

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

**ESTRESSE PRECOCE E PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR,  
PROCESSOS EMOCIONAIS E COGNITIVOS: UMA PERSPECTIVA  
TRANSLACIONAL**

**Randriely Merscher Sobreira de Lima**

**Porto Alegre  
2021**

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

**ESTRESSE PRECOCE E PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR,  
PROCESSOS EMOCIONAIS E COGNITIVOS: UMA PERSPECTIVA  
TRANSLACIONAL**

**Randriely Merscher Sobreira de Lima**

**Orientadora: Profa. Dra. Carla Dalmaz**

**Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt**

**Orientadora no Doutorado Sanduiche no Exterior: Profa. Dra. Patrícia Pelufo Silveira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Neurociências.

**Porto Alegre  
2021**

### CIP - Catalogação na Publicação

Lima, Randriely Merscher Sobreira de  
ESTRESSE PRECOCE E PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO  
ALIMENTAR, PROCESSOS EMOCIONAIS E COGNITIVOS: UMA  
PERSPECTIVA TRANSLACIONAL / Randriely Merscher  
Sobreira de Lima. -- 2021.  
219 f.  
Orientadora: Carla Dalmaz.

Coorientadora: Ana Paula Santana de Vasconcellos  
Bittencourt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Porto  
Alegre, BR-RS, 2021.

1. adversidades no início da vida. 2. comportamento  
alimentar. 3. receptor de leptina. 4. transportador de  
serotonina. 5. transtorno de déficit de atenção e  
hiperatividade. I. Dalmaz, Carla, orient. II. Santana  
de Vasconcellos Bittencourt, Ana Paula, coorient. III.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

À minha família por todo amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A conclusão dessa tese de doutorado só foi possível pelo apoio incondicional de pessoas que fazem parte da minha base ou que apareceram na minha vida para mudar o curso comum e torná-la extraordinária. Sem vocês, nada seria possível.

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Antonio e Rosinete, meu coração fora do peito. Vocês são meus grandes exemplos, maiores professores e maiores incentivadores. Mesmo sem compreender a árdua trajetória, o apoio sempre foi incondicional. Nesses anos de vida eu nunca conheci pessoas tão determinadas como vocês. O esforço da vida de vocês me ensinou que tudo é possível. À vocês eu agradeço não só pela minha vida, mas pela família mais linda que alguém poderia ter. Aos meus irmãos e irmãs: Cintia Mara, Ana Paula, Lucas, Iorran, Aylla, Fernando e Raquel, pelos momentos de alegria e por segurarem a saudade. A força que vocês me dão me move!

Ao João Paulo, meu companheiro, amor, namorado e esposo. Há oito anos você me incentiva, me ama, segura minha mão e me diz que eu sou capaz de fazer tudo o que me proponho a fazer. Obrigada pelos sorvetes na hora do desespero de não saber o que fazer; pelas palavras certas nos momentos de angústia; por segurar tanta saudade enquanto eu trabalhava de longe! Obrigada por me fazer acreditar em mim.

Agradeço as minhas avós: Vovó Lúcia e Vovó Neta, que seguraram a saudade mesmo sem entender por que eu precisava estar tão longe de vocês. Obrigada por me ensinarem valores da vida, por me ensinarem a levantar a cabeça e me ensinarem a ser tão forte: nada derruba essas mulheres. Aos meus padrinhos, tio, tias e primos, por serem uma grande família de apoio!

À Profa. Dra. Carla Dalmaz, minha orientadora e meu exemplo de vida e de professora. Obrigada por me acolher de braços abertos nesses anos. Obrigada pela confiança depositada em mim e pelo carinho em todas as situações em que fomos expostas. A sua atenção, disponibilidade, carinho e ensinamentos foram essenciais para minha formação pessoal e profissional. Sua paciência e calma nos momentos certos, me fazendo respirar fundo e pensar nas soluções me fizeram aprender mais do que eu achava que seria possível! Muito obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt, que me acolheu ainda uma adolescente no seu laboratório na UFES e me ensinou os primeiros passos da vida acadêmica e depois me deixou voar. A você meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio, pela introdução na pesquisa, pelo carinho de amiga, pelo acolhimento em momentos felizes e muito difíceis em que passei nesses anos com você! Ao Prof. Dr. Athelson Bittencourt, com quem eu trabalhei por muitos anos no Museu de Ciências da Vida e me ensinou que sonhos devem ser realizados. Obrigada por ter aberto todas as portas possíveis e me ensinar a abri-las.

À Profa. Dra. Patricia Pelufo Silveira pelos últimos anos desse doutorado e por ter contribuído imensamente para minha formação. Obrigada por sempre me incentivar com muito

carinho e paciência. Serei sempre grata por tantas oportunidades, por ter aberto as portas de um mundo que eu nem sabia que era possível alcançar!!!

Aos meus colegas do Lab 37 e 25, ou seria 62? Agradeço a vocês todo o acolhimento, pela amizade e pela parceria no que fosse necessário! Aos alunos de iniciação científica do Lab 37, em especial ao Eduardo e a Luisa, vocês são incríveis e direi sempre com orgulho que fiz parte da vida de vocês! Obrigada por todo apoio e toda a disponibilidade! À Rachel pela confiança e por ter me recebido de braços abertos! Que pena que nosso tempo juntas foi curto! À Cris Matte, minha amiga querida, uma pessoa ímpar que transformou qualquer momento em diversão. Obrigada pelas experiências e pelo exemplo! Aos colegas do Lab 23, em especial a Pauline, com quem a gente pode contar de olhos fechados! Obrigada pela parceria de experimentos, e por ensinar a leveza de levar a vida. Aos muitos colegas que fiz durante meus anos na UFES e aos alunos de iniciação que passaram pelo Laboratório de Neuroendocrinologia e Estresse Perinatal, muito obrigada! Aos colegas e funcionários do Silveira e do Meaney Lab, pela parceria nas descobertas e pelo acolhimento!

Agradeço imensamente à Danusa, minha amiga, companheira de trabalho e um exemplo. Obrigada pelo apoio, pelo incentivo e por me ensinar tudo o que foi possível desde que a gente se conheceu! À Barbara, minha amiga do coração, que com seu olhar de psicóloga me leu perfeitamente desde que nos conhecemos. A vocês duas eu agradeço por tanto carinho em dividir conhecimento, por toda a disponibilidade, mesmo que para responder perguntas óbvias. Vocês duas foram essenciais nessa trajetória!

Aos amigos que entraram na minha vida durante esses anos de doutorado para fazer parte da minha história. À Amanda, minha companheira de casa em Porto Alegre, com quem eu tive o privilégio de passar um ano de quarentena e compartilhar muitos momentos culinários! À Alessandra (e ao Alvin), que me acolheu em um momento tão delicado no último ano, me ajudou nos experimentos, nas escolhas difíceis e nos felizes! E à Tamara, com quem dividi as angústias do doutorado sanduíche! Que sorte a minha poder chamar de amiga pessoas tão incríveis quanto vocês!

Aos amigos de infância e de vida adulta, obrigada por toda a parceria de vida e pelos momentos de alegria e descontração! Eu sei que foi difícil acompanhar minha rotina e ainda assim vocês estiveram presentes sempre que possível!

Aos professores que fizeram parte da minha formação acadêmica. Agradeço ao incentivo dos professores da minha graduação em Fonoaudiologia. Aos meus professores do mestrado do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, da UFES. E aos mestres do Programa de Pós-graduação em Neurociências, da UFRGS, com quem eu tive o prazer de estudar o que mais amo na vida, obrigada pelas avaliações, pelos ensinamentos e pela disponibilidade. Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Quillfeldt e à Profª. Dra. Denise Zancan, por serem verdadeiros mestres.

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao Departamento de Ciências Fisiológicas, e aos Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg e Profa. Dra. Vanessa Bejjamini Harres, pela disponibilidade em poder realizar parte dos meus experimentos nos seus laboratórios.

À McGill University, ao Douglas Mental Health University Institute, pelo período de grande aprendizado e pelo contato com grandes nomes das Neurociências. Ao Prof. Dr. Michael Meaney, que abriu as portas do seu laboratório e de tantas oportunidades.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Bioquímica e ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde pela oportunidade. Aos órgãos financiadores de pesquisa, especialmente a CAPES pela bolsa de doutorado, e também a de doutorado sanduíche.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e ao Biotério da Bioquímica pela disponibilidade.

Aos professores da banca examinadora, por toda disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos coordenadores, professores e a secretária do Programa de Pós-graduação em Neurociências, pela oportunidade do doutorado, pela disponibilidade e apoio.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento da minha formação: muito obrigada!

## *SUMÁRIO*

APRESENTAÇÃO.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. Introdução.....	13
1.1 Impacto de Experiências Ambientais no Período Perinatal.....	14
1.2 Resposta do Organismo ao Estresse.....	16
1.3 Consequências da Exposição a Adversidades no Início da vida.....	18
1.4 Modelos Animais para estudo de Adversidades no Início da Vida.....	21
2. Estado da Arte.....	23
Influência de Adversidades no Início da Vida no Desenvolvimento de Transtornos de Ansiedade.....	25
Influência de Adversidades no Início da Vida no Desenvolvimento de Transtornos de Atenção e Hiperatividade.....	30
Influência de Adversidades no Início da Vida na Programação do Comportamento alimentar e do metabolismo.....	37
3. Hipótese.....	75
4. Objetivos.....	77
4.1 Objetivo Geral.....	78
4.1 Objetivos Específicos.....	78
5. Metodologia e Resultados.....	79
Capítulo I.....	81
Capítulo II.....	94
Capítulo III.....	158
6. Discussão.....	178
7. Conclusões.....	200
8. Perspectivas.....	202
9. Referências bibliográficas.....	204
10. Anexos.....	217
Anexo I: Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.....	218



Anexo II: Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo .....	219
--	-----

## *APRESENTAÇÃO*

Esta tese está organizada nos tópicos de **Introdução, Estado da Arte, Hipótese, Objetivos, Métodos e Resultados, Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexos.**

A **Introdução** da tese apresenta a revisão bibliográfica e o embasamento teórico dos temas de estudo desta tese. A sessão **Estado da Arte** está dividida em três partes: a parte inicial apresenta o estado da arte revisando os efeitos de adversidades no início da vida e a programação de aspectos emocionais; a segunda parte apresenta os efeitos de adversidades no início da vida e a programação de processos cognitivos; por fim, a terceira parte consiste em um capítulo de livro publicado pela autora durante o doutorado revisando as influências das adversidades no início da vida no comportamento alimentar e no metabolismo, considerando diferentes fatores que controlam o apetite, como a homeostase energética, as propriedades hedônicas dos alimentos, os estados emocionais e cognitivos.

A **Hipótese** e os **Objetivos** definem os propósitos de cada artigo que será apresentado nas sessões seguintes.

A sessão **Metodologia e Resultados** está subdividida em Capítulos, sendo que cada Capítulo corresponde a um artigo científico específico referente aos trabalhos desenvolvidos durante o período do doutorado no Laboratório de Neurobiologia do Estresse (Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS), Laboratório de Neuroendocrinologia e Estresse Perinatal (Departamento de Ciências Fisiológicas, UFES), Silveira Lab e Meaney Lab (Douglas Research Centre - McGill University). Os capítulos serão apresentados com prefácio de cada artigo.

A sessão de **Discussão** corresponde à discussão da hipótese geral da tese, relacionando todos os trabalhos apresentados. Em seguida será apresentada a **Conclusão** dos principais achados da tese, bem como as **Perspectivas** futuras e as **Referências Bibliográficas** da Introdução e da Discussão, considerando que cada capítulo contém uma sessão bibliográfica formatada conforme as especificações de cada revista.

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

5-HT <sub>1-7</sub>	Receptores de serotoninas
5-HTT ou SERT	Transportador de serotonina
5-HTTLPR	Polimorfismo do gene do transportador de serotonina
ACTH	Liberação do hormônio adrenocorticotrópico
AgRP	Proteína relacionada à agouti
ALSPAC	Coorte europeia utilizada nos estudos em humanos, sigla do inglês “Avon Longitudinal Study of Parents And Children”
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo, sigla do termo em inglês “Brain-derived neurotrophic factor”
CEBQ	Questionário de comportamento alimentar infantil, sigla do termo em inglês “Child Eating Behaviour Questionnaire”
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DAT 1	Transportador de dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico, sigla do termo em inglês “Deoxyribonucleic acid”
DOHaD	Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença, sigla do termo em inglês “ <i>Developmental origins of health and disease</i> ”
DRD2-5	Receptores de dopamina
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição
ePRS	Escore de risco poligênico baseado em expressão, sigla do termo em inglês “expression-based polygenic risk score”
GCs	Glicocorticóides
GR	Receptores glicocorticóides
GUSTO	Coorte asiática utilizada nos estudos em humanos, sigla do inglês “ <i>Growing Up Towards Healthy Outcomes</i> ”
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPT	Hipotálamo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
MAVAN	Coorte canadense utilizada nos estudos em humanos, sigla do inglês “ <i>Maternal Adversity Vulnerability and Neurodevelopment</i> ”
MD	Privação maternal
MR	Receptores mineralocorticóides
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro, sigla do termo em inglês “ <i>messenger ribonucleic acid</i> ”
MS	Separação maternal
MSHs	Hormônios estimuladores dos melanócitos
NPY	Neuropeptídeo Y
PFC	Córtex pré-frontal
PND	Dia pós-natal
POMC	Pró-opiomelanocortina
SLC6A3	Soluto família 6 membro 3, codificador do transportador de dopamina
SLC6A4	Soluto família 6 membro 4, codificador do transportador de serotonina
SN	Sistema nervoso
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único, sigla do termo em inglês “ <i>single nucleotide polymorphisms</i> ”
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

## ***RESUMO***

A exposição a adversidades no início da vida é associada a susceptibilidades para o desenvolvimento de doenças metabólicas e psiquiátricas. Entretanto, os mecanismos por trás dessa associação, bem como as características que tornam o indivíduo resiliente ou susceptível, precisam ser melhor investigados. Assim, o objetivo desta tese foi investigar os efeitos de interações genéticas e ambientais no desenvolvimento de alterações de comportamento alimentar, processos emocionais e cognitivos. Inicialmente, desenvolvemos um estudo em modelos animais e investigamos os efeitos de diferentes protocolos de estresse no início da vida na predisposição a comportamento tipo-ansioso, alterações de peso corporal e comportamento alimentar. Os resultados mostram que animais machos submetidos ao estresse de privação materna apresentam diminuição de peso corporal ao longo da vida e essa diminuição está associada à redução de consumo de ração padrão. Por outro lado, tanto a separação quanto privação materna induz aumento de consumo de alimentos palatáveis e comportamento do tipo-ansioso na idade adulta. De forma interessante, esses resultados são sexo-específicos: em fêmeas não observamos alteração de ansiedade e resultados opostos foram vistos com relação ao consumo de alimentos palatáveis, sugerindo comportamento tipo-anedônico no grupo submetido a privação materna. Observamos também que o estresse precoce induziu alterações de conteúdo serotoninérgico na amígdala e no hipotálamo, em ambos os sexos, e redução da expressão de POMC no hipotálamo em machos. A partir desses resultados, levantamos a hipótese que os efeitos do estresse no início da vida no comportamento alimentar poderiam ser resultado da interação com redes de genes funcionais. Nessa perspectiva, com o objetivo de desenvolver uma pesquisa translacional focando em redes de genes regiões-específicas que poderiam ser afetadas pelo estresse no início da vida, desenvolvemos um estudo que analisou interações entre a exposição a adversidades no início da vida e genes relacionados ao receptor de leptina. Para tanto, realizamos um estudo em duas coortes longitudinais humanas e avaliamos a suscetibilidade ao desenvolvimento de padrões alimentares em crianças com histórico de adversidade no início da vida, considerando a expressão da rede de genes que se co-expressam com o receptor de leptina no córtex pré-frontal e no hipotálamo como possível modulador dessa associação. Os resultados desse trabalho demonstram que a interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressam com o receptor de leptina no córtex pré-frontal influencia o comportamento alimentar de crianças. Esses resultados foram replicados em diferentes idades e em ambas as coortes analisadas. Por fim, considerando nossos achados em modelos animais com relação ao sistema serotoninérgico, continuamos nossos estudos em humanos e avaliamos como processos cognitivos, epigenéticos e a densidade de matéria cinzenta encefálica são modulados pela interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressam com o transportador de serotonina na amígdala. Os resultados desse trabalho demonstram que a interação entre adversidades em períodos sensíveis de desenvolvimento e a rede de genes que se co-expressam com o transportador de serotonina na amígdala modula comportamentos relacionados à atenção e hiperatividade, bem como variações de metilação de DNA ao longo do genoma, e que SNPs dessa rede também são associados a variações de densidade de matéria cinzenta encefálica. Em conjunto, por meio de um estudo translacional nesta tese, identificamos um perfil genético e funcional associado à sinalização da leptina no córtex pré-frontal como um importante modulador dos efeitos de experiências adversas no comportamento alimentar. Por outro lado, evidências consistentes em nossos achados apontam que a funcionalidade da rede de genes co-expressos com o transportador de serotonina na amígdala é importante para resiliência ou risco aumentado de desenvolver psicopatologias ao longo da vida, interagindo com a presença de adversidades precoces.

**Palavras-chave:** adversidades no início da vida; comportamento alimentar; receptor de leptina; rede de genes; transportador de serotonina; transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

## ***ABSTRACT***

Early life adversities have been associated with the susceptibility to develop metabolic and psychiatric diseases later in life. However, the mechanisms behind this association need to be further investigated, as well as the individual characteristics that provide vulnerability or resilience. Therefore, the aim of this dissertation was to investigate the effects of interactions between genetic and environmental factors on eating behavior, and emotional and cognitive processes. For this, we first investigated the effects of different animal models of early life stress on anxiety-like behavior, body weight, and eating behavior. The results showed that maternal deprivation decreases body weight throughout life and this decrease is associated with a reduction in standard chow intake. On the other hand, both maternal separation and deprivation increased consumption of palatable foods and anxiety-like behavior in male animals. Interestingly, these results were sex-specific: in females, we did not observe changes in anxiety, and opposite results were seen regarding palatable foods intake, suggesting anhedonia-like behavior in the maternal deprivation group. We also observed that both early stress models induced alterations in the serotonergic content in the amygdala and hypothalamus, and reduced POMC expression in the hypothalamus of males. From these results, we hypothesized that early life stress effects on eating behavior could result from the interaction with functional gene networks. Therefore, we developed a translational study that analyzed interactions between exposure to adversity in early life and genes associated with the leptin receptor on eating behavior patterns and metabolic parameters in children from two prospective births cohorts. The results demonstrated that the interaction between adversity in early life and a gene network that co-expresses with the leptin receptor in the prefrontal cortex influences feeding behavior of children. These results were replicated at different ages and different cohorts. Finally, considering our findings in animal models regarding the serotonergic system, we continued our studies in humans and evaluated whether cognitive, epigenetic processes, and brain gray matter density are modulated by the interaction between adversities in early life and the gene network that is co-expressed with the serotonin transporter in the amygdala. The results of this study demonstrated that the interaction between adversities early in life and the gene network that co-expresses with the serotonin transporter in the amygdala modulates behaviors related to attention and hyperactivity, as well as variations in DNA methylations; and SNPs from this network are also associated with variations in brain gray matter density. In conclusion, here we identified a genetic and functional profile associated with leptin signaling in the prefrontal cortex as an important modulator of the effects of early life adversity on eating behavior. On the other hand, strong evidence from our findings indicates that the interaction between the amygdala serotonin transporter gene network and early life adversities modulated the resilience or increased risk of developing psychopathologies throughout life.

**Keywords:** attention deficit hyperactivity disorder; early life adversities; eating behavior; gene network; leptin receptor; serotonin transporter.

## **1. Introdução**

---

## 1.1 Impacto de Experiências Ambientais no Período Perinatal

O ambiente em que uma criança é inserida é fundamental para o seu desenvolvimento. Nesse sentido, o ambiente em si inclui todo o contexto em que uma criança se desenvolve, como o ambiente externo, a comunidade, a sociedade e o ambiente familiar (Perlroth & Castelo Branco, 2017). O cuidado parental, o contato social, bem como estímulos e experiências no período pré e pós-natal são essenciais para o desenvolvimento motor, cognitivo e emocional de uma criança (do Prado et al., 2016; Grace, Bulsara, Robinson, & Hands, 2016; Juruena, Eror, Cleare, & Young, 2020).

A necessidade de cuidados especiais, bem como ações que visam à proteção e à manutenção da saúde da mãe e do bebê durante a gravidez e o pós-parto são amplamente conhecidos pela sociedade. De acordo com o senso comum, o resguardo, clinicamente denominado puerpério, se constitui de um período de respeito a normas culturalmente aprendidas, que tem como objetivo preservar a saúde e diminuir complicações pós-parto (Luz, Berni, & Selli, 2007). Dessa forma, o período pós-natal é marcado por orientações e práticas passadas de geração em geração relacionadas a restrições alimentares, de repouso, de higiene corporal, abstinência sexual, bem como de cuidado com a exposição a variações de temperatura. Tais práticas tem como objetivo o cuidado e a proteção da saúde da criança em períodos sensíveis de desenvolvimento (Acosta, Gomes, Kerber, & da Costa, 2012).

Na clínica, a importância do cuidado e boas práticas na atenção obstétrica e neonatal é bem estabelecida. O Sistema Único de Saúde brasileiro, por exemplo, desenvolveu em 2011 a “*Rede Cegonha*” de atenção à promoção de saúde e prevenção de doenças da mãe e do bebê. O objetivo da rede é garantir o planejamento reprodutivo e a assistência à gestante durante o pré-natal, parto, nascimento e período puerpério, com atenção integral à saúde da criança (Portaria Nº 1.459, de 24 de junho de 2011). Além disso, a prática de utilização do Método Canguru vem sendo adotada em unidades de terapia intensiva neonatais para recém-nascidos que precisam de cuidados especiais após o nascimento. Esse método promove a humanização e participação dos pais e da família no cuidado do bebê que precisa permanecer no hospital. O método de cuidado se inicia com o contato pele a pele do toque e evolui até a posição canguru (Ministério da Saúde, 2011). Estudos indicam que a utilização do método reduz o tempo de separação e facilita o vínculo afetivo dos pais com o recém-nascido, estimula o aleitamento materno, contribui para a redução do risco de infecção

hospitalar, bem como do estresse e da dor, favorecendo a estimulação sensorial e o desenvolvimento neuropsicomotor.

Estudos em humanos e modelos animais demonstram a importância do cuidado e proteção adequados no período perinatal, sendo que a exposição a adversidades nesse período pode levar a prejuízos a curto e longo prazo para os filhotes (Couto-Pereira et al., 2019; Diehl et al., 2014; Meaney et al., 2013; Miguel, Pereira, et al., 2019; Silveira et al., 2010). De fato, é de se imaginar que a exposição a adversidades graves, como abandono, negligência, abuso físico e emocional, maus tratos, bem como doenças gestacionais e que acometem os bebês nos pós-parto, podem tornar os indivíduos mais vulneráveis a distúrbios metabólicos e comportamentais, além de déficits cognitivos e psicopatologias mais tarde na vida (Gentner & Leppert, 2019). Entretanto, o cuidado inapropriado dos filhos, a estrutura e as condições socioeconômicas da família, bem como baixo ou alto peso ao nascimento também são fatores de estresse que podem levar a prejuízos no desenvolvimento (Escobar et al., 2014; Levitan et al., 2017; Wendland et al., 2014).

A exposição a fatores ambientais adversos, como nutrição inadequada, infecções, estresse, e alterações hormonais maternas pode modular a expressão gênica individual e ser determinante para o desenvolvimento de condições específicas de saúde e doença (Mandy & Nyirenda, 2018). Muitos achados clínicos, como os demonstrado na clínica pelo Professor Dr. David Barker, apontam que condições adversas intrauterinas e na primeira infância, como baixo peso ao nascer, aumentam o risco para desenvolver doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta (Barker, Winter, Osmond, Margetts, & Simmonds, 1989). Embora tal condição não seja determinística, a hipótese de que a vida fetal e as fases iniciais da vida extrauterina são essenciais para o desenvolvimento dos indivíduos, levou à criação de uma linha de pesquisa conhecida como Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (DOHaD, sigla do termo em inglês “*Developmental origins of health and disease*”), a qual investiga a relação entre variações ambientais na vida precoce e desfechos tardios (Silveira, Portella, Goldani, & Barbieri, 2007; Wadhwa, Buss, Entringer, & Swanson, 2009).

Diversas espécies animais, embora em diferentes graus, apresentam desenvolvimento continuado após a gestação, em especial nos primeiros estágios de vida pós-natal. Em humanos, os primeiros dois anos de vida são determinantes para o desenvolvimento estrutural e funcional do sistema nervoso (SN) (Kolb, Harker, & Gibb, 2017). Durante esse período, o encéfalo permanece



em maturação em um processo caracterizado pela formação, migração e diferenciação de neurônios. Além disso, ocorrem processos como organização de redes neurais, expansão da substância cinzenta encefálica em regiões como o lobo frontal, e aumento da espessura cortical (Gilmore, Knickmeyer, & Gao, 2018). Ao mesmo tempo, processos de mielinização dos neurônios se iniciam no período pré-natal e permanecem após o nascimento, especialmente em regiões motoras, sensoriais e no hipocampo. Dessa forma, experiências ambientais nesse período sensível do desenvolvimento podem afetar a plasticidade encefálica, modulando profundamente o desenvolvimento do SN e fenótipos relacionados.

## **1.2 Resposta do Organismo ao Estresse**

O estresse, que foi inicialmente descrito em 1936 como uma síndrome produzida por diversos agentes nocivos (Selye, 1998), é um termo amplamente utilizado para descrever situações e experiências desafiadoras para os indivíduos, às quais o organismo precisa se adaptar de maneira física e/ou emocional. Dentre as diversas definições de estresse, o grupo do Professor Dr. Bruce McEwen propôs a distinção entre estresse bom, estresse tolerável e estresse tóxico (McEwen, 2007). O estresse bom se refere a situações de duração limitada e é associado a um sentimento de felicidade/realização após o fator estressor encerrar-se, como falar em público. Mediadores químicos relacionados ao estresse, como cortisol e adrenalina, são liberados, promovendo a adaptação necessária do organismo. Por outro lado, o estresse tolerável está relacionado ao estresse decorrente de uma situação desfavorável ou ruim, como a perda de um emprego. Nesse caso, tanto o cortisol quanto a adrenalina são liberados, e podem permanecer elevados até que o organismo volte a se adaptar. Esse processo pode gerar consequências fisiopatológicas, como desregulação cardiovascular, imunológica, metabólica e mudanças nos circuitos encefálicos envolvidos na regulação emocional (Cohen, Janicki-Deverts, & Miller, 2007). Entretanto, é esperado que, eventualmente, o organismo minimize esses efeitos em longo prazo (McEwen, 1998). O estresse tóxico, por sua vez, também ocorre após um gatilho, como no estresse tolerável, porém nesse caso o indivíduo não tem recursos internos ou suporte externo suficiente para minimizar os efeitos do estresse, o que leva à desregulação fisiológica crônica, resultando em carga ou sobrecarga alostática, que conseqüentemente pode levar a distúrbios de saúde física e mental (Picard, McEwen, Epel, & Sandi, 2018).

A exposição a estressores, mesmo que de naturezas distintas, provoca um processo dinâmico no organismo que envolve respostas comportamentais, imunológicas, neurovegetativas e neuroendócrinas associadas à alostase, em um processo de manutenção da homeostase (McEwen, 2007). Nesse sentido, duas respostas fisiológicas são importantes e classicamente conhecidas: a ativação do sistema neuroendócrino e do sistema nervoso autônomo. O estresse ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e essa resposta é iniciada quando o núcleo paraventricular do hipotálamo sintetiza e secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o qual estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise. O córtex da glândula adrenal é estimulado pelo ACTH a liberar glicocorticóides, especificamente cortisol em humanos e corticosterona em roedores (Tsigos & Chrousos, 2002). Os glicocorticóides (GCs) estão relacionados a uma série de funções fisiológicas necessárias durante situações estressantes, como a gliconeogênese, necessária para condições de luta ou fuga, e direcionamento de fluxo sanguíneo para órgãos específicos. Além disso, GCs também têm funções importantes em regiões encefálicas envolvidas em processos cognitivos, como memória, ansiedade e tomada de decisão, por meio de ações em mudanças de plasticidade sináptica, neurogênese, bem como indução de morte celular e expressão de receptores para neurotransmissores (Picard et al., 2018). Já o sistema nervoso autônomo, uma das principais vias neurais ativadas durante situações de estresse, tem sua ativação iniciada no núcleo paraventricular do hipotálamo. Neste núcleo, projeções de neurônios que contêm CRH para centros noradrenérgicos no tronco encefálico e medula espinhal aumentam a atividade simpática, culminando, entre outros processos, com a liberação de adrenalina pela medula da glândula adrenal e noradrenalina pelos gânglios paravertebrais simpáticos (Won & Kim, 2016). Em conjunto, esses mecanismos levam a alterações comportamentais e periféricas que melhoram a capacidade do organismo de ajustar a homeostase e aumentar as chances de sobrevivência em situações de estresse.

Os GCs, após liberação pelo córtex da glândula adrenal, acessam o encéfalo facilmente e exercem suas ações ao se ligarem em duas classes de receptores, os mineralocorticóides (MR) e os glicocorticóides (GR). Um importante efeito dos GCs no encéfalo ocorre via sistema de retroalimentação negativa sobre o eixo HHA (Tsigos & Chrousos, 2002). Entretanto, receptores de glicocorticóides são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e estão envolvidos em ações não-genômicas e genômicas que levam a alterações fisiológicas e comportamentais (Harris, Holmes, de Kloet, Chapman, & Seckl, 2013). Os receptores da classe GR são expressos em

diversas regiões encefálicas e estão envolvidos diretamente na resposta ao estresse e no controle de retroalimentação negativa do eixo HHA. Por sua vez, os receptores MR são expressos principalmente em áreas límbicas, como o hipocampo e a amígdala, e estão associados a processos adaptativos, como consolidação da memória (de Quervain, Schwabe, & Roozendaal, 2017).

O estresse agudo provoca liberação de mediadores, como aqueles citados acima, e causa modificações fisiológicas com o objetivo de adaptar o organismo para situações específicas. Entretanto a exposição crônica a esses mediadores pode causar mudanças metabólicas, cardiovasculares e neuroquímicas prejudiciais ao organismo. A exposição a longo prazo aos glicocorticóides aumenta a glicemia, estimula a maturação do precursor de adipócitos, aumenta a susceptibilidade a infecções, doenças metabólicas, obesidade, distúrbios de saúde mental como depressão e ansiedade, e doenças cardiovasculares (McEwen, 2007; McIntosh & Sapolsky, 1996; Picard et al., 2018; Russell & Lightman, 2019). Nesse sentido, condições de estresse aplicadas em períodos sensíveis de desenvolvimento, como na primeira infância, podem afetar o desenvolvimento encefálico. Estudos demonstram que o eixo HHA continua seu desenvolvimento e maturação durante a infância, e a exposição a níveis de cortisol elevados nesse período pode afetar a sensibilidade dos seus receptores no encéfalo (Gunnar & Quevedo, 2007), levando a efeitos de curta e longa duração bem estabelecidos, como aumento da reatividade do eixo HHA e consequente prejuízo na adaptação ao estresse (McEwen, 1998). Essas alterações são consideradas por muitos autores como o mecanismo primário pelo qual o estresse precoce predispõe indivíduos a alterações de saúde mental e física (Essex et al., 2011; Kim, Choi, Kim, Hong, & Park, 2020; Levine, 2001; Nishi, Horii-Hayashi, & Sasagawa, 2014).

### **1.3 Consequências da Exposição a Adversidades no Início da vida**

Adversidades no início da vida são altamente associadas a vulnerabilidade para o desenvolvimento de uma grande quantidade de doenças crônicas ao longo da vida. Estudos em humanos e em modelos animais vêm demonstrando que a exposição a estressores podem predispor indivíduos a alterações neuroquímicas e comportamentais (figura 1). Estudos em humanos indicam que estressores em períodos sensíveis do desenvolvimento, como na infância e na adolescência, são considerados como fatores de risco para o desenvolvimento de psicopatologias, como transtornos de ansiedade, disfunções emocionais (Poole, Dobson, & Pusch, 2017) e depressão (Bouvette-Turcot et al., 2017). Crianças submetidas a experiências de abuso físico ou emocional

e violência doméstica, na primeira infância, são mais propensas a apresentarem prejuízos cognitivos (Holland et al., 2020).

A nutrição inadequada durante a gestação está associada ao aumento de risco para desenvolvimento de obesidade e esse desfecho parece ser dependente do período gestacional em que o estresse intrauterino ocorreu. Por exemplo, um estudo clássico desenvolvido com mulheres que estiveram grávidas durante a Segunda Guerra Mundial, nos Países Baixos, demonstrou que filhos de mulheres que sofreram desnutrição no primeiro semestre de gestação apresentavam altos índices de obesidade no início da vida adulta. Por outro lado, os resultados eram opostos quando as mulheres sofreram desnutrição no último semestre de gestação: nesse caso os filhos apresentavam baixa incidência de obesidade. Assim, sugere-se que a nutrição adequada em períodos específicos do desenvolvimento favorece a diferenciação de centros encefálicos responsáveis pelo controle do consumo alimentar e ganho de peso corporal (Ravelli, Stein, & Susser, 1976).

A obesidade e o excesso de peso são condições multifatoriais caracterizadas pelo excesso de gordura corporal decorrente de um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas (Engin, 2017). É bem estabelecido que o excesso de gordura corporal é resultado de alterações metabólicas determinadas pela interação entre fatores genéticos e ambientais, e adversidades no início da vida podem levar a alterações metabólicas duradouras, que contribuem para o risco de desenvolver tais disfunções (Morris, Beilharz, Maniam, Reichelt, & Westbrook, 2015), como será revisado em detalhes no tópico do Estado da Arte. Além disso, a exposição a experiências adversas na primeira infância também é altamente associada ao ganho de peso e índice de massa corporal ao longo da vida. Lumeng e colaboradores, por exemplo, observaram que experiências negativas durante a infância aumentam a chance de desenvolver sobrepeso em meninos e meninas aos 15 anos de idade, de forma independente de sexo, etnia, educação e status de peso materno (Lumeng et al., 2013). Outras adversidades na infância também são relacionadas a propensão ao desenvolvimento de sobrepeso, por exemplo, problemas psicológicos maternos são correlacionados com o desenvolvimento de obesidade de filhos ainda na infância (Ramasubramanian, Lane, & Rahman, 2013). Corroborando esses achados, mulheres vítimas de abuso sexual na infância também apresentam maiores chances de desenvolver obesidade na vida adulta (Noll, Zeller, Trickett, & Putnam, 2007).

A *American Heart Association* publicou uma declaração científica destacando os principais trabalhos da literatura sobre a influência de adversidades na infância em desfechos cardiometabólicos, incluindo também obesidade, hipertensão e diabetes mellitus tipo 2 (Suglia et al., 2018). As experiências adversas na infância e na adolescência, como ameaças percebidas à segurança e à proteção da integridade corporal e da estrutura familiar da criança, são altamente associadas com doenças cardiovasculares ao longo da vida (Suglia et al., 2018). Uma série de trabalhos evidencia a associação entre adversidades no início da vida e risco aumentado de desenvolver infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares encefálicos e doenças coronarianas (Su, Jimenez, Roberts, & Loucks, 2015). Nesse cenário, estudos sugerem que os mecanismos pelos quais adversidades aumentam o risco para doenças cardiovasculares envolvem fatores comportamentais, biológicos e de saúde mental (Suglia et al., 2018). Assim, evidências sugerem que as adversidades em estágios sensíveis do desenvolvimento estão associadas com o aumento de comportamentos que são considerados como fatores de risco para doenças cardiometabólicas, como hábito de fumar (Anda et al., 1999), consumo alimentar em excesso, principalmente alimentos com alto teor de energia (Hemmingsson, Johansson, & Reynisdottir, 2014) e a falta de hábito de praticar exercícios físicos (Sherwood & Jeffery, 2000). Além disso, adversidades no início da vida são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade e de humor, os quais são positivamente correlacionados com taxas de morbidade e mortalidade cardiometabólicas (Tully, Harrison, Cheung, & Cosh, 2016). Ainda, adversidades na infância são associadas a alteração do sistema imune, do metabolismo e do sistema neuroendócrino (Suglia et al., 2018). De fato, um estudo recente demonstrou que adultos que passaram por adversidades na infância apresentam até duas vezes mais chances de desenvolver doenças cardiovasculares e risco de morte prematura (Godoy et al., 2021). A Figura 1 ilustra as possíveis consequências da exposição a experiências adversas na infância.

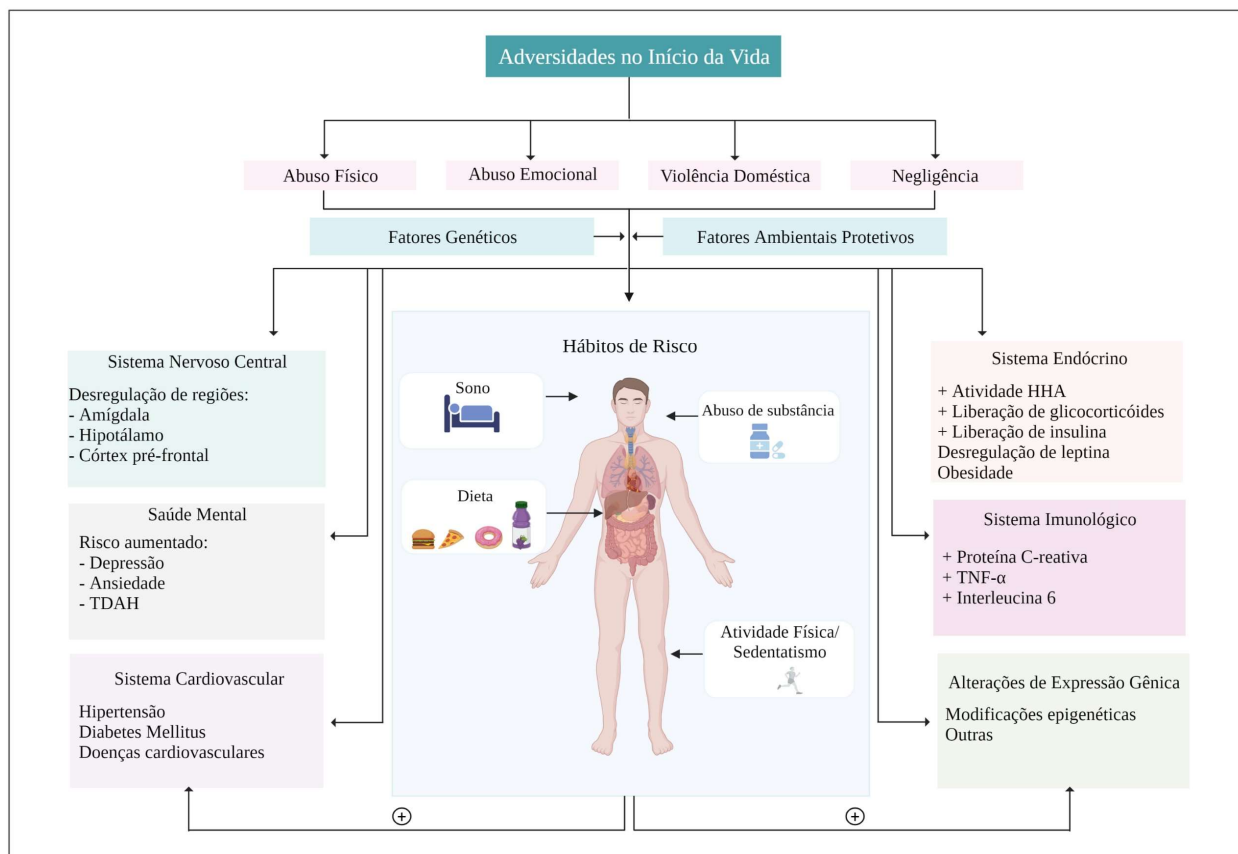


Figura 1: Resumo dos efeitos de experiências adversas na infância e a influência de fatores ambientais protetivos e de fatores genéticos relacionados a resiliência e a vulnerabilidade ao desenvolvimento de alterações comportamentais, psicopatologias, doenças metabólicas, e risco aumentado ao desenvolvimento para hábitos de risco para a saúde como má qualidade de sono, dietas ricas em açúcar e gordura, abuso de substância e sedentarismo. Adaptado de (Godoy et al., 2021). TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa; TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; HHA: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Criado com BioRender.com.

#### 1.4 Modelos Animais para estudo de Adversidades no Início da Vida

A separação materna (MS) de filhotes de roedores é um modelo animal amplamente utilizado na pesquisa pré-clínica para mimetizar os efeitos de adversidades no início da vida em humanos (Couto-Pereira et al., 2019; Heim & Nemeroff, 2001). Nesse modelo de estresse precoce, roedores, os quais também têm desenvolvimento continuado após a gestação, são submetidos à separação da presença materna por algumas horas diárias durante as primeiras semanas de vida. Os protocolos de MS variam entre laboratórios, de acordo com o tempo de separação diária (entre 10 minutos a até 6 horas diárias) e o período pós-natal de separação (durante primeiros 10 dias, 14 dias ou ainda 21 dias de vida). Modelos com separação de no máximo 30 minutos são considerados

como manipulação apenas, enquanto modelos de 1 ou mais horas são considerados separação de fato (Nylander & Roman, 2013). Outros modelos envolvem separação de 24 horas durante dias específicos no período pós-natal, e tais protocolos são chamados de privação maternal (MD) (Miragaia et al., 2018; Wertheimer, Girardi, de Oliveira, Monteiro Longo, & Suchecki, 2016). Esse protocolo se constitui de uma combinação de fatores estressantes, que envolvem a falta de cuidado e proteção maternal, e falta de alimentação durante o período de separação.

Embora esses modelos sejam muito utilizados na pesquisa pré-clínica, os protocolos apresentam grande variabilidade, o que contribui para diferentes achados comportamentais e neuroquímicos, que variam conforme a janela de desenvolvimento que afetam. Nesse sentido, estudos são necessários para identificar os mecanismos fisiológicos pelos quais diferentes modelos de estresse causam diferentes fenótipos, principalmente considerando diferenças sexo-específicas.

## **2. Estado da Arte**

---



A exposição a adversidades no início da vida pode predispor indivíduos a alterações comportamentais e metabólicas, como comentado anteriormente. De interesse especial para esta tese, serão revisados estudos clássicos e atuais relativos aos efeitos de adversidades no início da vida no desenvolvimento de transtornos mentais como ansiedade, atenção e hiperatividade, bem como as influências de adversidades em alterações de comportamento alimentar e metabólicas.

O capítulo estado da arte revisará inicialmente a influência de adversidades no início da vida na programação de aspectos emocionais e cognitivos. Em seguida, o capítulo *Life-course effects of early life adversity exposure on eating behavior and metabolism* terá como foco a influência do ambiente perinatal na programação do comportamento alimentar e do metabolismo.

## **Influência de Adversidades no Início da Vida no Desenvolvimento de Transtornos de Ansiedade**

Transtornos de ansiedade são distúrbios de saúde mental altamente prevalentes na população. Estima-se que 3,6% da população global apresentam transtornos de ansiedade, com a maioria dos casos ocorrendo nas regiões do Sudeste Asiático e das Américas (WHO, 2017). Os transtornos de ansiedade variam conforme situações que os desencadeiam, mas compartilham entre si sintomas excessivos de medo e ansiedade. Enquanto o medo é definido como uma resposta emocional a uma ameaça percebida e real, necessário em situações de luta ou fuga, a ansiedade consiste na antecipação de uma ameaça futura e uma preparação para situações de perigo, caracterizada por tensão muscular e vigilância ao perigo (Figura 2). Diferentemente do medo e ansiedade adaptativos, nos transtornos de ansiedade essas emoções são caracterizadas como excessivas, sendo muitas vezes incapacitantes. Segundo o Manual de Diagnósticos de Transtornos Mentais (DSM), os transtornos de ansiedade podem ser classificados em: Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno de Ansiedade de Separação, Mutismo Seletivo, Fobia Específica, Transtorno de Ansiedade Social ou Fobia Social, Transtorno de Pânico, Agorafobia, Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância/Medicamento ou Outra Condição Médica (American Psychiatric Association, 2013).

Embora atividades do cotidiano possam gerar ansiedade, nos transtornos de ansiedade, em especial no transtorno de ansiedade generalizada, os sinais de ansiedade são desencadeados por eventos ou atividades específicas que, em geral, resultam em preocupação excessiva e desproporcional à situação. Diferentemente da ansiedade rotineira, os sintomas associados ao transtorno de ansiedade interferem diretamente nas atividades diárias, relações sociais e profissionais. Além disso, os transtornos de ansiedade apresentam altas taxas de comorbidade com outros transtornos mentais, como outros transtornos de ansiedade e depressão, afetando de forma significativa a qualidade de vida do indivíduo. O diagnóstico é realizado com base em avaliações clínicas, utilizando como base o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. O critério diagnóstico para Ansiedade Generalizada inclui ansiedade e preocupação excessivas ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses e acompanhadas de pelo menos três outros sintomas como: inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono. Em crianças, por sua vez, o diagnóstico é realizado quando pelo

menos um desses sintomas está presente pelo tempo determinado (American Psychiatric Association, 2013).

Os transtornos de ansiedade generalizada são decorrentes de ativação excessivas de regiões encefálicas associadas aos comportamentos de medo e resposta de luta ou fuga. Regiões encefálicas do sistema límbico, áreas corticais e regiões do tronco encefálico estão relacionadas à modulação de resposta de ansiedade. As bases neurobiológicas dos transtornos de ansiedade apontam que alterações tanto estruturais quanto funcionais, de neurotransmissores e neuropeptídeos são responsáveis pelos quadros de ansiedade excessiva (Dunsmoor & Paz, 2015). A amígdala é considerada como a região central para controle da ansiedade, sendo também altamente associada à modulação da atenção, processamento de estímulos e ativação de respostas de medo, agressão e comportamento defensivo (Martin, Ressler, Binder, & Nemeroff, 2009). Lesões em subdivisões da amígdala, que incluem a amígdala central, basolateral e medial, núcleos altamente complexos, heterogêneos e inervados por diferentes populações neuronais, induzem alterações de ansiedade em animais (Sanders & Shekhar, 1995; Ventura-Silva et al., 2013). Por exemplo, a hiperexcitabilidade da amígdala basolateral é associada ao aumento de comportamento tipo-ansioso e medo excessivos, enquanto a inibição da mesma região é associada à diminuição desses comportamentos (Truitt, Johnson, Dietrich, Fitz, & Shekhar, 2009).

Além da amígdala, outras regiões encefálicas são associadas ao controle da ansiedade (Martin et al., 2009). O córtex pré-frontal está envolvido em funções executivas, como tomada de decisão, controle de impulsos e humor, no processamento de recompensas e na modulação da resposta a emoções. Por outro lado, o córtex límbico integra informações sensoriais, afetivas e cognitivas. Evidências de muitos estudos demonstram que tanto a atividade de cada uma dessas regiões, quando as conexões entre elas, induzem comportamentos específicos caracterizados como medo e ansiedade. O principal circuito envolvido na regulação da ansiedade é composto pela amígdala e essas demais regiões. A amígdala basolateral recebe informações potencialmente ansiogênicas vindas dos sistemas sensoriais via tálamo e de regiões do córtex sensorial e então ativa o núcleo central da amígdala através de impulsos excitatórios glutamatérgicos. Impulsos inibitórios via neurônios GABAérgicos são projetados da amígdala para o hipotálamo e regiões do tronco encefálico induzindo sensações autonômicas associadas à ansiedade. Impulsos excitatórios,

por sua vez, são enviados da amígdala para regiões corticais e contribuem para a apresentação do estímulo emocional (Nuss, 2015).

Dois sistemas neurotransmissores são considerados chaves para o controle de comportamentos relacionados a medo e ansiedade: o sistema GABAérgico e o sistema serotoninérgico. De fato, a maioria dos fármacos utilizados na clínica para o tratamento de ansiedade são benzodiazepínicos e barbitúricos (Newman, Llera, Erickson, Przeworski, & Castonguay, 2013). Estudos optogenéticos demonstraram que inibição de neurônios GABAérgicos da amígdala produz efeito ansiogênico em camundongos (Luo et al., 2020), e curiosamente a ativação de astrócitos na amígdala basolateral reduz o comportamento tipo-ansiedade induzido por estresse, talvez por favorecer a eficiência da liberação e recaptção de neurotransmissores (Xiao, Xu, & Tu, 2020). O sistema serotoninérgico, de maior interesse neste trabalho, modula diversos comportamentos que incluem percepção de dor, sono, agressão, comportamento alimentar, de ansiedade e de medo. Neurônios serotoninérgicos são originados no núcleo dorsal da rafe e se projetam para uma série de estruturas encefálicas como a amígdala e outras estruturas límbicas (Figura 2). A serotonina é sintetizada no citoplasma de neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos a partir do aminoácido triptofano pela ação da enzima triptofano hidroxilase, que produz 5-hidroxitriptofano, o qual é descarboxilado pela ação da enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase, produzindo serotonina. Após a formação do neurotransmissor, ele é armazenado em vesículas via transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Ao ser liberada na fenda sináptica, a serotonina se liga a receptores na superfície de neurônios pós-sinápticos (5-HT<sub>1-7</sub>). Os neurotransmissores são então recaptados pelo transportador de serotonina (SERT) para neurônios pré-sinápticos, e podem ser degradados pela enzima monoamino-oxidase. Alterações na síntese, liberação e disponibilidade de serotonina são associadas com alterações de comportamentos de ansiedade e atenção, como será discutido adiante (Curran & Chalasani, 2012). Estudos em humanos considerando polimorfismos de genes associados a sinalização de serotonina, por exemplo, identificaram que a presença de uma ou duas cópias do alelo curto (5-HTTLPR) da região promotora do transportador de serotonina (SLC6A4) está associada à redução da expressão e da função do transportador de serotonina e a um aumento de atividade neuronal da amígdala, bem como aumento de comportamentos relacionados a medo e ansiedade (Hariri et al., 2002).

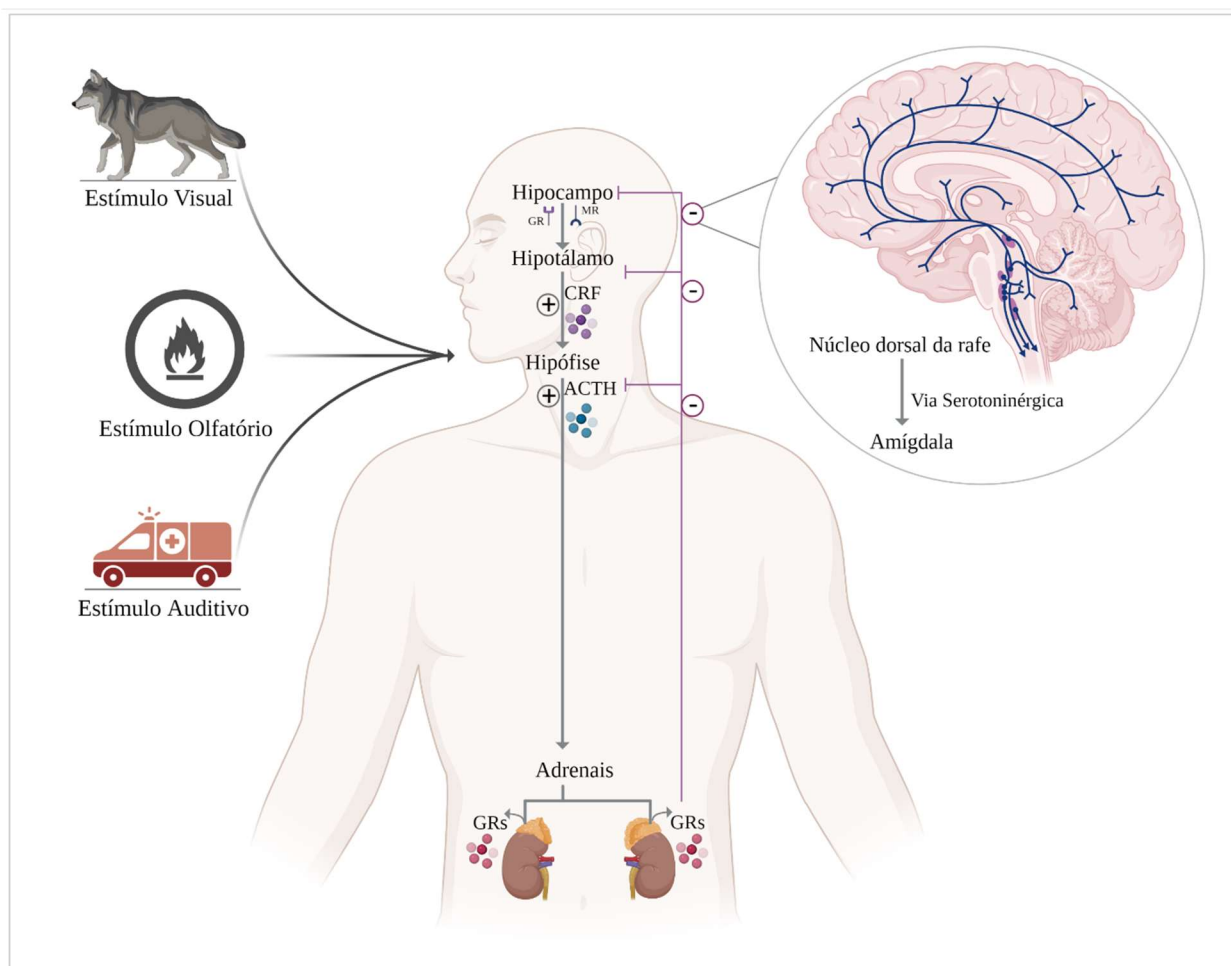


Figura 2: Respostas Serotoninérgicas Envolvendo Medo e Ansiedade. Reações de medo ocorrem em resposta a uma ameaça percebida, como um estímulo que poderia desencadear danos físicos, enquanto um comportamento de ansiedade ocorre em resposta a uma ameaça imprecisa ou desconhecida. O processamento fisiológico de um estímulo ameaçador ocorre quando o estímulo de natureza variada, como exemplificado por estímulos visuais, olfatórios e auditivos, é percebido. O estímulo se torna um gatilho, ativando regiões encefálicas como o hipocampo e desencadeando a ativação do eixo HHA. O estímulo ameaçador é processado pelo tálamo e amígdala. A amígdala integra informações de memória do hipocampo e córtex e envia projeções serotoninérgicas para outras regiões encefálicas como a ínsula e o hipotálamo. A serotonina é liberada por neurônios do núcleo dorsal da rafe e inerva regiões do cerebelo, tálamo, hipocampo, hipotálamo, córtex pré-frontal e amígdala. Adaptada de (Curran & Chalasani, 2012). Criado com BioRender.com.

Algumas variáveis são consideradas como fatores de risco ou fatores capazes de aumentar a vulnerabilidade a transtornos de ansiedade. Dentre os principais fatores de risco estima-se que ser do sexo feminino é um dos mais importantes, considerando que mulheres apresentam até duas vezes mais chances de apresentarem transtornos de ansiedade. Entretanto, fatores genéticos, fatores ambientais e a interação gene e ambiente contribuem substancialmente para a etiologia dos transtornos de ansiedade. Dentre os fatores genéticos, a presença de variantes como o

polimorfismo da região promotora do gene do transportador de serotonina (Hariri et al., 2002), citado anteriormente, ou familiares com histórico de transtornos mentais (Craske et al., 2017), podem favorecer o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade. Além disso, a exposição a adversidades na infância, como abuso físico ou social, divórcio dos pais, tratamento inadequado ou mesmo a necessidade de hospitalização, está associada ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade e também de humor na idade adulta (Afifi, Mota, Dasiewicz, MacMillan, & Sareen, 2012; Otowa, York, Gardner, Kendler, & Hettema, 2014; Sareen et al., 2013). Estudos em modelos animais também demonstram que adversidades no início da vida aumentam a vulnerabilidade ao desenvolvimento de comportamentos tipo-ansiosos (Daniels, Pietersen, Carstens, & Stein, 2004; Trujillo, Durando, & Suarez, 2016). Entretanto, as bases neuroquímicas que levam a alterações de ansiedade ainda precisam ser melhor investigadas para o direcionamento de estratégias adequadas direcionadas ao público-alvo.

## **Influência de Adversidades no Início da Vida no Desenvolvimento de Transtornos de Atenção e Hiperatividade**

Os transtornos de neurodesenvolvimento são caracterizados como condições específicas que se manifestam no início do desenvolvimento infantil e acarretam prejuízos pessoais, sociais, acadêmicos e profissionais ao longo da vida. Esses prejuízos se manifestam como alterações de aprendizagem, do controle de funções executivas, prejuízos globais e de habilidades sociais. Dentre esses transtornos, destaca-se o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), um dos transtornos psiquiátricos mais comuns na infância. O TDAH é caracterizado por sintomas de dificuldade de atenção, impulsividade e hiperatividade (American Psychiatric Association, 2013). Embora seja comum na infância, frequentemente o transtorno persiste até a vida adulta e é considerado como um fator de risco para transtornos mentais, tais como comportamentos desafiadores e antissociais, problemas emocionais, propensão ao abuso de substâncias, baixo desempenho educacional, dificuldades com emprego e relacionamentos (Sayal, Prasad, Daley, Ford, & Coghill, 2018).

O diagnóstico do TDAH é realizado utilizando os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (American Psychiatric Association, 2013), tendo como característica base um padrão contínuo e persistente de desatenção e/ou hiperatividade e impulsividade. O diagnóstico de crianças é realizado quando os familiares reportam pelo menos seis sintomas de desatenção (exemplo: dificuldade em detalhes ou erros por descuido em tarefas escolares, no trabalho ou durante outras atividades; dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas); hiperatividade e impulsividade (exemplo: frequentemente levanta da cadeira em situações em que se espera que permaneça sentado, corre ou sobe nas coisas em situações em que isso é inapropriado, ou em adultos observa-se sensações de inquietude); e são persistentes por pelo menos seis meses. Esses sintomas devem estar presentes em pelo menos dois ambientes, como na escola e em casa e devem ser evidentes antes dos 12 anos de idade. Comumente, três apresentações do TDAH podem ser distinguidas de acordo com a classificação do DSM-5: (I) TDAH subtipo combinado, ou seja, tanto sinais de desatenção quanto de hiperatividade e impulsividade estão presentes; (II) TDAH subtipo predominantemente desatento, quando sinais de desatenção são mais prevalentes; e (III) TDAH subtipo hiperativo/impulsivo, caracterizado por sinais de hiperatividade e impulsividade predominantes.

Embora o diagnóstico do TDAH possa ser realizado também por outras ferramentas, o que consequentemente dificulta o rastreamento da prevalência do transtorno, uma série de revisões sistemáticas apontaram que a prevalência mundial do transtorno está entre 2,2 e 7,2% (Sayal et al., 2018). Estudos sugerem que alguns fatores sociodemográficos como sexo, etnicidade e status socioeconômico são importantes para a estimativa do transtorno. Por exemplo, em crianças e adolescentes as taxas de diagnósticos de TDAH são maiores em meninos que em meninas, embora a estimativa de proporção varie entre os estudos (2-3 meninos a cada 1 menina em estudos populacionais ou 4 a cada 1 em estudos clínicos) (Faraone et al., 2015; Sayal et al., 2018). Além disso, a prevalência do transtorno também parece estar associada à baixa renda familiar e a algumas etnias, apesar de esses resultados serem pouco conclusivos (Faraone et al., 2015).

Pacientes com TDAH frequentemente apresentam outros transtornos comportamentais associados. O transtorno oppositor desafiador é altamente comórbido com o TDAH e estima-se que metade das crianças diagnosticadas com o subtipo combinado também apresentam o transtorno de oposição desafiante (American Psychiatric Association, 2013). Além disso, transtornos de conduta e transtornos específicos de aprendizagem são comuns em indivíduos com TDAH. Crianças com TDAH tendem a apresentar dificuldade de escrita, leitura e/ou matemática (DuPaul, Gormley, & Laracy, 2013). De fato, a dificuldade de atenção e a hiperatividade em períodos escolares iniciais podem comprometer o aprendizado convencional. Em adultos, estima-se taxas de comorbidade de TDAH e transtorno bipolar entre 9,5% e 21,2%. Corroborando esses achados, estudos observam que indivíduos com TDAH apresentam também transtornos de humor, que podem aparecer ainda na infância. Por outro lado, transtornos de ansiedade, como fobia social e transtorno do pânico, são comuns em indivíduos com TDAH e possivelmente decorrem das mesmas bases neuroanatômicas que serão discutidas a seguir (Katzman, Bilkey, Chokka, Fallu, & Klassen, 2017).

Diversas linhas de pesquisa apontam que os sintomas de dificuldade de atenção e hiperatividade são decorrentes de disfunções cognitivas, especialmente por alterações de funções executivas (Barkley, 1997; Castellanos et al., 2002). Um estudo clássico nos anos 90 propôs um modelo teórico de que o TDAH seria resultado de alterações de comportamento inibitório e prejuízos de funções executivas (Barkley, 1997). O modelo de Barkley define funções executivas como uma série de quatro funções, sendo elas: memória de trabalho, auto-regulação do afeto,



motivação e excitação; internalização da fala; e reconstituição. Essas funções controlariam outros sistemas neuropsicológicos e influenciariam o sistema motor, levando a alterações comportamentais associadas ao transtorno (Barkley, 1997). Corroborando esses achados, dados da literatura demonstram que crianças e adultos com TDAH apresentam também prejuízos de memória e baixo desempenho em testes de aprendizagem verbal (Roth et al., 2004).

Estudos de neuroimagem propõem que a ocorrência do transtorno está associada ao atraso no desenvolvimento de regiões encefálicas envolvidas no controle de funções executivas (Castellanos et al., 2002), regiões essas que permanecem em desenvolvimento no decorrer da infância e da adolescência (Sowell, Thompson, & Toga, 2004). Essa hipótese surgiu da observação de que algumas crianças diagnosticadas com TDAH apresentavam comportamento mais ativo e impulsivo, semelhante a crianças mais jovens. De fato, algumas características corroboram essa hipótese, como por exemplo o fato de crianças com TDAH apresentarem déficits em desenvolvimento de funções cognitivas superiores, de autocontrole inibitório, necessidade de recompensa imediata, bem como dificuldade de atenção e falha na previsão de consequências temporais (Rubia, 2007). Outro fato que corrobora essa hipótese parte do princípio de que muitos pacientes diagnosticados com o transtorno apresentam melhora e normalização do quadro na vida adulta (Faraone et al., 2015). Com o objetivo de avaliar se o TDAH poderia ser caracterizado por alterações de espessura de regiões do córtex envolvidas no controle atencional, Shaw e colaboradores (2006) realizaram um estudo longitudinal em que avaliaram o desenvolvimento encefálico de crianças com TDAH comparadas com crianças controle. Nesse estudo, um total de 163 crianças diagnosticadas com o transtorno e 166 crianças controles tiveram pelo menos dois exames de ressonância magnética e avaliações clínicas pelo tempo de acompanhamento de 5 anos. Os autores observaram diminuição da espessura do córtex, particularmente córtex pré-frontal medial e superior e de regiões pré-centrais de crianças com TDAH comparadas com crianças controle. Entretanto, durante o desenvolvimento, o córtex parietal direito de crianças com TDAH de quadro leve normalizou em relação ao grupo controle, o que é esperado durante a maturação encefálica na adolescência (Shaw et al., 2006; Sowell et al., 2004). Esses resultados corroboram a hipótese de que o TDAH tem fisiopatologia associada ao atraso do desenvolvimento e maturação de estruturas encefálicas que são associadas ao controle de funções executivas.

O TDAH possui etiologia multifatorial com fatores genéticos, fatores ambientais e a interação gene x ambiente contribuindo substancialmente para o desenvolvimento do transtorno. Muitos estudos apontam a elevada prevalência do TDAH entre familiares. Estima-se que pais com TDAH têm entre duas e oito vezes mais chances de terem filhos com o mesmo transtorno. Da mesma forma, irmãos de indivíduos diagnosticados têm risco elevado para o desenvolvimento da doença (Faraone et al., 2000). Além disso, considerando que fatores ambientais poderiam interferir no desenvolvimento do transtorno, um estudo duplo-cego analisou os riscos de desenvolver TDAH entre irmãos, controlando variáveis como sexo, integridade familiar e status socioeconômico e confirmou as altas taxas de desenvolvimento do transtorno entre famílias (Faraone et al., 2005). Finalmente, estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos, que compartilham respectivamente praticamente 100% e 50% do genoma, foram revisados em 2005. Considerando diversas etnias, a média de hereditariedade do TDAH foi estimada em 76%, sendo considerado um dos transtornos psiquiátricos mais herdáveis (Faraone et al., 2005).

Dados da literatura apontam que fatores genéticos estáveis e comuns, fatores genéticos que emergem em diferentes estágios de desenvolvimento desde a infância até a vida adulta e algumas variantes genéticas são associadas ao desenvolvimento do TDAH (Faraone et al., 2015). Vários estudos têm se esforçado para identificar genes centrais importantes para a etiologia do TDAH. Um dos primeiros estudos com gene candidato para TDAH identificou que certos polimorfismos do transportador de dopamina aumentam a susceptibilidade para o desenvolvimento do transtorno (Cook et al., 1995). De fato, o tratamento mais efetivo para TDAH envolve a utilização de fármacos como metilfenidato, anfetamina, pemolina e bupropiona, que atuam inibindo o transportador de dopamina, corroborando os resultados de genes candidatos (Minzenberg, 2012).

Com o objetivo de identificar os principais genes candidatos associados ao desenvolvimento de TDAH, Gizer e colaboradores realizaram uma meta-análise em 2009, considerando genes que foram associados ao transtorno em diferentes estudos. Dentre os candidatos identificados, destacam-se genes envolvidos na sinalização de monoaminas neurotransmissoras, tais como genes envolvidos nas vias dopaminérgicas, vias adrenérgicas, vias serotoninérgicas e vias colinérgicas, além de genes envolvidas nas vias de desenvolvimento do sistema nervoso (Gizer, Ficks, & Waldman, 2009). O sistema dopaminérgico foi amplamente associado ao desenvolvimento do TDAH. O gene do transportador de dopamina (DAT1,

SLC6A3), por exemplo, responsável pela recaptação do neurotransmissor, tem sido amplamente identificado como gene candidato para o transtorno. De fato, animais nocaute para o gene DAT1 são utilizados como modelos animais para o estudo do TDAH (Leo & Gainetdinov, 2013). Além disso, receptores de dopamina, tais como receptores de dopamina D4 (DRD4), D2 (DRD2) e D5 (DRD5), que são amplamente expressos em regiões do córtex orbitofrontal e do giro cingulado, do córtex pré-frontal, e do hipocampo, respectivamente, estão envolvidos na etiologia do transtorno e no processamento das vias de recompensa (Gizer et al., 2009).

Variações em genes relacionados à função do sistema serotoninérgico também apresentam resultados importantes na etiologia do TDAH (Gizer et al., 2009). Nesse sentido, o transportador de serotonina (SLC6A4; 5-HTT) foi identificado como um gene candidato fundamental no fenótipo do transtorno, especialmente por seu envolvimento no controle da impulsividade e hiperatividade (Gizer et al., 2009). O gene do transportador de serotonina está localizado no braço longo do cromossomo 17 e seu produto atua na recaptação da serotonina na fenda sináptica, sendo o mecanismo primário para regulação da disponibilidade de serotonina extracelular (Halperin et al., 1997). Além disso, o 5-HTT está amplamente distribuído em regiões encefálicas associadas ao controle da atenção, memória e atividades motoras, tais como o hipocampo, o hipotálamo, o córtex cingulado e a amígdala (Frankle et al., 2004; Oquendo et al., 2007; Puig & Gullledge, 2011). Dentre as funções da amígdala, discutimos anteriormente sua função no controle de comportamentos relacionado ao medo e à ansiedade, contudo essa região também está envolvida no controle e manutenção de processos atencionais e de aprendizagem, e grande parte dessas funções está relacionada a alta inervação serotoninérgica (Pessoa, 2010).

Embora estudos tentem identificar um gene em comum responsável pelo transtorno, a inconsistência dos achados para um gene específico sugere que o TDAH, por ser uma doença complexa, poderia resultar da influência de uma série de genes contribuindo para o desenvolvimento do mesmo fenótipo (Thapar & Cooper, 2016). Nesse sentido, apenas em 2019 um estudo de associação genômica ampla (GWAS) foi desenvolvido para identificar variantes comuns de DNA que aumentam o risco de TDAH, o qual identificou 12 polimorfismos significativamente associados ao transtorno (Demontis et al., 2019). A identificação desses polimorfismos corrobora a hipótese de que o TDAH se constitui em um transtorno com múltiplas variáveis contribuindo para um transtorno complexo. Dessa forma, estudos que contemplem a ação

de diferentes variantes genéticas podem ser fundamentais para o direcionamento e identificação de crianças com risco elevado para o desenvolvimento do transtorno.

Além de fatores hereditários, fatores ambientais são extremamente importantes para o risco de desenvolvimento do TDAH. Evidências apontam que a exposição a adversidades no período perinatal, exposição a toxinas, disponibilidade de nutrição adequada e fatores psicossociais são associados ao TDAH (Thapar & Cooper, 2016). Dentre as adversidades no período perinatal, baixo peso ao nascer, prematuridade, exposição a drogas ilícitas, tabaco e álcool durante o período gestacional são amplamente associados ao risco para desenvolver o transtorno (Thapar, Cooper, Eyre, & Langley, 2013). A importância do período perinatal para o risco aumentado de TDAH é estabelecida e confirmada por estudos em modelos animais que observaram que hipóxia e isquemia neonatal aumentavam comportamentos associados a inatenção, impulsividade, além de alterar a síntese de dopamina no córtex pré-frontal (Ketzer, Gallois, Martinez, Rohde, & Schmitz, 2012; Mikkelsen et al., 2017). Miguel e colaboradores em 2019 avaliaram a atividade locomotora e a flexibilidade cognitiva em ratos expostos a hipóxia e isquemia no período neonatal e observaram que o estresse nesse período levou à inflexibilidade cognitiva, que foi revertida pelo tratamento com metilfenidato, embora o mesmo tenha causado aumento de atividade locomotora nesse grupo de animais. Além disso, esses resultados foram associados à diminuição dos receptores dopaminérgicos D2 e do transportador de dopamina e a um aumento dos níveis da enzima tirosina hidroxilase fosforilada. Esses resultados em conjunto validaram o modelo de hipóxia e isquemia neonatal como um modelo animal para o estudo do TDAH, confirmando a importância do ambiente neonatal para o desenvolvimento do TDAH (Miguel, Deniz, et al., 2019).

De acordo com o exposto, não é possível afirmar que um único fator de risco ou variante genética poderia explicar o desenvolvimento do TDAH, embora uma extensa literatura aponte que fatores hereditários e ambientais contribuam substancialmente para o desenvolvimento do transtorno. Nesse sentido, a interação gene e ambiente ( $G \times E$ ) seria o principal mecanismo pelo qual fatores ambientais interagem com fatores genéticos e aumentam o risco para o desenvolvimento do transtorno (Faraone et al., 2015). Variantes genéticas poderiam conferir vulnerabilidade a adversidades que poderiam predispor indivíduos ao desenvolvimento de fenótipos específicos. Corroborando essa hipótese, o polimorfismo do gene do transportador de serotonina (5-HTTLPR) foi identificado como moderador dos efeitos da exposição ao estresse

crônico e preditor do desenvolvimento do TDAH (van der Meer et al., 2014). No entanto, doenças complexas, como o TDAH, envolvem uma complexa rede de genes funcional organizada de forma hierárquica, que envolve vias moleculares, tipos celulares e circuitos que acarretam modificações cognitivas e comportamentais (Gaiteri, Ding, French, Tseng, & Sibille, 2014; Parikshak, Gandal, & Geschwind, 2015). Por outro lado, a exposição a adversidades poderia levar a alterações epigenéticas, como metilação do DNA, que levam a alterações na expressão genômica e, conseqüentemente, a alterações funcionais. Embora pouco estudado no contexto do TDAH, alterações epigenéticas poderiam mediar a associação entre fatores de risco ambientais e o desenvolvimento do TDAH (Mill & Petronis, 2008).

## **Influência de Adversidades no Início da Vida na Programação do Comportamento alimentar e do metabolismo**

As influências de adversidades no início da vida na programação de comportamento alimentar e do metabolismo foram revisadas e publicadas em um capítulo da série de livros *Advances in Food and Nutrition Research* da editora Elsevier. A seguir, serão discutidos os efeitos de condições ambientais, em períodos sensíveis do desenvolvimento, no comportamento alimentar e no metabolismo, considerando fatores que são associados ao apetite, como emoções e processos cognitivos, comportamentos hedônicos e o sistema de recompensa, e a exposição a dietas palatáveis, finalizando com estudos de interação gene e ambiente sobre o desenvolvimento do comportamento alimentar e fenótipos relacionados.

## Advances in Food and Nutrition Research

ISSN 1043-4526

<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.00>

### Life-course effects of early life adversity exposure on eating behavior and metabolism

Randriely Merscher Sobreira de Lima<sup>a,\*</sup>, Barbara Barth<sup>b</sup>, Danusa Mar Arcego<sup>c</sup>, Rachel Krolow<sup>d</sup>, Patrícia Pelufo Silveira<sup>b,c,e</sup>, and Carla Dalmaz<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Integrated Program in Neuroscience (IPN), McGill University, Montreal, QC, Canada

<sup>c</sup>Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, McGill University, Douglas Hospital Research Centre, Montreal, QC, Canada

<sup>d</sup>Departamento e PPG Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup>Ludmer Centre for Neuroinformatics and Mental Health, Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada

\*Corresponding author: e-mail address: randriely@gmail.com

#### Abstract

Environmental variations in early life influence brain development, making individuals more vulnerable to psychiatric and metabolic disorders. Early life stress (ELS) has a strong impact on the development of eating behavior. However, eating is a complex behavior, determined by an interaction between signals of energy homeostasis, neuronal circuits involved in its regulation, and circuits related to rewarding properties of the food. Although mechanisms underlying ELS-induced altered feeding behavior are not completely understood, evidence suggest that the effects of ELS on metabolic, mood, and emotional disorders, as well as reward system dysfunctions can contribute directly or indirectly to altered feeding behavior. The focus of this chapter is to discuss the effects of ELS on eating behavior and metabolism, considering different factors that control appetite such as energy homeostasis, hedonic properties of the food, emotional and cognitive status. After highlighting classic studies on the association between ELS and eating behavior alterations, we discuss how exposure to adversity can interact with genetics characteristics to predict variable outcomes.

### **3. Hipótese**

---



Considerando que:

1. o período perinatal se constitui de um período sensível para o desenvolvimento, sendo uma fase da vida em que vários sistemas continuam seu processo de maturação, como é o caso do encéfalo, e que influências ambientais nesse período podem causar prejuízos na formação e/ou eficácia de circuitos neurais que podem levar a alterações comportamentais e neuroquímicas a longo prazo;
2. embora exista uma grande variabilidade de protocolos de estresse neonatal em modelos animais, diversas evidências apontam que adversidades no início da vida estão associadas a alterações de peso corporal e consumo alimentar, bem como de comportamentos relacionados, tais como ansiedade, hiperatividade e impulsividade, e que os mecanismos pelos quais fatores ambientais em fases iniciais da vida afetam esses desfechos ainda precisam ser mais bem elucidados;
3. fatores genéticos e ambientais interagem entre si e influenciam o desenvolvimento;

a hipótese dessa tese é que a exposição a adversidades no início da vida interage com redes funcionais associadas ao comportamento alimentar e a processos emocionais e/ou cognitivos, aumentando a resiliência ou a suscetibilidade ao desenvolvimento de alterações de comportamento alimentar, de atenção e hiperatividade durante o desenvolvimento, observáveis tanto em modelos animais quanto em estudos em humanos.

## **4. Objetivos**

---

## 4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral dessa tese foi investigar se a exposição a eventos adversos no início da vida aumentam a suscetibilidade ao desenvolvimento de alterações de comportamento alimentar e de processos emocionais e cognitivos, partindo de estudos empíricos em um modelo animal para, a seguir, utilizando uma perspectiva translacional, investigar como a interação entre fatores genéticos e o ambiente precoce poderia modular redes funcionais associadas a tais fenótipos.

## 4.1 Objetivos Específicos

- a) Investigar como diferentes protocolos de estresse no início da vida afetam a ansiedade, o comportamento alimentar e o peso corporal de ratos adultos, considerando mecanismos encefálicos envolvidos diretamente no controle do apetite, bem como mecanismos hedônicos relacionados à motivação alimentar (Capítulo I).
- b) Investigar os efeitos da interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que é co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal e no hipotálamo, em comportamentos alimentares e no metabolismo de crianças de coortes independentes (Capítulo II).
- c) Investigar os efeitos da interação entre a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala e exposição a adversidades no início da vida, sobre o desenvolvimento de alterações comportamentais de atenção e hiperatividade, densidade da massa cinzenta do encéfalo e fatores epigenéticos (Capítulo III).

## **5. Metodologia e Resultados**

---

A metodologia e resultados dessa tese serão apresentados a seguir na forma de três capítulos:

- ❖ Capítulo I: *Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides.*
  
- ❖ Capítulo II: *Leptin receptor co-expression gene network moderates the effect of early life adversity on eating behavior in children.*
  
- ❖ Capítulo III: *Amygdala 5-HTT Gene Network Moderates the Effects of Postnatal Adversity on Attention Problems: Anatomico-Functional Correlation and Epigenetic Changes.*

## *Capítulo I*

**Artigo:** *Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides.*

**Publicado na revista:** *Behavioural Brain Research.*

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112399>

No primeiro capítulo desta tese, propomos investigar, em animais, os efeitos de diferentes protocolos de estresse, aplicados em períodos sensíveis do desenvolvimento, no comportamento alimentar, no peso corporal e na ansiedade. Parâmetros homeostáticos e hedônicos associados a tais fenótipos também foram analisados.

Os resultados desse trabalho demonstram que, animais submetidos ao estresse no início da vida apresentam alteração de consumo de alimentos palatáveis. Entretanto, tanto o sexo quanto o tipo de estresse aplicado no início da vida, podem modular diferentemente esse consumo. Além disso, animais machos submetidos ao estresse foram susceptíveis ao aumento de comportamento tipo-ansioso na vida adulta. O estresse precoce reduziu a expressão de POMC e aumentou a atividade serotoninérgica no hipotálamo, enquanto na amígdala efeitos sobre o sistema serotoninérgico foram dependentes de sexo e tipo de estresse.

Esse trabalho foi realizado em parceria entre o Laboratório de Neuroendocrinologia e Estresse Perinatal, coordenado pela Profa. Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt, vinculado ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, e o Laboratório de Neurobiologia do Estresse, coordenado pela Profa. Dra. Carla Dalmaz, vinculado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio grande do Sul.

## Behavioural Brain Research

*Behavioural Brain Research* 379 (2020) 112399

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112399>

### **Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides**

Randriely Merscher Sobreira de Lima<sup>a \*</sup>, Lucas Victor dos Santos Bento<sup>b</sup>, Marcelo di Marcello Valladão Lugon<sup>b</sup>, Valerio Garrone Barauna<sup>c</sup>, Athelson Stefanon Bittencourt<sup>b,d</sup>, Carla Dalmaz<sup>a,c</sup>, Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil

<sup>e</sup>Departamento e PPG Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

#### Abstract

Early life experiences have strong influences on brain programming and can affect eating behavior control and body weight later in life. However, there is no consensus about the relationship between neonatal stress and feeding behavior. We evaluated whether maternal deprivation (MD) and maternal separation (MS) alter body weight and appetite using standard rat chow consumption and palatable food. Also, we evaluated anxiety and the expression of the leptin receptor, neuropeptides POMC, CART, NPY in the hypothalamus, as well as the serotonergic system in the amygdala and hypothalamus as possible modulators of these behaviors. We found a decrease in standard rat chow consumption in MD. However, both neonatal stress protocols increased the consumption of palatable food and led to anxiogenic behavior in male animals. MD led to decreased hypothalamic POMC levels in adult males. Serotonin in the hypothalamus was decreased by both stress models in males and females. In the amygdala, MS decreased serotonin levels while MD increased its metabolite levels. We observed that males are more vulnerable and females are more resilient to the effects of neonatal stress on anxiety-like behavior, as well as on food consumption and on the central changes observed. These data together add support to the concept that the early environment contributes to the development of eating disorders later in life.

Keywords: Maternal separation, Maternal deprivation, Food consumption, POMC, Serotonin

## *Capítulo II*

**Artigo:** *Leptin receptor co-expression gene network moderates the effect of early life adversity on eating behavior in children.*

### **A ser submetido.**

No segundo capítulo desta tese, partimos para uma perspectiva translacional, considerando que, embora resultados comportamentais em nosso estudo com animais apontem que o estresse induza alterações de comportamento alimentar, poucos efeitos em genes envolvidos nesses comportamentos foram identificados. Dessa forma, na segunda parte do nosso trabalho, realizamos um estudo em humanos com o objetivo de avaliar a suscetibilidade ao desenvolvimento de padrões alimentares em crianças com histórico de adversidade no início da vida, considerando fatores genéticos associados não somente a um gene alvo, mas à expressão da rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal e no hipotálamo.

Os resultados desse trabalho demonstram que a interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal influenciam o comportamento alimentar de crianças. Esses resultados foram replicados em diferentes idades e em diferentes coortes.

Esse trabalho foi executado durante um período de doutorado sanduíche no exterior com parceria entre o Silveira Lab, coordenado pela Profa. Dra. Patricia Pelufo Silveira, e o Meaney Lab, vinculados ao Douglas Mental Health University Institute da Universidade McGill (Canadá), e o Laboratório de Neurobiologia do Estresse, coordenado pela Profa. Dra. Carla Dalmaz, vinculado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio grande do Sul.



### *Capítulo III*

**Artigo:** *Amygdala 5-HTT Gene Network Moderates the Effects of Postnatal Adversity on Attention Problems: Anatomic-Functional Correlation and Epigenetic Changes.*

**Publicado na revista:** *Frontiers in Neuroscience*

**DOI:** <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00198>

No terceiro capítulo desta tese, considerando nossos achados em modelos animais com relação ao sistema serotoninérgico e considerando que a amígdala, principalmente pela grande inervação do sistema serotoninérgico, atua em diversas funções cognitivas, continuamos nossos estudos em humanos e avaliamos como processos cognitivos são modulados pela interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala. Além disso, inovamos nesse trabalho ao investigar os efeitos da interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina sobre a densidade da massa cinzenta do cérebro e sobre variações de metilação de DNA ao longo do genoma.

Os resultados desse trabalho demonstram que a interação entre adversidades em períodos sensíveis de desenvolvimento e a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala, modulam comportamentos relacionados à atenção e hiperatividade, bem como variações de metilações de DNA, e que SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único, sigla do termo em inglês “single nucleotide polymorphisms”) dessa rede também são associados a densidade de matéria cinzenta encefálica.

Esse trabalho foi realizado durante um período de doutorado sanduíche no exterior com parceria entre o Silveira Lab, coordenado pela Profa. Dra. Patricia Pelufo Silveira, vinculado ao Meaney Lab e ao Douglas Mental Health University Institute da Universidade McGill (Canadá), e o Laboratório de Neurobiologia do Estresse, coordenado pela Profa. Dra. Carla Dalmaz,

vinculado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio grande do Sul.



# Amygdala 5-HTT Gene Network Moderates the Effects of Postnatal Adversity on Attention Problems: Anatomic-Functional Correlation and Epigenetic Changes

Randriely Merscher Sobreira de Lima<sup>1</sup>, Barbara Barth<sup>2</sup>, Danusa Mar Arcego<sup>3</sup>, Euclides José de Mendonça Filho<sup>3,4</sup>, Andrew Clappison<sup>5</sup>, Sachin Patel<sup>5</sup>, Zihan Wang<sup>5</sup>, Irina Pokhvisneva<sup>5</sup>, Roberto Britto Sassi<sup>6</sup>, Geoffrey B. C. Hall<sup>7</sup>, Michael S. Kobor<sup>8</sup>, Kieran J. O'Donnell<sup>2,3,5</sup>, Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt<sup>9</sup>, Michael J. Meaney<sup>2,3,5,10</sup>, Carla Dalmaz<sup>1</sup> and Patrícia Pelufo Silveira<sup>2,3,5\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Deborah Suchecki,  
Federal University of São Paulo, Brazil

### Reviewed by:

Carina Bodden,  
University of Melbourne, Australia  
Tamas Kozicz,  
Mayo Clinic, United States

### \*Correspondence:

Patrícia Pelufo Silveira  
patricia.silveira@mcgill.ca

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neuroendocrine Science,  
a section of the journal  
Frontiers in Neuroscience

**Received:** 16 October 2019

**Accepted:** 24 February 2020

**Published:** 17 March 2020

### Citation:

de Lima RMS, Barth B, Arcego DM, de Mendonça Filho EJ, Clappison A, Patel S, Wang Z, Pokhvisneva I, Sassi RB, Hall GBC, Kobor MS, O'Donnell KJ, Bittencourt APSV, Meaney MJ, Dalmaz C and Silveira PP (2020) Amygdala 5-HTT Gene Network Moderates the Effects of Postnatal Adversity on Attention Problems: Anatomic-Functional Correlation and Epigenetic Changes. *Front. Neurosci.* 14:198. doi: 10.3389/fnins.2020.00198

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>2</sup> Integrated Program in Neuroscience (IPN), McGill University, Montreal, QC, Canada, <sup>3</sup> Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, QC, Canada, <sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Instituto de Psicologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>5</sup> Ludmer Centre for Neuroinformatics and Mental Health, Douglas Hospital Research Centre, McGill University, Montreal, QC, Canada, <sup>6</sup> Mood Disorders Program, Department of Psychiatry & Behavioural Neurosciences, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, <sup>7</sup> Department of Psychology, Neuroscience & Behaviour, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, <sup>8</sup> Centre for Molecular Medicine and Therapeutics, BC Children's Hospital Research Institute, Department of Medical Genetics, The University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, <sup>9</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitoria, Brazil, <sup>10</sup> Singapore Institute for Clinical Sciences, Agency for Science, Technology and Research (A\*STAR), Singapore, Singapore

Variations in serotonergic signaling have been related to behavioral outcomes. Alterations in the genome, such as DNA methylation and histone modifications, are affected by serotonin neurotransmission. The amygdala is an important brain region involved in emotional responses and impulsivity, which receives serotonergic input. In addition, studies suggest that the serotonin transporter gene network may interact with the environment and influence the risk for psychiatric disorders. We propose to investigate whether/how interactions between the exposure to early life adversity and serotonin transporter gene network in the amygdala associate with behavioral disorders. We constructed a co-expression-based polygenic risk score (ePRS) reflecting variations in the function of the serotonin transporter gene network in the amygdala and investigated its interaction with postnatal adversity on attention problems in two independent cohorts from Canada and Singapore. We also described how interactions between ePRS-5-HTT and postnatal adversity exposure predict brain gray matter density and variation in DNA methylation across the genome. We observed that the expression-based polygenic risk score, reflecting the function of the amygdala 5-HTT gene network, interacts with postnatal adversity, to predict attention and hyperactivity problems across both cohorts. Also, both postnatal adversity score and amygdala ePRS-5-HTT score, as well as their interaction, were observed to be associated with variation in DNA methylation across the

genome. Variations in gray matter density in brain regions linked to attentional processes were also correlated to our ePRS score. These results confirm that the amygdala 5-HTT gene network is strongly associated with ADHD-related behaviors, brain cortical density, and epigenetic changes in the context of adversity in young children.

**Keywords:** early environment, serotonin transporter, ADHD, DNA methylation, ePRS, parallel independent component analysis, attention, impulsivity

## INTRODUCTION

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a prevalent psychiatric condition characterized by symptoms of inattention, impulsivity, and hyperactivity (American Psychiatric Association, 2013). ADHD is a developmental disorder with symptoms often evident before 6 years of age (Faraone et al., 2003). Both genetic and environmental factors make a substantial contribution to the etiology of ADHD (Matthews et al., 2014). Childhood adversities are associated with the development of ADHD (Boecker et al., 2014; Björkenstam et al., 2017; Bock et al., 2017) while candidate gene studies suggest that low serotonergic activity is associated with increased impulsive-aggressive behavior (Faraone et al., 2003). Alterations in serotonin synthesis, breakdown and transport have been associated to ADHD-related phenotypes (Oades, 2010).

Serotonin or 5-hydroxytryptamine belongs to the indolamine family of neurotransmitters, and influences physiological processes, including autonomic function, motor activity, hormone secretion, and behavioral processes such as cognition, emotion, reward and attention (Carlsson, 1987; Greengard, 2001). The synthesis of 5-HT occurs in serotonergic neurons (Strüder and Weicker, 2001) where 5-HT is stored into presynaptic vesicles by a vesicular monoamine transporter (Sakowski et al., 2006). After being released, 5-HT is recycled through a process of active re-uptake by the serotonin transporter (5-HTT) (Hoffman et al., 1998). The 5-HTT gene, also known as *SLC6A4*, is localized in the long arm of chromosome 17. This gene encodes an integral membrane protein that transports the neurotransmitter serotonin from synaptic spaces into presynaptic neurons, and represents a primary mechanism for the regulation of serotonergic activity (Heils et al., 2002). 5-HTT is expressed in brain regions implicated in attention and memory such as the amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex (Frankle et al., 2004; Oquendo et al., 2007; Puig and Gullledge, 2011). The amygdala is predominantly modulated by the 5-HT system, and plays an important role in attentional processes (Pessoa, 2011). Several studies have observed that variations specifically in this gene are associated with impulsivity, hyperactivity, and ADHD (Halperin et al., 1997; Manor et al., 2001; Seeger et al., 2001). Likewise, Genetic variation in *SLC6A4* also associates with individual differences in DNA methylation, a functional epigenetic modification of DNA, and *SLC6A4* gene expression. Interestingly, such genetic effects on DNA methylation emerged as a function of exposure to adversity early in life (Beach et al., 2010; Vijayendran et al., 2012); highlighting the importance of the interplay between the genome and the environment in the regulation of *SLC6A4* gene expression.

A large number of studies focuses on heritability and candidate genes involved in ADHD. However, dysfunctions usually involve several molecular pathways that may result from variants in many genes, each of them contributing with only weak effects to the phenotype (Gaiteri et al., 2014). Analyzing the effect of genes co-expressed with a gene of interest allows the integration of information on gene networks and the functional relationships between these genes (Silveira et al., 2017; Miguel et al., 2019). Multivariate approaches like parallel ICA (p-ICA) are used to identify relationships between clusters of functionally related SNPs that are statistically correlated and phenotype components, such as brain structure (Pearlson et al., 2015; Khadka et al., 2016). Studies have been using p-ICA to correlate biological pathways with variations in gray matter density, which represents an important tool to identify an anatomical-functional basis for a behavioral phenotype (Khadka et al., 2016; Miguel et al., 2019). Additionally, stressors in early life are known to alter the expression of genes and cellular processes that influence behavior, and one of the molecular processes that contributes to this change is DNA methylation (Vinkers et al., 2015; Hing et al., 2018). However, the mechanisms linking these associations need to be further investigated.

Based on this evidence, we hypothesized that early life adversity would interact with individual differences in genetic variation within the *SLC6A4* gene network to predict attention-related problems in childhood. We constructed an expression-based polygenic risk score (ePRS) that reflects the function of the amygdala 5-HTT gene network, and described how this polygenic predictor interacted with postnatal adversity to predict attention/hyperactivity and brain gray matter density. We also investigated the association between postnatal adversity and the ePRS of the 5-HTT gene network on variations in DNA methylation across the genome.

## METHODS AND MATERIALS

### Participants

We used data from two prospective birth cohorts based in Canada (Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment—MAVAN) and in Singapore (Growing Up in Singapore Toward Healthy Outcomes—GUSTO), to analyze the gene network by environment interaction effects on behavioral outcomes.

The study sample MAVAN is a birth cohort that followed up children from birth up to 6 years of age in Montreal (Quebec), and Hamilton (Ontario), Canada (O'Donnell et al., 2014). Mothers aged 18 years or above, with singleton pregnancies, and fluent in French or English were included in the study.

Severe maternal chronic illness, placenta previa, and history of incompetent cervix, impending delivery, or a fetus/infant affected by a major anomaly or gestational age <37 weeks were the exclusion criteria. Approval for the MAVAN project was obtained by the ethics committees and university affiliates (McGill University and Université de Montréal, the Royal Victoria Hospital, Jewish General Hospital, Centre hospitalier de l'Université de Montréal and Hôpital Maisonneuve-Rosemount) and St. Joseph's Hospital and McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada. Informed consent was obtained from all participants. In GUSTO, the replication cohort, pregnant women aged 18 years and above were recruited at the National University Hospital (NUH) and KK Women's and Children's Hospital (KKH), being of Chinese, Malay or Indian ethnicity with homogeneous parental ethnic background. Mothers receiving chemotherapy, psychotropic drugs or who had type I diabetes mellitus were excluded. Informed written consent was obtained from each participant (Soh et al., 2014).

## Genotyping

Genome-wide platforms (PsychArray/PsychChip, Illumina) were used to genotype 242,211 autosomal SNPs of buccal epithelial cells of children in MAVAN, according to manufacturer's guidelines. SNPs with a low call rate (<95%), low *p*-values on Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) exact test ( $p < 1e-40$ ), and minor allele frequency (MAF < 5%) were removed. Afterwards, imputation using the Sanger Imputation Service was performed and SNPs with an info score >0.80 were retained for the analysis, resulting in 20,790,893 SNPs (McCarthy et al., 2017).

In GUSTO, genotyping was performed using Infinium OmniExpressExome array and split by ethnicity for quality checks. Non-autosomal SNPs, SNPs with call rates <95%, minor allele frequencies <5%, and failed Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value of 10<sup>-6</sup> were removed. Variants discordant with their respective subpopulation in the 1,000 G reference panel were removed (Chinese: EAS with a threshold of 0.20; Malays: EAS with a threshold of 0.30; Indian: SAS with a threshold of 0.20). Samples with call rate <99%, cryptic relatedness and sex/ethnic discrepancies were excluded. The resulting data were pre-phased using SHAPEIT v2.837 with family trio information. We then used Sanger Imputation Service for imputation, choosing 1,000 G Phase 3 as reference panel and imputed "with PBWT, no pre-phasing" as the pipeline. Imputed data that were non-monomorphic, had biallelic SNPs and an INFO score >0.80 were retained. Imputed genotyping data that were common in all three ethnicities (5,771,259 SNPs) were used for further analyses.

The population structure of the MAVAN and GUSTO cohorts were evaluated using principal component analysis of all autosomal SNPs that passed the quality control without low allele frequency (MAF > 5%) and not in high linkage disequilibrium ( $r^2 > 0.2$ ) across 500 kb regions (Price et al., 2006; Wray et al., 2014). Based on the inspection of the scree plot, the first three principal components were the most informative of population structure in both cohorts and were included in all subsequent analyses.

## DNA Methylation Analyses

DNA methylation analyses were done in buccal epithelial cells (Catch-All Swabs, Epicenter, USA) in MAVAN children at a

mean age of 6.99 years. Details of DNA extraction, preprocessing and quality control procedures were described in Garg et al. (2018). Briefly, genomic DNA (750 ng) was bisulfite converted using the EZ-DNA Methylation Kit (Zymo Research, USA) and hybridized on Infinium HumanMethylation450 beadchip array (450 K, Illumina). Data was processed in R using the Minfi package (Aryee et al., 2014). Samples that failed standard Minfi quality control procedure were removed. All remaining samples had a high call rate (>95%). Probes with a low call rate (<75%), a high detection *p*-value ( $p > 0.05$ ) and a low number of beads (<3 in >5% of the cohort) were also removed. We also used ComBat (Johnson et al., 2007) to iteratively adjust our data for unwanted technical variation associated with experimental batch, array row (sentrix row), and plate position (sample column). We also predicted buccal epithelial cell content of each sample (Smith et al., 2015) and included the proportion of buccal cells per sample as a covariate in all models describing variation in DNA methylation levels. A full explanation of the DNA methylation analyses is provided in Garg et al. (2018).

## 5-HTT Co-expressed Genes and ePRS

The expression-based polygenic risk score was created considering genes co-expressed with the serotonin transporter gene (5-HTT-ePRS) in amygdala, according to the protocol previously described by Silveira et al. (2017) and Miguel et al. (2019). The genetic score from the 5-HTT gene network was created using: GeneNetwork (<http://genenetwork.org>), BrainSpan (<http://www.brainspan.org>), NCBI Variation Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view>), and The Genotype-Tissue Expression (GTEx) (<https://gtexportal.org/home/>) (Lonsdale et al., 2013). GeneNetwork was used to generate a list of genes coexpressed with 5-HTT in the amygdala in mice (Mulligan et al., 2016). Only genes with absolute value of co-expression correlation higher or equal to 0.5 were retained. The gene list generated by GeneNetwork was then filtered using BrainSpan to identify consensus transcripts enriched in the fetal and childhood human brain (Miller et al., 2014). Since we were interested in genes that were active during early developmental periods, we selected autosomal transcripts expressed in the amygdala at least 1.5-fold more during fetal and child development (all fetal samples and up to the first 5 years of age) as compared to adult samples. Based on their functional annotation in the National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (NCBI Variation Viewer), using GRCh37.p13, we gathered all the SNPs from these genes and merged this list with the SNPs from the GTEx data in human amygdala to form a list of common SNPs. The list of common SNPs was then subjected to linkage disequilibrium clumping ( $r^2 < 0.25$ ), which resulted in 463 SNPs. In ePRS calculation, alleles at a given cis-SNP were weighed by the estimated effect of the genotype on gene expression (expression quantitative trait loci from GTEx, in which the effect allele is the alternative allele). Final ePRS was obtained by summation over all SNPs accounting for the sign of correlation coefficient between the genes and 5HTT gene expression. For more information on ePRS calculation, see Hari Dass et al. (2019). The summation of these values from the total number of SNPs provides the amygdala 5-HTT-ePRS score (Table 1 shows the



**TABLE 1** | Genes selected for composing the genetic score (5-HTT-ePRS).

Gene	Ensembl	Description
ADAMTS7	ENSG00000136378	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7
ATAD2B	ENSG00000119778	Atpase family, AAA domain containing 2B
AURKA	ENSG00000087586	Aurora kinase A
CHD7	ENSG00000171316	Chromodomain helicase DNA binding protein 7
CHRNB4	ENSG00000117971	Cholinergic receptor, nicotinic, beta 4
CNGA3	ENSG00000144191	Cyclic nucleotide gated channel alpha 3
COL3A1	ENSG00000168542	Collagen, type III, alpha 1
DLL3	ENSG00000090932	Delta-like 3 (Drosophila)
DNMT3B	ENSG00000088305	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
EHMT2	ENSG00000204371	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2
EIF4EBP1	ENSG00000187840	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
ELN	ENSG00000049540	Elastin
GAS5	ENSG00000234741	Growth arrest-specific 5 (non-protein coding)
GTSE1	ENSG00000075218	G-2 and S-phase expressed 1
HMGB1	ENSG00000189403	High mobility group box 1
HNRNPA1	ENSG00000135486	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
LRRC26	ENSG00000184709	Leucine rich repeat containing 26
NBEAL1	ENSG00000144426	Neurobeachin-like 1
NHLH1	ENSG00000171786	Nescient helix loop helix 1
PKN1	ENSG00000123143	Protein kinase N1
PRKDC	ENSG00000253729	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
PTK7	ENSG00000112655	PTK7 protein tyrosine kinase 7
RAD54L	ENSG00000085999	RAD54-like ( <i>S. cerevisiae</i> )
RBM12B	ENSG00000183808	RNA binding motif protein 12B
RBM4	ENSG00000173933	RNA binding motif protein 4
RPL27A	ENSG00000166441	Ribosomal protein I27a
RPL36	ENSG00000130255	Ribosomal protein L36
SCLT1	ENSG00000151466	Sodium channel and clathrin linker 1
SFRP1	ENSG00000104332	Secreted frizzled-related protein 1
TEAD2	ENSG00000074219	TEA domain family member 2
TRIM58	ENSG00000162722	Tripartite motif containing 58
TSKU	ENSG00000182704	Tsukushi small leucine rich proteoglycan homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
USP49	ENSG00000164663	Ubiquitin specific peptidase 49
WDR62	ENSG00000075702	WD repeat domain 62
ZCCHC7	ENSG00000147905	Zinc finger, CCHC domain containing 7

final gene list). **Figure 1** illustrates the steps involved in the creation of the ePRS.

## Postnatal Adversity Score

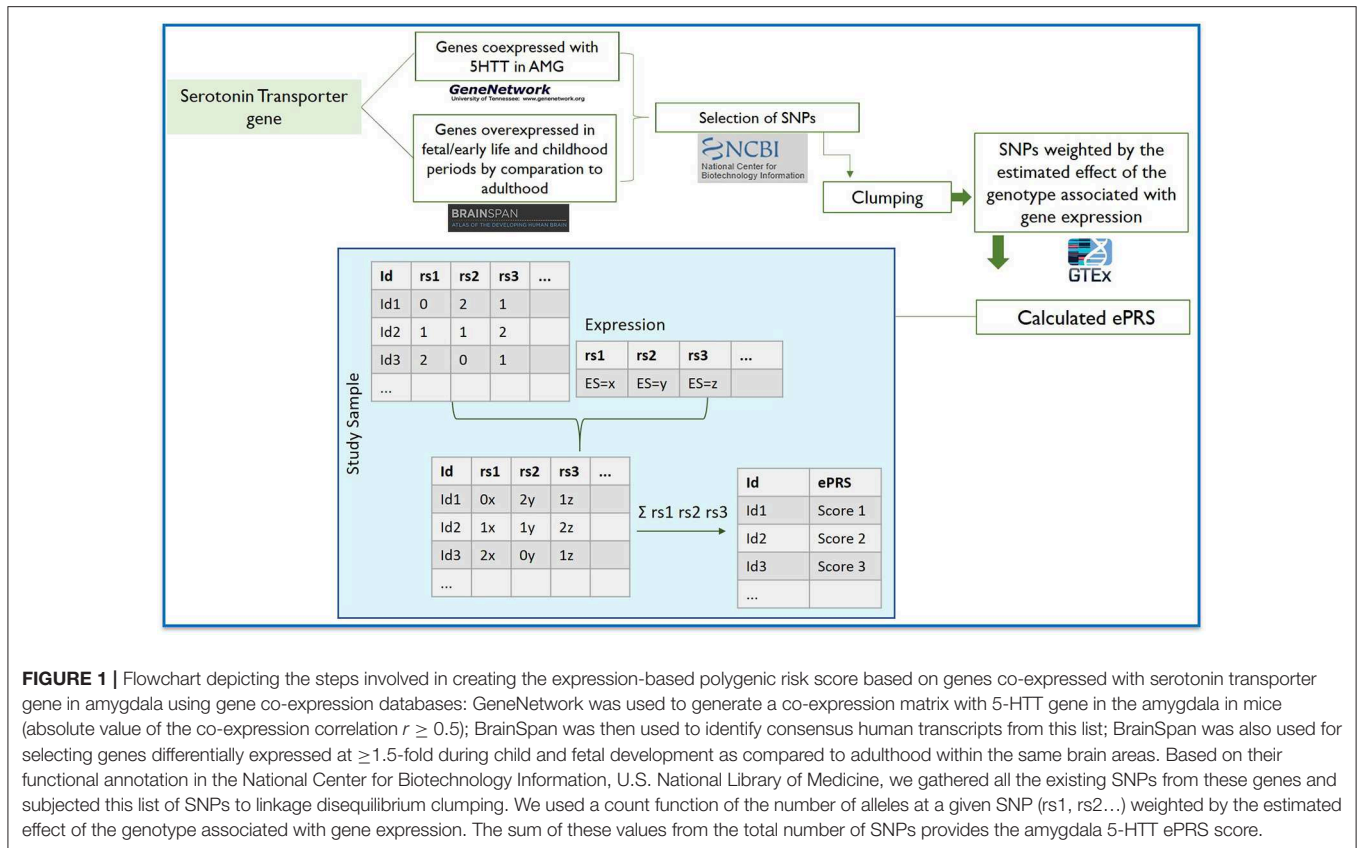
The postnatal adversity score was created combining multiple indicators of adversity. The instruments included as indicators of postnatal adversity were the following: (1) *The Health and well-being questionnaire*: short versions of multiple measures (Kramer et al., 2001): (a) Presence of chronic disease during pregnancy or severe acute conditions; (b) A subscale from

the Daily Hassles was used to measure how often, and to what degree, the woman had lacked money for basic needs since the beginning of pregnancy (Kanner et al., 1981); (c) The Marital Strain Scale of Pearlin and Schooler was used to assess chronic stress with the romantic partner (Pearlin and Schooler, 1978); (d) The Abuse Assessment Screen was used to assess conjugal violence (Newberger et al., 1992; Parker et al., 1993); (e) Questions about anxiety during pregnancy (Lobel et al., 1992; Parker et al., 1993). (2) *Smoking during pregnancy*: composed of yes or no questions. (3) *Household gross income* (Daveluy et al., 1998). (4) *Depression questionnaire* (Centre of Epidemiological Studies) (CES-D): a 20 Likert-Scale item instrument applied to assess the symptoms of depression (Radolf, 1977). (5) *Child Health Questionnaire*: Includes questions on acute, chronic conditions, and hospitalizations (Plante et al., 2002). (6) *Maternal mental health*: Beck Depression Inventory, a 21-question self-report questionnaire (Beck et al., 1961); Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS), a 10-item self-report scale designed to screen for postpartum depression (Cox et al., 1987); State-Trait Anxiety Inventory (STAI), a self-report instrument consisted of two forms of 20 items each to measure psychic components of state and trait anxiety (Spielberger, 2010). (7) *Attachment*: The Preschool Separation—Reunion Procedure (PSRP) was applied at 36 months and used to measure attachment security in preschool-aged children. The task consists of a baseline interaction, followed by two separation and reunion episodes lasting 5 min; scoring was based on video coding (reliability  $k = 0.83$ ). Four categories were assessed: secure, ambivalent, avoidant and disorganized (Cassidy and Marvin, 1992). (8) *Family Assessment Device*: 60-item self-report instrument developed to assess the six dimensions of the family functioning outlined in the McMaster Model of Family Functioning (Moss et al., 2004). A general functioning scale assesses overall health-pathology (Kabacoff et al., 1990). In GUSTO the indicators of adversity were similar, except that there was no information on attachment styles in this cohort. For each continuous variable we applied 15th or 85th percentile cut-off to categorize subjects in exposed or not to that event. The total score represents the summation of all points. The earliest postnatal time point available for each variable was used for the calculation of the adversity score.

## Behavioral Outcome: Child Behavior Checklist

The Child Behavior Checklist (CBCL) questionnaire which includes 100 items was used to evaluate emotional, behavioral, and social difficulties in preschool children. The focus of this study was in scales related with attention and hyperactivity problems, so we chose ADHD Problems, Attention Problems and Externalizing Problem scales for this work. An externalizing scale is computed by summing scores on items related to attention problems and aggressive behaviors (Achenbach, 2011).

A total of 137 children from the MAVAN cohort and 401 from the GUSTO cohort had complete data (genotype, information on early life environment, and CBCL scores) and were included in the study.



## Gray Matter Density

Structural MRI of the whole brain was acquired using a 3T trio Siemens scanner available at Cerebral Imaging Center, Douglas Research Centre (Montreal, Canada) (1 mm isotropic 3D MPRAGE, sagittal acquisition,  $256 \times 256$  mm grid, TR = 2,300 ms, TE = 4 ms, FA =  $9^\circ$ ) and a GE MR750 Discovery 3T MRI scanner at the Imaging Research Centre, St. Joseph's Healthcare (Hamilton, Canada) (3D inversion recovery-prepped, T1-weighted anatomical data set, fSPGR, axial acquisition, TE/TR/flip angle = 3.22/10.308/9,  $512 \times 512$  matrix with 1 mm slice thickness and 24 cm FOV. T1-weighted images were processed by computational Anatomy Toolbox (CAT12) from the Statistical Parametric Mapping software (SPM12). In the preprocessing step, the images were normalized and segmented into gray matter and white matter. After a high-dimensional Diffeomorphic Anatomical Registration Through Exponentiated Lie Algebra (DARTEL) normalization, a smoothing process was applied using 8 mm full width half maximum kernel.

## Enrichment Analysis

The gene network data were retrieved from GeneMANIA (Warde-Farley et al., 2010) (<https://genemania.org>) database and the gene-gene interaction networks were constructed and visualized in the Cytoscape software (Saito et al., 2012). Enrichment analysis was performed using MetaCore™ (Clarivate Analytics). Data for analysis of the co-expression data during development was extracted from BrainSpan (Miller et al., 2014). Epigenes (genes and proteins involved in

epigenetic regulation) within the networks were investigated using the Epifactors Database (<http://epifactors.autosome.ru/>) (Medvedeva et al., 2015). Localization of epigenes on cell classes in the brain were made using cell types enrichment (<https://www.brainrnaseq.org/>) (Zhang et al., 2014). Enrichment analysis for molecular function, biological process, protein class, cell components and pathways were performed in Panther (<http://pantherdb.org/>) (Mi et al., 2019).

## Statistical Analysis

Data was analyzed using R (<https://www.rstudio.com/>) (R Foundation for Statistical Computing, 2018). Significance levels for all measures were set at  $\alpha < 0.05$ . Linear regression analysis was applied to examine the effects of interaction between the polygenic score and the adversity score on the behavioral outcomes (CBCL), adjusting for sex and population stratification. For the analyses with a significant interaction term, simple slope analyses were conducted to describe the differences. Population stratification was composed by models adjusted by principal components (Patterson et al., 2006; Price et al., 2006). For that, population structure was analyzed to identify the presence of a systematic difference in allele frequencies between subpopulations in a population. We added the principal components to adjust for false results due to ancestry differences. We pruned our datasets to common variants (MAF > 0.05) that were not in linkage disequilibrium ( $r^2 < 0.20$ ) with a sliding window (50 kilobases) approach that examined linkage disequilibrium in increments of 5 SNPs using PLINK 1.9 (Price

et al., 2006). Principal component analysis was performed using SMARTPCA on this pruned dataset and generated a scree plot (see Hari Dass et al., 2019, for scree plot for the MAVAN cohort). Based on the inspection of the scree plot, the first three principal components were the most informative of population structure in both cohorts and were included in all analyses.

A multivariate approach called parallel independent component analysis (pICA) was applied to identify relationships between two different data modalities focusing on inter-related patterns in a data driven manner (Price et al., 2006). The goal of this method is to discover independent components from these two data modalities, in addition to the relationship between them (Liu and Calhoun, 2014). The pICA is a variant of ICA for multimodality processing that extracts maximally independent components within each data modality separately, while also maximizing the association between modalities using an entropy term based on information theory, thus enhancing the interconnection by maximizing the linkage function in a joint estimation process (Liu and Calhoun, 2014; Pearlson et al., 2015).

Using this approach we sought to find the relationship between the SNP-based ePRS-5-HTT (or genotype x GTEX gene expression slope at each SNP comprised by the ePRS-5-HTT) and the voxel-based gray matter in the whole brain, instead of investigating the relationship between the crude genotype and the gray matter-voxel-based measures. The groups for comparison (25 children with high adversity score and 24 children with low adversity score) were defined by the

postnatal environment aggregated with population stratification (ethnicity) for adjustment. The number of independent components estimated using minimum description length criteria (Calhoun et al., 2001) was 17 for genetic data and 8 for MRI data. Loading coefficients, which describe the presence of the identified component across participants (Liu et al., 2012) were extracted for each component, modality, and participant. The mean participant-specific loading coefficients of these components between children from high and low-adversity-score groups was compared using Student's *t*-test.

Further we explored if variation in the levels of DNA methylation was predicted by postnatal adversity score, ePRS-5-HTT, or their interaction. We used the following models of linear regression analyses to test these associations:

1. CpG  $\sim$  sex + PC1 + PC2 + PC3 + A postnatal
2. CpG  $\sim$  sex + PC1 + PC2 + PC3 + ePRS
3. CpG  $\sim$  sex + PC1 + PC2 + PC3 + A\_ postnatal \* ePRS

CpG represents methylation levels at a single variably methylated probe; sex is the biological sex of participant; PC(1, 2, or 3) represents the population stratification principal components from the genetic data, and A\_ postnatal represents the postnatal adversity score.

For each variably methylated CpG we compared the Akaike information criterion (AIC) across the three models to identify the model that best explained variation in DNA methylation at a given CpG. We utilized AIC since it permits the comparison of non-nested models.

**TABLE 2 |** Description of the baseline characteristics of the MAVAN and GUSTO samples according to high and low amygdala ePRS-5-HTT.

Sample description	Total (n = 145)	Low 5-HTT (n = 69)	High 5-HTT (n = 76)	p-value
<b>MAVAN</b>				
Sex—male	49.7% (72)	53.6% (37)	46.1% (35)	0.36
Maternal age at birth (years)	30.60 (4.62)	30.20 (4.58)	30.95 (4.65)	0.33
Gestational age (weeks)	39.18 (1.21)	39.25 (1.25)	39.12 (1.17)	0.52
Birth weight (grams)	3,308 (452)	3,380 (477)	3,242 (420)	0.06
Breastfeeding (months)	7.53 (4.80)	7.54 (4.61)	7.52 (4.99)	0.98
Smoking during pregnancy	12.4% (18)	10.1% (7)	14.5% (11)	0.43
Maternal education—University degree or above	57.9% (84)	62.3% (43)	53.9% (41)	0.30
Low family income	15.2% (20)	15.4% (10)	14.9% (10)	0.94
<b>GUSTO</b>				
Sex - male	51.9% (208)	50.3% (99)	53.4% (109)	0.52
Maternal age at birth (years)	31.21 (5.12)	31.33 (5.27)	31.1 (4.98)	0.65
Gestational age (weeks)	38.48 (1.27)	38.43 (1.36)	38.53 (1.18)	0.39
Birth weight (grams)	3,139 (425)	3,119 (420)	3,158 (430)	0.36
Breastfeeding for at least 3 months	61.0% (241)	66.1% (127)	56.2% (114)	0.042*
Smoking during pregnancy	2.0% (8)	1.0% (2)	2.9% (6)	0.16
Maternal education—University degree or above	35.4% (142)	39.1% (77)	31.9% (65)	0.13
Household income <SG\$2,000	13.5% (54)	11.2% (22)	15.7% (32)	0.18

Numbers are presented as mean (SD) or percentage (number of participants).

\*Significant differences between low and high ePRS groups ( $p < 0.05$ ).



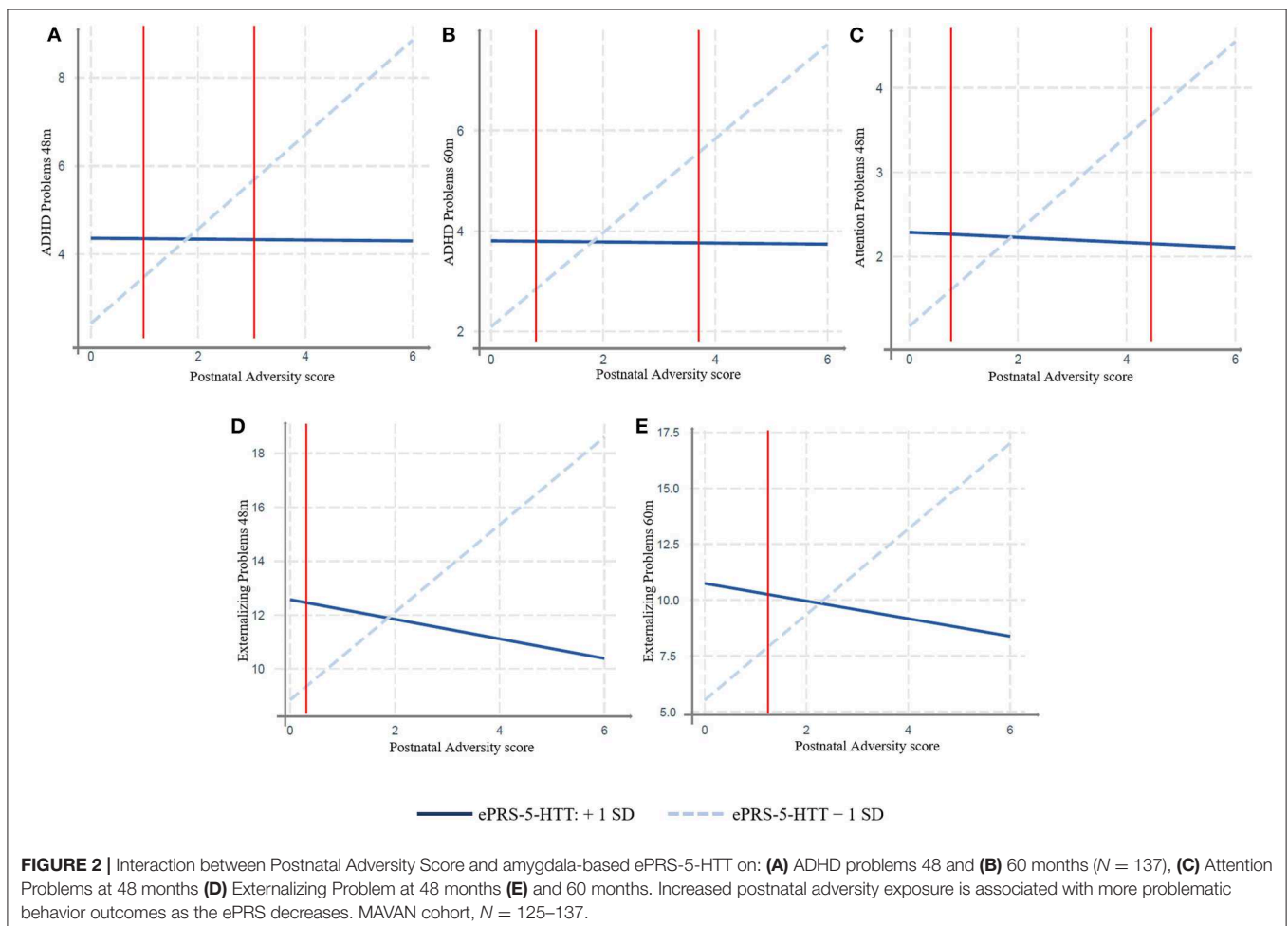
## RESULTS

Baseline comparisons between low and high ePRS groups (median split) were done in the two cohorts. Differences in means on the main confounding variables were tested using Student's *t*-test for independent samples and Chi-square Test was applied for categorical variables. No differences were found in relation to the main confounding variables in MAVAN (**Table 2**). In GUSTO (**Table 2**), we observed a higher prevalence of breastfeeding for at least 3 months in the low ePRS group (66%) vs. high ePRS group (56%). To confirm our results we adjusted the interaction by breastfeeding in GUSTO. The same results were observed.

### Interaction Between ePRS-5-HTT in the Amygdala and Postnatal Adversity Score Moderates the Behavior in Children

In MAVAN children, we found a significant effect of interaction between the adversity score and the amygdala-based ePRS-5-HTT on domains of the CBCL related to attentional problems and hyperactivity: ADHD Problems at 48 months ( $\beta = -71.19, p = 0.0009$ ) and 60 months ( $\beta = -62.32, p = 0.006$ ); Attention Problems at 48 months ( $\beta = -39.07, p = 0.010$ ) and a trend at 60 months ( $\beta = -27.81, p = 0.07$ ); and Externalizing Problem at 48 months ( $\beta = -131.06, p = 0.03$ ) and 60 months ( $\beta = -151.64, p = 0.01$ ). Simple slope analysis showed that increased postnatal adversity exposure is associated with more ADHD problems (48 months:  $\beta = 0.93, p = 0.0001$ ; 60 months:  $\beta = 1.07, p < 0.0001$ ), attentional problems ( $\beta = 0.56, p = 0.0004$ ); externalizing problems (48 months:  $\beta = 1.62, p = 0.01$ ; 60 months:  $\beta = 1.91, p = 0.002$ ), as the ePRS-5-HTT score decreases (**Figure 2**). After correction for multiple testing using Bonferroni-Holm method, ADHD Problems at 48 and 60 months were still significant.

We replicated our findings in a different population. More specifically, we analyzed whether the interaction between the adversity score and the amygdala-based ePRS-5-HTT would predict attention problems in children in the GUSTO cohort, and similar results were found. We observed significant effect of interactions between adversity score and the amygdala-based ePRS-5-HTT on CBCL scales: ADHD problems at 4 years ( $\beta = -32.79, p = 0.02$ ) and attention problems at 4 years ( $\beta = -31.77, p = 0.0014$ ) and externalizing problems at 4 years ( $\beta = -87.06, p = 0.031$ ; **Table 3**). A simple slope analysis showed



**TABLE 3 |** Results of interactions between the adversity score and the amygdala-based ePRS-5-HTT on CBCL behavior of children in MAVAN and GUSTO cohorts; and evidence of differential susceptibility.

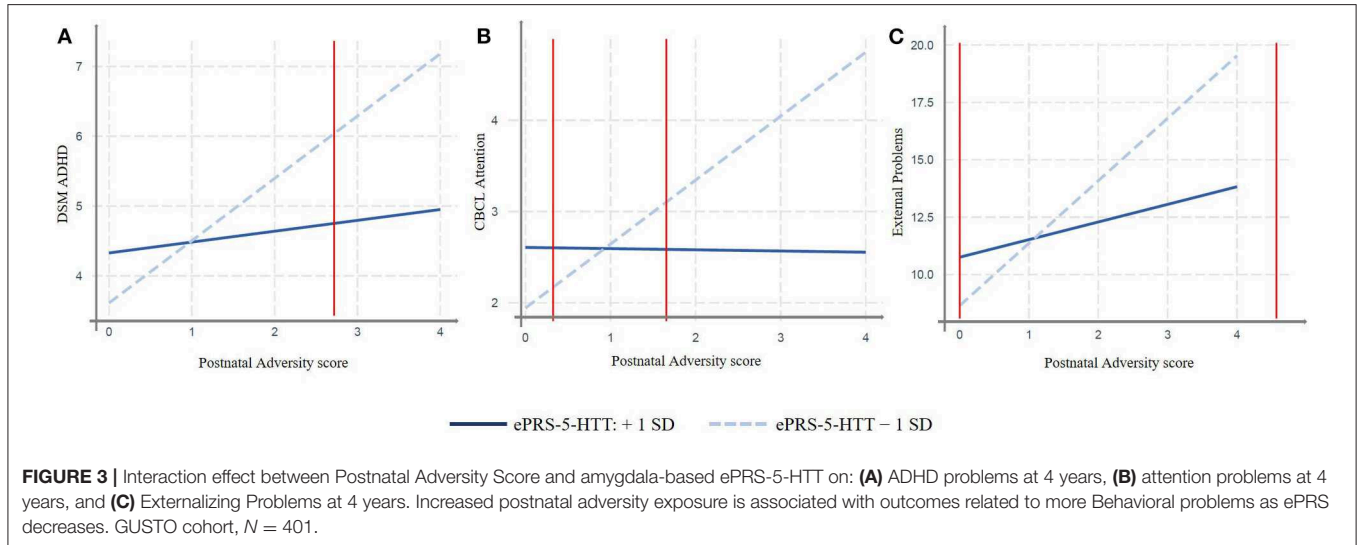
Interactions between the adversity score and the amygdala-based ePRS-5-HTT				
MAVAN		GUSTO		
Outcome	Adversity x ePRS	Outcome	Adversity x ePRS	
Attention problems 48 m	$\beta = -39.07, p = 0.010^*$	Attention Problems 48m	$\beta = -31.77, p = 0.0014^*$	
ADHD problems 48 m	$\beta = -71.19, p = 0.0009^*$	ADHD Problems 48m	$\beta = -32.79, p = 0.02^*$	
Externalizing problems 48 m	$\beta = -131.06, p = 0.03^*$	Externalizing Problems 48m	$\beta = -87.06, p = 0.03^*$	
Attention problems 60 m	$\beta = -27.81, p = 0.07$			
ADHD problems 60 m	$\beta = -62.32, p = 0.006^*$			
Externalizing problems 60 m	$\beta = -151.64, p = 0.01^*$			

Evidence of differential susceptibility				
Outcome	Cohort	PoI	PA	Differential susceptibility
Attention problems 48 m	MAVAN	0.17	0.60	Yes
ADHD problems 48 m	MAVAN	0.15	0.60	Yes
ADHD problems 60 m	MAVAN	0.15	0.61	Yes
Externalizing problems 48 m	MAVAN	0.17	0.60	No
Externalizing problems 60 m	MAVAN	0.27	0.80	No
Attention problems 48 m	GUSTO	0.85	0.43	Yes
ADHD problems 48 m	GUSTO	0.09	0.43	No
Externalization problems 48 m	GUSTO	0.12	0.78	Yes

PoI and PA values close to 0.50 suggest strong evidence for differential susceptibility.

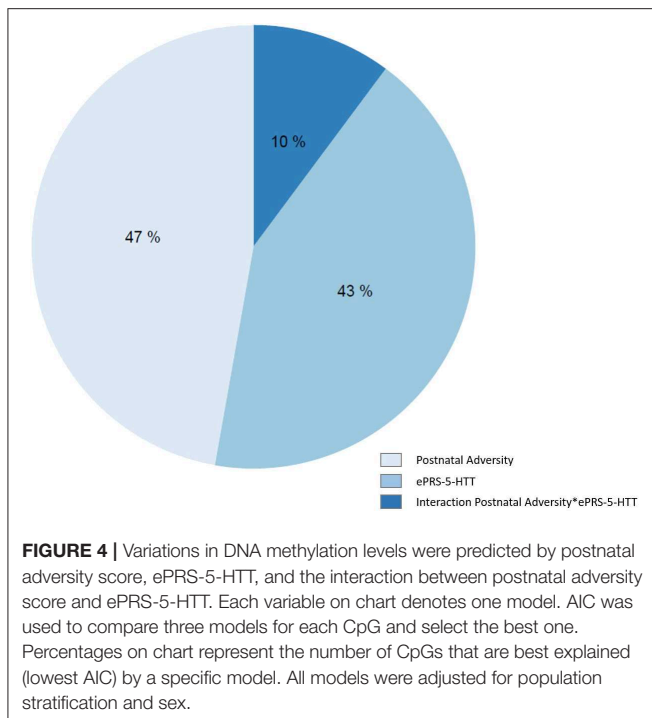
\*Significant interactions between the adversity score and the amygdala-based ePRS-5-HTT ( $p < 0.05$ ).



that increased postnatal adversity exposure is associated with more ADHD problems ( $\beta = 0.89, p < 0.0001$ ), as well as with higher attentional ( $\beta = 0.70, p < 0.0001$ ), and externalizing problems ( $\beta = 2.72, p < 0.0001$ ) as the ePRS-5-HTT score decreases (Figure 3). After correction for multiple testing, all the associations remained significant.

We also analyzed whether these interactions were consistent with the differential susceptibility model (Roisman et al., 2012). We verified if regions of significance were inside the possible

range of value for the environmental score, calculated proportion of interaction (PoI) and proportion affected (PA). Table 3 shows these results in MAVAN and GUSTO cohorts. In every case we find some evidence (PoI and PA values close to 0.50 suggest strong evidence for differential susceptibility) for differential susceptibility. All three criteria showed that interactions were consistent with differential susceptibility. These results suggest that the same genetic background associated with the 5-HTT gene network is affected by the exposure to adversity but also



more protected in supportive environments with regards to ADHD and Attention Problems outcomes. Pol and PA are consistent with differential susceptibility in MAVAN and GUSTO cohort (see **Table 3**).

These results suggest a presence of a strong genome x environment interaction effect on behavior outcomes in children. Exposure to postnatal adversity and decreased ePRS-5-HTT are associated with negative outcomes in CBLC at different ages in different cohorts. This suggests that the amygdala 5-HTT ePRS is a strong predictor of attention-related processes in the context of variation in the environmental quality in line with the differential susceptibility paradigm.

### Postnatal Adversity, ePRS-5-HTT, and Their Interaction Contribute to DNA Methylation Variations

We identified a total of 54,295 variably methylated probes cross the genome. For each probe we compared AIC across three models to explore the prediction of the DNA methylation by postnatal adversity, ePRS or their interaction. We observed that postnatal adversity explained DNA methylation levels better than other predictors for 47% of all variably methylated sites. The ePRS-5-HTT main effect was a better predictor for 43% of the variably methylated sites and the interaction between the two factors—for 10% of CpGs (**Figure 4**).

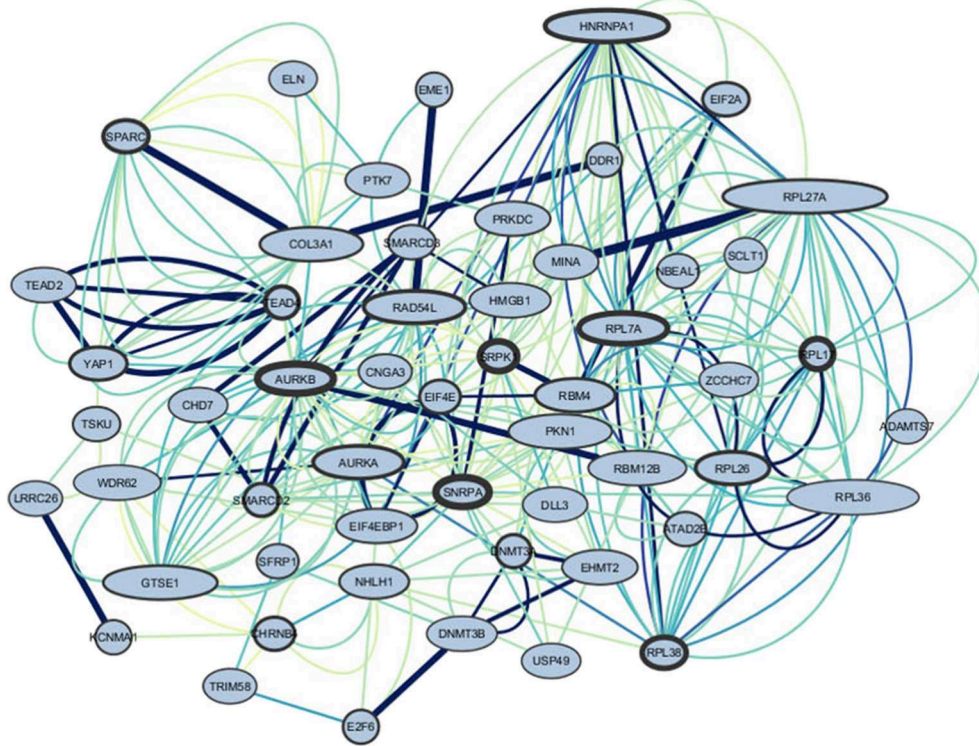
### Enrichment Analysis of the 5-HTT Co-expression Networks

We performed enrichment analysis on the genes selected for composing the genetic score (complete list of genes on

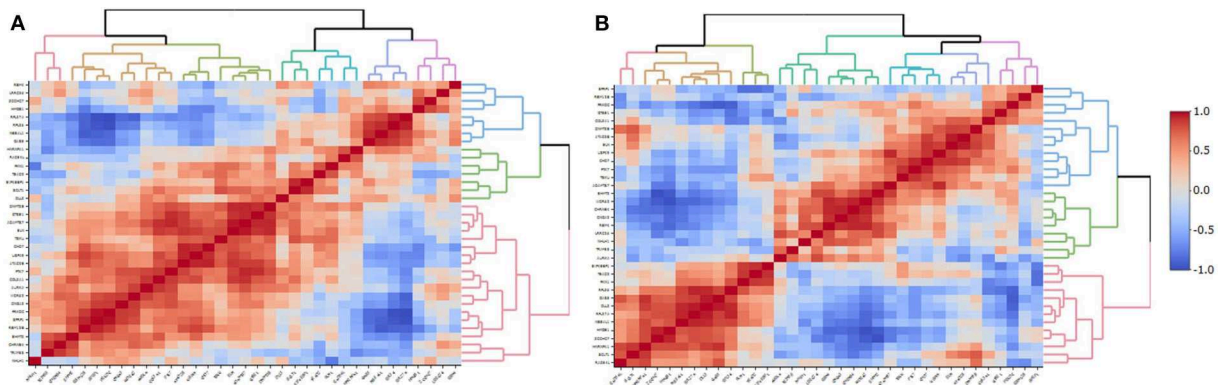
**Table 1**). The relationship between genes was performed using GeneMANIA, and the interaction networks were constructed in the Cytoscape software. **Figure 5** shows the gene interactions. Using Cytoscape, we calculated the degrees and betweenness of the 5-HTT network. Nodes above the threshold (mean + 1 SD) were considered central nodes (high betweenness indicated bottlenecks and high degrees indicated hubs) (Neves de Oliveira et al., 2018). The two most important hubs and bottlenecks of this list included: HNRNPA1 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1), a protein coding gene, member of a family of ubiquitously expressed heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, which are RNA-binding proteins that associate with pre-mRNAs in the nucleus and influence pre-mRNA processing, as well as other aspects of mRNA metabolism and transport; and PRKDC, a protein kinase, which encodes the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. AURKA (Aurora kinase) is the most important hub gene of the gene network co-expressed with 5-HTT in amygdala. The protein encoded by this gene is a cell cycle-regulated protein kinase that appears to be involved in microtubule formation and/or stabilization at the spindle pole during chromosome segregation. The most important bottleneck is RAD54L. The protein encoded by this gene is involved in homologous recombination and repair of DNA (Stelzer et al., 2016).

BrainSpan data was used to correlate the expression levels of the genes included in the ePRS-5-HTT in the amygdala in two periods (a) infancy and early childhood, and (b) adulthood. We observed large clusters of highly co-expressed genes in both periods (**Figure 6**). However, different gene clusters were observed during infancy/early childhood and during adulthood, suggesting that there is a developmental influence on the design of the clusters of co-expression of these genes.

Enrichment analyses performed in Metacore<sup>®</sup> shows two important pathways related with DNA damage and epigenetic regulation of gene expression (see all results in **Table 4**). The enrichment analysis for gene ontology shows enrichment processes related to chromosome organization, DNA conformational changes, DNA methylation; and nervous system development (such as generation of neurons and developmental process). Interestingly, of the 35 genes on the list of genes co-expressed with 5-HTT in the amygdala, 10 are classified as epifactors and are involved in histone phosphorylation and methylation, chromatin remodeling and DNA methylation (**Figure 7**). We also analyzed the cell classes in the brain where these epifactors are more expressed, and most of them are localized in astrocytes, neurons, and oligodendrocyte precursor cells (**Figure 7**). Enrichment analyses performed in Panther shows molecular functions related with transporter activity and binding, biological process related with developmental processes, cellular processes, and metabolic processes. At same time, proteins classes were enriched for transporter, nucleic acid binding, and transferases. Finally, this gene network was enriched in pathways related to muscarinic acetylcholine and nicotine receptors signaling pathways (**Figure 8**).



**FIGURE 5** | Genes interactions of the amygdala 5-HTT co-expression network. The border of the genes represents the out-degree of these nodes, meaning the number of outgoing relationships. The larger the border, the stronger the relationship of the gene to other genes. The size of the nodes represents the in-degree, i.e., the number of incoming relationships with neighbors. The bigger the node, the higher the relationships of other genes to the target gene. The edges represent co-expression. Color and thickness were used to identify the most co-expressed genes, darker, and thicker represent higher co-expression.



**FIGURE 6** | Co-expression of the genes included in the ePRS-5-HTT in the amygdala in the **(A)** infancy and early childhood, and **(B)** adulthood periods in humans. Each vertical line represents correlation with a unique gene. Genes from the same expression quantification tend to cluster together and could be visualized in red (positive correlation), or blue (negative correlation) patterns. Infancy and early childhood period ranges from 0 to 4 years of age ( $N = 7$ ); Adulthood ranges from 20 to 40 years ( $N = 6$ ). Data for this analysis was extracted from BrainSpan.

## SNP-Based ePRS-5-HTT and the Voxel-Based Gray Matter Density

In order to perform an anatomical-functional correlation of our findings, we analyzed the relationship between brain gray matter density and the SNPs used to create the ePRS-5-HTT in 49 children from MAVAN that had MRI and genotype

data available. The Parallel ICA identified seven significant relationships between regional gray matter volume and SNP-based ePRS. The most significant relationships between regional gray matter density and SNP-based ePRS-5-HTT data was on the genetic component 12 and MRI component 5 ( $r = 0.704$ ,  $p = 1.62e-08$ ). The comparison of mean loading coefficients of these



**TABLE 4 |** Pathway Maps and Gene Ontology Processes related to genes included in the expression-based polygenic risk score of the 5-HTT in the amygdala.

Enrichment by Metacore®		
Maps	p-value	FDR
<b>Pathway Maps</b>		
Apoptosis and survival_nAChR in apoptosis inhibition and cell cycle progression	0.0009	0.046
DNA damage_Mismatch repair	0.001	0.046
Transcription_Role of heterochromatin protein 1 (HP1) family in transcriptional silencing	0.0017	0.046
Transcription_Sin3 and NuRD in transcription regulation	0.0017	0.046
Canonical Notch signaling pathway in colorectal cancer	0.0023	0.046
Signal transduction_Adenosine A2A receptor signaling pathway	0.003	0.046
Translation_Translation regulation by Alpha-1 adrenergic receptors	0.003	0.046
TLRs-mediated IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in SLE	0.003	0.046
Transcription_Epigenetic regulation of gene expression	0.003	0.048
<b>GO Processes</b>		
Chromosome organization	0.00000004	0.00005
DNA geometric change	0.0000001	0.00008
Nervous system development	0.0000001	0.00009
Chromatin organization	0.0000002	0.00010
Generation of neurons	0.0000004	0.00016
Cellular response to stress	0.0000005	0.00016
System development	0.0000005	0.00016
Neurogenesis	0.000001	0.00023
DNA conformation change	0.000002	0.00027
Developmental process	0.000017	0.00109
DNA methylation on cytosine within a CG sequence	0.00004	0.00162
Positive regulation of DNA ligation	0.00004	0.00162

components between children from high- and low adversity score groups by Student's *t*-test indicated no statistically significant differences (Figure 9), suggesting that SNPs on the ePRS-5-HTT list moderate gray matter density in specific brain regions, but this effect is not moderated by the adversity experienced on these parameters.

To define the significant SNPs in each component, we used a threshold of higher than 2.5 and lower than 2.5 ( $Z$ -Threshold  $> \pm 2.5$ ). In component 12, we found 14 significant SNPs, and the enrichment analysis by Metacore® demonstrated that these SNPs are involved especially in regulation of neuronal migration [false discovery rate (FDR) = 0.0082], cerebral cortex development (FDR = 0.02), neurogenesis (FDR = 0.025), regulation of cell migration (FDR = 0.030), and cell development (FDR = 0.04). This group of SNPs were related to gray matter density located mainly in cortical areas, such as superior, middle and inferior frontal gyrus, temporal gyrus, precuneus, and inferior parietal

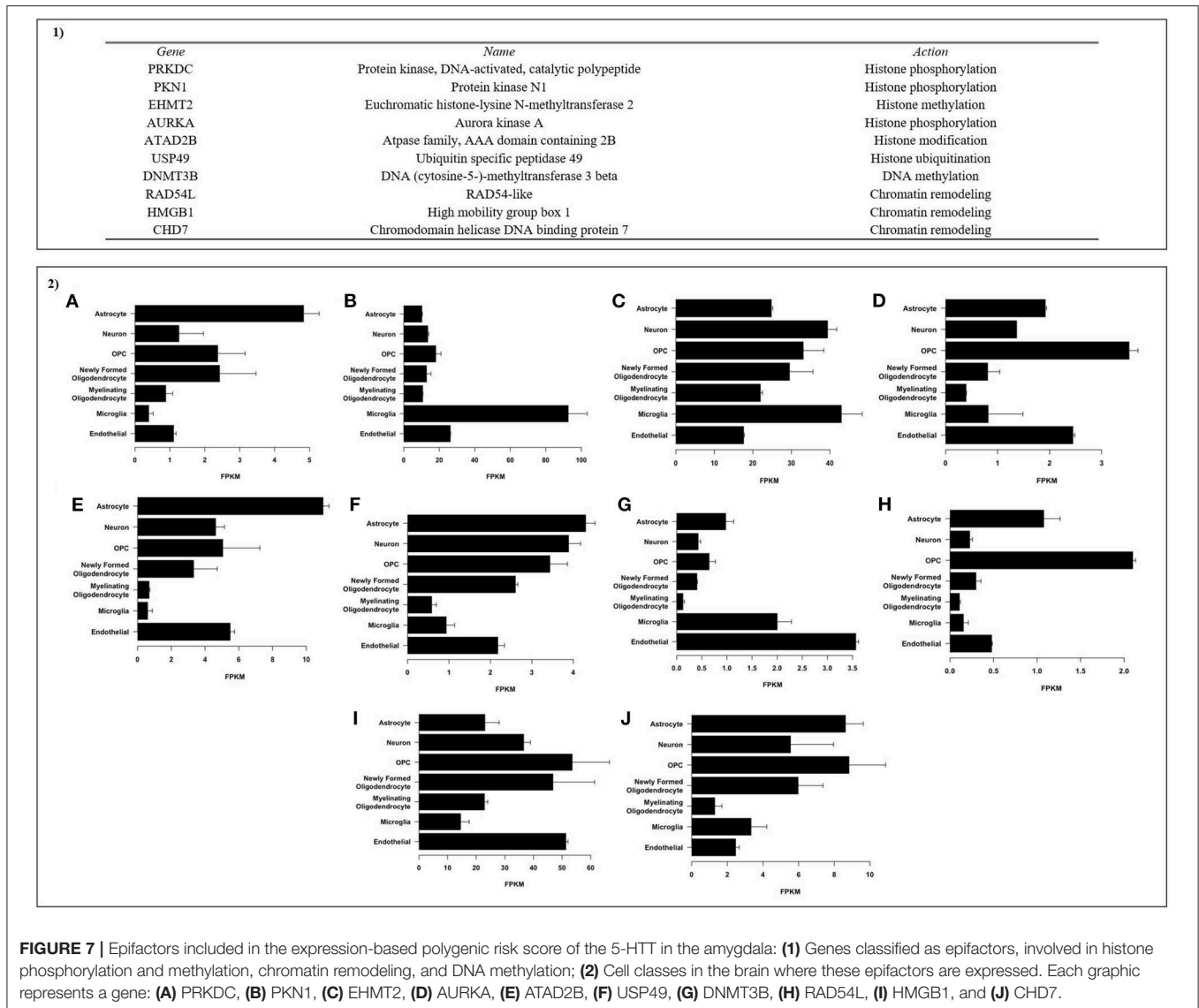
lobule (MRI component 5). All the significant brain regions and SNPs are listed in Tables 5, 6.

## DISCUSSION

The main aim of this study was to analyze whether a genetic score based on genes co-expressed with the serotonin transporter in the amygdala moderates the impact of adversity exposure in early life on behaviors related to attention and hyperactivity, as well as comorbidities associated with this condition. We demonstrated that the expression-based polygenic risk score reflecting the function of an amygdala 5-HTT gene network interacts with postnatal adversity exposure, influencing attention and hyperactivity problems in different cohorts and different ages. We found a correlation between the postnatal adversity score, amygdala ePRS-5-HTT scores and their interaction on variations of DNA methylation across the genome. Additionally, we observed that SNPs used to create the ePRS-5-HTT are positively and negatively correlated with variations in gray matter density. These results together confirm that the gene network co-expressed with 5-HTT is strongly associated with behavioral, brain cortical density, and epigenetic changes in the context of adversity, that strongly correlate with their impact on attentional problems in young children.

The attention deficit hyperactivity disorder is characterized by symptoms of inattention, impulsivity, and hyperactivity. Often, ADHD is associated with emotions and behavior dysfunctions, such as affect dysregulation, irritability, and mood (Matthews et al., 2014). We demonstrated that early life adversity is strongly associated not only with attention and hyperactivity problems, but also with behaviors correlated with ADHD, such as externalizing behaviors and total problems (as measured through the CBCL). Externalizing behavioral problems reflect the child negatively acting on the external environment and consist of disruptive, hyperactive, and aggressive behaviors (Nolan et al., 1996; Liu, 2004). Our finding corroborates the associations between ADHD problems and comorbidities, primarily related to externalizing behavior problems.

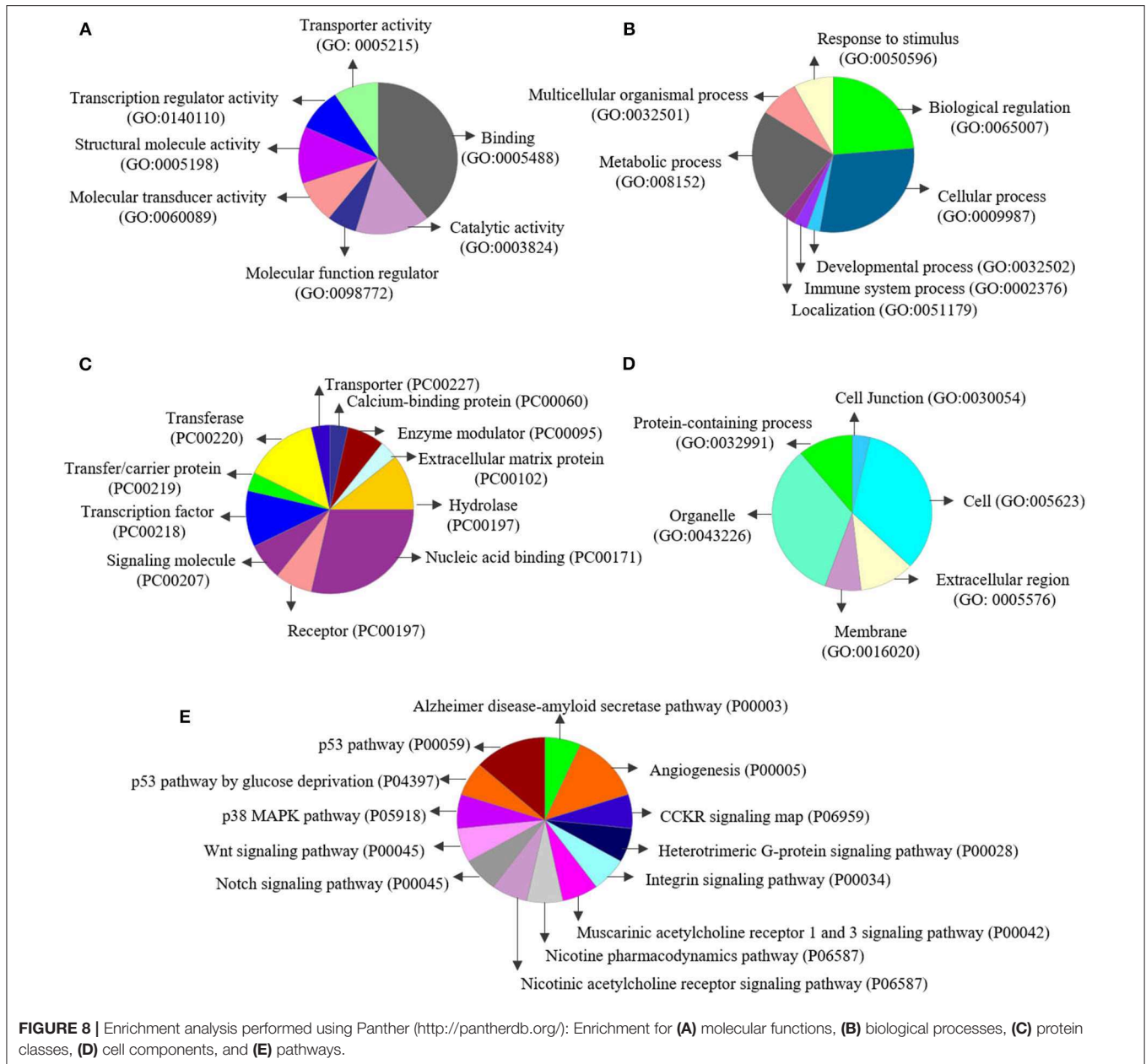
The serotonergic system is associated with several behavioral processes, in domains such as cognition, emotion, reward, and attention (Carlsson, 1987; Greengard, 2001). Variations in the 5-HTT gene have been reported to be associated with impulsivity, hyperactivity, and ADHD (Halperin et al., 1997; Manor et al., 2001; Seeger et al., 2001; Heils et al., 2002). The amygdala is a complex structure rich in serotonergic terminals, and it is involved in several processes related to emotion, mechanisms of vigilance, and attention (Pessoa, 2011). While several studies have focused on the effects of serotonergic function on comorbidities, our approach presents a biologically defined gene network of genes co-expressed with the serotonin transporter in the amygdala. We demonstrated that variation across the 5HTT gene network moderated the effects of postnatal adversity on attention and hyperactivity problems. Furthermore, we observed that the interaction between genetic variation and environment on attention and hyperactivity problems provided support for the differential susceptibility hypothesis. These results suggest



that individuals whose behavior is negatively affected by environmental adversity could be the same individuals to benefit most from an enriched/supportive environment (Belsky et al., 2009). Belsky et al. have suggested that children more sensitive to context might be more affected by developmental factors, being that an exposure to adversity or to more enriched environments in early life (Belsky, 1997). These results provide evidence that the 5-HTT gene network is associated with vulnerability and resilience to environmental variations, which can have implications for both preventive and therapeutic interventions.

Our findings showed that the postnatal adversity score and gene network of 5-HTT in the amygdala predict variation in DNA methylation across the genome. In fact, several studies have demonstrated that trauma in early life affects DNA methylation (Beach et al., 2010; Ouellet-Morin et al., 2013). Infant attachment is also associated with variations in genome-wide DNA methylation (Garg et al., 2018) and the early

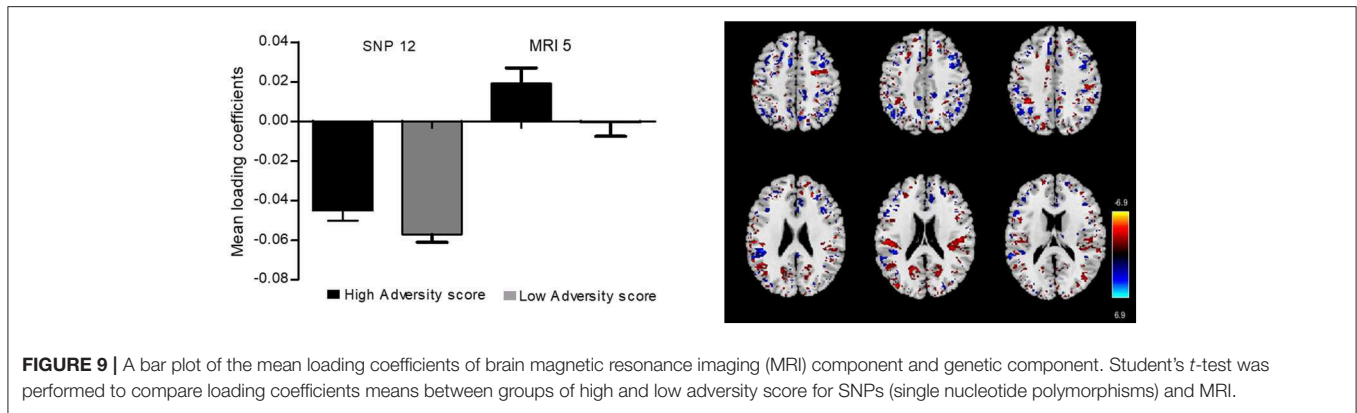
social environment has persisting influence until adult life on the DNA methylation variation across the genome (O'Donnell et al., 2018). The serotonergic system, especially the serotonin transporter, regulates a number of epigenetic modifications (Ismaylova et al., 2018). However, we show that a broader analysis of 5-HTT gene network variation is associated with epigenetic changes. Interestingly, several genes included in the 5-HTT gene network are associated with epigenetic processes. As shown in **Figure 7**, 10 of the 35 genes in the amygdala 5HTT gene network are associated with histone phosphorylation and methylation, chromatin remodeling, and DNA methylation. This explains the strong association between the ePRS and variations of DNA methylation observed in our model. Although the ePRS-5-HTT in the amygdala and postnatal adversity explain most of the variations observed, it is important to emphasize that the interaction between these two factors also predicts variations in DNA methylation across the genome. These results may explain,



at least in part, the mechanism by which adversity exerts its long-term effects, especially in attention hyperactivity problems.

We also analyzed the relationship between the SNPs used to create the ePRS-5-HTT in amygdala and brain gray matter density, in order to obtain anatomical-functional resolution in our findings. We observed an association between these SNPs and gray matter density in cortical areas involved in memory, attention, information processing, and decision-making, such as precuneus, superior and inferior temporal gyrus, frontal gyrus, and inferior parietal lobule, respectively (Shapiro et al., 2002; du Boisgueheneuc et al., 2006; Wallentin et al., 2006; Vickery and Jiang, 2009; Tops and Boksem, 2011). Clinical studies have been demonstrated that smaller volumes of frontal, parietal and

occipital cortices were associated with the higher rates of ADHD (Botellero et al., 2017; Suffren et al., 2017). In fact, ADHD is a disorder associated with cognitive control and reward response. Theories that address ADHD as a disorder of executive control have considered atypical activity or connectivity specifically in prefrontal regions and posterior cortical regions (Miller and Cohen, 2001; Aron et al., 2004; Matthews et al., 2014). At the same time, theories that consider ADHD as a sensory and reward dysfunction have associated this disorder with brain regions involved in motivation, reward and emotional regulation, and with dysregulation of emotional control (Matthews et al., 2014). Even though we analyzed brain gray matter density, not activity or connectivity, it is interesting that the results pointed



**TABLE 5 |** Significant brain regions associated with gray matter density and SNP-based ePRS-5-HTT data on MRI component 5 by Parallel ICA.

**Brain-phenotype component 5**

Area	Brodmann area	L/R volume (cc)	Random effects: Max value (x, y, z)
<b>POSITIVE</b>			
Middle temporal gyrus	19	0.4/0.6	5.1 (−53, −53, −9)/5.2 (62, −28, −10)
Sub-gyral	*	0.4/0.4	5.0 (−34, −40, 38)/6.0 (45, −47, −9)
Precuneus	7, 31	0.4/0.2	5.0 (−22, −61, 38)/4.0 (9, −53, 44)
Middle frontal gyrus	6, 8, 10	0.3/0.6	3.9 (−22, 22, 38)/4.7 (18, −11, 61)
Inferior temporal gyrus	19, 20, 21, 37	0.3/0.4	4.9 (−34, −3, −36)/5.3 (49, −57, −2)
Postcentral gyrus	3, 4	0.3/0.4	4.7 (−50, −19, 20)/4.2 (55, −20, 37)
Fusiform gyrus	19, 20, 37	0.3/0.3	5.5 (−53, −11, −23)/4.3 (48, −49, −13)
Superior frontal gyrus	6, 10	0.3/0.3	4.8 (−24, 51, −5)/4.5 (18, −11, 66)
Cerebellar declive	*	0.3/0.2	4.9 (−37, −71, −22)/5.6 (30, −77, −20)
Lingual gyrus	18	0.3/0.2	4.5 (−12, −77, 0)/4.0 (27, −64, −6)
Superior temporal gyrus	42	0.3/0.1	4.3 (−55, −34, 16)/3.8 (61, −34, 18)
Middle occipital gyrus	*	0.2/0.3	5.4 (−22, −92, 3)/5.2 (42, −70, −7)
Supramarginal gyrus	40	0.2/0.0	3.9 (−45, −50, 25)/−999.0 (0, 0, 0)
Precentral gyrus	6	0.1/0.3	4.1 (−49, 8, 8)/5.1 (33, −19, 48)
Medial frontal gyrus	10, 11	0.1/0.3	3.7 (−7, 39, 30)/4.2 (10, 51, 2)
<b>NEGATIVE</b>			
Middle frontal gyrus	6, 9, 10, 11, 46	0.8/1.2	4.8 (−30, 8, 52)/5.5 (36, 18, 39)
Inferior parietal lobule	39, 40	0.6/0.6	5.5 (−48, −47, 42)/5.4 (31, −53, 45)
Inferior frontal gyrus	9, 44, 45, 47	0.6/0.6	4.9 (−48, 32, 0)/5.0 (46, 4, 30)
Sub-gyral	*	0.5/0.4	5.4 (−31, −51, 38)/4.8 (25, −35, 52)
Superior temporal gyrus	13, 22, 39	0.4/0.2	5.1 (−58, −40, 19)/3.8 (64, −26, 10)
Medial frontal gyrus	6, 10, 11	0.4/0.1	5.2 (−13, 4, 59)/4.1 (16, 62, −4)
Precuneus	7	0.3/0.6	4.3 (−4, −61, 31)/4.2 (13, −48, 55)
Superior frontal gyrus	8, 9, 11	0.3/0.5	4.6 (−34, 46, 16)/5.1 (9, 58, 22)
Precentral gyrus	9, 44	0.3/0.1	6.5 (−48, 19, 9)/4.4 (39, 8, 37)
Postcentral gyrus	2, 3	0.3/0.1	5.0 (−25, −34, 53)/4.6 (27, −31, 55)
Supramarginal gyrus	40	0.2/0.3	4.0 (−50, −48, 33)/4.3 (55, −48, 30)
Middle temporal gyrus	37	0.2/0.2	4.0 (−50, −65, 6)/5.0 (49, −51, 7)
Superior parietal lobule	7	0.2/0.1	3.9 (−40, −56, 48)/4.1 (31, −56, 48)

\*Does not have a close match to a particular brodmann area.

to an association between SNPs of genes co-expressed with 5-HTT in amygdala and gray matter density in cortical regions associated with executive control, suggesting that both theories

may be important for typical behaviors observed in this disorder, and that this gene network could have an important role in this moderations.



**TABLE 6** | Dominant SNPs (Z-Threshold = 2.5) associated with gray matter density on SNP component 12 by Parallel ICA.

Gene	SNP	Z Score
TRIM58	rs61857833	8.86
TRIM58	rs9787332	6.85
TRIM58	rs55634584	6.65
ZCCHC7	rs68046074	5.24
TRIM58	rs34268703	4.87
WDR62	rs117559678	-4.84
TRIM58	rs2101702	-3.42
CNGA3	rs4851129	-3.30
COL3A1	rs3134656	3.03
WDR62	rs139494942	2.77
GTSE1	rs79334853	2.74
TRIM58	rs4925574	2.64
GTSE1	rs3817874	2.53
TRIM58	rs112538341	2.53

These results together point to an association between genes and the environment: the gene network co-expressed with 5-HTT in the amygdala was consistently associated with behavioral outcomes, variations of gray matter density and DNA methylation. In fact, the biological processes enriched for this gene network show a high association with nervous system development and epigenetic pathways. Previous studies have shown that ADHD patients with higher *SLC6A4* promoter methylation status had significantly worse hyperactive-impulsive symptoms, suggesting the potential role of epigenetics pathways in attention problems (Park et al., 2015). Furthermore, epigenes of this gene network were enriched in different cells, such as astrocytes, neurons and precursors of oligodendrocytes, which demonstrates the wide distribution of these factors. Interestingly, this gene network was also enriched for pathways of the cholinergic system, which have been associated with a number of cognitive functions, including memory, attention, and emotional processing (Sarter et al., 2001, 2006; Bentley et al., 2003). The presence of these pathways demonstrates that complex dysfunctions are probably associated not only with a gene, but possibly with a network of genes, and several systems, cells and brain regions (Gaiteri et al., 2014). Exposure to stress has been shown to affect methylation of Lys4 in histone 3 (Han et al., 2012). Methylation of this amino acid residue has been reported to affect the activity of DNMT3B (Liang et al., 2002; Chen et al., 2003) one of the enzymes coded by a gene in the ePRS-5-HTT network. This is a possible mechanism through which early adversity could epigenetically influence the function of this network and, thus, interact with our genetic score.

## REFERENCES

Achenbach, T. M. (2011). "Child behavior checklist," in *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*, eds J. S. Kreutzer, J. DeLuca, and B. Caplan (New York, NY: Springer), 546–552.

In conclusion, our present findings provide support for the impact of exposure to postnatal adversity on attention deficit hyperactivity disorder and externalizing problems, showing that the 5-HTT gene network is an important moderator of these effects. Our data also supports the hypothesis that this gene network has important impact in brain regions related with attention and cognitive processes. Additionally, the 5-HTT gene network and postnatal adversity are associated with variation in DNA methylation, which may explain the mechanism of long-term effects of postnatal adversity. Our study extends the knowledge of how exposure to postnatal adversity affects behavior and highlights the importance of analyzing not just a candidate gene in psychiatric disorders, but an entire gene network.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher upon reasonable request.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by MAVAN: (McGill University and Université de Montréal, the Royal Victoria Hospital, Jewish General Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and Hôpital Maisonneuve-Rosemount) and St. Joseph's Hospital and McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada. GUSTO: National Healthcare Group Domain Specific Review Board and the Sing Health Centralized Institutional Review Board. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RL, PS, and CD designed the experiments. RS, GH, MK, KO'D, PS, and MM performed the data collection. CD and AB performed the enrichment analysis. SP performed the ePRS. ZW, AC, IP, and EM performed statistical analysis. BB, DA, CD, and PS analyze the results and wrote the manuscript with RL.

## FUNDING

This research was supported by National Research Council of Brazil (CNPq), Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), and the JPB Foundation through a grant to The JPB Research Network on Toxic Stress: A Project of the Center on the Developing Child at Harvard University.

American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Arlington, TX: APA. doi: 10.1176/appi.books.9780890425596  
 Aron, A. R., Robbins, T. W., Poldrack, R. A. (2004). Inhibition and the right inferior frontal cortex. *Trends Cogn. Sci.* 18, 177–185. doi: 10.1016/j.tics.2013.12.003

- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., et al. (2014). Minfi: a flexible and comprehensive bioconductor package for the analysis of infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* 30, 363–369. doi: 10.1093/bioinformatics/btu049
- Beach, S. R. H., Brody, G. H., Todorov, A. A., Gunter, T. D., and Philibert, R. A. (2010). Methylation at SLC6A4 is linked to family history of child abuse: an examination of the iowa adoptee sample. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153, 710–713. doi: 10.1002/ajmg.b.31028
- Beck, A. T., Ward, C. H., Mendelson, M., Mock, J., and Erbaugh, J. (1961). Inventory for Measuring Depression. *Arch Gen Psychiatry*. 4, 53–63.
- Belsky, J. (1997). Variation in susceptibility to environmental influence: an evolutionary argument. *Psychol. Inq.* 8, 182–186. doi: 10.1207/s15327965pli0803\_3
- Belsky, J., Jonassaint, C., Pluess, M., Stanton, M., Brummett, B., and Williams, R. (2009). Vulnerability genes or plasticity genes? *Mol. Psychiatry* 14, 746–754. doi: 10.1038/mp.2009.44
- Bentley, P., Vuilleumier, P., Thiel, C. M., Driver, J., and Dolan, R. J. (2003). Cholinergic enhancement modulates neural correlates of selective attention and emotional processing. *NeuroImage* 20, 58–70. doi: 10.1016/s1053-8119(03)00302-1
- Björkenstam, E., Björkenstam, C., Jablonska, B., and Kosidou, K. (2017). Cumulative exposure to childhood adversity, and treated attention deficit/hyperactivity disorder: a cohort study of 543 650 adolescents and young adults in sweden. *Psychol. Med.* 48, 498–507. doi: 10.1017/S0033291717001933
- Bock, J., Breuer, S., Poeggel, G., and Braun, K. (2017). Early life stress induces attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD)-like behavioral and brain metabolic dysfunctions: functional imaging of methylphenidate treatment in a novel rodent model. *Brain Struct. Funct.* 222, 765–780. doi: 10.1007/s00429-016-1244-7
- Boecker, R., Holz, N. E., Buchmann, A. F., Blomeyer, D., Plichta, M. M., Wolf, I., et al. (2014). Impact of early life adversity on reward processing in young adults: EEG-fMRI results from a prospective study over 25 years. *PLoS ONE* 9:e112155. doi: 10.1371/journal.pone.0104185
- Botellero, V. L., Skranes, J., Bjuland, K. J., Häberg, A. K., Lydersen, S., Brubakk, A. M., et al. (2017). A longitudinal study of associations between psychiatric symptoms and disorders and cerebral gray matter volumes in adolescents born very preterm. *BMC Pediatr.* 17:45. doi: 10.1186/s12887-017-0793-0
- Calhoun, V. D., Adali, T., Pearson, G. D., and Pekar, J. J. (2001). A method for making group inferences from functional MRI data using independent component analysis. *Hum. Brain Mapp.* 140, 140–151. doi: 10.1002/hbm.1048
- Carlsson, A. (1987). Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission. *Ann. Rev. Neurosci.* 10, 19–40. doi: 10.1146/annurev.ne.10.030187.000315
- Cassidy, J., and Marvin, R. S. (1992). *Attachment Organization in 2 1/2 to 4 1/2 Years Olds: Coding Manual*. Available online at: [http://is.muni.cz/el/1423/jaro2014/PSY103/um/46958257/Handbook\\_of\\_Attachment\\_ch.18.pdf](http://is.muni.cz/el/1423/jaro2014/PSY103/um/46958257/Handbook_of_Attachment_ch.18.pdf) (accessed February 03, 2020).
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z., and Li, E. (2003). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by dnmt3a and dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5594–5605. doi: 10.1128/mcb.23.16.5594-5605.2003
- Cox, J. L., Holden, J. M., and Sagovsky, R. (1987). Detection of postnatal depression. development of the 10-item edinburgh postnatal depression scale. *Br. J. Psychiatry* 150, 782–786. doi: 10.1192/bjp.150.6.782
- Daveluy, C., Pica, L., Audet, N., Courtemanche, R., and Lapoint, F. (1998). *Enquête Sociale Et De Santé 1998, 2ème Edition*. Québec, QC: Institut de la statistique du Québec.
- du Boisgueheneuc, F., Levy, R., Volle, E., Seassau, M., Duffau, H., Kinkingnehun, S., et al. (2006). Functions of the left superior frontal gyrus in humans: a lesion study. *Brain* 129, 3315–3328. doi: 10.1093/brain/awl244
- Faraone, S. V., Sergeant, J., Gillberg, C., and Biederman, J. (2003). The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2, 104–113.
- Frankle, W. G., Huang, Y., Hwang, D. R., Talbot, P. S., Slifstein, M., Van Heertum, R., et al. (2004). Comparative evaluation of serotonin transporter radioligands 11C-DASB and 11C-McN 5652 in healthy humans. *J. Nucl. Med.* 45, 682–695.
- Gaiteri, C., Ding, Y., French, B., Tseng, G. C., and Sibille, E. (2014). Beyond modules & hubs: the potential of gene coexpression networks for investigating molecular mechanisms of complex brain disorders. *Genes Brain Behav.* 13, 13–24. doi: 10.1111/gbb.12106
- Garg, E., Chen, L., Nguyen, T. T. T., Pokhvisneva, I., Chen, L. M., Unteraehrer, E., et al. (2018). The early care environment and dna methylome variation in childhood. *Dev. Psychopathol.* 30, 891–903. doi: 10.1017/S0954579418000627
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294, 1024–1030. doi: 10.1126/science.294.5544.1024
- Halperin, J. M., Newcorn, J. H., Schwartz, S. T., Sharma, V., Siever, L. J., Koda, V. H., et al. (1997). Age-related changes in the association between serotonergic function and aggression in boys with ADHD. *Biol. Psychiatry* 41, 682–689. doi: 10.1016/S0006-3223(96)00168-0
- Han, Y., Han, D., Yan, Z., Boyd-Kirkup, J. D., Green, C. D., Khaitovich, P., et al. (2012). Stress-associated H3K4 methylation accumulates during postnatal development and aging of rhesus macaque brain. *Aging Cell* 11, 1055–1064. doi: 10.1111/accel.12007
- Hari Dass, S. A., McCracken, K., Pokhvisneva, I., Chen, L. M., Garg, E., Nguyen, T. T. T., et al. (2019). A biologically-informed polygenic score identifies endophenotypes and clinical conditions associated with the insulin receptor function on specific brain regions. *EBioMed.* 42, 188–202. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.051
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., et al. (2002). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J. Neurochem.* 66, 2621–2624. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66062621.x
- Hing, B., Braun, P., Cordner, Z. A., Ewald, E. R., Moody, L., McKane, M., et al. (2018). Chronic social stress induces DNA methylation changes at an evolutionary conserved intergenic region in chromosome X. *Epigenetics* 13, 627–641. doi: 10.1080/15592294.2018.1486654
- Hoffman, B. J., Hansson, S. R., Mezey, E., and Palkovits, M. (1998). Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front. Neuroendocrinol.* 19, 187–231. doi: 10.1006/frne.1998.0168
- Ismaylova, E., Lévesque, M. L., Pomares, F. M., Szyf, M., Nemoda, Z., Fahim, C., et al. (2018). Serotonin transporter promoter methylation in peripheral cells and neural responses to negative stimuli: a study of adolescent monozygotic twins. *Transl. Psychiatry* 8:147. doi: 10.1038/s41398-018-0195-6
- Johnson, W. E., Li, C., and Rabinovic, A. (2007). Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical bayes methods. *Biostatistics* 8, 118–127. doi: 10.1093/biostatistics/kxj037
- Kabacoff, R. I., Miller, I. W., Bishop, D. S., Epstein, N. B., and Keitner, G. I. (1990). A psychometric study of the mcmaster family assessment device in psychiatric, medical, and nonclinical samples. *J. Fam. Psychol.* 3, 431–439. doi: 10.1037/h0080547
- Kanner, A. D., Coyne, J. C., Schaefer, C., Lazarus, R. S. (1981). Comparison of two modes of stress measurement: daily hassles and uplifts versus major life events. *J. Behav. Med.* 4, 1–39. doi: 10.1007/bf00844845
- Khadka, S., Pearlson, G. D., Calhoun, V. D., Liu, J., Gelernter, J., Bessette, K. L., et al. (2016). Multivariate imaging genetics study of MRI gray matter volume and SNPs reveals biological pathways correlated with brain structural differences in attention deficit hyperactivity disorder. *Front. Psychiatry* 7:128. doi: 10.3389/fpsy.2016.00128
- Kramer, M. S., Goulet, L., Lydon, J., Séguin, L., McNamara, H., Dassa, C., et al. (2001). Socio-economic disparities in preterm birth: causal pathways and mechanisms. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 15, 104–123. doi: 10.1046/j.1365-3016.2001.00012.x
- Liang, G., Chan, M. F., Tomigahara, Y., Tsai, Y. C., Gonzales, F. A., Li, E., et al. (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell. Biol.* 22, 480–491. doi: 10.1128/mcb.22.2.480-491.2002
- Liu, J. (2004). Childhood externalizing behavior: theory and implications jianghong. *J. Child and Adolesc. Psychiatr. Nurs.* 17, 93–103. doi: 10.1111/j.1744-6171.2004.tb00003.x
- Liu, J., and Calhoun, V. D. (2014). A review of multivariate analyses in imaging genetics. *Front. Neuroinform.* 8:29. doi: 10.3389/fninf.2014.00029
- Liu, J., Ghassemi, M. M., Michael, A. M., Boutte, D., Wells, W., Perrone-Bizzozero, N., et al. (2012). An ICA with reference approach in identification

- of genetic variation and associated brain networks. *Front. Hum. Neurosci.* 6:21. doi: 10.3389/fnhum.2012.00021
- Lobel, M., Dunkel-Schetter, C., and Scrimshaw, S. C. (1992). Prenatal maternal stress and prematurity: a prospective study of socioeconomically disadvantaged women. *Health Psychol.* 11, 32–40. doi: 10.1037//0278-6133.11.1.32
- Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., et al. (2013). The genotype-tissue expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* 45, 580–585. doi: 10.1038/ng.2653
- Manor, I., Eisenberg, J., Tyano, S., Sever, Y., Cohen, H., Ebstein, R. P., et al. (2001). Family-based association study of the serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* 105, 91–95.
- Matthews, M., Nigg, J. T., and Fair, D. A. (2014). Attention deficit hyperactivity disorder marguerite. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 16, 235–266. doi: 10.1007/978-3-662-45758-0\_249
- McCarthy, S., Das, S., Kretzschmar, W., Delaneau, O., Wood, A. R., Teumer, A., et al. (2017). A Reference panel of 64,976 haplotypes for genotype imputation. *Nat. Genet.* 48, 1279–1283. doi: 10.1038/ng.3643
- Medvedeva, Y. A., Lennartsson, A., Ehsani, R., Kulakovskiy, I. V., Vorontsov, I. E., Panahandeh, P., et al. (2015). EpiFactors: a comprehensive database of human epigenetic factors and complexes. *Database* 2015, 1–10. doi: 10.1093/database/bav067
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., and Thomas, P. D. (2019). PANTHER Version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 47, D419–D426. doi: 10.1093/nar/gky1038
- Miguel, P. M., Pereira, L. O., Barth, B., de Mendonça Filho, E. J., Pokhvisneva, I., Nguyen, T. T. T., et al. (2019). 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* 86, 621–630. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.03.983
- Miller, E. K., and Cohen, J. D. (2001). An integrate theory of PFC function. *Ann. Rev. Neurosci.* 24, 167–202. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.167
- Miller, J. A., Ding, S. L., Sunkin, S. M., Smith, K. A., Ng, L., Szafer, A. et al. (2014). Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature* 508, 199–206. doi: 10.1038/nature13185
- Moss, E., Bureau, J. F., Cyr, C., Mongeau, C., and St-Laurent, D. (2004). Correlates of attachment at age 3: construct validity of the preschool attachment classification system. *Dev. Psychol.* 40, 323–334. doi: 10.1037/0012-1649.40.3.323
- Mulligan, M. K., Mozhui, K., Prins, P., and Williams, R. W. (2016). Genenetwork: a toolbox for systems genetics. *Methods Mol. Biol.* 1488, 75–120. doi: 10.1007/978-1-4939-6427-7\_4
- Neves de Oliveira, B. H., Dalmaz, C., and Zeidán-Chuliá, F. (2018). Network-based identification of altered stem cell pluripotency and calcium signaling pathways in metastatic melanoma. *Med. Sci.* 6:23. doi: 10.3390/medsci610023
- Newberry, E. H., Barkan, S. E., Lieberman, E. S., McCormick, M. C., Yllo, K., Garg, L. T., et al. (1992). Abuse of pregnant women and adverse birth outcome: current knowledge and implication for practice. *Obstet. Gynecol. Surv.* 267, 2370–2372.
- Nolan, T. M., Bond, L., Adler, R., Littlefield, L., Birlson, P., Marriage, K., et al. (1996). Child behaviour checklist classification of behaviour disorder. *J. Paediatr. Child Health* 32, 405–411. doi: 10.1111/j.1440-1754.1996.tb00939.x
- Oades, R. D. (2010). The role of serotonin in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Handb. Behav. Neurosci.* 21, 565–584. doi: 10.1016/S1569-7339(10)70101-6
- O'Donnell, K. A., Gaudreau, H., Colalillo, S., Steiner, M., Atkinson, L., Moss, E., et al. (2014). The maternal adversity, vulnerability and neurodevelopment project: theory and methodology. *Can. J. Psychiatry* 59, 497–508. doi: 10.1177/070674371405900906
- O'Donnell, K. J., Chen, L., MacIsaac, J. L., McEwen, L. M., Nguyen, T., Beckmann, K., et al. (2018). DNA methylome variation in a perinatal nurse-visit program that reduces child maltreatment: a 27-year follow-up. *Transl. Psychiatry* 8:15. doi: 10.1038/s41398-017-0063-9
- Oquendo, M. A., Hastings, R. S., Huang, Y. Y., Simpson, N., Ogden, R. T., Hu, X. Z., et al. (2007). Brain serotonin transporter binding in depressed patients with bipolar disorder using positron emission tomography. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 201–208. doi: 10.1001/archpsyc.64.2.201
- Ouellet-Morin, I., Wong, C. C., Danese, A., Pariante, C. M., Papadopoulos, A. S., Mill, J., et al. (2013). Increased serotonin transporter gene (SERT) DNA methylation is associated with bullying victimization and blunted cortisol response to stress in childhood: a longitudinal study of discordant monozygotic twins. *Psychol. Med.* 43, 1813–1823. doi: 10.1017/S0033291712002784
- Park, S., Lee, J. M., Kim, J. W., Cho, D. Y., Yun, H. J., Han, D. H., et al. (2015). Associations between serotonin transporter gene (SLC6A4) methylation and clinical characteristics and cortical thickness in children with ADHD. *Psychol. Med.* 45, 3009–3017. doi: 10.1017/S003329171500094X
- Parker, B., McFarlane, J., Soeken, K., Torres, S., and Campbell, D. (1993). Physical and emotional abuse in pregnancy: a comparison of adult and teenage women. *Nurs. Res.* 42, 173–178. doi: 10.1097/00006199-199305000-00009
- Patterson, N., Price, A. L., and Reich, D. (2006). Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2:e190. doi: 10.1371/journal.pgen.0020190
- Pearlin, L. I., and Schooler, C. (1978). The structure of coping. *J. Health Soc. Behav.* 19, 2–21. doi: 10.2307/2136319
- Pearlson, G. D., Liu, J., and Calhoun, V. D. (2015). An introductory review of parallel independent component analysis (p-ICA) and a guide to applying p-ICA to genetic data and imaging phenotypes to identify disease-associated biological pathways and systems in common complex disorders. *Front. Genet.* 6:276. doi: 10.3389/fgene.2015.00276
- Pessoa, L. (2011). Emotion and cognition and the amygdala: from ‘what is it?’ to ‘what’s to be done?’ *Neuropsychologia* 48, 3416–3429. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2010.06.038
- Plante, N., Courtemanche, R., and Grosseilliers, L. D. (2002). “Survey description and methodology - part II - statistical methodology - longitudinal aspects of 1998 to 2000 rounds,” in *Québec Longitudinal Study of Child Development (QLSCD 1998-2002) - From Birth to 29 Months* (Québec, QC).
- Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A., and Reich, D. (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38, 904–909. doi: 10.1038/ng1847
- Puig, M. V., and Gullledge, A. T. (2011). Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol. Neurobiol.* 44, 449–464. doi: 10.1007/s12035-011-8214-0
- R Foundation for Statistical Computing (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, Vol. 2. Available online at: <http://www.R-Project.org/> (accessed February 03, 2020).
- Radolf, L. S. (1977). The CES-D Scale: a self-report depression scale for research in the general population. *Appl. Psychol. Meas.* 1, 385–401. doi: 10.1177/014662167700100306
- Roisman, G. I., Newman, D. A., Fraley, R. C., Haltigan, J. D., Groh A. M., Haydon K. C., et al. (2012). Distinguishing differential susceptibility from diathesis-stress: recommendations for evaluating interaction effects. *Dev. Psychopathol.* 24, 389–409. doi: 10.1017/S0954579412000065
- Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruschinski, J., Wang, P. L., Lotia, S., et al. (2012). A travel guide to cytoscape plugins. *PLoS ONE* 9, 1069–1076. doi: 10.1038/nmeth.2212
- Sakowski, S. A., Geddes, T. J., Thomas, D. M., Levi, E., Hatfield, J. S., and Kuhn, D. M. (2006). Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.* 1085, 11–18. doi: 10.1016/j.brainres.2006.02.047
- Sarter, M., Gehring, W. J., and Kozak, R. (2006). More attention must be Paid: the neurobiology of attentional effort. *Brain Res. Rev.* 51, 145–160. doi: 10.1016/j.brainresrev.2005.11.002
- Sarter, M., Givens, B., and Bruno, J. P. (2001). The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35, 146–160. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00044-3
- Seeger, G., Schloss, P., and Schmidt, M. H. (2001). Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder—predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? *Neurosci. Lett.* 313, 45–48. doi: 10.1016/s0304-3940(01)02253-4
- Shapiro, K., Hillstrom, A. P., and Husain, M. (2002). Control of visuotemporal attention by inferior parietal and superior temporal cortex. *Science* 12, 1320–1325. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01040-0
- Silveira, P. P., Pokhvisneva, I., Parent, C., Cai, S., Rema, A. S. S., Broekman, B. F. P., et al. (2017). Cumulative prenatal exposure to adversity reveals associations

- with a broad range of neurodevelopmental outcomes that are moderated by a novel, biologically informed polygenic score based on the serotonin transporter solute carrier family C6, member 4 (SLC6A4) gene expression. *Dev. Psychopathol.* 29, 1601–1617. doi: 10.1017/S0954579417001262
- Smith, A. K., Kilaru, V., Klengel, T., Mercer, K. B., Bradley, B., Conneely, K. N., et al. (2015). DNA extracted from saliva for methylation studies of psychiatric traits: evidence tissue specificity and relatedness to brain. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 168B, 36–44. doi: 10.1002/ajmg.b.32278
- Soh, S. E., Chong, Y. S., Kwek, K., Saw, S. M., Meaney, M. J., Gluckman, P. D., et al. (2014). Insights from the growing up in singapore towards healthy outcomes (GUSTO) cohort study. *Ann. Nutr. Metab.* 64, 218–25. doi: 10.1159/000365023
- Spielberger, C. D. (2010). “State-trait anxiety inventory,” in *The Corsini Encyclopedia of Psychology*, eds I. B. Weiner and W. E. Craighead (New York, NY: John Wiley & Sons). doi: 10.1002/9780470479216.corpsy0943
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., et al. (2016). The genecards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 54–1.30.1–1.30.33. doi: 10.1002/cpbi.5
- Strüder, H. K., and Weicker, H. (2001). Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part I. *Int. J. Sports Med.* 22, 467–481. doi: 10.1055/s-2001-17605
- Suffren, S., Angulo, D., Ding, Y., Reyes, P., Marin, J., Hernandez, J. T., et al. (2017). Long-Term attention deficits combined with subcortical and cortical structural central nervous system alterations in young adults born small for gestational age. *Early. Hum. Dev.* 110, 44–49. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2017.04.016
- Tops, M., and Boksem, M. A. (2011). A potential role of the inferior frontal gyrus and anterior insula in cognitive control, brain rhythms, and event-related potentials. *Front. Psychol.* 2:330. doi: 10.3389/fpsyg.2011.00330
- Vickery, T. J., and Jiang, Y. V. (2009). Inferior parietal lobule supports decision making under uncertainty in humans. *Cereb. Cortex.* 19, 916–925. doi: 10.1093/cercor/bhn140
- Vijayendran, M., Beach, S. R., Plume, J. M., Brody, G. H., and Philibert, R. A. (2012). Effects of genotype and child abuse on DNA methylation and gene expression at the serotonin transporter. *Fron. Psychiatry.* 3:55. doi: 10.3389/fpsyg.2012.00055
- Vinkers, C. H., Kalafateli, A. L., Rutten, B. P., Kas, M. J., Kaminsky, Z., Turner, J. D., et al. (2015). Traumatic stress and human dna methylation: a critical review. *Epigenomics* 7, 593–608. doi: 10.2217/epi.15.11
- Wallentin, M., Roepstorff, A., Glover, R., and Burgess, N. (2006). Parallel memory systems for talking about location and age in precuneus, caudate and broca’s region. *NeuroImage* 32, 1850–1864. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.05.002
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., et al. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic. Acids. Res.* 38 (Suppl. 2), 214–220. doi: 10.1093/nar/gkq537
- Wray, N. R., Lee, S. H., Mehta, D., Vinkhuyzen, A. A., Dudbridge, F., and Middeldorp, C. M. (2014). Research review: polygenic methods and their application to psychiatric traits. *J. Child. Psychol. Psychiatry* 55, 1068–1087. doi: 10.1111/jcpp.12295
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keefe, S., et al. (2014). An RNA-Sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929–11947. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 de Lima, Barth, Arcego, de Mendonça Filho, Clappison, Patel, Wang, Pokhvisneva, Sassi, Hall, Kobor, O’Donnell, Bittencourt, Meaney, Dalmaz and Silveira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **6. Discussão**

---

Nesta tese buscamos avaliar os efeitos da exposição a adversidades no início da vida sobre o desenvolvimento de alterações comportamentais alimentares, metabólicas, cognitivas e emocionais, focando na interação entre fatores genéticos e ambientais que contribuiriam para tais fenótipos. Para tanto, inicialmente, utilizamos dois modelos de estresse em períodos hiporresponsivos ao estresse durante o desenvolvimento de roedores, buscando identificar diferenças sexo-específicas de comportamento alimentar hedônico e homeostático, bem como ansiedade e a expressão de genes associados a esses comportamentos. Em seguida, realizamos um estudo em humanos com o objetivo de avaliar a suscetibilidade ao desenvolvimento de distintos padrões alimentares em crianças com histórico de adversidade no início da vida, considerando os perfis genético e funcional associados à sinalização da leptina no hipotálamo e no córtex pré-frontal. Por fim, realizamos um segundo estudo em crianças, e investigamos a contribuição de interação entre fatores genéticos, associados à sinalização serotoninérgica na amígdala, e ambientais, de adversidades precoces, para o desenvolvimento de características relacionadas ao transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. Os principais resultados provenientes desses estudos estão resumidos nas tabelas 1, 2 e 3 que antecedem a discussão dos achados desta tese.

Tabela 1: Resumo dos principais resultados comportamentais e neuroquímicos em animais.

Análise	Resultados observados
Peso Corporal	Sexo * Tempo ♂ Grupo * Tempo – MD ↓ ♀ Grupo * Tempo – MD e MS ↓
Consumo Alimentar de Ração Padrão de Biotério	Sexo – ♂ Ingestão ↑ ♀ ♂ MD ↓ ♀ sem efeito
Consumo de Alimento Palatável	Interação Estresse Neonatal * Sexo ♂ MD e MS ↑ ♀ MD ↓ MS ↑
Labirinto em Cruz Elevado	Efeito do sexo e tendência de efeito do estresse neonatal % de tempo no braço aberto ♂ MD e MS ↓ % de Tempo Braços Abertos MS ↓ Entrada nos Braços Abertos comparado ao MD MS ↑ Tempo nos Braços Fechados ♀ sem efeito
Campo Aberto	Sexo – ♀ apresentam ↑ distância periférica, central e total percorrida que ♂

Neuropeptídios Hipotalâmicos	Sexo – ♀ apresentaram ↓ da expressão do NPY que ♂ ♂ MD e MS ↓ a Expressão de POMC Tendência ↓ da Expressão em MD e ↑ em MS de LepR ♀ sem efeito
Conteúdo Serotoninérgico na Amígdala	♂ MS ↓ 5-HTT MD ↑ 5HIAA ♀ MD ↓ 5-HTT
Conteúdo Serotoninérgico no Hipotálamo	♂ MD e MS ↓ 5-HTT MD e MS ↑ 5-HIAA / 5-HT ♀ MD e MS ↓ 5-HTT MD e MS ↑ 5-HIAA

Tabela 2: Resumo dos principais resultados da interação entre a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal e exposição a adversidades no início da vida em crianças. Considerando que não identificamos interação entre a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no hipotálamo e exposição a adversidades no início da vida, esses resultados não são descritos na tabela.

Análise	Resultados observados
	<i>Coorte MAVAN</i> - LepR-ePRS do Córtex Pré-frontal * Adversidade: ↑ Adversidade Pós-natal e ↓ LepR-ePRS ↑ Escore de Apreciação Alimentar (48 m e 72 m) † ↑ Escore de Saciedade (48 m e tendência aos 72 m) †  ↑ Adversidade Pós-natal e ↑ LepR-ePRS ↑ Escore de Resposta Alimentar (48 m) †
Comportamentos	- LepR-ePRS do Córtex Pré-frontal ↓ LepR-ePRS ↑ Score de Lentidão Alimentar (48 m e tendência aos 72 m) †  <i>Coorte GUSTO</i> - ePRS-5-HTT * Adversidade: ↑ Adversidade Pós-natal e ↑ ePRS-5-HTT ↑ Escore de Apreciação Alimentar (60 m) † ↓ Escore de Inquietação ao Alimentar (60 m) † ↓ Escore de Saciedade (60 m) †
Parâmetros metabólicos	Leptina Circulante



Sem efeito do LepR-ePRS do Córtex Pré-frontal  
 Glicose de jejum  
 Sem efeito do LepR-ePRS do córtex pré-frontal

† Evidência de diátese-estresse

Tabela 3: Resumo dos principais resultados da interação entre a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala e exposição a adversidades no início da vida em crianças.

Análise	Resultados observados
	<p><i>Coorte MAVAN</i>            - ePRS-5-HTT da Amígdala * Adversidade:            † Adversidade Pós-natal e † ePRS-5-HTT            † TDAH (48 m e 60 m) - susceptibilidade diferencial #            † Problemas de Atenção (48 m e tendência aos 60 m) - susceptibilidade diferencial #            † Problema de Externalização (48 m e 60 m) †</p>
Comportamento	<p><i>Coorte GUSTO</i>            - ePRS-5-HTT da Amígdala * Adversidade:            † Adversidade Pós-natal e † ePRS-5-HTT            † Problemas de TDAH (48 m) †            † Problemas de Atenção (48 m) - susceptibilidade diferencial #            † Problema de Externalização (48 m) - susceptibilidade diferencial #</p>
Metilação de DNA	<p>54.295 Regiões Metiladas ao longo do genoma            Adversidade: melhor preditor de 47% das variações de metilações de DNA            ePRS-5-HTT da Amígdala: melhor preditor de 43% das variações de metilações de DNA            ePRS-5-HTT da Amígdala * Adversidade: melhor preditor de 10% das variações de metilações de DNA</p>
Densidade de Matéria Cinzenta Encefálica	<p>SNPs que compõem o ePRS-5-HTT moderam a densidade de matéria cinzenta encefálica            Adversidade:            sem efeito</p>

† Evidência de diátese-estresse

# Evidência de susceptibilidade diferencial

O estresse no início da vida, representado por adversidades no período anterior e posterior ao nascimento, é amplamente associado à predisposição ao desenvolvimento de doenças a curto e longo prazo. Diante disso, modelos animais que induzam alterações semelhantes às observadas em humanos são indispensáveis e devem ser amplamente estudados, com o intuito de compreender os



mecanismos subjacentes a tais alterações e averiguar possíveis intervenções ou tratamentos capazes de reverter efeitos indesejáveis. No primeiro capítulo desta tese, estudamos dois modelos de estresse precoce. Os principais achados apontam para alterações de consumo alimentar, em particular de alimentos palatáveis. Além disso, resultados sexo-específicos foram encontrados quando analisamos o comportamento tipo-ansioso e atividade motora: machos submetidos a estresse precoce foram mais vulneráveis a um aumento do comportamento tipo-ansioso e fêmeas estressadas precocemente apresentaram aumento da atividade locomotora. Ao mesmo tempo, o estresse precoce reduziu a expressão de POMC e aumentou a atividade serotoninérgica no hipotálamo, enquanto na amígdala efeitos sobre o sistema serotoninérgico foram dependentes de sexo e tipo de estresse. No segundo capítulo dessa tese, estudamos o efeito da interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal e no hipotálamo em comportamentos associados a alimentação e marcadores metabólicos. Nossos achados demonstram que a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina, especificamente no córtex pré-frontal, modulam os efeitos de adversidades no início da vida nas respostas alimentares. Por fim, no terceiro capítulo dessa tese, nós avaliamos como processos cognitivos são modulados pela interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala. Nossos achados demonstram que a interação entre fatores ambientais e genéticos associados ao transportador de serotonina modulam comportamentos relacionados a atenção e hiperatividade, bem como variações de metilação de DNA ao longo do genoma, e que SNPs relacionados a essa rede também são associados a densidade de matéria cinzenta encefálica.

Não existe uma padronização de modelo de estresse no início da vida de roedores, o que dificulta a comparação dos resultados encontrados entre os estudos. A separação maternal é o modelo mais frequentemente utilizado para mimetizar adversidades no início da vida, embora exista grande variabilidade na duração e no período em que a MS ocorre (Pryce & Feldon, 2003). Tractenberg e colaboradores realizaram uma revisão sistemática comparando as diferenças entre os modelos de separação maternal e suas influências no comportamento de camundongos, considerando algumas definições e nomenclaturas que são importantes de serem destacados nessa tese, dentre eles: a variação nos tipos de procedimento de separação maternal e detalhes metodológicos dos diferentes modelos (Tractenberg et al., 2016). O procedimento do estresse de separação maternal pode acontecer por poucos minutos até uma hora, e nesse caso podem ser

classificados como *Breve Separação Maternal*; outros autores consideram a separação até 30 minutos como *Manipulação*, pois esse é o tempo em que a genitora muitas vezes se afasta do ninho para buscar alimento (Kalinichev, 2010). Por outro lado, a *Separação Maternal Prolongada*, ou apenas *Separação Maternal*, se constitui da separação dos filhotes por suas mães por no mínimo uma hora até 8 horas diárias (Nylander & Roman, 2013). O termo *Privação Maternal* é utilizado para protocolos de separação materna por 24 horas (Ellenbroek, van den Kroonenberg, & Cools, 1998). Além disso, dentro desses modelos existem algumas variações metodológicas que podem contribuir para o nível de estresse aplicado nos animais. Por exemplo, se o estressor é realizado em um único ou repetidos episódios, se os filhotes são isolados dos irmãos de ninhada ou permanecem em ninhada, se existe controle de temperatura, além do período em que o estresse aconteceu, como no período hipo-responsivo ao estresse (entre os dias pós-natais 0-14) (Tractenberg et al., 2016). Essa variabilidade de modelos de protocolos nos leva a duas questões principais: (I) independente do modelo de estresse aplicado no início da vida, desde o mais leve, como pouco cuidado materno, até os mais severos, como privação maternal, esse estresse pode predispor filhotes a alterações neuroquímicas e comportamentais; (II) o período da vida em que o estresse acontece pode acarretar alterações específicas, considerando que eventos de desenvolvimento seguem um padrão de sequência temporal. Nesse sentido, o primeiro trabalho dessa tese teve como objetivo investigar os efeitos de diferentes protocolos de estresse neonatal em desfechos relacionados especificamente ao comportamento alimentar.

É sabido que o nível de estresse interfere diretamente no consumo alimentar e consequentemente em parâmetros metabólicos e de peso corporal (Morris et al., 2015). Estudos com humanos e modelos animais vêm demonstrando que o estresse pode tanto aumentar quanto diminuir o consumo alimentar (Foster, Solomon, Huhman, & Bartness, 2006). Essa divergência nos resultados pode ser explicada tanto pela gravidade e frequência em que o estresse ocorre, quanto pelo tipo de alimento ofertado. Por exemplo, o estresse é associado a redução do consumo alimentar, entretanto, se um alimento palatável é ofertado em um momento estressante, observa-se aumento do consumo como forma de aliviar os efeitos negativos do estresse (Adam & Epel, 2007). Grande parte desses efeitos são relacionados à sobreposição entre os sistemas neurais que regulam o estresse e a alimentação, uma vez que o núcleo paraventricular do hipotálamo está envolvido na regulação do eixo HHA e do sistema de controle de ingestão alimentar (Morris et al., 2015). Nosso estudo adicionou dados importantes à literatura, ao demonstrar, dentro de um mesmo

ambiente controlado, como a variação de modelos de estresse interfere no consumo e preferências por alimentos de forma diferente em animais machos e fêmeas. Em nossos achados, animais machos submetidos ao estresse contínuo de MS por três horas diárias durante o período hiporresponsivo ao estresse, com temperatura controlada e animais isolados de irmãos de ninhada, não apresentaram alteração de consumo alimentar de rações padrão. Entretanto, quando esses animais são expostos a alimentos palatáveis, observa-se um aumento do consumo comparado a animais controle. Por outro lado, o estresse por MD, por 24 horas, também durante o período hiporresponsivo ao estresse e com temperatura controlada, porém com animais em ninhada, diminuiu o consumo de ração padrão, possivelmente levando ao baixo peso corporal identificado. De modo interessante, quanto esses animais foram expostos a alimentos palatáveis, observamos um aumento do consumo quando comparado ao grupo controle. Esse aumento no consumo de alimentos palatáveis em ambos os grupos de estresse deve-se provavelmente ao estado ansioso dos animais, observado em nossos resultados, considerando que alimentos ricos em açúcar e gordura atuam como “alimentos confortantes” (Maniam & Morris, 2010).

Além disso, nesse trabalho nós demonstramos que fêmeas também se mostraram vulneráveis aos efeitos do estresse no início da vida, o que foi observado inicialmente pela redução de peso corporal em ambos os grupos, embora com essa diferença sendo reduzida na idade adulta, possivelmente decorrente do consumo de ração padrão que, ao contrário dos machos, não foi diferente entre os grupos. Quando essas fêmeas foram expostas a alimentos palatáveis, os efeitos com relação ao grupo controle foram evidentes e opostos para os diferentes estressores. A exposição a separação maternal repetida aumentou o consumo de alimentos palatáveis, ao passo que a privação maternal diminuiu o consumo do mesmo alimento. Considerando que a exposição ao alimento palatável foi uma novidade de alto teor reforçador, esperava-se que as fêmeas apresentassem pelo menos consumo semelhante ao grupo controle, mas observamos uma redução de consumo em animais expostos ao estresse mais severo. Nesse sentido, poderíamos especular que a diminuição do consumo de alimentos palatáveis seria um sinal de anedonia, ou seja, incapacidade ou diminuição de motivação para receber recompensas consideradas prazerosas, como consumo de alimentos (Stanton, Holmes, Chang, & Joormann, 2019). Esse sintoma é considerado como um dos sinais de depressão e observado em animais expostos a protocolos de estresse de derrota social e de estresse crônico (Golden, Covington, Berton, & Russo, 2011; Willner, 2005). Nesse sentido, um estudo investigando os efeitos da privação maternal em fêmeas

seria uma boa proposta a ser executada como um modelo de estresse no início da vida e predisposição à depressão na vida adulta.

Um dos desfechos que apresentam certa inconsistência na literatura é de que a exposição a adversidades no período pós-natal induz comportamento tipo-ansioso em roedores. Estudos com estresse em ratos mostram comportamentos de ansiedade em animais adultos (Miragaia et al., 2018; Wei, David, Duman, Anisman, & Kaffman, 2010). Entretanto, outros estudos com ratos e camundongos mostram uma grande variabilidade nos resultados (McIntosh, Anisman, & Merali, 1999; Millstein & Holmes, 2007). Em nosso estudo, mostramos que tanto a separação quanto a privação materna induziram comportamento do tipo-ansioso de animais machos avaliados pelo teste do labirinto em cruz elevado. Miragaia e colaboradores (2018) demonstraram que a privação materna no dia pós-natal 3 (PND) aumentou o índice de ansiedade, corroborando nossos resultados, embora o mesmo estudo não tenha encontrado alterações desses comportamentos em animais submetidos à privação no PND 11 (Miragaia et al., 2018). Diferenças metodológicas entre nossos modelos de estresse devem ser consideradas e podem estar associadas aos resultados observados. Algumas revisões de literatura apontam a importância de utilizar modelos de estresse que mimetizem adversidades específicas em humanos como abuso emocional, negligência emocional, abuso físico, negligência física e abuso sexual ou uma combinação de adversidades, considerando que o tipo e a gravidade das adversidades podem ser importantes em termos de disfunções comportamentais (Murthy & Gould, 2018). Nesse sentido, a combinação de dias de privação materna se constitui de um modelo de estresse severo que induziu importantes alterações comportamentais e neuroquímicas.

Embora os protocolos de estresse tenham induzido aumento de comportamento tipo-ansioso em machos, nós não observamos efeitos ansiogênico do estresse em fêmeas. As fêmeas, contudo, apresentaram de maneira geral, maior atividade locomotora que machos. A discrepância dos resultados entre machos e fêmeas submetidos aos mesmos protocolos de estresse vem sendo discutida em outros estudos como uma consequência também do cuidado materno. E em nosso trabalho, foram observadas tanto em comportamentos quanto em dosagens bioquímicas. Estudos clássicos e recentes demonstram que mães tendem a apresentar cuidado materno diferenciado, promovendo maior estimulação tátil em machos que em fêmeas (Moore & Morelli, 1979). O comportamento da mãe em relação aos filhotes pode programar respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse na idade adulta (Hao, Huang, Nielsen, & Kosten, 2011). Parte desses

efeitos são associados a mudanças na expressão gênica de regiões encefálicas que medeiam as respostas ao estresse, como aumento da expressão de mRNA do receptor de glicocorticóide hipocampal e diminuição dos níveis de mRNA de CRH no hipotálamo (Meaney, 2001). Wei e colaboradores (2010) demonstraram que até mesmo uma breve separação materna de 15 minutos, entre os dias pós-natais 1 e 21, aumenta o cuidado materno com a prole. De forma interessante, esse aumento do cuidado foi correlacionado com tempo de exploração do centro do aparato de campo aberto, demonstrando que o cuidado materno durante um período específico de desenvolvimento é associado à programação de comportamento tipo-ansioso em animais adultos. Esses autores argumentam que, embora o cuidado materno possa minimizar os efeitos do estresse no início da vida, algumas alterações podem permanecer a longo prazo (Wei et al., 2010). Nesse sentido, nosso estudo demonstrou que tanto a separação quanto a privação materna induziram alterações robustas no comportamento e no sistema serotoninérgico, analisado na amígdala e no hipotálamo, de machos. Por outro lado, em fêmeas os efeitos comportamentais foram menos evidentes, possivelmente por diferenças na resposta ao estresse, o que poderia torná-las mais resilientes aos efeitos do estresse nos comportamentos analisados. Estudos que avaliem o cuidado materno frente a dois episódios de privação materna podem trazer informações interessantes relacionado os efeitos maternos desse modelo de estresse com a programação do comportamento na idade adulta.

Os resultados desta tese relacionados aos comportamentos alimentar e do tipo-ansioso nos direcionaram para duas regiões encefálicas importantes para tais comportamentos: a amígdala e o hipotálamo. Conforme discutido anteriormente, a amígdala é considerada uma região fundamental para o controle de comportamentos relacionados à ansiedade (Martin et al., 2009) e variações na atividade serotoninérgica nessa região modulam esses comportamentos (Curran & Chalasani, 2012). Dessa forma, alterações no conteúdo de serotonina e seus metabólitos na amígdala podem explicar as alterações observadas no comportamento do tipo-ansioso. Por outro lado, as alterações serotoninérgicas encontradas no hipotálamo nos direcionam para a hipótese de que o estresse teria modulado vias serotoninérgicas que inervam o hipotálamo, modulando o comportamento de consumo de alimentos palatáveis, cabendo aqui ainda lembrar que o próprio estado de ansiedade, possivelmente resultado das alterações na atividade serotoninérgica na amígdala, também pode modificar o consumo de alimentos palatáveis (Machado et al., 2013).

Assim, alterações no conteúdo de serotonina e de seu metabólito no hipotálamo podem estar relacionadas às alterações de consumo de alimento palatável tanto em machos quanto em fêmeas. De fato, estudos indicam que injeções periféricas e centrais de agonistas serotoninérgicos resultam em supressão da ingestão alimentar, enquanto o efeito oposto é observado com antagonistas receptor 5-HT<sub>1A</sub> e outras drogas que reduzem a atividade da 5-HT (Leibowitz & Alexander, 1998). Grande parte dos efeitos anorexigênicos da serotonina ocorre pela ativação de seus receptores no hipotálamo, que modificam a atividade de neurônios contendo o neuropeptídeo Y (NPY), a proteína relacionada à agouti (AgRP) e a pró-opiomelanocortina (POMC) (Currie, Coiro, Niyomchai, Lira, & Farahmand, 2002; Qiu et al., 2007). Xu e colaboradores, em 2007, desenvolveram duas linhagens de camundongos nocaute para o receptor de serotonina 5-HT<sub>2C</sub>: um deles com deficiência total de 5-HT<sub>2C</sub>R e outro com expressão regular apenas nos neurônios POMC. Animais com deficiência total de 5-HT<sub>2C</sub>R desenvolveram hiperfagia ao serem expostos a dieta rica em gordura, além de hiperatividade e obesidade. Esses resultados foram normalizados em animais expressando o 5-HT<sub>2C</sub>R apenas nos neurônios POMC, o que demonstra que receptores serotoninérgicos no núcleo arqueado do hipotálamo medeiam os efeitos de componentes do sistema serotoninérgicos no consumo alimentar (Xu et al., 2008). Dessa forma, o prejuízo na neurotransmissão serotoninérgica, observada em nossos resultados, pode estar influenciando o controle da fome e saciedade no hipotálamo por meio da ativação de neuropeptídios hipotalâmicos.

Com o objetivo de investigar os mecanismos associados à influência do estresse sobre o consumo alimentar, medidas de expressão gênica dos neuropeptídios hipotalâmicos envolvidos no controle do consumo alimentar foram realizadas. Comparadas a machos, fêmeas apresentaram menor expressão de NPY, corroborando outros estudos que observaram que fêmeas apresentam menor imunorreatividade de NPY em regiões como a amígdala basolateral, e as regiões ventral e dorsal do hipocampo (Miragaia et al., 2018). Além disso, evidências apontam que o NPY está envolvido não somente no controle do consumo alimentar, como também em processos relacionados a emoções e modulação de respostas ao estresse, atuando como neuromodulador de processos emocionais (Morales-Medina, Dumont, & Quirion, 2010). A diminuição da expressão do NPY em fêmeas pode ser sugestiva de alterações de humor, da mesma forma que observado na redução do consumo de alimentos palatáveis. Vale ressaltar novamente, que estudos investigando os efeitos de dois episódios de privação materna em fêmeas considerando comportamentos relacionados à depressão ajudariam a explicar nossos achados.

Além disso, nossos resultados apontam que animais machos submetidos à privação materna apresentam redução dos níveis de POMC. A POMC é uma proteína precursora que produz peptídeos biologicamente ativos por meio de uma série de etapas enzimáticas específicas, produzindo os hormônios estimuladores dos melanócitos (MSHs), ACTH e  $\beta$ -endorfina. A ativação da via da POMC pela leptina, no núcleo arqueado do hipotálamo, inibe o consumo alimentar (Millington, 2007). A diminuição de um neuropeptídeo anorexigênico em nossos resultados sugere um efeito compensatório sistêmico desses animais para atingir o peso corporal que se encontra diminuído. De fato, em modelos de restrição alimentar observa-se redução da expressão do mRNA de POMC (Mizuno et al., 1998). Além disso, como comentado acima, os neurônios POMC do núcleo arqueado do hipotálamo são modulados por receptores 5HT<sub>2C</sub>, e considerando que em nossos achados a atividade serotoninérgica está afetada, essa poderia ser outra causa que colabora para variações de neurônios POMC.

Diante dos nossos achados com relação ao consumo alimentar e ao peso corporal, esperávamos efeitos robustos com relação ao receptor de leptina no hipotálamo, principalmente porque, em ratos, a leptina apresenta um aumento de liberação no período pós-natal iniciado por volta do PND 5 com um pico entre PND 9 e PND 10 (Ahima, Prabakaran, & Flier, 1998), ou seja, no período em que aconteceu o estresse nos animais. Entretanto, surpreendentemente observamos apenas uma tendência em animais machos, com aumento evidenciado pela separação materna, e diminuição pela privação materna. Em trabalhos anteriores, a privação materna no PND 9 foi associada ao rápido declínio nos níveis de leptina circulante, ao mesmo tempo que observou-se aumento do seu receptor, e redução dos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) no hipotálamo (Viveros, Diaz, Mateos, Rodriguez, & Chowen, 2010). Esses resultados, contudo, foram mensurados logo após o estresse, diferente das nossas análises que foram a longo prazo.

O comportamento alimentar e a regulação do peso corporal correspondem a processos fisiológicos altamente complexos e consequentes da ação coordenada e sincronizada de genes, células e regiões periféricas e centrais que interagem em vias hedônicas e homeostáticas (Friedman & Halaas, 1998; Leibowitz & Alexander, 1998; Timper & Bruning, 2017; Zanchi et al., 2017). Nesse sentido, disfunções nesses processos podem, por muitas vezes, derivar de alterações em atividades sistêmicas, ao invés de serem reguladas por alterações de genes específicos (Gaiteri et al., 2014). Pesquisas atuais apontam que o estudo de redes de genes fornece uma abordagem

alternativa que permite analisar, integrar e quantificar interações moleculares em escala de genômica (Lorsch et al., 2019; Vidal, Cusick, & Barabasi, 2011). Levando em conta estudos anteriores e nossos resultados, levantamos a hipótese que os efeitos do estresse no início da vida no comportamento alimentar devem ser desencadeados por alterações sistêmicas. Sabe-se que doenças complexas, como a obesidade, são resultado da integração de rede de genes funcionais, que interagem entre si em níveis de regulação molecular e celular para o desenvolvimento da condição e doença como um todo (Gaiteri et al., 2014; Parikshak et al., 2015). Nessa perspectiva, considerando que uma vasta literatura aponta que o receptor de leptina seja um gene alvo para o controle alimentar, em nossos dados observamos apenas uma tendência de alteração na sua expressão ao mesmo tempo que observamos que genes associados a ele, como a POMC apresentavam alteração de expressão. Dessa forma, com o objetivo de desenvolver uma pesquisa translacional focando em redes genes regiões-específicas que poderiam ser afetadas pelo estresse no início da vida, desenvolvemos um estudo translacional que analisou interações entre a exposição a adversidades no início da vida e genes associados ao receptor de leptina.

No segundo capítulo desta tese, realizamos um estudo em três coortes comunitárias, em que avaliamos a interação entre fatores genéticos e ambientais na predisposição ao desenvolvimento de disfunções alimentares e metabólicas. Com relação ao componente genético das nossas análises, empregamos a análise de redes de genes para criar um escore de risco poligênico baseado em expressão (ePRS, da sigla em inglês para *expression-based polygenic risk score*), que reflete variações na função dessa rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal (PFC) e, também, no hipotálamo (HPT). Através dessa metodologia, analisamos padrões de expressão de genes que se correlacionam com o receptor de leptina. Em relação a fatores ambientais, criamos um escore utilizando múltiplos indicadores de adversidades no período perinatal, que incluíram desde potenciais problemas de saúde da criança, como idade gestacional ao nascimento, peso ao nascer, doenças neonatais, e também problemas de saúde materna e condições ambientais familiares, como indicadores socioeconômicos e o relacionamento no núcleo familiar, que pode ser caracterizado por conflitos ou fragilidade de vínculos.

Alguns detalhes metodológicos do escore de adversidade são importantes de serem destacados. Primeiro, que a utilização de um escore de adversidade possibilita a análise de fatores ambientais considerados não extremos que podem, em conjunto, predispor indivíduos a doenças psiquiátricas e metabólicas, como observado em estudos anteriores (Levitan et al., 2017; Miguel,



Pereira, et al., 2019; Wendland et al., 2014). Além disso, o escore de adversidade, que varia nos sujeitos do estudo, permite a análise de diferentes graus de adversidade, consistindo assim, em uma ferramenta mais translacional em relação ao nosso modelo animal: um deles um pouco mais severo e agudo (MD) e outro mais prolongado e crônico (MS). Vale acrescentar também que o escore de adversidade foi criado de forma semelhante em duas coortes, o que possibilitou a replicação dos dados, considerando diferentes etnias e culturas.

O Questionário do Comportamento Alimentar da Criança (CEBQ, do inglês *Child Eating Behaviour Questionnaire*), por sua vez, foi utilizado como desfecho comportamental com o objetivo de avaliar atitudes e fatores psicossociais implícitos na seleção de quais alimentos ingerir. Esse questionário também avalia características comportamentais associadas ao estilo alimentar individual, como resposta à saciedade, ritmo e seletividade alimentar, prazer em comer, sub e sobre-ingestão emocional e desejo de beber (Wardle, Guthrie, Sanderson, & Rapoport, 2001). Embora no artigo não nos concentremos em efeitos individuais da adversidade e sim na interação com a rede de genes, quando avaliamos os efeitos específicos da adversidade no início da vida no comportamento alimentar observamos um efeito nas escalas de desejo por bebidas e tendência de efeito para o item consumo alimentar em resposta a emoções. Esses resultados foram observados em diferentes idades nas coortes avaliadas, como demonstrados nas tabelas suplementares do capítulo II. O domínio do CEBQ relacionado ao desejo por bebidas se refere a questões relacionadas ao desejo por bebidas ricas em açúcar, como sucos industrializados e refrigerantes (Wardle et al., 2001). Nossos resultados apontam que, conforme esperado, o aumento da adversidade induz o aumento do desejo por tais bebidas. Por outro lado, o consumo alimentar em resposta a emoções negativas se refere à impulsividade diante de situações emocionalmente estressantes, como em situações de inquietude, preocupação ou ansiedade. Nesse caso, resultados obtidos em ambas as coortes, MAVAN e GUSTO, indicaram uma tendência ao aumento do consumo alimentar em situações que envolvem emoções. Assim sendo, podemos especular que crianças expostas a adversidades no início da vida tendem a apresentar maior consumo de alimentos em situações de desconforto emocional. Esses resultados corroboram trabalhos da literatura que observaram que adversidades no início da vida, como qualidade da interação entre mãe e bebê nos períodos iniciais da vida, contribuem para o excesso do consumo alimentar posteriormente em crianças e adolescentes (Beijers, Miragall, van den Berg, Konttinen, & van Strien, 2021; Escobar et al., 2014).

Além disso, esses resultados são importantes de serem discutidos considerando também nossos achados no capítulo I desta tese, uma vez que animais expostos ao estresse no início da vida apresentam aumento de consumo de alimentos doces e palatáveis e aumento de ansiedade. Embora em modelos animais tenhamos analisamos o comportamento alimentar avaliando consumo de ração padrão e de alimento palatável, sabemos que o comportamento alimentar humano é decorrente da associação entre padrões genéticos com decisões diárias, disponibilidades alimentares, cultura, hábitos e exposições (Barth et al., 2020; Dallman, 2010; Grzymislawska, Puch, Zawada, & Grzymislawski, 2020; Machado et al., 2013; Silveira et al., 2008; van Strien et al., 2013). Portanto, analisar os efeitos de adversidades no início da vida de forma translacional possibilitou observar nuances comportamentais relativas de um comportamento que pode ser preditivo de disfunções alimentares e metabólicas mais tarde na vida, uma vez que nossos resultados apontam que, tanto em modelos animais como em humanos, adversidades no início da vida são associadas ao aumento do consumo alimentar, em especial de alimentos ricos em glicídeos simples e gorduras, principalmente quando associados a emoções negativas.

Com relação aos resultados da interação entre adversidade no início da vida e o ePRS do receptor de leptina no córtex pré-frontal, demonstramos que ambos os fatores interagem entre si e modulam o comportamento alimentar de crianças, de forma independente da idade, da etnia e da cultura. Especificamente, a interação entre o escore ambiental e o escore genético influenciou comportamentos relacionados ao prazer em comer (*enjoyment of food*), resposta à comida (*food responsiveness*), seletividade alimentar e a saciedade. De modo interessante, esses resultados apontam que variações no nível de adversidade induzem comportamentos obesogênicos ou anorexigênicos dependendo dos padrões individuais de expressão gênica da rede de genes que se co-expressam com o receptor de leptina no córtex pré-frontal. Nesse sentido, crianças submetidas a adversidades tendem a apresentar menor prazer alimentar, menor resposta ao alimento e mais saciedade quando apresentam menor expressão de genes relacionados ao receptor de leptina. Entretanto, o padrão oposto pode ser observado em função de características individuais: crianças submetidas a adversidade tendem a apresentar maior prazer e resposta ao alimento quando apresentam maior expressão de genes relacionados ao receptor de leptina. Dessa forma, considerando nossos achados em modelos animais e em crianças, o nível da exposição a adversidades tem influência significativa na modulação do padrão de comportamento alimentar. Além disso, com esse trabalho identificamos que a rede de genes que se co-expressa com o receptor

de leptina, especificamente no córtex pré-frontal, parece modular os comportamentos observados sendo um possível mecanismo para a associação entre adversidades no início da vida e alterações de comportamento alimentar. Em nosso modelo animal, neuropeptídeos hipotalâmicos associados ao consumo alimentar foram pouco afetados pelo estresse no início da vida. Entretanto, em humanos decidimos analisar o hipotálamo e o córtex pré-frontal. De fato, os efeitos da interação adversidade precoce e ePRS do LepR no córtex pré-frontal foram muito mais significativos, indicando que o hipotálamo, possivelmente por ser uma região com maior importância para a sobrevivência, pode sofrer menor influência ambiental.

Com objetivo de investigar os efeitos metabólicos da rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina, dois marcadores metabólicos, glicemia em jejum e leptina circulante, foram analisados em uma terceira coorte (ALSPAC). Considerando que adversidades no início da vida são associadas à programação do metabolismo e consequente alterações de peso corporal (Gehrand et al., 2016; Raff et al., 2018; Ruiz et al., 2018), conforme revisado em detalhes no estado da arte, investigar os efeitos da adversidade nesses marcadores não foi nosso foco. Por outro lado, a análise dos efeitos da rede de genes nesses marcadores nos direcionaria para a identificação de efeitos periféricos dessas redes. Nesse sentido, nossos resultados apontam que as redes de genes que se co-expressam com o receptor de leptina no córtex pré-frontal e no hipotálamo não influenciam os níveis de glicemia em jejum e leptina circulante, sugerindo assim que os efeitos dessas redes de genes ocorrem centralmente. Além disso, com o objetivo de investigar os processos biológicos nos quais a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal está envolvida, diversas plataformas foram utilizadas para a análise de enriquecimento funcional<sup>1</sup> de processos biológicos e vias relacionadas com essas redes. Conforme esperado, essa rede de genes tem enriquecimento para funções e processos relacionados a respostas a lipídeos e nutrientes, mas também para desenvolvimento do sistema nervoso central e morfogênese de estruturas anatômicas, o que pode contribuir para os efeitos da interação entre rede de genes com adversidade no início da vida.

Uma das questões importantes considerando nosso modelo translacional é que, em animais, nós analisamos machos e fêmeas e observamos resultados sexo-específicos. Entretanto, em

---

<sup>1</sup> Análise de enriquecimento são definidas como um método estatístico para identificar, a partir de uma lista de genes e seus produtos gênicos, classes de genes que são associadas à processos e vias biológicos, bem como a doenças (Subramanian et al., 2005)

crianças, as análises foram feitas agrupando meninos e meninas, uma vez que o modelo de regressão utilizado não identificou diferença entre sexos. Nessa perspectiva, um estudo da Universidade Federal de Pelotas avaliou diferenças no comportamento alimentar das crianças entre 6 e 10 anos também utilizado o CEBQ. Crianças com excesso de peso corporal, nesse estudo, apresentaram maiores pontuações em escalas relacionadas a busca ativa e consumo de alimentos, quando comparadas com crianças de peso normal. Contudo, corroborando nossos achados, não foram encontradas diferenças no comportamento alimentar em relação ao sexo e à idade (dos Passos, Gigante, Maciel, & Matijasevich, 2015). Nesse sentido, é importante ressaltar que as crianças da nossa coorte são saudáveis e não apresentam alterações de índice de massa corporal (dados não mostrados). Não podemos excluir, contudo, a possibilidade de que diferenças sexo-específicas emergam após a puberdade. Uma vasta literatura demonstra que existem diferenças de sexos tanto no consumo, quanto na aquisição e no preparo de alimentos. Conforme revisado recentemente por Grzymisławska e colaboradores (2020), condições individuais, como fatores genéticos e psicossociais, bem como condições socioeconômicas e culturais contribuem substancialmente para essas diferenças sexo-específicas. Estima-se que mulheres manifestam maior preocupação com nutrição saudável e controle do peso corporal, entretanto apresentam tendência por comer mais em grupo ou em situações estressantes. Por outro lado, homens tendem a alimentar-se pelo prazer do consumo e por isso preferem alimentos mais saborosos e muitas vezes mais gordurosos, tendendo a se alimentar impulsivamente e consumir mais suplementos dietéticos (Grzymisławska et al., 2020). Essas diferenças nos achados da literatura sugerem que as alterações de comportamento alimentar podem aparecer a partir de um momento no desenvolvimento de crianças e adolescentes, considerando que em crianças fatores hormonais, bem como a possibilidade de escolha alimentar são minimizadas. Dessa forma, a influência do sexo no comportamento alimentar pode depender do sexo biológico, mas também da fase do desenvolvimento e de fatores culturais.

Processos cognitivos tais como atenção, memória e aprendizagem, são altamente especializados e podem influenciar o comportamento alimentar, conforme descrito anteriormente. Como já discutido no estudo em modelos animais, foram observadas alterações de serotonina na amígdala em animais que haviam sido submetidos a um estressor mais severo (privação materna). Além disso, circuitos envolvendo a amígdala participam de diversas funções cognitivas (Pessoa, 2010). Assim sendo, no capítulo III desta tese, realizamos um segundo estudo translacional,

analisando interação gene x ambiente, com o objetivo de investigar os efeitos de adversidades no início da vida em processos cognitivos. Considerando a mesma metodologia da exposição a condições de adversidade no início da vida, aqui criamos um escore de risco poligênico baseado na expressão dos genes que são co-expressos com o gene do transportador de serotonina (5-HTT) na amígdala, visto que o sistema serotoninérgico foi afetado pelo estresse em nossos modelos animais. Semelhante ao capítulo II, analisamos a influência da interação entre esses dois fatores na modulação de distúrbios comportamentais. Nesse capítulo, observamos que a interação entre a adversidade no início da vida e o ePRS do transportador de serotonina na amígdala influenciam comportamentos relacionados à atenção e à hiperatividade. Nossos resultados apontam que a exposição a adversidades predispõe a problemas de déficit de atenção e hiperatividade em crianças que apresentam baixa expressão gênica (ePRS baixo) para a rede de co-expressão gênica do 5-HTT. É interessante observar que, ao analisarmos comportamentos relacionados à impulsividade, como externalização, observamos o mesmo padrão comportamental, sugerindo que a interação entre a rede de genes do transportador de serotonina e adversidade em períodos iniciais da vida influencia não somente comportamentos associados a atenção e hiperatividade, mas também outros transtornos comportamentais associados a eles. Vale ressaltar que esses achados foram replicados em coortes de diferentes etnias aos quatro anos de idade.

Um resultado interessante observado foi que as interações entre os escores de adversidade e poligênico são consistentes com o modelo de susceptibilidade diferencial. Esse modelo foi proposto inicialmente por Jay Belsky (Belsky & Hartman, 2014) e corresponde a uma proposta adicional para a interpretação dos achados comportamentais e psicológicos que geralmente são discutidos de acordo com o modelo diátese-estresse, também identificado em nossos resultados. O modelo de interpretação de diátese-estresse ou duplo risco propõe que indivíduos poderiam ser classificados como resilientes ou vulneráveis a uma exposição ambiental negativa. O grupo resiliente apresentaria resultados bons em desfechos clínicos ou comportamentais, independente da exposição ambiental. Por outro lado, o grupo vulnerável seria mais afetado pela exposição a ambientes adversos, resultando em resultados negativos em desfechos clínicos e comportamentais. Entretanto, quando esses indivíduos são expostos a experiências positivas passam a apresentar resultados bons de forma semelhante ao grupo resiliente. Isso significa que alguns indivíduos, devido às suas características genéticas, são mais vulneráveis aos efeitos adversos das experiências negativas, enquanto outros são relativamente resilientes. A hipótese de susceptibilidade

diferencial, por sua vez, está associada a uma sensibilidade mais “plástica” ou maleável de um grupo de indivíduos em comparação com um grupo de indivíduos menos sensível, ou seja, de comportamento estável em diferentes ambientes. Nessa hipótese, indivíduos mais plásticos seriam desproporcionalmente mais afetados por ambientes negativos e positivos em comparação com o grupo "fixo". Vale ressaltar que esses modelos são complementares e ambos foram identificados em nossos achados (Belsky, Bakermans-Kranenburg, & van Ijzendoorn, 2007; Belsky & Hartman, 2014). Interações que modularam comportamentos relacionados a atenção e hiperatividade foram, em nossos achados, consistentes com suscetibilidade diferencial, enquanto interações que modularam comportamentos relacionados a externalização foram consistentes com diátese-estresse. Esses resultados sugerem que crianças com baixa expressão dos genes que se co-expressam com o transportador de serotonina são afetados pelo ambiente negativo apresentando maiores alterações comportamentais, mas em ambiente mais positivo apresentam os melhores resultados. Entretanto, crianças com o perfil genético oposto apresentam pouca ou nenhuma alteração atencional mesmo quando expostas a diferentes ambientes. Em resumo, esses resultados nos ajudam a interpretar como crianças, a partir de distintas características genéticas, respondem de forma diferente a influências ambientais. Além disso, esses achados sugerem que estratégias ambientais em certos estágios do desenvolvimento podem ser utilizadas para minimizar a exposição a adversidades em períodos iniciais da vida.

Um dos avanços importantes na execução desse trabalho foi a inclusão de fatores epigenéticos, como avaliação do nível de metilacao do DNA, que poderiam explicar os mecanismos da associação entre a rede de genes do 5-HTT e adversidades no início da vida. Para explorar os efeitos da adversidade e do ePRS do transportador de serotonina nos níveis de metilação de DNA, nós executamos três modelos de regressão lineares (considerando o ePRS, o escore de adversidade e a interação entre eles), uma para cada CpG com metilação variável, totalizando 54.295 análises. Nossos resultados apontaram que a exposição a adversidade no início da vida foi o melhor modelo para explicar praticamente metade das metilações variáveis analisadas ao longo do genoma. Esses resultados corroboram outros autores que também observaram diferenças de metilação do DNA associadas a variações do ambiente (Dunn et al., 2019). Um trabalho recente de Wiegand e colaboradores (2021), por exemplo, identificou doze sítios CpGs diferencialmente metiladas associadas a adversidades na infância, reforçando assim a influência do ambiente no início da vida na metilação de DNA (Wiegand et al., 2021). Além dos achados

referentes a adversidade, nossos resultados também mostraram que genes da rede do transportador de serotonina em conjunto são o melhor fator, dentre os analisados, para explicar 43% de variações de metilação em CpGs analisadas. A análise desses resultados é interessante quando levamos em consideração a função biológica dessa rede, uma vez que grande parte dos genes que a compõem estão associados com fatores epigenéticos. Dessa forma, a influência do ePRS na variação de metilação de DNA poderia ser explicada pelo envolvimento dos genes dessa rede em vias e processos associados à metilação de DNA, como fosforilação e metilação de histonas, e remodelamento de cromatina. Além disso, a interação entre a adversidade e a rede de genes contribuiu, conforme esperado, para variações de metilação ao longo do genoma. Em conjunto, esses resultados sugerem que variações de metilação de DNA podem contribuir para alterações a longo prazo observadas pelo ambiente adverso no início da vida, corroborando a hipótese de que sinais acionados pela exposição ambiental no início da vida, ativariam vias de sinalização encefálicas e de tecidos periféricos que têm como alvo genes envolvidos na metilação e desmetilação de DNA. Essa modulação da metilação do DNA em resposta a estímulos ambientais no início da vida então atuaria como um mecanismo de adaptação do genoma ao longo da vida, que incorpora as primeiras experiências de uma criança na estruturação da cromatina (Szyf, 2011).

Considerando que análises de neuroimagem estrutural fornecem conhecimentos importantes sobre o espectro do desenvolvimento neurocognitivo e do cérebro típico e não típico, nesse trabalho nós utilizamos uma análise multivariada chamada de *Parallel Independent Component Analysis* (p-ICA) para investigar efeitos genéticos e ambientais na variação de densidade de matéria cinzenta encefálica. Com essa análise foi possível captar associações entre as variações de padrões de componentes genético (escore poligênico) e variações de matéria cinzenta encefálica (MRI estrutural) de forma sistemática, levando em consideração a influência da exposição a adversidades precoce. Embora a exposição a adversidade não tenha influenciado aspectos anatômicos analisados, os achados dessa abordagem apontam que um sub-grupo de SNPs que foram utilizados no ePRS do transportador de serotonina são significativamente associados a variação de densidade de matéria cinzenta de regiões corticais envolvidas em funções executivas. Ao analisar os SNPs envolvidos nessas associações, observamos que grande parte deles estão relacionados a funções de regulação e desenvolvimento do sistema nervoso central. De fato, estudos de neuroimagem demonstram a importância do aumento de densidade de matéria cinzenta, desde a infância até o início da vida adulta, para o desenvolvimento de funções cognitivas

(Gennatas et al., 2017). Nesse sentido, nossos achados apontam que a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala tem um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso, sugerindo que variações na funcionalidade dessa rede podem contribuir substancialmente para o curso adequado da densidade de matéria cinzenta encefálica, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de transtornos de neurodesenvolvimento, tais como o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

Em conjunto, tais resultados apontam que a exposição a adversidades no início da vida predispõe indivíduos a prejuízos cognitivos associados à atenção e hiperatividade e que a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala é um importante modulador dessa associação, possivelmente pelo envolvimento desses genes em processos de metilação de DNA, consequente função gênica, e de desenvolvimento do sistema nervoso central. As evidências da associação entre o ePRS do transportador de serotonina na amígdala com transtornos de neurodesenvolvimento possivelmente se devem a questões metodológicas associadas à criação do escore. O cálculo do ePRS consiste em um procedimento que integra três diferentes sistemas de coleta e organização de dados para identificar redes de genes de uma região encefálica específica, como a amígdala em nossas análises. O primeiro método é utilizado na fase inicial para identificação de genes co-expressos com o gene alvo (utilizando dados de camundongos), o segundo, para filtrar o padrão de expressão de desenvolvimento específico, selecionando os genes que são mais intensamente expressos em um determinado período de desenvolvimento e, finalmente, o terceiro, para integrar os dados com a coorte alvo (Hari Dass et al., 2019).

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que a exposição a adversidades no início da vida predispõe indivíduos a alterações neuroquímicas, epigenéticas e anátomo-funcionais, provocando alterações de comportamento alimentar e processos cognitivos como atenção e hiperatividade ao longo da vida (Figura 3). Um importante paralelo a ser feito com o nosso escore de adversidade é a exposição à pandemia de COVID-19, que teve início no ano de 2020 e já segue com um ano de recomendações restritas de distanciamento social. De fato, estima-se que alterações globais de funcionamento da sociedade terão impactos significativos no desenvolvimento de crianças. Atualmente, sabe-se que crianças apresentam níveis elevados de ansiedade e medo durante a pandemia de corona-vírus (Pierce et al., 2020). Entretanto, o impacto de um mesmo estressor pode ser diferente para cada indivíduo quando consideramos fatores socioeconômicos e



familiares, como avaliado em nosso escore. Por exemplo, o isolamento social por si, em idades específicas, tem efeitos estressantes e negativos sobre o desenvolvimento geral e de saúde mental de crianças. Em todo o mundo, crianças foram isoladas de seus pares, escolas e atividades que estimulam o seu desenvolvimento sensorial, motor e cognitivo. Além disso, a pandemia destacou e evidenciou desigualdades socioeconômicas, tornando esse período um possível somatório de adversidades. Por exemplo, enquanto algumas crianças foram expostas ao isolamento total de pares, outras tinham irmãos ou familiares da mesma faixa etária, o que diminuiu o nível de isolamento por si. Por outro lado, algumas crianças foram totalmente isoladas do ensino convencional e remoto, uma vez que algumas escolas, por dificuldades econômicas ou estratégicas, não conseguiram realizar o ensino remoto. Nesse mesmo sentido, outras crianças, embora também de forma não convencional, foram submetidas a ensino remoto no modo emergencial. Diferenças nas rendas familiares durante o período de pandemia foram ainda mais exacerbadas, em especial observando-se a falta de renda fixa, que levou muitas famílias à falta de suprimentos básicos, como comida, água, saneamento, moradia segura e acesso a cuidados de saúde. Além disso, muitas crianças perderam pais ou cuidadores. Todos esses fatores em conjunto podem ser somatórios e contribuir desproporcionalmente para um mesmo fator de estresse. Considerando nossos achados com os escores de adversidade, estratégias para identificar crianças em risco serão fundamentais e poderão direcionar políticas públicas em um período pós-pandemia.

Em suma, nesta tese, por meio de um estudo translacional, identificamos um perfil genético e funcional associado à sinalização da leptina no córtex pré-frontal como um importante modulador dos efeitos de experiências adversas no comportamento alimentar. Por outro lado, evidências consistentes em nossos achados apontam que a funcionalidade da rede de genes co-expressos com o transportador de serotonina na amígdala é importante para resiliência ou risco aumentado de desenvolver psicopatologias ao longo da vida, interagindo com a presença de adversidades precoces. Nesse sentido, os resultados deste trabalho sugerem que 5-HTT-ePRS é um forte modulador e possível preditor de processos de atenção e impulsividade, associado à qualidade do ambiente nos períodos iniciais da vida. Como método não invasivo, a ferramenta ePRS pode ser investigada para permitir a identificação e intervenção precoce para crianças com TDAH ou em risco para desenvolvimento de obesidade e transtornos alimentares.

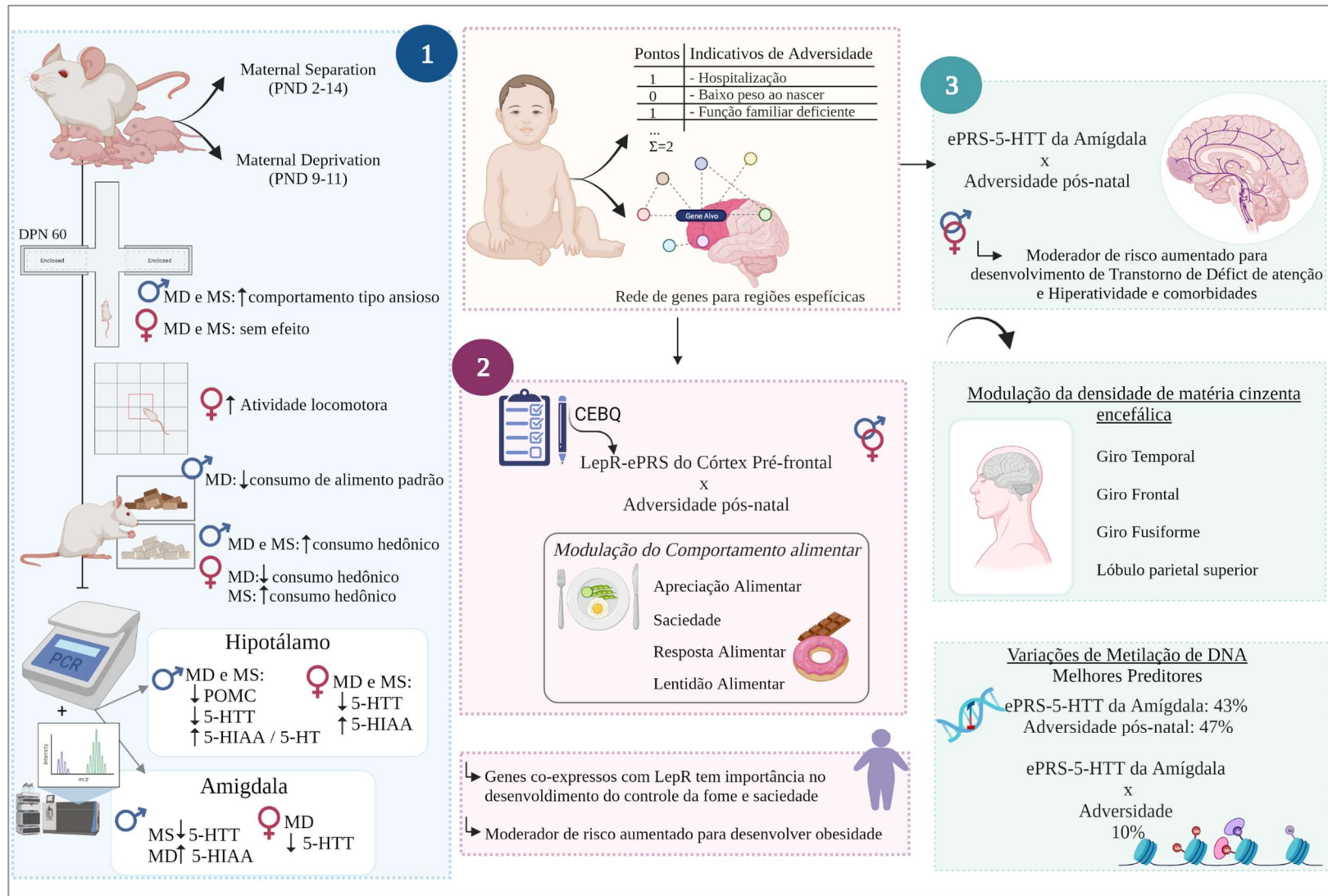


Figura 3: Estudo translacional dos efeitos do estresse precoce na programação do comportamento alimentar e de processos cognitivos. Revisão dos achados dessa tese. Cada capítulo foi demarcado com o número, seguindo a sequência temporal em que foram executados. Criado com BioRender.com.

## **7. Conclusões**

---

❖ A exposição à diferentes protocolos de estresse nas duas primeiras semanas de vida induziu alterações de comportamento alimentar hedônico e homeostático, comportamento tipo-ansioso e alteração de peso corporal. Possivelmente decorrente de alterações de neuropeptídeos hipotalâmicos e em sistemas monoaminérgicos. Entretanto, o tipo de estresse, ao qual os animais foram submetidos, e o sexo dos animais contribuíram substancialmente para os fenótipos analisados.

❖ A interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal modulou comportamentos alimentares, mas não influenciou marcadores metabólicos periféricos. Com relação a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina no hipotálamo, nenhum efeito de interação com adversidades no início da vida foi observado, confirmando a especificidade dessa rede no córtex pré-frontal para modular os efeitos de adversidades no início da vida às respostas alimentares.

❖ A interação entre adversidades no início da vida e a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala modula comportamentos relacionados à atenção e hiperatividade e comportamentos de externalização. Além disso, tanto adversidades quando o ePRS do transportador de serotonina e sua interação foram associadas a variações de metilações de DNA ao longo do genoma. Os SNPs dessa rede também são associados com densidade da matéria cinzenta encefálica, confirmando que a rede de genes co-expressos com o transportador de serotonina na amígdala é um importante modulador da resiliência ou risco de desenvolver Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade ao interagir com fatores ambientais.

## **8. Perspectivas**

---

- ❖ Os resultados demonstram que fêmeas submetidas a privação materna apresentam alteração de comportamento alimentar hedônico sugestivas de comportamento tipo-depressivo. Dessa forma, uma perspectiva é avaliar os efeitos do estresse de privação materna nos PND 9 e 11 no comportamento tipo-depressivo de fêmeas na idade adulta, considerando também o comportamento materno em períodos iniciais de vida, uma vez que parte dos efeitos sexo-específicos pode ser decorrente de alterações de cuidado materno.
- ❖ Investigar funções biológicas de genes centrais na rede que se co-expressa com o receptor de leptina no córtex pré-frontal, considerando que o efeito modulador da rede de genes se deve à função de genes centrais.
- ❖ Observamos diferenças sexo-específicas em adultos em nossos modelos com animais, entretanto esses resultados não foram observados em nossos estudos em humanos. Dessa forma, faz-se necessário analisar os efeitos da interação da rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina e adversidade no início da vida no comportamento alimentar de adultos, considerando parâmetros metabólicos, cognitivos e comportamentais e diferenças sexo-específicas.
- ❖ Validar a hipótese de que a interação entre a rede de genes que se co-expressa com o receptor de leptina e adversidades no início da vida modula o comportamento alimentar, por meio do bloqueio da expressão, na idade adulta, da rede de genes funcionalmente relacionados ao receptor de leptina no córtex pré-frontal de animais submetidos ao estresse no início da vida, e análise dos efeitos comportamentais e neuroquímicos desse bloqueio, considerando diferenças sexo-específicas.
- ❖ Considerando que diferenças sexo-específicas podem aparecer em determinadas fases do desenvolvimento, como a após a puberdade, propomos analisar os efeitos da interação entre a rede de genes que se co-expressa com o transportador de serotonina na amígdala e adversidades no início da vida em parâmetros cognitivos de adultos.

## **9. Referências bibliográficas**

---

- Acosta, D. F., Gomes, V. L., Kerber, N. P., & da Costa, C. F. (2012). [The effects, beliefs and practices of puerperal women's self-care]. *Rev Esc Enferm USP*, *46*(6), 1327-1333. doi:10.1590/s0080-62342012000600007
- Adam, T. C., & Epel, E. S. (2007). Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav*, *91*(4), 449-458. doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.011
- Afifi, T. O., Mota, N. P., Dasiewicz, P., MacMillan, H. L., & Sareen, J. (2012). Physical punishment and mental disorders: results from a nationally representative US sample. *Pediatrics*, *130*(2), 184-192. doi:10.1542/peds.2011-2947
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., & Flier, J. S. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest*, *101*(5), 1020-1027. doi:10.1172/JCI1176
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (V. Arlington Ed. 5th ed.). Washington, DC.
- Anda, R. F., Croft, J. B., Felitti, V. J., Nordenberg, D., Giles, W. H., Williamson, D. F., & Giovino, G. A. (1999). Adverse childhood experiences and smoking during adolescence and adulthood. *JAMA*, *282*(17), 1652-1658. doi:10.1001/jama.282.17.1652
- Barker, D. J., Winter, P. D., Osmond, C., Margetts, B., & Simmonds, S. J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, *2*(8663), 577-580. doi:10.1016/s0140-6736(89)90710-1
- Barkley, R. A. (1997). Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull*, *121*(1), 65-94. doi:10.1037/0033-2909.121.1.65
- Barth, B., Bizarro, L., Miguel, P. M., Dube, L., Levitan, R., O'Donnell, K., . . . Silveira, P. P. (2020). Genetically predicted gene expression of prefrontal DRD4 gene and the differential susceptibility to childhood emotional eating in response to positive environment. *Appetite*, *148*, 104594. doi:10.1016/j.appet.2020.104594
- Beijers, R., Miragall, M., van den Berg, Y., Konttinen, H., & van Strien, T. (2021). Parent-Infant Attachment Insecurity and Emotional Eating in Adolescence: Mediation through Emotion Suppression and Alexithymia. *Nutrients*, *13*(5). doi:10.3390/nu13051662
- Belsky, J., Bakermans-Kranenburg, M. J., & van Ijzendoorn, M. H. (2007). For Better and For Worse: Differential Susceptibility to Environmental Influences. *Current Directions in Psychological Science*, *16*(6), 300-304. doi:10.1111/j.1467-8721.2007.00525.x
- Belsky, J., & Hartman, S. (2014). Gene-environment interaction in evolutionary perspective: differential susceptibility to environmental influences. *World Psychiatry*, *13*(1), 87-89. doi:10.1002/wps.20092
- Bouvette-Turcot, A. A., Unternaehrer, E., Gaudreau, H., Lydon, J. E., Steiner, M., Meaney, M. J., & Team, M. R. (2017). The joint contribution of maternal history of early adversity and adulthood depression to socioeconomic status and potential relevance for offspring development. *J Affect Disord*, *207*, 26-31. doi:10.1016/j.jad.2016.08.012
- Castellanos, F. X., Lee, P. P., Sharp, W., Jeffries, N. O., Greenstein, D. K., Clasen, L. S., . . . Rapoport, J. L. (2002). Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA*, *288*(14), 1740-1748. doi:10.1001/jama.288.14.1740
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D., & Miller, G. E. (2007). Psychological stress and disease. *JAMA*, *298*(14), 1685-1687. doi:10.1001/jama.298.14.1685



- Cook, E. H., Jr., Stein, M. A., Krasowski, M. D., Cox, N. J., Olkon, D. M., Kieffer, J. E., & Leventhal, B. L. (1995). Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet*, *56*(4), 993-998. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7717410>
- Couto-Pereira, N. S., Lampert, C., Vieira, A. D. S., Lazzaretti, C., Kincheski, G. C., Espejo, P. J., . . . Dalmaz, C. (2019). Resilience and Vulnerability to Trauma: Early Life Interventions Modulate Aversive Memory Reconsolidation in the Dorsal Hippocampus. *Front Mol Neurosci*, *12*, 134. doi:10.3389/fnmol.2019.00134
- Craske, M. G., Stein, M. B., Eley, T. C., Milad, M. R., Holmes, A., Rapee, R. M., & Wittchen, H. U. (2017). Anxiety disorders. *Nat Rev Dis Primers*, *3*, 17024. doi:10.1038/nrdp.2017.24
- Curran, K. P., & Chalasani, S. H. (2012). Serotonin circuits and anxiety: what can invertebrates teach us? *Invert Neurosci*, *12*(2), 81-92. doi:10.1007/s10158-012-0140-y
- Currie, P. J., Coiro, C. D., Niyomchai, T., Lira, A., & Farahmand, F. (2002). Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. *Pharmacol Biochem Behav*, *71*(4), 709-716. doi:10.1016/s0091-3057(01)00671-2
- Dallman, M. F. (2010). Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab*, *21*(3), 159-165. doi:10.1016/j.tem.2009.10.004
- Daniels, W. M., Pietersen, C. Y., Carstens, M. E., & Stein, D. J. (2004). Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis*, *19*(1-2), 3-14. doi:10.1023/b:mebr.0000027412.19664.b3
- de Quervain, D., Schwabe, L., & Roozendaal, B. (2017). Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nat Rev Neurosci*, *18*(1), 7-19. doi:10.1038/nrn.2016.155
- Demontis, D., Walters, R. K., Martin, J., Mattheisen, M., Als, T. D., Agerbo, E., . . . Neale, B. M. (2019). Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet*, *51*(1), 63-75. doi:10.1038/s41588-018-0269-7
- Diehl, L. A., Pereira Nde, S., Laureano, D. P., Benitz, A. N., Noschang, C., Ferreira, A. G., . . . Dalmaz, C. (2014). Contextual fear conditioning in maternal separated rats: the amygdala as a site for alterations. *Neurochem Res*, *39*(2), 384-393. doi:10.1007/s11064-013-1230-x
- do Prado, C. H., Narahari, T., Holland, F. H., Lee, H. N., Murthy, S. K., & Brenhouse, H. C. (2016). Effects of early adolescent environmental enrichment on cognitive dysfunction, prefrontal cortex development, and inflammatory cytokines after early life stress. *Dev Psychobiol*, *58*(4), 482-491. doi:10.1002/dev.21390
- dos Passos, D. R., Gigante, D. P., Maciel, F. V., & Matijasevich, A. (2015). [Children's eating behaviour: comparison between normal and overweight children from a school in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil]. *Rev Paul Pediatr*, *33*(1), 42-49. doi:10.1016/j.rpped.2014.11.007
- Dunn, E. C., Soare, T. W., Zhu, Y., Simpkin, A. J., Suderman, M. J., Klengel, T., . . . Relton, C. L. (2019). Sensitive Periods for the Effect of Childhood Adversity on DNA Methylation: Results From a Prospective, Longitudinal Study. *Biol Psychiatry*, *85*(10), 838-849. doi:10.1016/j.biopsych.2018.12.023
- Dunsmoor, J. E., & Paz, R. (2015). Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. *Biol Psychiatry*, *78*(5), 336-343. doi:10.1016/j.biopsych.2015.04.010

- DuPaul, G. J., Gormley, M. J., & Laracy, S. D. (2013). Comorbidity of LD and ADHD: implications of DSM-5 for assessment and treatment. *J Learn Disabil*, *46*(1), 43-51. doi:10.1177/0022219412464351
- Ellenbroek, B. A., van den Kroonenberg, P. T., & Cools, A. R. (1998). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res*, *30*(3), 251-260. doi:10.1016/s0920-9964(97)00149-7
- Engin, A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*, *960*, 1-17. doi:10.1007/978-3-319-48382-5\_1
- Escobar, R. S., O'Donnell, K. A., Colalillo, S., Pawlby, S., Steiner, M., Meaney, M. J., . . . Team, M. S. (2014). Better quality of mother-child interaction at 4 years of age decreases emotional overeating in IUGR girls. *Appetite*, *81*, 337-342. doi:10.1016/j.appet.2014.06.107
- Essex, M. J., Shirtcliff, E. A., Burk, L. R., Ruttle, P. L., Klein, M. H., Slattery, M. J., . . . Armstrong, J. M. (2011). Influence of early life stress on later hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning and its covariation with mental health symptoms: a study of the allostatic process from childhood into adolescence. *Dev Psychopathol*, *23*(4), 1039-1058. doi:10.1017/S0954579411000484
- Faraone, S. V., Asherson, P., Banaschewski, T., Biederman, J., Buitelaar, J. K., Ramos-Quiroga, J. A., . . . Franke, B. (2015). Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers*, *1*, 15020. doi:10.1038/nrdp.2015.20
- Faraone, S. V., Biederman, J., Mick, E., Williamson, S., Wilens, T., Spencer, T., . . . Zallen, B. (2000). Family study of girls with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, *157*(7), 1077-1083. doi:10.1176/appi.ajp.157.7.1077
- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A., & Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, *57*(11), 1313-1323. doi:10.1016/j.biopsych.2004.11.024
- Foster, M. T., Solomon, M. B., Huhman, K. L., & Bartness, T. J. (2006). Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *290*(5), R1284-1293. doi:10.1152/ajpregu.00437.2005
- Frankle, W. G., Huang, Y., Hwang, D. R., Talbot, P. S., Slifstein, M., Van Heertum, R., . . . Laruelle, M. (2004). Comparative evaluation of serotonin transporter radioligands 11C-DASB and 11C-McN 5652 in healthy humans. *J Nucl Med*, *45*(4), 682-694. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073266>
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, *395*(6704), 763-770. doi:10.1038/27376
- Gaiteri, C., Ding, Y., French, B., Tseng, G. C., & Sibille, E. (2014). Beyond modules and hubs: the potential of gene coexpression networks for investigating molecular mechanisms of complex brain disorders. *Genes Brain Behav*, *13*(1), 13-24. doi:10.1111/gbb.12106
- Gehrand, A. L., Hoeyneck, B., Jablonski, M., Leonovicz, C., Ye, R., Scherer, P. E., & Raff, H. (2016). Sex differences in adult rat insulin and glucose responses to arginine: programming effects of neonatal separation, hypoxia, and hypothermia. *Physiol Rep*, *4*(18). doi:10.14814/phy2.12972
- Gennatas, E. D., Avants, B. B., Wolf, D. H., Satterthwaite, T. D., Ruparel, K., Ciric, R., . . . Gur, R. C. (2017). Age-Related Effects and Sex Differences in Gray Matter Density, Volume, Mass, and Cortical Thickness from Childhood to Young Adulthood. *J Neurosci*, *37*(20), 5065-5073. doi:10.1523/JNEUROSCI.3550-16.2017

- Gentner, M. B., & Leppert, M. L. O. (2019). Environmental influences on health and development: nutrition, substance exposure, and adverse childhood experiences. *Dev Med Child Neurol*, *61*(9), 1008-1014. doi:10.1111/dmcn.14149
- Gilmore, J. H., Knickmeyer, R. C., & Gao, W. (2018). Imaging structural and functional brain development in early childhood. *Nat Rev Neurosci*, *19*(3), 123-137. doi:10.1038/nrn.2018.1
- Gizer, I. R., Ficks, C., & Waldman, I. D. (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*, *126*(1), 51-90. doi:10.1007/s00439-009-0694-x
- Godoy, L. C., Frankfurter, C., Cooper, M., Lay, C., Maunder, R., & Farkouh, M. E. (2021). Association of Adverse Childhood Experiences With Cardiovascular Disease Later in Life: A Review. *JAMA Cardiol*, *6*(2), 228-235. doi:10.1001/jamacardio.2020.6050
- Golden, S. A., Covington, H. E., 3rd, Berton, O., & Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc*, *6*(8), 1183-1191. doi:10.1038/nprot.2011.361
- Grace, T., Bulsara, M., Robinson, M., & Hands, B. (2016). Early life events and motor development in childhood and adolescence: a longitudinal study. *Acta Paediatr*, *105*(5), e219-227. doi:10.1111/apa.13302
- Grzymislawska, M., Puch, E. A., Zawada, A., & Grzymislawski, M. (2020). Do nutritional behaviors depend on biological sex and cultural gender? *Adv Clin Exp Med*, *29*(1), 165-172. doi:10.17219/acem/111817
- Gunnar, M., & Quevedo, K. (2007). The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol*, *58*, 145-173. doi:10.1146/annurev.psych.58.110405.085605
- Halperin, J. M., Newcorn, J. H., Schwartz, S. T., Sharma, V., Siever, L. J., Koda, V. H., & Gabriel, S. (1997). Age-related changes in the association between serotonergic function and aggression in boys with ADHD. *Biol Psychiatry*, *41*(6), 682-689. doi:10.1016/S0006-3223(96)00168-0
- Hao, Y., Huang, W., Nielsen, D. A., & Kosten, T. A. (2011). Litter gender composition and sex affect maternal behavior and DNA methylation levels of the *oprm1* gene in rat offspring. *Front Psychiatry*, *2*, 21. doi:10.3389/fpsy.2011.00021
- Hari Dass, S. A., McCracken, K., Pokhvisneva, I., Chen, L. M., Garg, E., Nguyen, T. T. T., . . . Silveira, P. P. (2019). A biologically-informed polygenic score identifies endophenotypes and clinical conditions associated with the insulin receptor function on specific brain regions. *EBioMedicine*, *42*, 188-202. doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.051
- Hariri, A. R., Mattay, V. S., Tessitore, A., Kolachana, B., Fera, F., Goldman, D., . . . Weinberger, D. R. (2002). Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science*, *297*(5580), 400-403. doi:10.1126/science.1071829
- Harris, A. P., Holmes, M. C., de Kloet, E. R., Chapman, K. E., & Seckl, J. R. (2013). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(5), 648-658. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.08.007
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*, *49*(12), 1023-1039. doi:10.1016/s0006-3223(01)01157-x
- Hemmingson, E., Johansson, K., & Reynisdottir, S. (2014). Effects of childhood abuse on adult obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, *15*(11), 882-893. doi:10.1111/obr.12216

- Holland, J. F., Khandaker, G. M., Dauvermann, M. R., Morris, D., Zammit, S., & Donohoe, G. (2020). Effects of early life adversity on immune function and cognitive performance: results from the ALSPAC cohort. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, *55*(6), 723-733. doi:10.1007/s00127-019-01813-8
- Juruena, M. F., Erer, F., Cleare, A. J., & Young, A. H. (2020). The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. *Adv Exp Med Biol*, *1191*, 141-153. doi:10.1007/978-981-32-9705-0\_9
- Kalinichev, M. F., D. (2010). Maternal Deprivation. In M. L. M. George F. Koob, Richard F. Thompson (Ed.), *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (pp. 173-177). Academic Press.
- Katzman, M. A., Bilkey, T. S., Chokka, P. R., Fallu, A., & Klassen, L. J. (2017). Adult ADHD and comorbid disorders: clinical implications of a dimensional approach. *BMC Psychiatry*, *17*(1), 302. doi:10.1186/s12888-017-1463-3
- Ketzer, C. R., Gallois, C., Martinez, A. L., Rohde, L. A., & Schmitz, M. (2012). Is there an association between perinatal complications and attention-deficit/hyperactivity disorder-inattentive type in children and adolescents? *Braz J Psychiatry*, *34*(3), 321-328. doi:10.1016/j.rbp.2012.01.001
- Kim, E. Y., Choi, J. E., Kim, M., Hong, J., & Park, Y. (2020). N-3 PUFA Have Antidepressant-like Effects Via Improvement of the HPA-Axis and Neurotransmission in Rats Exposed to Combined Stress. *Mol Neurobiol*, *57*(9), 3860-3874. doi:10.1007/s12035-020-01980-9
- Kolb, B., Harker, A., & Gibb, R. (2017). Principles of plasticity in the developing brain. *Dev Med Child Neurol*, *59*(12), 1218-1223. doi:10.1111/dmcn.13546
- Leibowitz, S. F., & Alexander, J. T. (1998). Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry*, *44*(9), 851-864. doi:10.1016/s0006-3223(98)00186-3
- Leo, D., & Gainetdinov, R. R. (2013). Transgenic mouse models for ADHD. *Cell Tissue Res*, *354*(1), 259-271. doi:10.1007/s00441-013-1639-1
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav*, *73*(3), 255-260. doi:10.1016/s0031-9384(01)00496-6
- Levitan, R. D., Jansen, P., Wendland, B., Tiemeier, H., Jaddoe, V. W., Silveira, P. P., . . . Meaney, M. (2017). A DRD4 gene by maternal sensitivity interaction predicts risk for overweight or obesity in two independent cohorts of preschool children. *J Child Psychol Psychiatry*, *58*(2), 180-188. doi:10.1111/jcpp.12646
- Lorsch, Z. S., Hamilton, P. J., Ramakrishnan, A., Parise, E. M., Salery, M., Wright, W. J., . . . Nestler, E. J. (2019). Stress resilience is promoted by a Zfp189-driven transcriptional network in prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, *22*(9), 1413-1423. doi:10.1038/s41593-019-0462-8
- Lumeng, J. C., Wendorf, K., Pesch, M. H., Appugliese, D. P., Kaciroti, N., Corwyn, R. F., & Bradley, R. H. (2013). Overweight adolescents and life events in childhood. *Pediatrics*, *132*(6), e1506-1512. doi:10.1542/peds.2013-1111
- Luo, Z. Y., Huang, L., Lin, S., Yin, Y. N., Jie, W., Hu, N. Y., . . . Gao, T. M. (2020). Erbin in Amygdala Parvalbumin-Positive Neurons Modulates Anxiety-like Behaviors. *Biol Psychiatry*, *87*(10), 926-936. doi:10.1016/j.biopsych.2019.10.021

- Luz, A. M., Berni, N. I., & Selli, L. (2007). [Myths and taboos of motherhood: focusing on the health-disease process]. *Rev Bras Enferm*, *60*(1), 42-48. doi:10.1590/s0034-71672007000100008
- Machado, T. D., Dalle Molle, R., Laureano, D. P., Portella, A. K., Werlang, I. C., Benetti Cda, S., . . . Silveira, P. P. (2013). Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for "comfort foods" in adult female rats. *Stress*, *16*(5), 549-556. doi:10.3109/10253890.2013.816841
- Mandy, M., & Nyirenda, M. (2018). Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *Int Health*, *10*(2), 66-70. doi:10.1093/inthealth/ihy006
- Maniam, J., & Morris, M. J. (2010). Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology*, *35*(5), 717-728. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.10.013
- Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. (2009). The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am*, *32*(3), 549-575. doi:10.1016/j.psc.2009.05.004
- McEwen, B. S. (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*, *338*(3), 171-179. doi:10.1056/NEJM199801153380307
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, *87*(3), 873-904. doi:10.1152/physrev.00041.2006
- McIntosh, J., Anisman, H., & Merali, Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res*, *113*(1-2), 97-106. doi:10.1016/s0165-3806(99)00005-x
- McIntosh, L. J., & Sapolsky, R. M. (1996). Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology*, *17*(3-4), 873-882. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9086511>
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci*, *24*, 1161-1192. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1161
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., Tatarewicz, J. E., & Sapolsky, R. M. (2013). Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav Neurosci*, *127*(5), 637-641. doi:10.1037/a0034187
- Miguel, P. M., Deniz, B. F., Confortim, H. D., Bronauth, L. P., de Oliveira, B. C., Alves, M. B., . . . Pereira, L. O. (2019). Methylphenidate administration reverts attentional inflexibility in adolescent rats submitted to a model of neonatal hypoxia-ischemia: Predictive validity for ADHD study. *Exp Neurol*, *315*, 88-99. doi:10.1016/j.expneurol.2019.02.004
- Miguel, P. M., Pereira, L. O., Barth, B., de Mendonca Filho, E. J., Pokhvisneva, I., Nguyen, T. T. T., . . . Silveira, P. P. (2019). 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*, *86*(8), 621-630. doi:10.1016/j.biopsych.2019.03.983
- Mikkelsen, S. H., Olsen, J., Bech, B. H., Wu, C., Liew, Z., Gissler, M., . . . Arah, O. (2017). Birth asphyxia measured by the pH value of the umbilical cord blood may predict an increased risk of attention deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr*, *106*(6), 944-952. doi:10.1111/apa.13807
- Mill, J., & Petronis, A. (2008). Pre- and peri-natal environmental risks for attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): the potential role of epigenetic processes in mediating

- susceptibility. *J Child Psychol Psychiatry*, 49(10), 1020-1030. doi:10.1111/j.1469-7610.2008.01909.x
- Millington, G. W. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)*, 4, 18. doi:10.1186/1743-7075-4-18
- Millstein, R. A., & Holmes, A. (2007). Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev*, 31(1), 3-17. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.05.003
- Ministério da Saúde. (2011). *Atenção humanizada ao recém-nascido: Método Canguru* (K. Silva & T. Alcântara Eds. Vol. 3).
- Minzenberg, M. J. (2012). Pharmacotherapy for attention-deficit/hyperactivity disorder: from cells to circuits. *Neurotherapeutics*, 9(3), 610-621. doi:10.1007/s13311-012-0128-7
- Miragaia, A. S., de Oliveira Wertheimer, G. S., Consoli, A. C., Cabbia, R., Longo, B. M., Girardi, C. E. N., & Suchecki, D. (2018). Maternal Deprivation Increases Anxiety- and Depressive-Like Behaviors in an Age-Dependent Fashion and Reduces Neuropeptide Y Expression in the Amygdala and Hippocampus of Male and Female Young Adult Rats. *Front Behav Neurosci*, 12, 159. doi:10.3389/fnbeh.2018.00159
- Mizuno, T. M., Kleopoulos, S. P., Bergen, H. T., Roberts, J. L., Priest, C. A., & Mobbs, C. V. (1998). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes*, 47(2), 294-297. doi:10.2337/diab.47.2.294
- Moore, C. L., & Morelli, G. A. (1979). Mother rats interact differently with male and female offspring. *J Comp Physiol Psychol*, 93(4), 677-684. doi:10.1037/h0077599
- Morales-Medina, J. C., Dumont, Y., & Quirion, R. (2010). A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Res*, 1314, 194-205. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.077
- Morris, M. J., Beilharz, J. E., Maniam, J., Reichelt, A. C., & Westbrook, R. F. (2015). Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, 58, 36-45. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.12.002
- Murthy, S., & Gould, E. (2018). Early Life Stress in Rodents: Animal Models of Illness or Resilience? *Front Behav Neurosci*, 12, 157. doi:10.3389/fnbeh.2018.00157
- Newman, M. G., Llera, S. J., Erickson, T. M., Przeworski, A., & Castonguay, L. G. (2013). Worry and generalized anxiety disorder: a review and theoretical synthesis of evidence on nature, etiology, mechanisms, and treatment. *Annu Rev Clin Psychol*, 9, 275-297. doi:10.1146/annurev-clinpsy-050212-185544
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., & Sasagawa, T. (2014). Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci*, 8, 166. doi:10.3389/fnins.2014.00166
- Noll, J. G., Zeller, M. H., Trickett, P. K., & Putnam, F. W. (2007). Obesity risk for female victims of childhood sexual abuse: a prospective study. *Pediatrics*, 120(1), e61-67. doi:10.1542/peds.2006-3058
- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 11, 165-175. doi:10.2147/NDT.S58841
- Nylander, I., & Roman, E. (2013). Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? *Psychopharmacology (Berl)*, 229(4), 555-569. doi:10.1007/s00213-013-3217-3

- Oquendo, M. A., Hastings, R. S., Huang, Y. Y., Simpson, N., Ogden, R. T., Hu, X. Z., . . . Parsey, R. V. (2007). Brain serotonin transporter binding in depressed patients with bipolar disorder using positron emission tomography. *Arch Gen Psychiatry*, *64*(2), 201-208. doi:10.1001/archpsyc.64.2.201
- Otowa, T., York, T. P., Gardner, C. O., Kendler, K. S., & Hettema, J. M. (2014). The impact of childhood parental loss on risk for mood, anxiety and substance use disorders in a population-based sample of male twins. *Psychiatry Res*, *220*(1-2), 404-409. doi:10.1016/j.psychres.2014.07.053
- Parikshak, N. N., Gandal, M. J., & Geschwind, D. H. (2015). Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Genet*, *16*(8), 441-458. doi:10.1038/nrg3934
- Perlroth, N. H., & Castelo Branco, C. W. (2017). Current knowledge of environmental exposure in children during the sensitive developmental periods. *J Pediatr (Rio J)*, *93*(1), 17-27. doi:10.1016/j.jped.2016.07.002
- Pessoa, L. (2010). Emotion and cognition and the amygdala: from "what is it?" to "what's to be done?". *Neuropsychologia*, *48*(12), 3416-3429. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2010.06.038
- Picard, M., McEwen, B. S., Epel, E. S., & Sandi, C. (2018). An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol*, *49*, 72-85. doi:10.1016/j.yfrne.2018.01.001
- Pierce, M., Hope, H., Ford, T., Hatch, S., Hotopf, M., John, A., . . . Abel, K. M. (2020). Mental health before and during the COVID-19 pandemic: a longitudinal probability sample survey of the UK population. *Lancet Psychiatry*, *7*(10), 883-892. doi:10.1016/S2215-0366(20)30308-4
- Poole, J. C., Dobson, K. S., & Pusch, D. (2017). Anxiety among adults with a history of childhood adversity: Psychological resilience moderates the indirect effect of emotion dysregulation. *J Affect Disord*, *217*, 144-152. doi:10.1016/j.jad.2017.03.047
- Pryce, C. R., & Feldon, J. (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, *27*(1-2), 57-71. doi:10.1016/s0149-7634(03)00009-5
- Puig, M. V., & Gullledge, A. T. (2011). Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol*, *44*(3), 449-464. doi:10.1007/s12035-011-8214-0
- Qiu, J., Xue, C., Bosch, M. A., Murphy, J. G., Fan, W., Ronnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2007). Serotonin 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons: role in energy homeostasis in females. *Mol Pharmacol*, *72*(4), 885-896. doi:10.1124/mol.107.038083
- Raff, H., Hoeynck, B., Jablonski, M., Leonovicz, C., Phillips, J. M., & Gehrand, A. L. (2018). Insulin sensitivity, leptin, adiponectin, resistin, and testosterone in adult male and female rats after maternal-neonatal separation and environmental stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *314*(1), R12-R21. doi:10.1152/ajpregu.00271.2017
- Ramasubramanian, L., Lane, S., & Rahman, A. (2013). The association between maternal serious psychological distress and child obesity at 3 years: a cross-sectional analysis of the UK Millennium Cohort Data. *Child Care Health Dev*, *39*(1), 134-140. doi:10.1111/j.1365-2214.2011.01325.x
- Ravelli, G. P., Stein, Z. A., & Susser, M. W. (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, *295*(7), 349-353. doi:10.1056/NEJM197608122950701



- Roth, R. M., Wishart, H. A., Flashman, L. A., Riordan, H. J., Huey, L., & Saykin, A. J. (2004). Contribution of organizational strategy to verbal learning and memory in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychology, 18*(1), 78-84. doi:10.1037/0894-4105.18.1.78
- Rubia, K. (2007). Neuro-anatomic evidence for the maturational delay hypothesis of ADHD. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(50), 19663-19664. doi:10.1073/pnas.0710329105
- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licon-Limon, P., Jose Valdez-Alarcon, J., & Lajud, N. (2018). Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology, 96*, 203-211. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.07.012
- Russell, G., & Lightman, S. (2019). The human stress response. *Nat Rev Endocrinol, 15*(9), 525-534. doi:10.1038/s41574-019-0228-0
- Sanders, S. K., & Shekhar, A. (1995). Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav, 52*(4), 701-706. doi:10.1016/0091-3057(95)00153-n
- Sareen, J., Henriksen, C. A., Bolton, S. L., Afifi, T. O., Stein, M. B., & Asmundson, G. J. (2013). Adverse childhood experiences in relation to mood and anxiety disorders in a population-based sample of active military personnel. *Psychol Med, 43*(1), 73-84. doi:10.1017/S003329171200102X
- Sayal, K., Prasad, V., Daley, D., Ford, T., & Coghill, D. (2018). ADHD in children and young people: prevalence, care pathways, and service provision. *Lancet Psychiatry, 5*(2), 175-186. doi:10.1016/S2215-0366(17)30167-0
- Selye, H. (1998). A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 10*(2), 230-231. doi:10.1176/jnp.10.2.230a
- Shaw, P., Lerch, J., Greenstein, D., Sharp, W., Clasen, L., Evans, A., . . . Rapoport, J. (2006). Longitudinal mapping of cortical thickness and clinical outcome in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry, 63*(5), 540-549. doi:10.1001/archpsyc.63.5.540
- Sherwood, N. E., & Jeffery, R. W. (2000). The behavioral determinants of exercise: implications for physical activity interventions. *Annu Rev Nutr, 20*, 21-44. doi:10.1146/annurev.nutr.20.1.21
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Assis, S. A., Nieto, F. B., Diehl, L. A., Crema, L. M., . . . Dalmaz, C. (2010). Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci, 28*(1), 111-118. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.08.018
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Crema, L., Correa, M., Nieto, F. B., Diehl, L., . . . Dalmaz, C. (2008). Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. *Physiol Behav, 93*(4-5), 877-882. doi:10.1016/j.physbeh.2007.12.003
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Goldani, M. Z., & Barbieri, M. A. (2007). Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr (Rio J), 83*(6), 494-504. doi:10.2223/JPED.1728
- Sowell, E. R., Thompson, P. M., & Toga, A. W. (2004). Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist, 10*(4), 372-392. doi:10.1177/1073858404263960
- Stanton, C. H., Holmes, A. J., Chang, S. W. C., & Joormann, J. (2019). From Stress to Anhedonia: Molecular Processes through Functional Circuits. *Trends Neurosci, 42*(1), 23-42. doi:10.1016/j.tins.2018.09.008



- Su, S., Jimenez, M. P., Roberts, C. T., & Loucks, E. B. (2015). The role of adverse childhood experiences in cardiovascular disease risk: a review with emphasis on plausible mechanisms. *Curr Cardiol Rep*, *17*(10), 88. doi:10.1007/s11886-015-0645-1
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., . . . Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(43), 15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
- Suglia, S. F., Koenen, K. C., Boynton-Jarrett, R., Chan, P. S., Clark, C. J., Danese, A., . . . Outcomes, R. (2018). Childhood and Adolescent Adversity and Cardiometabolic Outcomes: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, *137*(5), e15-e28. doi:10.1161/CIR.0000000000000536
- Szyf, M. (2011). The early life social environment and DNA methylation: DNA methylation mediating the long-term impact of social environments early in life. *Epigenetics*, *6*(8), 971-978. doi:10.4161/epi.6.8.16793
- Thapar, A., & Cooper, M. (2016). Attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet*, *387*(10024), 1240-1250. doi:10.1016/S0140-6736(15)00238-X
- Thapar, A., Cooper, M., Eyre, O., & Langley, K. (2013). What have we learnt about the causes of ADHD? *J Child Psychol Psychiatry*, *54*(1), 3-16. doi:10.1111/j.1469-7610.2012.02611.x
- Timper, K., & Bruning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech*, *10*(6), 679-689. doi:10.1242/dmm.026609
- Tractenberg, S. G., Levandowski, M. L., de Azeredo, L. A., Orso, R., Roithmann, L. G., Hoffmann, E. S., . . . Grassi-Oliveira, R. (2016). An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, *68*, 489-503. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.06.021
- Truitt, W. A., Johnson, P. L., Dietrich, A. D., Fitz, S. D., & Shekhar, A. (2009). Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. *Neuroscience*, *160*(2), 284-294. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.01.083
- Trujillo, V., Durando, P. E., & Suarez, M. M. (2016). Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: effects of tianeptine. *Stress*, *19*(1), 91-103. doi:10.3109/10253890.2015.1105958
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, *53*(4), 865-871. doi:10.1016/s0022-3999(02)00429-4
- Tully, P. J., Harrison, N. J., Cheung, P., & Cosh, S. (2016). Anxiety and Cardiovascular Disease Risk: a Review. *Curr Cardiol Rep*, *18*(12), 120. doi:10.1007/s11886-016-0800-3
- van der Meer, D., Hartman, C. A., Richards, J., Bralten, J. B., Franke, B., Oosterlaan, J., . . . Hoekstra, P. J. (2014). The serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR moderates the effects of stress on attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*, *55*(12), 1363-1371. doi:10.1111/jcpp.12240
- van Strien, T., Cebolla, A., Etchemendy, E., Gutierrez-Maldonado, J., Ferrer-Garcia, M., Botella, C., & Banos, R. (2013). Emotional eating and food intake after sadness and joy. *Appetite*, *66*, 20-25. doi:10.1016/j.appet.2013.02.016
- Ventura-Silva, A. P., Melo, A., Ferreira, A. C., Carvalho, M. M., Campos, F. L., Sousa, N., & Pego, J. M. (2013). Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate

- stress-induced anxiety behavior. *Front Behav Neurosci*, 7, 32. doi:10.3389/fnbeh.2013.00032
- Vidal, M., Cusick, M. E., & Barabasi, A. L. (2011). Interactome networks and human disease. *Cell*, 144(6), 986-998. doi:10.1016/j.cell.2011.02.016
- Viveros, M. P., Diaz, F., Mateos, B., Rodriguez, N., & Chowen, J. A. (2010). Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm Behav*, 57(4-5), 405-414. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.01.009
- Wadhwa, P. D., Buss, C., Entringer, S., & Swanson, J. M. (2009). Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med*, 27(5), 358-368. doi:10.1055/s-0029-1237424
- Wardle, J., Guthrie, C. A., Sanderson, S., & Rapoport, L. (2001). Development of the Children's Eating Behaviour Questionnaire. *J Child Psychol Psychiatry*, 42(7), 963-970. doi:10.1111/1469-7610.00792
- Wei, L., David, A., Duman, R. S., Anisman, H., & Kaffman, A. (2010). Early life stress increases anxiety-like behavior in Balb c mice despite a compensatory increase in levels of postnatal maternal care. *Horm Behav*, 57(4-5), 396-404. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.01.007
- Wendland, B. E., Atkinson, L., Steiner, M., Fleming, A. S., Pencharz, P., Moss, E., . . . Team, M. S. (2014). Low maternal sensitivity at 6 months of age predicts higher BMI in 48 month old girls but not boys. *Appetite*, 82, 97-102. doi:10.1016/j.appet.2014.07.012
- Wertheimer, G. S., Girardi, C. E., de Oliveira, A. S., Monteiro Longo, B., & Suchecki, D. (2016). Maternal deprivation alters growth, food intake, and neuropeptide Y in the hypothalamus of adolescent male and female rats. *Dev Psychobiol*, 58(8), 1066-1075. doi:10.1002/dev.21440
- WHO. (2017). *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*, Geneva. Retrieved from
- Wiegand, A., Kreifelts, B., Munk, M. H. J., Geiselhart, N., Ramadori, K. E., MacIsaac, J. L., . . . Nieratschker, V. (2021). DNA methylation differences associated with social anxiety disorder and early life adversity. *Transl Psychiatry*, 11(1), 104. doi:10.1038/s41398-021-01225-w
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52(2), 90-110. doi:10.1159/000087097
- Won, E., & Kim, Y. K. (2016). Stress, the Autonomic Nervous System, and the Immune-kynurenine Pathway in the Etiology of Depression. *Curr Neuropharmacol*, 14(7), 665-673. doi:10.2174/1570159x14666151208113006
- Xiao, Q., Xu, X., & Tu, J. (2020). Chronic optogenetic manipulation of basolateral amygdala astrocytes rescues stress-induced anxiety. *Biochem Biophys Res Commun*, 533(4), 657-664. doi:10.1016/j.bbrc.2020.09.106
- Xu, Y., Jones, J. E., Kohno, D., Williams, K. W., Lee, C. E., Choi, M. J., . . . Elmquist, J. K. (2008). 5-HT<sub>2</sub>CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron*, 60(4), 582-589. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.033
- Zanchi, D., Depoorter, A., Egloff, L., Haller, S., Mahlmann, L., Lang, U. E., . . . Borgwardt, S. (2017). The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 80, 457-475. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.06.013



## **10. Anexos**

---

**Anexo I: Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 33367

**Título:** Avaliação da influência do estresse neonatal sobre o comportamento alimentar e mecanismos envolvidos no controle do peso corporal

**Vigência:** 01/08/2017 à 28/02/2021

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

CARLA DALMAZ - coordenador desde 01/08/2017

Randriely Merscher Sobreira de Lima - Aluno de Doutorado desde 01/08/2017

**Equipe Externa:**

Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt - pesquisador desde 01/08/2017

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 09/11/2017 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 70 fêmeas e 30 machos, ratos Wistar (200 - 250 g) - provenientes de Biotério do Departamento de Bioquímica/ICBS/UFRGS para utilização de 117 machos e 117 fêmeas da prole gerada, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Sexta-Feira, 1 de Dezembro de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI

Coordenador da comissão de ética

**Anexo II: Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da  
Universidade Federal do Espírito Santo**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

# CERTIFICADO

**Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da Influência do estresse neonatal sobre o comportamento alimentar e mecanismos envolvidos no Controle do Peso Corporal ", Protocolo nº.26/2017, sob a responsabilidade de Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 01-09-2017.**

Vigência do Projeto	Início: Outubro/2017 Término:Dezembro/2020
Espécie/Linhagem	Ratus norvegicus albinus( linhagem <i>Wistar</i> )
Nº de Animais	Experimento Piloto:30 Protocolo Experimental:234 e para obtenção de filhotes: 70 fêmeas e 30 machos Total:264
Peso/Idade	Peso:200 gramas Idade:2 meses
Sexo	Ambos

Vitória (ES), 01 de setembro de 2017.