer, A. Baldwin, C. Baldwin, Stability of intelligence from preschool to adolescence: the influence of social and family risk factors. *Child Dev* **64**, 80-97 (1993).
  46. K. S. Beebe B, Rustin J, Sorter D, *Forms of intersubjectivity in infant research and adult treatment*. - *PsycNET*. (Other Press, New York, 2005).
  47. C. Heim, G. Meinlschmidt, C. B. Nemeroff, Neurobiology of Early-Life Stress. *Psychiatric Annals* **33**, 18-26 (2003).
  48. P. R. Perry BD, Blakley TL, Baker WL, Vigilante D, Childhood trauma, the neurobiology of adaptation, and “use-dependent” development of the brain: How “states” become “traits” - Perry - 1995 - *Infant Mental Health Journal* - Wiley Online Library. **16**, 271-291 (1995).
  49. A. N. Schore, *Relational trauma in infancy: Psychoanalytic, Attachment and Neuropsychological Contributions to Parent infant Psychotherapy*. B. T, Ed., Relational trauma and the development of the right brain: The neurobiology of broken attachment bonds (Routledge, London, 2010).
  50. D. Cicchetti, S. L. Toth, A developmental psychopathology perspective on child abuse and neglect. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **34**, 541-565 (1995).
  51. A. Lieberman, *Rochester Symposium on Developmental Psychopathology, Vol. 3: Models and integrations*. - *PsycNET*. C. D, Ed., Attachment theory and infant-parent psychotherapy: Some conceptual, clinical and research considerations (University of Rochester Press, New York, 1991).
  52. P. J. Lieberman AF, *Handbook of infant mental health*. C. Z. J, Ed., Infant-parent psychotherapy (Guilford Press, New York, 1993).

53. B. C. Baradon T, Gibbs I, James J, Joyce A, Woodhead J, *The Practice of Psychoanalytic Parent-Infant Psychotherapy*. (Routledge, New York, 2005).
54. R. Dalle Molle, A. R. Bischoff, A. K. Portella, P. P. Silveira, The fetal programming of food preferences: current clinical and experimental evidence. *Journal of developmental origins of health and disease*, 1-9 (2015).
55. S. Osborne *et al.*, Antenatal depression programs cortisol stress reactivity in offspring through increased maternal inflammation and cortisol in pregnancy: The Psychiatry Research and Motherhood - Depression (PRAM-D) Study. *Psychoneuroendocrinology* **98**, 211-221 (2018).
56. D. C. Dean, 3rd *et al.*, Association of Prenatal Maternal Depression and Anxiety Symptoms With Infant White Matter Microstructure. *JAMA Pediatr* **172**, 973-981 (2018).
57. M. Park, U. Brain, R. E. Grunau, A. Diamond, T. F. Oberlander, Maternal depression trajectories from pregnancy to 3 years postpartum are associated with children's behavior and executive functions at 3 and 6 years. *Arch Womens Ment Health* **21**, 353-363 (2018).
58. K. Appleyard, B. Egeland, M. H. van Dulmen, L. A. Sroufe, When more is not better: the role of cumulative risk in child behavior outcomes. *J Child Psychol Psychiatry* **46**, 235-245 (2005).
59. R. C. Kessler *et al.*, Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *Br J Psychiatry* **197**, 378-385 (2010).
60. G. E. Miller, E. Chen, K. J. Parker, Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging: moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. *Psychol Bull* **137**, 959-997 (2011).
61. R. L. Repetti, S. E. Taylor, T. E. Seeman, Risky families: family social environments and the mental and physical health of offspring. *Psychol Bull* **128**, 330-366 (2002).
62. I. C. Weaver *et al.*, Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* **7**, 847-854 (2004).
63. M. Suderman *et al.*, Conserved epigenetic sensitivity to early life experience in the rat and human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109 Suppl 2**, 17266-17272 (2012).
64. D. Liu *et al.*, Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**, 1659-1662 (1997).
65. P. O. McGowan *et al.*, Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* **12**, 342-348 (2009).
66. C. Hertzman, The biological embedding of early experience and its effects on health in adulthood. *Ann N Y Acad Sci* **896**, 85-95 (1999).
67. J. P. Shonkoff, W. T. Boyce, B. S. McEwen, Neuroscience, molecular biology, and the childhood roots of health disparities: building a new framework for health promotion and disease prevention. *Jama* **301**, 2252-2259 (2009).
68. M. J. Meaney, Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1161-1192 (2001).
69. C. L. Raison, A. H. Miller, When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* **160**, 1554-1565 (2003).

70. J. A. Markham, J. I. Koenig, Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology (Berl)* **214**, 89-106 (2011).
71. C. Nathan, A. Ding, Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871-882 (2010).
72. C. Blair, C. C. Raver, Child development in the context of adversity: experiential canalization of brain and behavior. *Am Psychol* **67**, 309-318 (2012).
73. W. Nasby, B. Hayden, B. M. DePaulo, Attributional bias among aggressive boys to interpret unambiguous social stimuli as displays of hostility. *J Abnorm Psychol* **89**, 459-468 (1980).
74. B. Weiss, K. A. Dodge, J. E. Bates, G. S. Pettit, Some consequences of early harsh discipline: child aggression and a maladaptive social information processing style. *Child Dev* **63**, 1321-1335 (1992).
75. R. L. Repetti, T. F. Robles, B. Reynolds, Allostatic processes in the family. *Dev Psychopathol* **23**, 921-938 (2011).
76. E. Haroon, C. L. Raison, A. H. Miller, Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* **37**, 137-162 (2012).
77. M. R. Irwin, S. W. Cole, Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. *Nat Rev Immunol* **11**, 625-632.
78. C. P. Fagundes, R. Glaser, J. K. Kiecolt-Glaser, Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain Behav Immun* **27**, 8-12 (2013).
79. K. B. Ehrlich, K. M. Ross, E. Chen, G. E. Miller, Testing the biological embedding hypothesis: Is early life adversity associated with a later proinflammatory phenotype? *Dev Psychopathol* **28**, 1273-1283 (2016).
80. S. W. Cole, Human social genomics. *PLoS Genet* **10**, e1004601 (2014).
81. A. H. Marques, M. N. Silverman, E. M. Sternberg, Glucocorticoid dysregulations and their clinical correlates. From receptors to therapeutics. *Ann N Y Acad Sci* **1179**, 1-18 (2009).
82. G. E. Miller *et al.*, A functional genomic fingerprint of chronic stress in humans: blunted glucocorticoid and increased NF-kappaB signaling. *Biol Psychiatry* **64**, 266-272 (2008).
83. U. Sovio *et al.*, Association between common variation at the FTO locus and changes in body mass index from infancy to late childhood: the complex nature of genetic association through growth and development. *PLoS Genet* **7**, e1001307 (2011).
84. L. M. Arterburn, E. B. Hall, H. Oken, Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition* **83**, 1467s-1476s (2006).
85. W. L. Chung, J. J. Chen, H. M. Su, Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *The Journal of nutrition* **138**, 1165-1171 (2008).
86. S. Gamoh *et al.*, Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* **93**, 237-241 (1999).
87. S. M. Innis, Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr* **143**, S1-8 (2003).
88. C. Agostoni *et al.*, in *Int J Mol Sci.* (2017), vol. 18.

89. M. G. Morgese, L. Trabace, in *Brain Sci.* (2016), vol. 6.
90. B. Koletzko, J. Muller, Cis- and trans-isomeric fatty acids in plasma lipids of newborn infants and their mothers. *Biol Neonate* **57**, 172-178 (1990).
91. M. H. Jorgensen, P. K. Nielsen, K. F. Michaelsen, P. Lund, L. Lauritzen, The composition of polyunsaturated fatty acids in erythrocytes of lactating mothers and their infants. *Matern Child Nutr* **2**, 29-39 (2006).
92. L. P. Pisani *et al.*, Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. *Lipids Health Dis* **7**, 13 (2008).
93. D. B. Shennan, M. Peaker, Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev* **80**, 925-951 (2000).
94. S. O. Olofsson *et al.*, Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 448-458 (2009).
95. J. P. Schuchardt, M. Huss, M. Stauss-Grabo, A. Hahn, Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *European journal of pediatrics* **169**, 149-164 (2010).
96. V. Balanza-Martinez *et al.*, Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert review of neurotherapeutics* **11**, 1029-1047 (2011).
97. J. Rombaldi Bernardi, R. de Souza Escobar, C. F. Ferreira, P. Pelufo Silveira, Fetal and neonatal levels of omega-3: effects on neurodevelopment, nutrition, and growth. *TheScientificWorldJournal* **2012**, 202473 (2012).
98. B. M. Ross, J. Seguin, L. E. Sieswerda, Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids in health and disease* **6**, 21 (2007).
99. A. Raine, J. Portnoy, J. Liu, T. Mahoomed, J. R. Hibbeln, Reduction in behavior problems with omega-3 supplementation in children aged 8-16 years: a randomized, double-blind, placebo-controlled, stratified, parallel-group trial. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* **56**, 509-520 (2015).
100. S. J. Long, D. Benton, A double-blind trial of the effect of docosahexaenoic acid and vitamin and mineral supplementation on aggression, impulsivity, and stress. *Human psychopharmacology* **28**, 238-247 (2013).
101. L. Zimmer *et al.*, The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* **75**, 662-667 (2002).
102. L. Zimmer *et al.*, Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of lipid research* **41**, 32-40 (2000).
103. J. M. Bourre *et al.*, Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. *J Neurochem* **43**, 342-348 (1984).
104. J. M. Bourre *et al.*, The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr* **119**, 1880-1892 (1989).
105. N. Yamamoto, M. Saitoh, A. Moriuchi, M. Nomura, H. Okuyama, Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. *J Lipid Res* **28**, 144-151 (1987).

106. N. Yamamoto *et al.*, Effect of the dietary alpha-linolenate/linoleate balance on lipid compositions and learning ability of rats. II. Discrimination process, extinction process, and glycolipid compositions. *J Lipid Res* **29**, 1013-1021 (1988).
107. C. Galli, H. B. White, Jr., R. Paoletti, Brain lipid modifications induced by essential fatty acid deficiency in growing male and female rats. *J Neurochem* **17**, 347-355 (1970).
108. S. Delion *et al.*, Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats. *J Nutr* **124**, 2466-2476 (1994).
109. I. Carrie, M. Clement, D. de Javel, H. Frances, J. M. Bourre, Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res* **41**, 465-472 (2000).
110. S. Favreliere, L. Barrier, G. Durand, S. Chalon, C. Tallineau, Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the fatty acid composition of plasmamylethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum, and cerebellum. *Lipids* **33**, 401-407 (1998).
111. H. Frances, C. Monier, J. M. Bourre, Effects of dietary alpha-linolenic acid deficiency on neuromuscular and cognitive functions in mice. *Life Sci* **57**, 1935-1947 (1995).
112. X. Lei *et al.*, Perinatal supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids improves sevoflurane-induced neurodegeneration and memory impairment in neonatal rats. *PLoS One* **8**, e70645 (2013).
113. C. L. Jensen *et al.*, Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr* **82**, 125-132 (2005).
114. L. A. Horrocks, A. A. Farooqui, Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **70**, 361-372 (2004).
115. S. M. Innis, Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* **137**, 855-859 (2007).
116. D. W. Luchtman, C. Song, Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from childhood to old age: findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacology* **64**, 550-565 (2013).
117. N. Parletta, C. M. Milte, B. J. Meyer, Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *The Journal of nutritional biochemistry* **24**, 725-743 (2013).
118. D. Tassoni, G. Kaur, R. S. Weisinger, A. J. Sinclair, The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* **17 Suppl 1**, 220-228 (2008).
119. P. A. Jackson, J. L. Reay, A. B. Scholey, D. O. Kennedy, DHA-rich oil modulates the cerebral haemodynamic response to cognitive tasks in healthy young adults: a near IR spectroscopy pilot study. *The British journal of nutrition* **107**, 1093-1098 (2012).
120. S. C. Cunnane *et al.*, Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Progress in lipid research* **48**, 239-256 (2009).

121. S. I. Rapoport, Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism in vivo. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **88**, 79-85 (2013).
122. E. Freemantle *et al.*, Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **75**, 213-220 (2006).
123. R. Guixa-Gonzalez *et al.*, Membrane omega-3 fatty acids modulate the oligomerisation kinetics of adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Sci Rep* **6**, 19839 (2016).
124. Z. Ren *et al.*, Activation of the Omega-3 Fatty Acid Receptor GPR120 Protects against Focal Cerebral Ischemic Injury by Preventing Inflammation and Apoptosis in Mice. *J Immunol* **202**, 747-759 (2019).
125. X. Geng *et al.*, Effects of Docosahexaenoic Acid and Its Peroxidation Product on Amyloid-beta Peptide-Stimulated Microglia. *Mol Neurobiol* **57**, 1085-1098 (2020).
126. S. Munro, sean@mrc-lmb.cam.ac.uk, Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* **115**, 377-388 (2003).
127. C. N. Serhan, N. Chiang, T. E. Van Dyke, Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**, 349-361 (2008).
128. L. M. Reynolds *et al.*, Tissue-specific impact of FADS cluster variants on FADS1 and FADS2 gene expression. *PLoS One* **13**, e0194610 (2018).
129. F. H. Chilton *et al.*, in *Nutrients*. (2017), vol. 9.
130. J. Bezard, J. P. Blond, A. Bernard, P. Clouet, The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod Nutr Dev* **34**, 539-568 (1994).
131. M. H. Davidson, Omega-3 fatty acids: new insights into the pharmacology and biology of docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Curr Opin Lipidol* **24**, 467-474 (2013).
132. F. Tosi, F. Sartori, P. Guarini, O. Olivieri, N. Martinelli, Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. *Adv Exp Med Biol* **824**, 61-81 (2014).
133. A. Ameer *et al.*, Genetic adaptation of fatty-acid metabolism: a human-specific haplotype increasing the biosynthesis of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids. *Am J Hum Genet* **90**, 809-820 (2012).
134. C. Madore *et al.*, Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. *Neural Plast* **2016**, (2016).
135. M. Hedelin *et al.*, Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism. *Int J Cancer* **120**, 398-405 (2007).
136. M. T. Willoughby, J. Pek, C. B. Blair, Measuring executive function in early childhood: a focus on maximal reliability and the derivation of short forms. *Psychol Assess* **25**, 664-670 (2013).
137. F. Verbruggen, G. D. Logan, Models of response inhibition in the stop-signal and stop-change paradigms. *Neurosci Biobehav Rev* **33**, 647-661 (2009).
138. R. Bull, G. Scerif, Executive functioning as a predictor of children's mathematics ability: inhibition, switching, and working memory. *Dev Neuropsychol* **19**, 273-293 (2001).

139. H. F. Østgård *et al.*, Executive function relates to surface area of frontal and temporal cortex in very-low-birth-weight late teenagers. *Early Human Development* **95**, 47-53 (2016).
140. M. Vink *et al.*, Function of striatum beyond inhibition and execution of motor responses. *Hum Brain Mapp* **25**, 336-344 (2005).
141. A. Gonzalez, J. M. Jenkins, M. Steiner, A. S. Fleming, Maternal early life experiences and parenting: the mediating role of cortisol and executive function. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **51**, 673-682 (2012).
142. L. Atkinson *et al.*, Attachment and selective attention: disorganization and emotional Stroop reaction time. *Dev Psychopathol* **21**, 99-126 (2009).
143. R. M. Pearson, S. L. Lightman, J. Evans, The impact of breastfeeding on mothers' attentional sensitivity towards infant distress. *Infant Behav Dev* **34**, 200-205 (2011).
144. T. Sakurai, N. J. Gamo, Cognitive functions associated with developing prefrontal cortex during adolescence and developmental neuropsychiatric disorders. *Neurobiol Dis* **131**, 104322 (2019).
145. L. Bevilacqua, D. Goldman, Genetics of impulsive behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20120380 (2013).
146. J. MacKillop *et al.*, The Latent Structure of Impulsivity: Impulsive Choice, Impulsive Action, and Impulsive Personality Traits. *Psychopharmacology (Berl)* **233**, 3361-3370 (2016).
147. J. L. Evenden, Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)* **146**, 348-361 (1999).
148. C. Nederkoorn, F. C. Dassen, L. Franken, C. Resch, K. Houben, Impulsivity and overeating in children in the absence and presence of hunger. *Appetite* **93**, 57-61 (2015).
149. G. D. Logan, R. J. Schachar, R. Tannock, Impulsivity and Inhibitory Control. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9280.1997.tb00545.x>, (2016).
150. M. R. Mitchell, M. N. Potenza, Addictions and Personality Traits: Impulsivity and Related Constructs. *Curr Behav Neurosci Rep* **1**, 1-12 (2014).
151. A. Bari, T. W. Robbins, Inhibition and impulsivity: behavioral and neural basis of response control. *Prog Neurobiol* **108**, 44-79 (2013).
152. H. Blencowe *et al.*, in *Lancet Glob Health*. (2019), vol. 7, pp. e849-860.
153. R. Martinez. (2017).
154. J. Golding, M. Pembrey, R. Jones, ALSPAC--the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. I. Study methodology. *Paediatr Perinat Epidemiol* **15**, 74-87 (2001).
155. D. Demontis *et al.*, Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet* **51**, 63-75 (2019).
156. M. Maekawa *et al.*, in *Transl Psychiatry*. (2017), vol. 7, pp. e1229-.
157. J. P. Vanden Heuvel, Nutrigenomics and nutrigenetics of omega3 polyunsaturated fatty acids. *Prog Mol Biol Transl Sci* **108**, 75-112 (2012).
158. A. P. Simopoulos, Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 785-795 (2010).
159. A. Wiktorowska-Owczarek, M. Berezinska, J. Z. Nowak, PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med* **24**, 931-941 (2015).



160. T. Larrieu, M. L. Hilal, V. De Smedt-Peyrusse, N. Sans, S. Laye, Nutritional Omega-3 Deficiency Alters Glucocorticoid Receptor-Signaling Pathway and Neuronal Morphology in Regionally Distinct Brain Structures Associated with Emotional Deficits. *Neural Plast* **2016**, 8574830 (2016).
161. C. W. Huang *et al.*, Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
162. A. P. Simopoulos, Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* **70**, 560s-569s (1999).
163. M. M. Pusceddu, P. Kelly, C. Stanton, J. F. Cryan, T. G. Dinan, N-3 Polyunsaturated Fatty Acids through the Lifespan: Implication for Psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol* **19**, (2016).
164. J. N. Giedd *et al.*, Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* **2**, 861-863 (1999).
165. N. Gogtay *et al.*, in *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2004), vol. 101, pp. 8174-8179.
166. R. K. Lenroot, J. N. Giedd, Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev* **30**, 718-729 (2006).
167. P. R. Huttenlocher, A. S. Dabholkar, Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* **387**, 167-178 (1997).
168. B. J. Casey, J. N. Giedd, K. M. Thomas, Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biol Psychol* **54**, 241-257 (2000).
169. K. Rubia *et al.*, Functional frontalisation with age: mapping neurodevelopmental trajectories with fMRI. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 13-19 (2000).
170. L. Tamm, V. Menon, A. L. Reiss, Maturation of brain function associated with response inhibition. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **41**, 1231-1238 (2002).
171. N. Steinbeis, J. Haushofer, E. Fehr, T. Singer, Development of Behavioral Control and Associated vmPFC-DLPFC Connectivity Explains Children's Increased Resistance to Temptation in Intertemporal Choice. *Cereb Cortex* **26**, 32-42 (2016).
172. W. Mischel, Y. Shoda, M. Rodriguez, Delay of gratification in children. (1989).
173. B. Luna, A. Padmanabhan, K. O'Hearn, What has fMRI told us about the Development of Cognitive Control through Adolescence? *Brain Cogn* **72**, 101 (2010).
174. S. J. Ordaz, W. Foran, K. Velanova, B. Luna, in *J Neurosci.* (2013), vol. 33, pp. 18109-18124.
175. T. Moriguchi, N. Salem, Jr., Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J Neurochem* **87**, 297-309 (2003).
176. W. E. Connor, M. Neuringer, D. S. Lin, Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. *J Lipid Res* **31**, 237-247 (1990).
177. A. J. Hulbert, N. Turner, L. H. Storlien, P. L. Else, Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev Camb Philos Soc* **80**, 155-169 (2005).

178. J. Bradbury, in *Nutrients*. (2011), vol. 3, pp. 529-554.
179. J. D. Carver, V. J. Benford, B. Han, A. B. Cantor, The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Res Bull* **56**, 79-85 (2001).
180. M. Standl *et al.*, FADS1 FADS2 gene cluster, PUFA intake and blood lipids in children: results from the GINIplus and LISAplus studies. *PLoS One* **7**, e37780 (2012).
181. A. Zak *et al.*, [Desaturases of fatty acids (FADS) and their physiological and clinical implication]. *Cas Lek Cesk* **155**, 15-21 (2016).
182. H. A. Jensen *et al.*, FADS single-nucleotide polymorphisms are associated with behavioral outcomes in children, and the effect varies between sexes and is dependent on PPAR genotype. *Am J Clin Nutr* **100**, 826-832 (2014).
183. C. Glaser, J. Heinrich, B. Koletzko, Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism* **59**, 993-999 (2010).
184. E. Lattka, T. Illig, B. Koletzko, J. Heinrich, Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* **21**, 64-69 (2010).
185. P. Rzehak *et al.*, Variants of the FADS1 FADS2 gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. *PLoS One* **5**, e13261 (2010).
186. A. Ahmad, M. Murthy, R. S. Greiner, T. Moriguchi, N. Salem, Jr., A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. *Nutr Neurosci* **5**, 103-113 (2002).
187. J. Catalan *et al.*, Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* **116**, 1022-1031 (2002).
188. T. Moriguchi, R. S. Greiner, N. Salem, Jr., Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* **75**, 2563-2573 (2000).
189. W. Stillwell, S. R. Shaikh, M. Zerouga, R. Siddiqui, S. R. Wassall, Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* **45**, 559-579 (2005).
190. H. F. Turk, R. S. Chapkin, Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **88**, 43-47 (2013).
191. M. Gueguinou *et al.*, Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca<sup>2+</sup> channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochim Biophys Acta* **1848**, 2603-2620 (2015).
192. M. Healy-Stoffel, B. Levant, N-3 (Omega-3) Fatty Acids: Effects on Brain Dopamine Systems and Potential Role in the Etiology and Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **17**, 216-232 (2018).
193. S. de la Presa Owens, S. M. Innis, Docosahexaenoic and arachidonic acid prevent a decrease in dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in frontal cortex caused by a linoleic and alpha-linolenic acid deficient diet in formula-fed piglets. *J Nutr* **129**, 2088-2093 (1999).
194. M. K. Georgieff, S. M. Innis, Controversial nutrients that potentially affect preterm neurodevelopment: essential fatty acids and iron. *Pediatr Res* **57**, 99r-103r (2005).

195. R. K. McNamara *et al.*, Omega-3 fatty acid deficiency increases constitutive pro-inflammatory cytokine production in rats: relationship with central serotonin turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **83**, 185-191 (2010).
196. L. Zimmer *et al.*, Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neurosci Lett* **240**, 177-181 (1998).
197. E. Kodas *et al.*, Neither the density nor function of striatal dopamine transporters were influenced by chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in rodents. *Neurosci Lett* **321**, 95-99 (2002).
198. V. L. Darcey, G. A. McQuaid, D. H. Fishbein, J. W. VanMeter, Dietary Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Are Related to Impulse Control and Anterior Cingulate Function in Adolescents. *Front Neurosci* **12**, 1012 (2018).
199. E. J. Kilford, E. Garrett, S. J. Blakemore, The development of social cognition in adolescence: An integrated perspective. *Neurosci Biobehav Rev* **70**, 106-120 (2016).
200. S. J. Blakemore, in *J R Soc Med.* (2012), vol. 105, pp. 111-116.
201. E. A. Crone, R. E. Dahl, in *Nat Rev Neurosci.* (England, 2012), vol. 13, pp. 636-650.
202. Y. S. Nikolova, R. E. Ferrell, S. B. Manuck, A. R. Hariri, Multilocus genetic profile for dopamine signaling predicts ventral striatum reactivity. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1940-1947 (2011).
203. E. Stice, S. Yokum, K. Burger, L. Epstein, A. Smolen, Multilocus genetic composite reflecting dopamine signaling capacity predicts reward circuitry responsivity. *J Neurosci* **32**, 10093-10100 (2012).
204. J. Belsky, M. Pluess, Beyond diathesis stress: differential susceptibility to environmental influences. *Psychol Bull* **135**, 885-908 (2009).
205. B. J. Ellis, W. T. Boyce, J. Belsky, M. J. Bakermans-Kranenburg, M. H. van Ijzendoorn, Differential susceptibility to the environment: an evolutionary--neurodevelopmental theory. *Dev Psychopathol* **23**, 7-28 (2011).
206. R. C. Paolicelli, C. T. Gross, Microglia in development: linking brain wiring to brain environment. *Neuron Glia Biol* **7**, 77-83 (2011).
207. R. C. Paolicelli *et al.*, Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**, 1456-1458 (2011).
208. C. Y. Kuan, K. A. Roth, R. A. Flavell, P. Rakic, Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* **23**, 291-297 (2000).
209. R. R. Buss, W. Sun, R. W. Oppenheim, Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* **29**, 1-35 (2006).
210. R. M. Sapolsky, *Behave: The Biology of Humans at Our Best and Worst.* (Penguin Books, New York, 2017), pp. 154-249.
211. A. Reimers, H. Ljung, in *Ther Adv Psychopharmacol.* (2019), vol. 9.
212. B. E. Cormack, J. E. Harding, S. P. Miller, F. H. Bloomfield, The Influence of Early Nutrition on Brain Growth and Neurodevelopment in Extremely Preterm Babies: A Narrative Review. *Nutrients* **11**, (2019).
213. L. Cordain *et al.*, Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* **81**, 341-354 (2005).

214. World Health Organization, Global Health Observatory data: Overweight and obesity. 2015  
(/entity/gho/ncd/risk\_factors/overweight/en/index.html).
215. D. S. Ward *et al.*, Strength of obesity prevention interventions in early care and education settings: A systematic review. *Prev Med* **95 Suppl**, S37-s52 (2017).
216. A. P. Simopoulos, An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* **8**, 128 (2016).
217. F. H. Chilton *et al.*, Diet-gene interactions and PUFA metabolism: a potential contributor to health disparities and human diseases. *Nutrients* **6**, 1993-2022 (2014).
218. A. W. Ferrante, Jr., Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* **262**, 408-414 (2007).
219. E. A. Hamminga, A. J. van der Lely, H. A. Neumann, H. B. Thio, Chronic inflammation in psoriasis and obesity: implications for therapy. *Med Hypotheses* **67**, 768-773 (2006).
220. E. K. Naderali, S. H. Ratcliffe, M. C. Dale, Obesity and Alzheimer's disease: a link between body weight and cognitive function in old age. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* **24**, 445-449 (2009).
221. H. Salaun, J. Thariat, M. Vignot, Y. Merrouche, S. Vignot, [Obesity and cancer]. *Bull Cancer* **104**, 30-41 (2017).
222. S. G. Leveille, C. C. Wee, L. I. Iezzoni, in *Am J Public Health*. (2005), vol. 95, pp. 1607-1613.
223. T. L. Bale *et al.*, Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry* **68**, 314-319 (2010).
224. P. Montgomery, T. F. Spreckelsen, A. Burton, J. R. Burton, A. J. Richardson, in *PLoS One*. (2018), vol. 13.
225. J. P. Chang, K. P. Su, V. Mondelli, C. M. Pariante, Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Youths with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials and Biological Studies. *Neuropsychopharmacology* **43**, 534-545 (2018).
226. Z. M, Vulnerability to Psychopathology: A Biosocial Model. (1999).
227. S. A. Hari Dass *et al.*, A biologically-informed polygenic score identifies endophenotypes and clinical conditions associated with the insulin receptor function on specific brain regions. *EBioMedicine* **42**, 188-202 (2019).
228. P. M. Miguel *et al.*, Prefrontal Cortex Dopamine Transporter Gene Network Moderates the Effect of Perinatal Hypoxic-Ischemic Conditions on Cognitive Flexibility and Brain Gray Matter Density in Children. *Biol Psychiatry*, (2019).
229. P. P. Silveira *et al.*, Cumulative prenatal exposure to adversity reveals associations with a broad range of neurodevelopmental outcomes that are moderated by a novel, biologically informed polygenetic score based on the serotonin transporter solute carrier family C6, member 4 (SLC6A4) gene expression. *Dev Psychopathol* **29**, 1601-1617 (2017).
230. S. H. Landry, K. E. Smith, P. R. Swank, Responsive parenting: establishing early foundations for social, communication, and independent problem-solving skills. *Dev Psychol* **42**, 627-642 (2006).
231. C. Heim, E. B. Binder, Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-

- environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol* **233**, 102-111 (2012).
232. P. Kim, L. Strathearn, J. E. Swain, The maternal brain and its plasticity in humans. *Horm Behav* **77**, 113-123 (2016).