

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

Inês Isabel Vieira Trancoso

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof. Doutor Joaquim Manuel Soares Cerejeira

maio de 2022

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

Resumo

Introdução: As perturbações de ansiedade são das perturbações psiquiátricas mais comuns, caracterizadas por medo excessivo, ansiedade e evitação de ameaças. São uma das principais causas de incapacidade mundial, com uma prevalência cada vez maior. Está normalmente associada a outras comorbilidades como depressão ou abuso de substâncias. A patogênese das perturbações de ansiedade é complexa, envolvendo interações entre fatores biológicos, influências do ambiente e mecanismos psicológicos.

Objetivos: Esta dissertação tem como objetivo reunir a literatura sobre o papel dos fatores epigenéticos no desenvolvimento de perturbações de ansiedade.

Métodos: A pesquisa foi realizada na plataforma PubMed entre setembro de 2021 até abril de 2022.

Resultados: A análise da literatura sobre as influências da epigenética no desenvolvimento de perturbações de ansiedade implica o envolvimento de genes que regulam o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, sistemas neurotransmissores ou plasticidade neuronal, e vários estudos sugerem que a disrupção da expressão genética destes genes através de mecanismos de epigenética contribuem para a patogênese de perturbações de ansiedade.

Conclusão: A investigação sobre qual a contribuição dos mecanismos epigenéticos para a suscetibilidade ou resistência para o desenvolvimento das perturbações de ansiedade ainda se encontra na sua infância pelo que será necessária mais pesquisa para clarificar detalhes nesta área.

Palavras-chave

Ansiedade; Epigenética; Metilação DNA; Histonas; RNA não codificante

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

Abstract

Introduction: Anxiety disorders are some of the most common psychiatric disorders. They're characterized by excessive fear, anxiety, and threat avoidance. They're one of the leading causes for disability worldwide, with a rising prevalence. It's usually associated with comorbidities like depression and substance abuse. Anxiety disorder's pathogenesis is complex, involving interactions between biology factors, environment influences and psychological mechanisms.

Objectives: This dissertation aims to report on current literature findings about the role of epigenetic factors on the development of anxiety disorders.

Methods: The research was done on the platform PubMed between the dates September 2021 until April 2022.

Results: Current literature about epigenetics' influence on the development of anxiety disorders implicates genes that regulate the axis hypothalamic-pituitary-adrenal, neurotransmitter systems, and neuroplasticity, and several studies suggest the disruption of the expression of these genes through epigenetic mechanisms contribute to the pathogenesis of AD.

Conclusion: Research about the epigenetic mechanisms' contribution towards susceptibility or resilience in developing anxiety disorders is still in its infancy and requires more more work to clarify details in the area.

Keywords

Anxiety; Epigenetics; DNA methylation; Histones; Noncoding RNA

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

Índice

Resumo	iii
Palavras-chave	iii
Abstract	v
Keywords	v
Lista de Tabelas	ix
Lista de Acrónimos	xi
1. Introdução	1
1.1 Perturbações de Ansiedade	1
1.2 Epigenética	2
1.2.1 Metilação do DNA	2
1.2.2 Modificação de Histonas	3
1.2.3 RNAs Não Codificantes	3
2. Objetivos	5
3. Metodologia	7
4. Modelos Animais de Ansiedade vs Modelos Clínicos	9
5. Metilação do DNA	11
5.1 Eixo HPA	11
5.1.1. NR3C1	12
5.1.2. CRH + AVP	12
5.1.3. FKBP5	13
5.2 OXTR	14
5.3 MAOA	15
5.4 SLC6A4	15
5.5 BDNF	16
6. Modificações de Histonas	19
7. RNAs não codificantes	21
8. Aplicabilidade na terapêutica	23
9. Conclusões	25
Referências	27

Lista de Tabelas

Tabela 1– Sumário dos estudos sobre metilação de DNA em Perturbações de Ansiedade

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

Lista de Acrónimos

PA	Perturbações de Ansiedade
YLD	<i>Years Lived with Disability</i>
DALY	<i>Disability-adjusted Life Year</i>
PAG	Perturbação de Ansiedade Generalizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
MeCP2	<i>Methyl CpG binding protein 2</i>
MBD	<i>Methyl-CpG-binding domain</i>
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HMT	<i>Histone methyltransferase</i>
HDM	<i>Histone demethylases</i>
ncRNA	RNA não codificante
siRNA	<i>Short-interfering RNA</i>
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i>
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
EPM	<i>Elevated Positive Maze</i>
LD	<i>Light/Dark</i>
OFT	<i>Open Field Test</i>
SD	<i>Social Defeat</i>
SIT	<i>Social Interaction Test</i>
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
CRH	Corticotrophin-Releasing hormone
ADH	Vasopressina
PVN	<i>Paraventricular Nucleus</i>
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
MR	<i>Mineralocorticoid receptor</i>
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
FKBP5	<i>FK506 binding protein 5</i>
OXTR	Recetor de Oxitocina
TSST	<i>Trier Social Stress Test</i>
MAOA	Monoamina Oxidase A
5-HTT	Transportador de Serotonina
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
CBP	<i>cAMP response element binding protein binding protein</i>
CBT	<i>Cognitive behavioural therapy</i>
SSRI	Inibidor seletivo de recaptação de serotonina
SNRI	Inibidor de recaptação de serotonina e noradrenalina

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

1.Introdução

1.1 Perturbações de Ansiedade

As perturbações de ansiedade (PA) são das perturbações psiquiátricas mais comuns. São caracterizadas por uma idade de início mais precoce que outros tipos de transtornos mentais, e tipicamente manifestam-se durante a infância ou adolescência. Têm uma alta comorbilidade com outras patologias mentais como depressão ou abuso de substâncias, o que geralmente resulta na presença de sintomatologia mais severa, com um maior fardo clínico, e, conseqüentemente numa menor taxa de resposta à terapêutica instituída. (1)

As suas principais características são o medo excessivo, ansiedade e evitação de ameaças, sendo estas persistentes e incapacitantes. O medo é a resposta emocional a uma ameaça real ou entendida como real, enquanto a ansiedade é a antecipação de uma futura ameaça. O medo é associado a estados de excitação automática necessária para uma resposta de luta ou fuga ou pensamentos de perigo iminente, e a ansiedade é mais comumente associada a tensão muscular e vigilância em preparação para a possibilidade de um perigo futuro, e comportamento cauteloso ou evitante. (2)

São uma das principais causas de incapacidade a nível mundial. Apresentam-se com alta cronicidade, encontrando-se em nono lugar entre todas as perturbações – incluindo somáticas – com mais ‘anos vividos com incapacidade’ (YLDs) e ‘anos de vida ajustados para a incapacidade’ (DALYs). (1,3)

A prevalência na população varia entre 2.5% a 8% por país. Em 2017 estima-se que cerca de 284 milhões de pessoas experienciam uma perturbação de ansiedade, sendo o transtorno de saúde mental mais prevalente a nível global. Em todos os países, denota-se uma maior prevalência desta perturbação no sexo feminino (63%, equivalente a 179 milhões), em comparação com o sexo masculino (37%, equivalente a 105 milhões). (4)

Dentro da classe de perturbações de ansiedade estão compreendidas as fobias específicas, fobia social ou perturbação de ansiedade social, perturbação de ansiedade generalizada (PAG), perturbação de pânico (PP), agorafobia, perturbação de ansiedade de separação e mutismo seletivo. (1–3)

A patogénese das perturbações de ansiedade é complexa, envolvendo interações entre fatores biológicos, influências do ambiente e mecanismos psicológicos. Em humanos, vários fatores de risco psicossociais como experiências de infância adversas (por exemplo, maus-tratos infantis, abuso emocional, abuso sexual, abuso físico, abandono), eventos de vida stressantes ou traumáticos (conflitos familiares ou matrimoniais, término de relações interpessoais, problemas profissionais, eventos relacionados com saúde, dificuldades financeiras, eventos de perda ou assuntos legais), tal como stress por si só, estão associados ao aumento de vulnerabilidade para o desenvolvimento de perturbações de ansiedade. (3,5)

O stress pré-natal, ou seja, altos níveis de ansiedade ou depressão durante a gravidez, também foi relacionado com consequências a longo prazo na criança, incluindo danos cognitivos, problemas de saúde físicos e o desenvolvimento de perturbações depressivas ou de ansiedade.

(3)

A contribuição genética no desenvolvimento de transtornos de ansiedade é estimada entre 30 a 50%, implicando que 50 a 70% se deve aos fatores psicossociais. Uma das hipóteses de ação destes fatores é através de mecanismos epigenéticos. (1,6)

1.2 Epigenética

O termo ‘epigenética’ foi utilizado pela primeira vez em 1942 por Conrad Waddington, e é derivado do prefixo grego ‘epi’, que traduz para ‘cima’ ou ‘sobre’ genética. (3)

Os mecanismos de epigenética compreendem processos biológicos capazes de alterar a expressão genética sem alterar a própria sequência de DNA, e incluem metilação de DNA, modificação de histonas como acetilação ou metilação da cauda das histonas, e RNAs não codificantes como microRNAs. (3,7)

A metilação do DNA e a modificação de histonas que compactam o DNA em cromatina são os dois mecanismos melhor entendidos e investigados. Estes mecanismos são capazes de governar a acessibilidade do DNA à maquinaria de expressão genética, sendo que genes não acessíveis ficam silenciados e os genes acessíveis são ativamente transcritos. (7)

1.2.1 Metilação de DNA

O processo de metilação de DNA é caracterizado por a adição de um grupo metil (CH₃) ao carbono 5 do nucleótido citosina numa sequência de dinucleótidos Citosina-Guanina (CpG) e é realizado por DNA metiltransferases (DNMTs). (3,7) Regiões com elevada densidade de dinucleótidos CpG são chamados de ‘ilhas CpG’ e são encontradas principalmente na região promotor dos genes. (3)

A inserção do grupo metil muda a aparência e estrutura do DNA, o que pode inibir expressão do gene através da sua interação direta com fatores que reprimem transcrição, ou indiretamente, através do recrutamento de proteínas ligantes a metil-CpG (MeCP2 e MBDs) complexadas com enzimas que modificam as proteínas das histonas. Estas modificações podem transformar a cromatina de um estado ativo para um estado reprimido, ou vice versa. (8)

A família de DNA metiltransferases (DNMTs) são as enzimas que estabelecem os padrões de metilação no DNA. Estas enzimas podem ser classificadas como de manutenção ou de novo. A DNMT₁ metila DNA hemi-metilado e tem como função reparar a metilação prévia, sendo referida como a ‘DNMT de manutenção’. Já as DNMT_{3a} e DNMT_{3b} introduzem metilação em

sequências CpG que eram antes completamente não metiladas, sendo por isso referidas como ‘de novo DNMTs’. (9)

1.2.2 Modificação de Histonas

A cromatina é um complexo de DNA enrolado à volta de um conjunto de histonas. Este complexo é composto por oito moléculas de histonas, duas de cada histona H3, H4, H2a e H2B. (3,6)

A modificação de histonas envolve as proteínas das histonas serem modificadas através de mudanças pós-tradução. (5) As caudas das histonas (N-terminal) podem ser sujeitas a várias modificações covalentes pós-tradução incluindo acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. Estas modificações vão determinar o estado de acessibilidade do DNA, ou seja, se a cromatina está ‘fechada’ (heterocromatina), ficando deste modo com transcrição reprimida ou ‘aberta’ (eucromatina) permitindo um aumento de transcrição, ou um estado intermédio entre os dois extremos. (3,6,7)

A acetilação de histonas por exemplo é realizada por histonas acetiltransferases (HATs), e vai reduzir a atração eletrostática entre a carga positiva da histona e a carga negativa do DNA, resultando em um estado conformacional mais aberto, o que permite um aumento de transcrição. Por outro lado, a diminuição de acetilação, induzida por histonas deacetilases (HDACs) vai diminuir a acessibilidade ao DNA e silenciar a expressão dos genes. (3,6)

Já a metilação de histonas é um sistema mais complexo que, dependendo da localização e o número de grupos metil conjugados, pode reprimir ou ativar a expressão dos genes. A metilação é controlada por histonas metiltransferases (HMTs) e histonas desmetilases (HDMs). (6)

1.2.3 RNAs não codificantes

A grande maioria do genoma humano é transcrito, mas apenas 2% destas transcrições são traduzidas em proteína. No entanto, muitas destas transcrições têm uma função como RNAs não codificantes (ncRNA), e podem regular a expressividade dos genes ao nível da transcrição e pós-transcrição.

Podem ser divididos em dois grandes grupos: os ncRNAs curtos (<30 nucleótidos) e os longos (>200 nucleótidos). As três maiores classes de RNAs não codificantes curtos são os microRNAs, os *short interfering RNAs* (siRNAs) e *piwi-interacting RNAs* (piRNAs). (7,10)

Os microRNAs é a classe que é mais frequentemente investigada, tendo a capacidade de regular a expressão dos genes, pois ligam-se ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, impedindo a sua tradução. (3,10)

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

2.Objetivos

O objetivo para a presente dissertação é perceber se e quais os fatores epigenéticos que têm um papel crucial no desenvolvimento de perturbações de ansiedade e dar a conhecer os mesmos de uma forma sintetizada e concreta.

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

3. Metodologia

Foi realizada uma revisão de literatura científica sobre este tema para a realização desta dissertação. Para tal, houve recurso a livros científicos de referência médica, revistas e jornais científicos, e recorreu-se à base de dados eletrónica Pubmed.

Para a realização da pesquisa bibliográfica, foi realizada uma pesquisa inicial utilizando as palavras-chave “anxiety disorders” e “epigenetics”, e em seguida, buscas mais específicas com a combinação de “anxiety disorders” com “*DNA methylation*”, “*Histone Modification*” e “*Noncoding RNA*”.

Foram incluídos artigos de revisão relacionados com o tema, assim como artigos de investigação, com publicações desde 2008 até ao ano de 2022, tendo sido, no entanto, priorizada a literatura mais recente.

A filtração de artigos foi realizada inicialmente com base no título, depois pela leitura do abstract, e por fim por leitura integral do artigo. Foram também filtrados por data de publicação e idioma, tendo sido incluídos apenas artigos publicados em inglês.

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

4. Modelos Animais de Ansiedade vs Modelos Clínicos

Atualmente é difícil ou impossível avaliar mudanças epigenéticas moleculares no sistema nervoso central de populações clínicas, e devido à especificidade tecidual dos mecanismos epigenéticos, os tecidos periféricos podem não refletir as mudanças presentes no cérebro. Por estas razões, foram utilizados modelos animais adaptados para representar os sinais de ansiedade. (8)

Embora os sintomas das perturbações de ansiedade, como por exemplo pensamentos intrusivos, são impossíveis de avaliar em ratinhos ou primatas não humanos, paradigmas sofisticados foram criados para modelar aspetos de ansiedade social, ansiedade generalizada e um temperamento ansioso em geral. Por exemplo, em modelos de roedores, os paradigmas de comportamento comuns para avaliar comportamentos ansiosos incluem o labirinto positivo elevado (EPM), caixa de luz/escuro (LD), teste de campo aberto (OFT), derrota social (SD), e o teste de interação social (SIT). (8)

O labirinto positivo elevado consiste em dois braços de plataformas abertas e dois braços de plataformas fechadas com três paredes. O EPM é baseado em um medo inato de alturas e espaços abertos, para o qual os roedores mostram preferência pelas plataformas fechadas às abertas. Após se habituarem à arena de teste, ratinhos menos ansiosos vão explorar e aumentar o tempo passado nas plataformas abertas. A caixa LD consiste em duas câmaras conectadas, uma iluminada e outra não. A preferência natural é a escolha pela câmara escura, contudo, com tempo, ratinhos menos ansiosos vão novamente explorar e começar a passar mais tempo na câmara de luz. O teste de campo aberto é uma arena de teste quadrada com quatro paredes. Em situações normais, os roedores preferem manter-se não expostos a predadores, neste caso, perto das paredes. Após aclimatização, ratinhos menos ansiosos vão explorar e passar tempo no centro da arena. Os paradigmas de derrota social variam, mas envolvem principalmente uma exposição repetida de um roedor a um roedor dominante, os quais vão eventualmente demonstrar evitação social. Evitação social é principalmente avaliado usando o teste de interação social. SIT é conduzido numa arena de duas câmaras, separado por uma parede para prevenir o contacto, mas que ao mesmo tempo permite outras trocas sensoriais. Os roedores mais ansiosos e evitantes sociais vão passar menos tempo na área perto da câmara vizinha após habituação. (8)

A maioria de estudos a investigar padrões de metilação de DNA no desenvolvimento de problemas de saúde mental em humanos foi realizada através de amostras de cérebro postmortem, ou amostras de tecido periféricos como sangue e saliva. (7,11)

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

5. Metilação de DNA

Sendo um mecanismo de epigenética, a metilação de DNA serve como um potencial método para avaliar de que modo as experiências de vida se manifestam a nível genético.

No esforço para entender como é que a epigenética influencia a patogénese de perturbações de ansiedade alguns autores realizaram estudos de associação a todo o epigenoma, como Shimada-Sugimoto et al (12) que reportou uma significativa diminuição dos níveis de metilação do DNA em 40 CpG em doentes de perturbação de pânico comparado com o grupo controlo de indivíduos saudáveis, ou Emeny et al (13), que utilizando uma amostra de indivíduos com perturbação de ansiedade generalizada, identificou um aumento de metilação em um CpG individual presente na região promotor do gene ASB1 em sujeitos com elevado risco de ansiedade severa.

No entanto, a grande maioria de estudos focou-se principalmente em genes candidatos já reconhecidos por estarem envolvidos na resposta a stress, neurotransmissão e neuroplasticidade. Nas secções seguintes serão apresentados os genes mais comumente estudados e encontrados na literatura.

5.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

O sistema neuroendócrino é um regulador importante na resposta ao stress, e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é um componente crítico da sua ação. Após exposição a um stressor, o sistema nervoso autónomo inicia uma resposta rápida de “luta ou fuga” e uma outra resposta mais lenta, com recurso ao eixo HPA. Esta resposta consiste na libertação de neuro peptídeos, hormona libertadora corticotropina (CRH) e vasopressina arginina (ADH) pelo núcleo paraventricular (PVN) no hipotálamo. Isto estimula a libertação de hormona adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise anterior, que vai atuar no córtex adrenal para libertar hormonas glicocorticoides, isto é, cortisol no caso de humanos, ou corticoesterona no caso de animais, para a corrente sanguínea. O cortisol ou corticoesterona vão depois ligar-se aos recetores mineralocorticoides (MR) e recetores glicocorticoides (GR) presentes no hipotálamo, hipófise e hipocampo, desativando o eixo através da inibição da produção de CRH. O córtex adrenal também vai produzir adrenalina e noradrenalina que controlam a resposta do corpo e do sistema nervoso periférico, reduzindo por exemplo a função imunitária ou digestiva, enquanto aumentando o ritmo cardíaco e pressão arterial. A desregulação deste sistema vai contribuir para o processo de ansiedade. (6–8)

Sendo este sistema crítico no processo fisiológico do stress, poderá ser um alvo de interesse na investigação de como mecanismos epigenéticos afetam a patogénese de perturbações de ansiedade.

5.1.1 NR3C1

Um dos principais genes em estudo é o gene NR3C1, também conhecido como gene GR pois codifica os recetores glicocorticoides ao qual o cortisol se vai ligar.

Em estudos animais, uma variação natural de cuidados maternos durante a primeira semana de vida causou um aumento no padrão de metilação no promotor do gene NR3C1 dos descendentes, modificação que persistiu até idade adulta, e correspondeu a uma expressão do recetor glicocorticoide reduzida, que por sua vez levou a uma maior ativação do eixo HPA após exposição a um stressor devido a ausência de inibição. As crias foram mais tarde caracterizadas como exibindo comportamentos-tipo ansiosos como consequência do cuidado materno recebido, medido através da utilização do labirinto positivo elevado e do teste de campo aberto. (8,11,14)

Em estudos clínicos, Wang et al (15) avaliou a associação entre a metilação do promotor NR3C1, a expressão do GR, a sua sensibilidade, os níveis de cortisol séricos, e a presença de sintomas clínicos numa amostra de doentes com perturbação de ansiedade generalizada (PAG) sem medicação comparada com sujeitos saudáveis, sem diferença significativa de idade e género entre os dois grupos. O estudo reportou que o nível de cortisol sérico na amostra com PAG foi significativamente mais elevado que nos controlos saudáveis, e uma sensibilidade periférica do recetor glicocorticoide reduzida. A capacidade de resposta diminuída do recetor no hipotálamo e hipocampo, que regulam a inibição do eixo HPA, vai causar uma maior reatividade ao stress. Adicionalmente, níveis elevados de metilação na região promotor do gene NR3C1 são inversamente relacionados com os níveis de expressão do GR. (15)

Estas descobertas contrastam com os resultados de Tyrka et al (16), que reportou uma diminuição de metilação no gene NR3C1 em adultos com perturbações de ansiedade, com história de maus-tratos infantis. (16) Estas descobertas devem-se possivelmente à diferença entre as amostras, sendo que Tyrka et al (16) apresenta uma amostra com vários tipos de perturbações de ansiedade, tendo se focado no impacto de experiências de vida adversas, fator importante na hipometilação da região promotor do gene NR3C1, enquanto que Wang et al (15) apresenta uma amostra de perturbações de ansiedade generalizada com baixa proporção de trauma. Isto demonstra que o processo de regulação da expressão génica através de mecanismos epigenéticos é um processo complexo, com necessidade de mais investigação para identificar os fatores que o podem afetar.

5.1.2 CRH + AVP

Para além do gene NR3C1, outros genes do eixo HPA também são epigeneticamente alterados por experiências da vida, sendo os mais prominentes os genes relacionados com os neuro péptidos ADH e CRH.

A hormona libertadora corticotropina (CRH), codificada pelo gene CRH, é um regulador central da resposta fisiológica ao stress, e um neurotransmissor importante em comportamentos relacionados com depressão e ansiedade. (11)

Para avaliar o impacto de stress na metilação do gene CRH, um estudo utilizou o modelo de derrota social, protocolo conhecido por causar evitação social e anedonia em ratinhos. Após 10 dias desse protocolo, avaliaram resiliência dos ratinhos em estudo através do teste de interação social. Os ratinhos mais ansiosos apresentavam hipometilação em 4 CpG do promotor CRH, com um aumento de expressão de CRH no núcleo paraventricular, em contraste com os ratinhos mais resilientes. (17)

Uma diminuição significativa da metilação da região promotor do gene CRHR1, gene responsável pelo recetor de CRH, foi observada numa amostra de doentes com perturbação de pânico, quando comparada com o grupo de controlo de indivíduos saudáveis. Estes resultados foram corroborados por outra amostra de indivíduos saudáveis com elevados scores de sintomas de ansiedade relacionados a pânico, comparado com indivíduos com scores baixos de ansiedade, que também apresentavam hipometilação no gene CRHR1. Esta alteração resulta no aumento de expressão do recetor de CRH, hiperativando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. (18)

A vasopressina (ADH), semelhante a CRH, funciona também como um neurotransmissor central, envolvido na regulação de ansiedade, comportamento depressivo e comportamento social como cuidados maternos ou laços afetivos e é codificada pelo gene AVP. (11)

Murgatroyd et al (19) concluiu que stress de vida causado por eventos nas fases iniciais da vida, modelado por separação materna em ratinhos causa um aumento de secreção de corticoesterona acompanhado por hipometilação de DNA na região promotor e aumento na expressão genética do gene AVP. (19)

5.1.3 FKBP5

Por fim, outro gene estudado por ter impacto na função do eixo HPA é o gene FKBP5.

FKBP5 codifica a proteína 5 de ligação FK506 (FKBP5), que age como um regulador da sensibilidade do recetor glicocorticoide (GR) através da redução da sua afinidade a glicocorticoides. A sua expressão é regulada por glicocorticoides, criando um feedback negativo. Um feedback comprometido pode levar a respostas de stress excessivas ou prolongadas como nas perturbações de ansiedade. (20) Exposição prolongada a corticoesterona causa um aumento na expressão do gene FKBP5, através de uma diminuição de metilação no intrão 1 e 5, tanto no sangue como no cérebro de ratinhos originando também um aumento de comportamentos ansiosos, que foram avaliados pelo paradigma de labirinto positivo elevado. (21,22)

5.2 OXTR

Experiências no início de vida também têm sido consideradas uma influência no funcionamento do sistema de oxitocina. Por exemplo, mulheres expostas a abuso infantil têm níveis mais baixos de oxitocina no líquido cérebrospinal e roedores expostos a baixos níveis de afetividade têm menor expressão de recetores de oxitocina em certas áreas do cérebro. (23) Níveis basais baixos de oxitocina também foram reportados em pessoas com fobia social. (24) A oxitocina é uma hormona que está envolvida no comportamento social e o desenvolvimento de laços de ligação emocional entre indivíduos. Estudos sugerem que oxitocina influencia a sensibilidade de um indivíduo ao ambiente social, podendo melhorar ou piorar a sua reação à situação conforme o nível de adversidade presente no mesmo. (23)

Devido à sua influência aparente nos comportamentos interpessoais básicos e complexos, que delimitam o funcionamento social, oxitocina e o seu recetor têm sido um alvo de interesse na investigação do desenvolvimento de perturbações do foro psiquiátrico. (23–27)

Um estudo observou que indivíduos com história de abuso apresentavam baixos níveis de metilação em sequências CpG no exão 1 da região promotor e hipermetilação no intrão 3 da região intragénica do gene OXTR. Estes indivíduos também se apresentavam com mais sintomas de ansiedade ou depressão, sendo ambos os padrões associados a um maior risco de psicopatologia após abuso. (23)

Semelhantemente, um estudo feito numa população feminina geriátrica com perturbações de ansiedade ou depressão observou um aumento de metilação do gene OXTR, mas apenas em um genótipo específico, AA em rs53576. Também colocaram a hipótese que tal metilação levaria uma reduzida expressão de OXTR. (27)

Uma diminuição de metilação no exão 3 do gene OXTR também foi denotada em pacientes com fobia social em comparação com um grupo controlo de indivíduos saudáveis. Este estudo relatou que esta associação não era influenciada pelo género ou presença de comorbilidades como depressão. Em indivíduos saudáveis, a metilação no CpG3 também foi relacionada com um aumento de libertação de cortisol após a aplicação do *Trier Social Stress Test* (TSST), onde os participantes são sujeitos a vários estímulos ansiogénicos. (24)

Por outro lado, também tem havido alguma investigação sobre a influência de padrões epigenéticos do gene OXTR na perceção de processos sociais como o processamento de emoções faciais. Níveis elevados de metilação foram associados a uma maior atividade em regiões cerebrais responsáveis por ansiedade, repugnância, e excitação emocional, mais especificamente a amígdala, o córtex insular e o giro fusiforme, após os participantes terem sido expostos a expressões faciais de raiva e medo. (26)

5.3 MAOA

A monoamina oxidase A (MAOA) é uma enzima codificada pelo gene MAOA, e é um dos grandes pontos de interesse na investigação do papel de metilação de DNA em perturbações psiquiátricas, visto a sua importância no metabolismo de monoaminas como a serotonina, norepinefrina e dopamina e a sua inibição pelos antidepressivos utilizados no tratamento das perturbações. (28)

Um estudo de um grupo de mulheres com perturbação de pânico exibiu significativamente menor metilação que o grupo de controlos saudáveis em várias regiões do gene MAOA, como no promotor, exão 1 e intrão 1. Adicionalmente, experiências de eventos de vida negativos no ano anterior à inclusão no estudo foram associados a hipometilação, enquanto eventos positivos foram associados a um aumento de metilação. (29) Este resultado foi replicado em outro estudo, que também estabeleceu uma associação entre a hipometilação presente no gene MAOA e o aumento de risco no desenvolvimento de perturbação de pânico. (30) Numa amostra de mulheres com acrofobia, a metilação no gene MAOA encontrava-se significativamente reduzida comparado com controlos saudáveis. (31) A hipometilação do promotor do gene MAOA é pensado resultar em um aumento da expressão da enzima monoamina oxidase A, levando a uma diminuição da disponibilidade de epinefrina, norepinefrina e serotonina na fenda sináptica. (29)

5.4 SLC6A4

A neurotransmissão serotoninérgica afeta diversas áreas incluindo comportamento, cognição, emoção e regulação de stress. Um regulador chave do sistema serotoninérgico é o transportador de serotonina (5-HTT), que remove serotonina da fenda sináptica e é codificado pelo gene SLC6A4. A expressão deste gene é regulada por vários mecanismos, sendo uma das hipóteses em estudo os mecanismos epigenéticos. (32)

Exposição a eventos de vida precoce adversos (por exemplo abuso físico e sexual ou perda de um progenitor) foi relacionada a padrões de hipermetilação no exão 1 do gene SLC6A4, constituindo um possível marcador de exposição a adversidade em humanos. Contudo, alguns estudos observaram o contrário, ou seja, uma diminuição da metilação no gene SLC6A4. (32) Uma possível explicação para esta variação é o facto das diferenças na metilação estarem relacionadas com o tipo de adversidade e com as características individuais dos participantes da amostra como género e idade. (33,34) A hipermetilação do gene SLC6A4 leva a uma diminuição da expressão do transportador de serotonina, levando a um aumento da mesma na fenda sináptica. (32,33) Embora estas alterações sejam um ponto de interesse na regulação de stress, ainda não há literatura suficiente a relacionar os fenótipos de ansiedade com as mesmas de modo que seja possível retirar as devidas conclusões.

5.5 BDNF

Fatores de crescimento são moléculas envolvidas na manutenção do desenvolvimento, diferenciação e plasticidade de neurónios. Deste modo, é de forma natural que estes fatores se tenham tornado um componente integral em várias hipóteses de desenvolvimento de perturbações psiquiátricas, em grande parte devido à diversidade dos seus papéis em manter o desenvolvimento cerebral normal e plasticidade na idade adulta. (35) O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é uma proteína codificada pelo gene BDNF, pertencente à família de fatores de crescimento neurotróficos, as neurotrofinas, e é necessário para o desenvolvimento e sobrevivência de vários tipos de neurónios, incluindo neurónios serotoninérgicos, que estão associados à ansiedade. Adicionalmente, BDNF tem um papel essencial na plasticidade sináptica e potenciação de longa duração, ambas funções que estão envolvidas no condicionamento de medo e a extinção de memórias de medo, fatores que contribuem para o desenvolvimento e manutenção de ansiedade. (35,36)

Foi demonstrado, através de um modelo animal de depressão, que alterações na expressão do gene BDNF após stress crónico pode ser atribuído à modificação epigenética do gene no hipocampo. Isto é, a metilação de DNA é capaz de regular os níveis de expressão do gene BDNF, mais especificamente que a hipermetilação está associada a uma baixa expressão. A modulação epigenética da transcrição do gene também foi implicada no impacto a longo prazo de experiências positivas maternas nas respostas ao stress de um rato adulto. (37)

Experiências de vida precoce também causam mudanças na metilação do gene BDNF no córtex pré-frontal que persistem até idade adulta. Especificamente, a cada idade examinada, maus-tratos maternos produziram um aumento significativo de exão 9 metilado e uma diminuição de exão 9 não metilado, em comparação com controlos com bons cuidados maternos. (37)

Exposição crónica a um predador também foi descoberto causar hipermetilação no campo CA1 do hipocampo, relacionada com uma diminuição da expressão da proteína BDNF. (38)

A nível de modelos clínicos, um estudo observou um maior nível de metilação de BDNF em uma amostra de mulheres mais velhas com perturbações de ansiedade ou depressão. Embora a metilação de DNA é naturalmente maior em populações idosas, tal não se aplica neste caso pois os sujeitos do grupo controlo estão no mesmo grupo etário. (27)

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

Tabela 1 - Sumário dos estudos sobre metilação de DNA.

GENE	FATOR/PERTURBAÇÃO ASSOCIADA	RESULTADO	REFERÊNCIA
<i>Epigenome-Wide</i>	Perturbação de Pânico	↓ metilação de DNA em 40 sequências CpG	(12)
<i>Epigenome-Wide</i>	Perturbação de Ansiedade Generalizada	↑ metilação no gene ASB1	(13)
NR3C1	Perturbação de Ansiedade Generalizada	↑ NR3C1	(15)
NR3C1	Perturbação de Ansiedade com trauma infantil	↓ NR3C1	(16)
CRH	Derrota Social	↓ CRH	(17)
CRHR1	Perturbação de Pânico	↓ CRHR1	(18)
AVP	Separação materna	↓ AVP	(19)
FKBP5	Administração de Corticosterona	↓ FKBP5	(21)
FKBP5	Administração de Corticosterona	↓ FKBP5	(22)
OXTR	Trauma infantil	↓ OXTR exão 1 ↑ OXTR intrão 3	(23)
OXTR	Perturbações de Ansiedade e Depressão	↑ OXTR	(27)
OXTR	Perturbação de Ansiedade Social	↓ OXTR exão 3	(24)
OXTR	Exposição a expressões faciais de raiva e medo	↑ OXTR	(26)
MAOA	Perturbação de Pânico	↓ MAOA	(29)
MAOA	Perturbação de Pânico	↓ MAOA	(30)
MAOA	Acrofobia	↓ MAOA	(31)
SLC6A4	Trauma Infantil	↑ SLC6A4 ↓ SLC6A4	(32)
BDNF	Maus-tratos maternos	↑ BDNF	(37)
BDNF	Maus-tratos maternos	↑ BDNF	(38)
BDNF	Perturbações de Ansiedade e Depressão	↑ BDNF	(27)

6. Modificação de Histonas

Como dito anteriormente, também as modificações de histonas são um importante mecanismo epigenético. Juntamente com a metilação de DNA, as modificações de histonas estão também frequentemente associadas a repressão de genes, tornando estes dois mecanismos dependentes um do outro, pois ambos influenciam o estado conformacional da cromatina. Esta regulação, no caso das histonas, é feita através da adição de compostos, que vão alterar a conformação da cromatina, tornando-a mais ou menos acessível à maquinaria de transcrição. (39,40)

Embora seja considerado um ponto de interesse no desenvolvimento de perturbações de ansiedade, suportado por investigação realizada em estudos animais, pela pesquisa efetuada ao longo do desenvolvimento desta dissertação, ainda não há literatura publicada sobre o impacto de modificações de histonas em fenótipos humanos de ansiedade, pelo que será um campo que poderá vir a ser alvo de mais estudos no futuro.

A literatura existente sobre modelos animais mostra evidência do papel importante das modificações de histonas no condicionamento do medo e extinção de memórias do medo, sendo mais prominente o processo de acetilação. Modificações de histonas induzidas por stress podem contribuir para a formação de memórias alterada, assim como uma maior vulnerabilidade a perturbações de humor.

Como descrito anteriormente, neurotrofinas como BDNF promovem a criação, desenvolvimento, sobrevivência e função de neurónios importantes na mediação de respostas ao stress. Ratinhos expostos a stressores na infância mostram uma diminuição de *cAMP response element binding protein binding protein* (CBP), uma proteína com atividade como histona acetiltransferase, e diminuição da associação da histona H3K9ac com o promotor do gene BDNF, levando à diminuição da sua expressão e inibição de neurogénese no hipocampo, e consequentemente ao aumento de comportamentos ansiosos na idade adulta. (40,41)

Foi também demonstrado que exposição a stress de forma crónica (usando o paradigma de derrota social) induz hipoacetilação das histonas H3 e H4 no hipocampo, e em contraste, um aumento global da acetilação da H3 na amígdala e córtex pré-frontal. (14,42) Outra modificação identificada em modelos animais de ansiedade é a hipermetilação de H3K27 que também foi associado à diminuição da expressão de BDNF após exposição a SD. (14)

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

7.RNA não codificantes

Os RNAs não codificantes são outro alvo de investigação epigenética em perturbações de ansiedade, dentro dos quais os microRNAs são os mais investigados. Aproximadamente 20 a 30% de todos os genes são regulados por pelo menos um microRNAs. Um único microRNA pode afetar centenas de genes, e um gene pode ser afetado por mais do que um microRNAs tornando a investigação relativa à quantificação do seu impacto algo complexa. (43,44)

A grande maioria dos estudos realizados sobre a regulação por parte dos microRNAs nas perturbações de ansiedade também foram realizados em modelos animais devido à inacessibilidade dos tecidos necessários em humanos. Malan-Muller e Hemmings (44) apresentaram em detalhe uma revisão de literatura, identificando 57 microRNAs que se encontram a ser investigados por associação a fenótipos de ansiedade em modelos animais e 18 microRNAs em modelos clínicos. (44)

Em modelos animais, por exemplo, a expressão de alguns microRNAs como miR-34a, miR-323, miR-378, e miR-451 relacionam-se com níveis baixos de ansiedade (avaliados por aumento de comportamento explorativo), enquanto miR-34c e miR-323 estão por sua vez associados a níveis elevados de ansiedade (demonstrado por diminuição de exploração), avaliados por EPM. (45)

A maioria dos estudos em modelos humanos estão limitados à avaliação da expressão de microRNAs em tecidos periféricos e a correlação destas descobertas com a presença de doença. Por exemplo, em casos de sujeitos com perturbação de ansiedade generalizada, níveis elevados de miR-4484, miR-4674, miR-501, miR-663, miR-4505, e níveis reduzidos de miR-1301 e miR-432 circulante correlacionavam-se com sintomas de ansiedade (46) e a expressão de miR-29c encontrava-se aumentada em pacientes com fobia social sujeitos a uma tarefa de stress social. (43)

Nas perturbações de pânico ou fenótipos relacionados a pânico foram associados expressão de miR-22, miR-138-2, miR-148a, miR-339 miR-488, e miR-491. (47)

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

8. Aplicabilidade na terapêutica

Mundialmente, é estimado que menos de 25% da população com uma perturbação de ansiedade recebe qualquer forma de tratamento, e mesmo dentro dos que têm uma necessidade explícita de cuidados, menos de 25% recebem tratamento potencialmente adequado. (1) Atualmente, as opções que existem para o tratamento de perturbações de ansiedade consistem na realização de psicoterapia (CBT), ou através de recurso a farmacoterapia, sendo ambas abordagens consideradas de primeira linha, reduzindo os sintomas de ansiedade e melhorando a qualidade de vida. (1)

Maior parte da medicação utilizada nas PA modifica o funcionamento da noradrenalina, serotonina e GABA, aumentando as suas ações. Atualmente, a medicação ansiolítica inclui inibidores seletivos da recaptção de serotonina (SSRIs), inibidores da recaptção de serotonina-noradrenalina (SNRIs), benzodiazepinas, buspirona, e bloqueadores de recetores β -adrenérgicos. A escolha da farmacoterapia instituída depende não só do subtipo da perturbação, mas também dependerá da necessidade de instituir um tratamento que tenha efeito ansiolítico de ação rápida, de forma a atuar nos episódios agudos. (48) No entanto, a eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis varia em cada pessoa e nos diferentes graus de severidade (1), sendo que um terço dos doentes não responde à medicação. (48) A investigação epigenética nas perturbações de ansiedade permite uma nova abordagem centrada no descobrimento de novos alvos para terapêutica farmacológica, ou seja, o reverter das alterações epigenéticas causadas por stress crónico poderá providenciar tratamentos eficazes para a ansiedade e na identificação de preditores epigenéticos que correlacionam com a resposta ao tratamento. Por exemplo, alguns estudos sugerem que as alterações epigenéticas se correlacionam com a resposta a psicoterapia. Numa amostra de crianças diagnosticadas com uma variedade de perturbações de ansiedade, um aumento na metilação de DNA no gene SLC6A4 foi associado a uma resposta mais eficaz quando realizado tratamento com terapia cognitiva comportamental. Por outro lado, crianças que são resistentes a este tratamento, apresentaram uma diminuição da metilação. (49) A hipometilação do gene MAOA presente em amostras de doentes com fobia social também foi demonstrado recuperar após 6 semanas de intervenção psicoterapêutica, atingindo os valores do grupo controlo. (30) A hipometilação do gene MAOA também foi associado a um comprometimento na resposta ao tratamento com SSRIs, ou seja, os padrões de metilação de MAOA podem constituir um preditor de resposta ao tratamento, permitindo criar opções personalizadas. Por exemplo, pacientes com hipometilação de MAOA podem beneficiar de um inibidor da ação MAOA em conjunto com um SSRI para contrariar a sua sobreexpressão. (28) O uso de inibidores de histonas deacetilases (HDACs) como o ácido valproico também foi reportado aliviar sintomas de stress e ansiedade. (48)

Epigenética nas Perturbações de Ansiedade

9. Conclusão

As perturbações de ansiedade são das doenças que causam um maior impacto a nível funcional, afetando milhões de pessoas, causando um fardo social e económico mundialmente. A patogénese da ansiedade ainda não é completamente compreendida, mas pensa-se que dois dos maiores contribuidores são os fatores genéticos e os fatores ambientais.

A maioria da investigação sobre as influências no desenvolvimento de perturbações de ansiedade implica o envolvimento de genes que regulam o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, sistemas neurotransmissores ou plasticidade neuronal, e vários estudos sugerem que a disrupção da expressão genética destes genes através de mecanismos de epigenética contribuem para a patogénese de perturbações de ansiedade.

No entanto, a investigação sobre qual a contribuição dos mecanismos epigenéticos para a suscetibilidade ou resistência para o desenvolvimento das perturbações de ansiedade ainda se encontra na sua infância pelo que será necessária mais pesquisa para clarificar detalhes nesta área.

Os vários mecanismos epigenéticos têm uma relação co dependente na qual vão afetar as ações uns dos outros, o que adiciona um grau de complexidade e dificuldade na identificação de mecanismos e cascatas moleculares envolvidas na regulação de genes e expressão proteica.

Neste momento, através dos resultados apresentados, podemos apenas especular de que maneira os mecanismos epigenéticos levam à origem de manifestações de ansiedade, no entanto podemos concluir que há uma associação entre os dois.

Nesta dissertação foram reportadas as alterações epigenéticas mais comumente investigadas e associadas às perturbações de ansiedade, no entanto ainda há muitos outros genes e mecanismos a ser investigados que não foram relatados.

A área da neuro epigenética é relativamente nova, porém já há provas da sua relevância no entendimento de perturbações psiquiátricas e a sua aplicabilidade na terapêutica das mesmas como a depressão, que é uma comorbilidade altamente comum nas perturbações de ansiedade, sendo uma possível área de investigação futura.

Em suma, como podemos ver ao longo desta dissertação, a patogénese de Perturbações de Ansiedade é complexa e repleta de nuances, e os fatores epigenéticos e ambientais assumem um papel importante embora não completamente compreendido.

Referências

- [1] Penninx BW, Pine DS, Holmes EA, Reif A. Anxiety disorders. *The Lancet*. 2021 Mar 6;397(10277):914–27.
- [2] American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. American Psychiatric Association; 2013.
- [3] Schiele MA, Domschke K. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. Vol. 17, *Genes, Brain and Behavior*. Blackwell Publishing Ltd; 2018.
- [4] Dattani S, Ritchie H, Roser M. Mental Health [Internet]. *Our World in Data*. 2021 [cited 2022 May 1]. Available from: <https://ourworldindata.org/mental-health#anxiety-disorders>
- [5] Lin E, Tsai SJ. Gene-environment interactions and role of epigenetics in anxiety disorders. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer; 2020. p. 93–102.
- [6] Nieto SJ, Patriquin MA, Nielsen DA, Kosten TA. Don't worry; Be informed about the epigenetics of anxiety. Vols. 146–147, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier Inc.; 2016. p. 60–72.
- [7] Alyamani RAS, Murgatroyd C. Epigenetic Programming by Early-Life Stress. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2018. p. 133–50.
- [8] Bartlett AA, Singh R, Hunter RG. Anxiety and epigenetics. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2017. p. 145–66.
- [9] Kader F, Ghai M, Maharaj L. The effects of DNA methylation on human psychology. Vol. 346, *Behavioural Brain Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 47–65.
- [10] Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: Roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. Vol. 14, *Nature Reviews Genetics*. 2013. p. 100–12.
- [11] Klengel T, Pape J, Binder EB, Mehta D. The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders. Vol. 80, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2014. p. 115–32.
- [12] Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, Umekage T, Kawamura Y, Bundo M, et al. Epigenome-wide association study of DNA methylation in panic disorder. *Clinical Epigenetics*. 2017 Jan 21;9(1).
- [13] Emeny RT, Baumert J, Zannas AS, Kunze S, Wahl S, Iurato S, et al. Anxiety associated increased CpG methylation in the promoter of *Asb1*: A translational

- approach evidenced by epidemiological and clinical studies and a murine model. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(2):342–53.
- [14] Règue-Guyon M, Lanfumey L, Mongeau R. Neuroepigenetics of Neurotrophin Signaling: Neurobiology of Anxiety and Affective Disorders. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2018. p. 159–93.
- [15] Wang W, Feng J, Ji C, Mu X, Ma Q, Fan Y, et al. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene promoter 1F in peripheral blood of patients with generalized anxiety disorder. *Journal of Psychiatric Research*. 2017 Aug 1;91:18–25.
- [16] Tyrka AR, Parade SH, Welch ES, Ridout KK, Price LH, Marsit C, et al. Methylation of the leukocyte glucocorticoid receptor gene promoter in adults: Associations with early adversity and depressive, anxiety and substance-use disorders. *Translational Psychiatry*. 2016 Jul 5;6(7).
- [17] Elliott E, Ezra-Nevo G, Regev L, Neufeld-Cohen A, Chen A. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. *Nature Neuroscience*. 2010 Nov;13(11):1351–3.
- [18] Schartner C, Ziegler C, Schiele MA, Kollert L, Weber H, Zwanzger P, et al. CRHR1 promoter hypomethylation: An epigenetic readout of panic disorder? *European Neuropsychopharmacology*. 2017 Apr 1;27(4):360–71.
- [19] Murgatroyd C, Patchev A v., Wu Y, Micale V, Bockmühl Y, Fischer D, et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature Neuroscience*. 2009 Dec;12(12):1559–66.
- [20] Roberts S, Keers R, Lester KJ, Coleman JRI, Breen G, Arendt K, et al. HPA AXIS RELATED GENES and RESPONSE to PSYCHOLOGICAL THERAPIES: GENETICS and EPIGENETICS. *Depression and Anxiety*. 2015 Dec 1;32(12):861–70.
- [21] Ewald ER, Wand GS, Seifuddin F, Yang X, Tamashiro KL, Potash JB, et al. Alterations in DNA methylation of Fkbp5 as a determinant of blood-brain correlation of glucocorticoid exposure. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;44:112–22.
- [22] Lee RS, Tamashiro KLK, Yang X, Purcell RH, Harvey A, Willour VL, et al. Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology*. 2010;151(9):4332–43.
- [23] Smearman EL, Almli LM, Conneely KN, Brody GH, Sales JM, Bradley B, et al. Oxytocin Receptor Genetic and Epigenetic Variations: Association With Child

- Abuse and Adult Psychiatric Symptoms. *Child Development*. 2016 Jan 1;87(1):122–34.
- [24] Ziegler C, Dannlowski U, Bräuer D, Stevens S, Laeger I, Wittmann H, et al. Oxytocin Receptor Gene Methylation: Converging Multilevel Evidence for a Role in Social Anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2015 May 1;40(6):1528–38.
- [25] Gottschalk MG, Domschke K. Oxytocin and anxiety disorders. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer Verlag; 2018. p. 467–98.
- [26] Puglia MH, Lillard TS, Morris JP, Connelly JJ. Epigenetic modification of the oxytocin receptor gene influences the perception of anger and fear in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 17;112(11):3308–13.
- [27] Chagnon YC, Potvin O, Hudon C, Prévaille M. DNA methylation and single nucleotide variants in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and oxytocin receptor (OXTR) genes are associated with anxiety/depression in older women. *Frontiers in Genetics*. 2015;6(JUN).
- [28] Ziegler C, Domschke K. Epigenetic signature of MAOA and MAOB genes in mental disorders. Vol. 125, *Journal of Neural Transmission*. Springer-Verlag Wien; 2018. p. 1581–8.
- [29] Domschke K, Tidow N, Kuithan H, Schwarte K, Klauke B, Ambrée O, et al. Monoamine oxidase A gene DNA hypomethylation—a risk factor for panic disorder? *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2012 Oct;15(9):1217–28.
- [30] Ziegler C, Richter J, Mahr M, Gajewska A, Schiele MA, Gehrman A, et al. MAOA gene hypomethylation in panic disorder - Reversibility of an epigenetic risk pattern by psychotherapy. *Translational Psychiatry*. 2016 Apr 5;6.
- [31] Schiele MA, Ziegler C, Kollert L, Katzorke A, Schartner C, Busch Y, et al. Plasticity of functional MAOA gene methylation in Acrophobia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2018 Sep 1;21(9):822–7.
- [32] Provenzi L, Giorda R, Beri S, Montirosso R. SLC6A4 methylation as an epigenetic marker of life adversity exposures in humans: A systematic review of literature. Vol. 71, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd; 2016. p. 7–20.
- [33] Booij L, Wang D, Lévesque ML, Tremblay RE, Szyf M. Looking beyond the DNA sequence: The relevance of DNA methylation processes for the stress-diathesis model of depression. Vol. 368, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society of London; 2013.

- [34] Booij L, Richard T, Szyf M, Benkelfat C. Genetic and early environmental influences on the serotonin system: Consequences for brain development and risk for psychopathology. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2015 Jan 1;40(1):5–18.
- [35] Notaras M, van den Buuse M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders. Vol. 25, *Molecular Psychiatry*. Springer Nature; 2020. p. 2251–74.
- [36] Kang HJ, Kim KO, Kim JW, Kim SW, Park MS, Kim HR, et al. A longitudinal study of the associations of BDNF genotype and methylation with poststroke anxiety. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2019 Nov 1;34(11):1706–14.
- [37] Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD. Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the BDNF Gene. *Biological Psychiatry*. 2009 May 1;65(9):760–9.
- [38] Roth TL, Zoladz PR, Sweatt JD, Diamond DM. Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*. 2011 Jul;45(7):919–26.
- [39] Hemstedt TJ, Lattal KM, Wood MA. Reconsolidation and extinction: Using epigenetic signatures to challenge conventional wisdom. Vol. 142, *Neurobiology of Learning and Memory*. Academic Press Inc.; 2017. p. 55–65.
- [40] Weaver ICG, Korgan AC, Lee K, Wheeler R v., Hundert AS, Goguen D. Stress and the emerging roles of chromatin remodeling in signal integration and stable transmission of reversible phenotypes. Vol. 11, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2017.
- [41] Blaze J, Asok A, Roth TL. Long-term effects of early-life caregiving experiences on brain-derived neurotrophic factor histone acetylation in the adult rat mPFC. *Stress*. 2015 Nov 2;18(6):607–15.
- [42] Siddiqui SA, Singh S, Ranjan V, Ugale R, Saha S, Prakash A. Enhanced Histone Acetylation in the Infralimbic Prefrontal Cortex is Associated with Fear Extinction. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017 Oct 1;37(7):1287–301.
- [43] Murphy CP, Singewald N. Role of MicroRNAs in Anxiety and Anxiety-Related Disorders. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer; 2019. p. 185–219.
- [44] Malan-Müller S, Hemmings SMJ. The Big Role of Small RNAs in Anxiety and Stress-Related Disorders. In: *Vitamins and Hormones*. Academic Press Inc.; 2017. p. 85–129.

- [45] Parsons MJ, Grimm CH, Paya-Cano JL, Sugden K, Nietfeld W, Lehrach H, et al. Using hippocampal microRNA expression differences between mouse inbred strains to characterise miRNA function. *Mammalian Genome*. 2008 Aug;19(7–8):552–60.
- [46] Chen SD, Sun XY, Niu W, Kong LM, He MJ, Fan HM, et al. Correlation between the level of microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and symptomatology in patients with generalized anxiety disorder. *Comprehensive Psychiatry*. 2016 Aug 1;69:216–24.
- [47] Muiños-Gimeno M, Espinosa-Parrilla Y, Guidi M, Kagerbauer B, Sipilä T, Maron E, et al. Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 are associated with panic disorder and regulate several anxiety candidate genes and related pathways. *Biological Psychiatry*. 2011 Mar 15;69(6):526–33.
- [48] Peedicayil J. The potential role of epigenetic drugs in the treatment of anxiety disorders. Vol. 16, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. Dove Medical Press Ltd; 2020. p. 597–606.
- [49] Roberts S, Lester KJ, Hudson JL, Rapee RM, Creswell C, Cooper PJ, et al. Serotonin transporter methylation and response to cognitive behaviour therapy in children with anxiety disorders. *Translational Psychiatry*. 2014 Jan 1;4(9).