**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MENTAL**

MARCOS GONÇALVES DE REZENDE

**ALTERAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO EIXO HHA NA
DEPRESSÃO PÓS-PARTO E CORRELAÇÕES COM
POLIMORFISMOS DO GENE DO CRHR1 E COM A
NEUROQUÍMICA DO GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR**

Ribeirão Preto

2016

MARCOS GONÇALVES DE REZENDE

**ALTERAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO EIXO HHA NA DEPRESSÃO
PÓS-PARTO E CORRELAÇÕES COM POLIMORFISMOS DO GENE DO
CRHR1 E COM A NEUROQUÍMICA DO
GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde Mental da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Saúde
Mental.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Marta Del-Ben

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rezende, Marcos Gonçalves

Alteração do funcionamento do eixo HHA na Depressão Pós-Parto e correlações com polimorfismos do gene do CRHR1 e com a neuroquímica do Giro do Cíngulo Anterior / Marcos Gonçalves de Rezende. Ribeirão Preto, 2016

160 p. : Il.; 30cm

Orientadora: Cristina Marta Del-Ben

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Saúde Mental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Depressão pós-parto.
2. Resposta do cortisol ao despertar.
3. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.
4. Giro do cíngulo anterior.
5. Espectroscopia por ressonância magnética.
6. Polimorfismos no gene do CRHR1.

MARCOS GONÇALVES DE REZENDE

**ALTERAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO EIXO HHA NA DEPRESSÃO PÓS-PARTO
E CORRELAÇÕES COM POLIMORFISMOS DO GENE DO CRHR1 E COM A
NEUROQUÍMICA DO GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Mental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Saúde Mental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*À minha **mãe**, avó e irmã - mães:*

"Se eu não fosse mãe, seria sozinha no mundo. Mas tenho uma descendência, e para eles no futuro eu preparo meu nome dia a dia. Sei que um dia abrirão as asas para o voo necessário e eu ficarei sozinha. É fatal, porque a gente não cria os filhos para a gente, nós criamos para eles mesmos. Quando eu ficar sozinha, estarei seguindo o destino de todas as mulheres."

Seleta, de Clarice Lispector. Pág. XV e XVI. (Seleção de Renato Cordeiro Gomes). Livraria José Olympio Editora, RJ; Brasília, INL, 1975.

Ao Dr. Sebastião, meu pai, por ter me 'botado fogo' para seguir no doutorado!

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, fica aqui expressa a minha gratidão, especialmente:

À Dra. Cristina Marta Del Ben, pelo aceite e pela orientação que têm em si os qualificadores da confiança e da afinidade. E desta caminhada os propósitos acadêmicos semeados desde o início, agora em frutos benignos colhidos são. E nesta seara da convivência, o aprendizado da seriedade e da responsabilidade também se dão. E à Dra. Cybele Garcia-Leal pelo empenho despendido na colaboração e elaboração deste projeto.

Aos professores: Dra. Margaret de Castro, Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli, Dra. Maristela Schaufelberger Spanghero, Dr. Marco Antonio Barbieri e Dra. Heloisa Bettiol, cujas colaborações foram essenciais para o bom desfecho desta etapa. Também aos colegas Felipe Pinheiro de Figueiredo e Carlos Eduardo Rosa, cujos dados colhidos do projeto BRISA somaram-se para o êxito deste trabalho. E ao José Roberto, técnico do Laboratório de Endocrinologia, pela seriedade com que dosou as amostras.

À Ivana Geraldo Cintra Faria, pelo suporte acadêmico, assim como a todo o corpo administrativo que trabalha em prol do funcionamento do Programa de Pós-Graduação em Saúde Mental.

Às Musketeers: Camila Loureiro, Taciana Ragazzi, Rosana Shuhama, pelo teto dividido, pelos diálogos expostos, pelas risadas exibidas e pelas lágrimas reveladas...

Aos amigos de Ribeirão, em especial ao Douglas Cuaglio que, pelo exemplo da luta aguerrida e pela paciência dividida, certamente colaborou para o conluio desta etapa. Hey!

Ao meu notebook, ao teto que me abrigou... aos meus tendões, meus neurônios... no todo: ao meu corpo - a efêmera morada que me carrega nesta jornada.

À tia Maria, minha primeira Professora no básico do básico ($2+2 = 4$), aos meus professores de todos os ciclos, aos mestres da graduação; enfim, a todos que colaboraram até este instante para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo direto suporte financeiro; e ao estado de São Paulo e à Federação Brasileira por meio dos quais os impostos de todos os cidadãos literalmente pagaram minha formação. É para você, sociedade, que saio desta etapa para em prol trabalhar.

“Concedei-nos, Senhor, a Serenidade necessária
para aceitar as coisas que não podemos modificar,
Coragem para modificar aquelas que podemos,
e Sabedoria para distinguir umas das outras.”

(Oração da Serenidade:
tradução de *Serenity Prayer* - Alcoholics Anonymous)

RESUMO

DE REZENDE, M.G. **Alteração do funcionamento do eixo HHA na depressão pós-parto e correlações com polimorfismos do gene do CRHR1 e com a neuroquímica do giro do cíngulo anterior.** 2016. 160 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

A depressão pós-parto (DPP) tem sido associada com alterações no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), mas pouco se sabe do envolvimento de estruturas cerebrais, ou outros mecanismos subjacentes a estas alterações. Uma hipótese fundamental é que o estresse inerente ao período puerperal, vulnerabilidade individual e, principalmente, as alterações hormonais decorrentes do final da gravidez desempenham um importante papel causal nas alterações do eixo HHA e na incidência da DPP. Estudos sobre o transtorno depressivo maior mostram que alterações funcionais em áreas cerebrais como o giro do cíngulo anterior (GCA) estão relacionadas com humor deprimido, e outros pesquisadores investigaram a relação entre a neuroquímica do GCA e a atividade do eixo HHA. Pesquisas sobre genes de interesse do eixo HHA também têm reportado associações entre polimorfismos nestes genes e alterações nos níveis de cortisol. O presente trabalho testou a hipótese de que mulheres deprimidas no puerpério remoto apresentariam atenuação no funcionamento do eixo HHA, medido pelos níveis de cortisol em 30 minutos após o despertar (CAR) e ao longo da variação diurna (VD); e também que polimorfismos em um gene do eixo HHA, o gene promotor do receptor do tipo 1 do hormônio liberador de corticotrofina (CRHR1), estariam associados com sintomas depressivos no puerpério para prever os níveis de cortisol; e finalmente que as alterações verificadas no funcionamento do eixo HHA de puérperas deprimidas teriam relação com a neuroquímica do GCA. Os resultados indicaram que (1) ao redor do sexto mês após o parto, o CAR e a VD estavam atenuados em puérperas deprimidas comparadas com puérperas eutímicas, e com controles saudáveis não-puérperas; (2) os metabólitos presentes no GCA tinham correlação com as medidas do eixo HHA nas puérperas deprimidas; e (3) a presença de sintomas depressivos em associação com polimorfismos do CRHR1 previram alterações nos níveis de cortisol. No geral, estes resultados sugerem que as alterações do eixo HHA de puérperas deprimidas no puerpério tardio estão associadas com fatores genéticos e com a neuroquímica funcional do GCA.

Palavras-chave: Depressão pós-parto. Resposta do cortisol ao despertar. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Giro do cíngulo anterior. Espectroscopia por ressonância magnética. Polimorfismos no gene do CRHR1.

ABSTRACT

DE REZENDE, M.G. **Altered functioning of the HPA axis in depressed postpartum women and correlations with polymorphisms in the CRHR1 gene and with the neurochemistry of the anterior cingulate gyrus.** 2016. 160 f. Thesis (Doctor) – University of São Paulo at Ribeirão Preto Faculty of Medicine, Ribeirão Preto, 2016.

Postpartum depression (PPD) has been associated with changes in the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, but little is known about the involvement of brain structures, or other mechanisms underlying these changes. A key assumption is that stress inherent to the puerperal period, individual vulnerability, and especially the hormonal changes resulting from the end of pregnancy play an important causal role in the alterations of the HPA axis and in the incidence of PPD. Studies on major depressive disorder show that functional changes in brain areas, such as the anterior cingulate gyrus (ACG), are related to depressed mood, and other researchers investigated the relation between the neurochemistry of the ACG and the activity of the HPA axis. Research on the HPA axis genes of interest have also reported associations between polymorphisms in these genes and changes in cortisol levels. The present study tested the hypothesis that depressed women in the remote postpartum period would show attenuation in the functioning of the HPA axis, measured by cortisol levels 30 minutes after awakening (cortisol awakening response, CAR) and by diurnal variation (DV) throughout the day; and also that polymorphisms in a gene of the HPA axis, the promoter gene of the corticotropin releasing hormone receptor type 1 (CRH-R1), would present association with depressive symptoms in the postpartum period to predict the levels of cortisol; and finally that the changes in the functioning of the HPA axis of postpartum depressed women have a relationship with the neurochemistry of the ACG. Results indicated that (1) around the sixth month after delivery, CAR and DV were attenuated in depressed postpartum women compared with euthymic postpartum women and with non-postpartum healthy control women; (2) metabolites present in the ACG showed correlation with measures of the HPA axis in depressed postpartum women; and (3) the presence of depressive symptoms in association with CRHR1 polymorphisms predicted changes in cortisol levels. Overall, these results suggest that changes in the functioning of the HPA axis of depressed postpartum women in the remote postpartum period are associated with genetic factors and with the functional neurochemistry of the ACG.

Keywords: Postpartum depression. Cortisol awakening response. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Anterior cingulate gyrus. Magnetic resonance spectroscopy. Polymorphisms in the CRHR1 gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.1** - QUEDA NATURAL DOS NÍVEIS HORMONAIS DE 14 MULHERES SAUDÁVEIS, MEDIDOS IMEDIATAMENTE APÓS O PARTO (T0) E EM 1 HORA (T1), 2 HORAS (T2), 6 HORAS (T6) E 12 HORAS (T12) APÓS O PARTO; * $p < 0,05$ COMPARADO COM A MEDIDA ANTERIOR; † $p < 0,05$ PARA T12 COMPARADO COM T0. (FONTE: DE REZENDE ET AL., EM PREPARAÇÃO). **20**
- FIGURA 1.2** - ATIVIDADE RÍTMICA DO EIXO HHA: NÍVEIS DE CORTISOL VERIFICADOS DURANTE 24 HORAS EM MULHERES DEPRIMIDAS (LINHA DESCONTÍNUA) E MULHERES CONTROLES (LINHA CONTÍNUA); O PERÍODO CLARO DO DIA ESTÁ REPRESENTADO EM AMARELO, O PERÍODO NOTURNO EM CINZA, E A TRANSIÇÃO ENTRE PERÍODOS É REPRESENTADA PELA MESCLA DE CINZA COM AMARELO; O INTERVALO DO PICO SECRETÓRIO DO CAR ESTÁ DESTACADO COM UM RETÂNGULO VERMELHO. (FIGURA MODIFICADA DE YOUNG, CARLSON E BROWN, 2001). **22**
- FIGURA 1.3** – EM (A) ESTÁ REPRESENTADA UMA VISÃO ESQUEMÁTICA DO GCA COM A SUBDIVISÃO ROSTRAL-VENTRAL (EMOCIONAL) MARCADA EM AZUL, E A SUBDIVISÃO DORSAL (COGNITIVA) MARCADA EM VERMELHO. EM (B) É DESTACADA A LOCALIZAÇÃO NEUROANATÔMICA DO GCA. (BUSH, LUU E POSNER, 2000). **31**
- FIGURA 1.4** - TÍPICO ESPECTRO DE METABÓLITOS NO GCA. A ÁREA ABAIXO DE CADA PICO INDICA A QUANTIDADE RELATIVA DO METABÓLITO PARTICULAR. OS PICOS MAIORES REPRESENTAM O N-ACETIL-ASPARTATO (NAA); CREATINA (CR); COLINA (CHO); MIOINOSITOL (M-INO) E COMPLEXO GLUTAMINA-GLUTAMATO (GLX). (FONTE: ZHENG ET AL., 2015). **33**
- FIGURA 1.5** - REPRESENTAÇÃO EM CORTE SAGITAL DO CÉREBRO, DESTACANDO AS ÁREAS QUE PROCESSAM ESTRESSORES FÍSICOS E PSICOLÓGICOS; DENTRE ESTAS ENCONTRA-SE O GCA (ACC) QUE EXPRESSANDO RECEPTORES PARA CORTICOIDES TEM PAPEL NA REGULAÇÃO DO EIXO HHA (DEDOVIC ET AL., 2009). **40**
- FIGURA 1.6** - LOCUS GÊNICO DA REGIÃO PROMOTORA DO CRHR1 NO CROMOSSOMO 17Q21.31; OS PONTOS VERMELHOS INDICAM OS SNPs DE INTERESSE (RS7209436, RS110402 E RS242924) QUE CONSTITUEM O HAPLÓTIPO TAT. FIGURA MODIFICADA DE BINDER E NEMEROFF, 2010. **43**
- FIGURA 2.1** - FLUXOGRAMA MOSTRANDO O RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIAS ELEGÍVEL E A COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA FINAL. **57**
- FIGURA 2.2** - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS NÍVEIS DE CORTISOL SALIVAR EM MULHERES EUTÍMICAS (N = 42) E DEPRIMIDAS (N = 37) NO PÓS-PARTO E NAS MULHERES CONTROLES SAUDÁVEIS NÃO-PUÉRPERAS (N = 25), IMEDIATAMENTE APÓS O DESPERTAR (0) E EM 30 MINUTOS, 3 HORAS E 12 HORAS DEPOIS DE DESPERTAR. RESPOSTA DO CORTISOL AO DESPERTAR (CAR: DESPERTAR (0) → 30 MIN); * $p = 0,05$ NAS MULHERES CONTROLES SAUDÁVEIS NÃO-PUÉRPERAS EM COMPARAÇÃO COM AS MULHERES DEPRIMIDAS APÓS O PARTO; † $p < 0,001$ NAS MULHERES CONTROLES SAUDÁVEIS NÃO-PUÉRPERAS EM COMPARAÇÃO COM AS MULHERES EUTÍMICAS E DEPRIMIDAS NO PÓS-PARTO; ** $p < 0,05$ NAS MULHERES DEPRIMIDAS NO PÓS-PARTO EM COMPARAÇÃO COM AS MULHERES EUTÍMICAS NO PÓS-PARTO. **61**
- FIGURA 2.3** - MÉDIA E ERRO PADRÃO DA MÉDIA DO INCREMENTO RELATIVO DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTISOL APÓS O DESPERTAR (CARI%) E DA REDUÇÃO RELATIVA DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTISOL NA VARIAÇÃO DIURNA (% DE VDR); * $p < 0,05$ COMPARADO COM AS MULHERES EUTÍMICAS NO PÓS-PARTO, E $p < 0,001$ COMPARADO COM AS MULHERES DEPRIMIDAS NO PÓS-PARTO; ** $p < 0,05$ COMPARADO COM AS MULHERES EUTÍMICAS NO PÓS-PARTO, E $p = 0,05$ COMPARADO COM AS MULHERES SAUDÁVEIS CONTROLES NÃO-PUÉRPERAS. **62**
- FIGURA 3.1** - CORRELAÇÕES, EM MULHERES DEPRIMIDAS PÓS-PARTO, ENTRE AUMENTO DE CARI% E GLU/CR (A) E GLX/CR (B); E ENTRE AUMENTO DE VDR% E MI (C). **78**
- FIGURA 4.1** - INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE DO CRHR1 NAS MEDIDAS DE CORTISOL EM PUÉRPERAS DEPRIMIDAS SEM CÓPIA TAT (D-TAT⁰) E COM 1 OU 2 CÓPIAS TAT (D-TAT^{1/2}), E EM PUÉRPERAS EUTÍMICAS SEM CÓPIA TAT (E-TAT⁰) E COM 1 OU 2 CÓPIAS TAT (E-TAT^{1/2}) DO POLIMORFISMO DO GENE PROMOTOR DO RECEPTOR 1 DE CRH. **95**
- FIGURA 4.2** - PUÉRPERAS PORTADORAS DE CÓPIA TAT APRESENTARAM CORRELAÇÃO DO INCREMENTO RELATIVO DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTISOL APÓS O DESPERTAR (CARI%) COM A ESCALA DE DEPRESSÃO PÓS-PARTO DE EDINBURG (EPDS) (A) E COM A ESCALA DE ESTRESSE PERCEBIDO (PSS) (B). **96**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS E DOS MÉTODOS DE COLETAS EM ESTUDOS AVALIANDO O FUNCIONAMENTO DO EIXO HHA EM TRANSTORNOS DEPRESSIVOS PUERPERAIS.	26
TABELA 1.2 - RESULTADOS DE ESTUDOS DE ¹ H-ERM QUE AVALIARAM METABÓLITOS NO GCA DE PACIENTES ADULTOS COM TRANSTORNOS DEPRESSIVOS COMPARADOS COM CONTROLES.	39
TABELA 2.1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO.	59
TABELA 2.2 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO INCREMENTO RELATIVO DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTISOL APÓS O DESPERTAR (CARI%) E DA REDUÇÃO RELATIVA DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTISOL NA VARIAÇÃO DIURNA (VDR%) DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS DO EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR ATUAL.	63
TABELA 3.1 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DAS PUÉRPERAS EUTÍMICAS E DEPRIMIDAS.	76
TABELA 3.2 - NÍVEIS DE METABÓLITOS, NORMALIZADOS PELA CREATINA, NO GCA DE PUÉRPERAS EUTÍMICAS E DEPRIMIDAS, E MEDIDAS DO EIXO HHA.	77
TABELA 3.3 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) ENTRE METABÓLITOS PRESENTES NO GCA DE PUÉRPERAS EUTÍMICAS (EPP) E DEPRIMIDAS (DPP), E MEDIDAS DO EIXO HHA.	78
TABELA 4.1 – TOTAL E PORCENTAGEM DA FREQUÊNCIA DO HAPLÓTIPO TAT ENTRE PUÉRPERAS EUTÍMICAS E DEPRIMIDAS.	92
TABELA 4.2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO.	93
TABELA 4.3 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE DO PROMOTOR DO CRHR1 DE ACORDO COM O CARI% E O DIAGNÓSTICO PARA DPP.	96

LISTA DE SIGLAS

(/Cr): Normalizado para creatina

¹H-ERM: Espectroscopia por ressonância magnética de emissão de próton

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico (adrenocorticotropic hormone)

BAI: Inventário de ansiedade de Beck (*Beck Anxiety Inventory*)

BRISA: *Brazilian, Ribeirão Preto e São Luís, Birth Cohort Studies*

CAR: Resposta do cortisol ao despertar (*cortisol awakening response*)

CARi%: Incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar

CES-D: Escala de depressão do centro de estudos epidemiológicos (*Center for Epidemiologic Studies Depression Scale*)

Cho: Compostos de colina (glicerofosfocolina + fosfocolina + colina livre)

Cr: Creatina

CRH: Hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin-releasing hormone*)

CRHR1: Receptor 1 do CRH (*corticotropin releasing hormone receptor 1*)

DEX: Dexametasona

DPP: Depressão pós-parto

DST: Teste de supressão de dexametasona (*dexamethasone suppression test*)

EPDS: Escala de depressão pós-parto de Edimburgo (*Edinburgh Postnatal Depression Scale*)

ERM: Espectroscopia por ressonância magnética

ESS: Escala de sonolência de Epworth (*Epworth Sleepiness Scale*)

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GCA: Giro do cíngulo anterior

Glu: Glutamato

Glx: Complexo glutamato + glutamina

HAM-D: Escala de avaliação de Hamilton para depressão

HHA: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

mI: Mio-inositol

NAA: N-acetil-aspartato + N-acetil-aspartil-glutamato

NMDA: N-metil-D-aspartato

PSS-14: Escala de estresse percebido (*Perceived Stress Scale*)

RM: Ressonância magnética

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)

SRQ-20: *Self-Reporting Questionnaire*

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TDM: Transtorno depressivo maior

TSST: *Trier social stress test*

VDr%: Redução relativa das concentrações de cortisol na variação diurna

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	POR QUE ESTUDAR DEPRESSÃO PÓS-PARTO?	16
1.1.1	<i>Classificação diagnóstica, prevalência e fatores de risco da depressão pós-parto</i>	17
1.1.2	<i>Alterações hormonais na depressão pós-parto</i>	19
1.2	FISIOLOGIA DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL	21
1.2.1	<i>Avaliação da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal</i>	22
1.2.2	<i>Funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na depressão pós-parto</i>	24
1.3	ANATOMIA E FUNÇÃO DO GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR	31
1.4	A ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE EMISSÃO DE PRÓTON, E OS METABÓLITOS AVALIADOS	32
1.4.1	<i>Complexo glutamato + glutamina</i>	34
1.4.2	<i>Compostos de colina</i>	34
1.4.3	<i>N-acetil-aspartato</i>	35
1.4.4	<i>Mio-inositol</i>	36
1.4.5	<i>Compostos de Creatina</i>	36
1.5	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE METABÓLITOS E O FUNCIONAMENTO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE- ADRENAL	37
1.6	ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA NO GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR EM TRANSTORNOS DEPRESSIVOS	38
1.7	A REGULAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL PELO GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR	39
1.8	INFLUÊNCIA DOS FATORES GENÉTICOS NA DPP	41
1.8.1	<i>O gene promotor do receptor 1 do hormônio liberador de corticotrofina</i>	42
1.8.2	<i>Polimorfismos do gene promotor do CRHR1 na depressão pós-parto</i>	43
1.9	O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL COMO ENDOFENÓTIPO E O GENE DE INTERESSE.....	44
1.9.1	<i>Polimorfismos do gene promotor do CRHR1 e o eixo HHA</i>	44
1.10	JUSTIFICATIVA	45
1.11	OBJETIVOS	46
1.12	HIPÓTESES	47
2	ALTERAÇÕES NO FUNCIONAMENTO DO EIXO HHA EM MULHERES COM DEPRESSÃO PÓS-PARTO.....	49
2.1	RESUMO.....	49
2.2	INTRODUÇÃO	50
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
2.3.1	<i>Desenho do estudo e protocolo</i>	52
2.3.2	<i>Indicadores de saúde mental durante a gravidez e pós-parto</i>	53
2.3.3	<i>Participantes</i>	53
2.3.4	<i>Coleta do cortisol salivar</i>	55
2.3.5	<i>Dosagem do cortisol salivar</i>	55
2.3.6	<i>Análise estatística</i>	56
2.4	RESULTADOS	57
2.4.1	<i>Variáveis clínicas e sociodemográficas</i>	57
2.4.2	<i>Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal</i>	60
2.5	DISCUSSÃO	63
3	ALTERAÇÕES DO EIXO HHA NA DEPRESSÃO PÓS-PARTO E ASSOCIAÇÕES COM A NEUROQUÍMICA FUNCIONAL DO GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR.....	69
3.1	RESUMO.....	69
3.2	INTRODUÇÃO	70

3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
3.3.1	<i>Participantes.....</i>	72
3.3.2	<i>Coleta de cortisol e medidas auxiliares.....</i>	73
3.3.3	<i>Aquisição de neuroimagem e quantificação de metabólitos.....</i>	74
3.3.4	<i>Análise estatística.....</i>	75
3.4	RESULTADOS	75
3.4.1	<i>Características clínicas e demográficas da amostra.....</i>	75
3.4.2	<i>Resultados das medidas do cortisol e metabólitos</i>	76
3.4.3	<i>Correlações entre metabólitos e medidas do cortisol.....</i>	77
3.5	DISCUSSÃO	79
4	IMPLICAÇÕES DE POLIMORFISMOS DO GENE DO CRHR1 NO FUNCIONAMENTO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL NA DEPRESSÃO PÓS-PARTO	84
4.1	RESUMO.....	84
4.2	INTRODUÇÃO	85
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
4.3.1	<i>Participantes.....</i>	87
4.3.2	<i>Coleta e dosagem do cortisol e medidas auxiliares do eixo HHA.....</i>	89
4.3.3	<i>Extração de DNA.....</i>	89
4.3.4	<i>Genotipagem de SNPs do CRHR1</i>	90
4.3.5	<i>Análise Estatística</i>	90
4.4	RESULTADOS	92
4.4.1	<i>Variáveis sociodemográficas e clínicas.....</i>	92
4.4.2	<i>Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....</i>	94
4.5	DISCUSSÃO	97
5	CONCLUSÕES.....	102
6	REFERÊNCIAS.....	105
7	ANEXOS.....	132

1 - INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Por que estudar depressão pós-parto?

O conhecimento a respeito da relação entre alterações fisiológicas no pós-parto e mudanças no humor, remonta a séculos. Em um breve histórico sob o título de "Sadness and Support: A Short History of Postpartum Depression"*, Sparks, 2013, informa que a associação de transtornos do humor com o período puerperal fora descrito desde Hipócrates, no século IV a.C., o qual propunha que, se o fluído escorrendo do útero após o parto fosse reprimido, ele correria para a cabeça causando agitação, delírio e ataques de mania. No século XII, Trotula de Salerno, pioneira da obstetrícia e ginecologia, acreditava que os distúrbios pós-parto eram devidos ao aumento da umidade no corpo. Por sua vez, Louis-Victor Marcé, psiquiatra francês, em 1858, escreveu o “Treatise On Insanity In Pregnant, Postpartum, And Lactating Women”, o primeiro artigo que formalmente tratava apenas de transtornos ligados ao puerpério. Posteriormente, Karnosh e Hope, em 1937, investigaram se alterações hormonais eram causadoras de alterações do humor no pós-parto.

Atualmente, entre os transtornos psiquiátricos puerperais, a depressão pós-parto (DPP), geralmente negligenciada e não tratada (Earls, 2010), tem ganhado a atenção da sociedade não só por sua alta prevalência (Gavin *et al.*, 2005), como também por noticiários chocantes relatando o abandono de recém-nascidos por suas mães. Por exemplo, nos Estados Unidos, o acumulado dos efeitos negativos da depressão perinatal, em conjunto com incidentes críticos como infanticídio e abandono, tem levado o trabalho de especialistas em saúde mental perinatal a influenciar a legislação, impelindo o Estado a recomendar o treinamento de profissionais de saúde para o rastreamento de transtornos do humor no período puerperal e o acompanhamento das mães deprimidas (Rhodes e Segre, 2013). Estas ações visam, sobretudo, minimizar as implicações dos efeitos negativos da DPP para a própria mulher e na interação do binômio mãe-bebê.

Mulheres com DPP sofrem de prejuízos cognitivos que levam a uma percepção negativa de si e dos outros, inclusive do seu filho (Teti e Gelfand, 1991; Stein *et al.*, 2010) e o aumento dos sintomas depressivos está associado com uma diminuição do foco em relação à família (Salmela-Aro *et al.*, 2001). A DPP também interfere no aleitamento materno (Gagliardi, Petrozzi e Rusconi, 2012), prejudicando de maneira geral o vínculo mãe-bebê (Field, 2010), cujas consequências podem repercutir no aumento da prevalência de problemas

comportamentais nos filhos (Josefsson e Sydsjo, 2007; Araya *et al.*, 2009). Uma metanálise confirma a associação entre depressão materna e psicopatologia geral em crianças (Goodman *et al.*, 2011).

Assim, dados os prejuízos que decorrem para todo o contexto familiar, em especial para os filhos e para a própria mãe, as pesquisas em DPP concentram-se nas suas manifestações e consequências e também na sua etiologia. Ultimamente, os resultados de estudos apontam para uma associação de fatores sociodemográficos, biológicos e psiquiátricos/psicológicos para a ocorrência de sintomas depressivos no puerpério. Desta forma, compreender o papel das alterações hormonais, da neuroquímica cerebral, e da vulnerabilidade genética em interação com estresse ambiental, pode ser a chave para um melhor tratamento e diagnóstico da DPP.

1.1.1 Classificação diagnóstica, prevalência e fatores de risco da depressão pós-parto

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição (*Diagnostic Statistical Manual*, DSM-5) (American Psychiatric Association, 2013) e a Classificação Internacional de Doenças, décima revisão (CID-10) publicado pela Organização Mundial de Saúde, não reconhecem a DPP como um diagnóstico à parte, mas sim como um episódio depressivo maior.

É importante ressaltar que da 4ª edição para a 5ª edição do DSM houve uma mudança no critério de diagnóstico com relação ao período. Enquanto a 4ª edição considerava DPP a ocorrência de depressão com o especificador “com início no pós-parto”, a 5ª edição passa a caracterizar como DPP o episódio depressivo com início durante a gestação ou no pós-parto, e que deve preencher os seguintes critérios para episódio depressivo maior:

a) Cinco ou mais de 9 sintomas (incluindo, no mínimo, um de humor depressivo e perda de interesse ou prazer) no mesmo período de 2 semanas. Cada um desses sintomas representa uma mudança do funcionamento prévio, precisando estar presente quase todos os dias:

- Humor depressivo (subjetivo ou observado), na maior parte do dia, quase todos os dias;
- Perda de interesse ou prazer, na maior parte do dia, quase todos os dias;
- Redução ou aumento no peso ou no apetite. Peso: mudança de 5% em 1 mês;

- Insônia ou hipersonia;
- Agitação ou retardo psicomotor (observados);
- Perda de energia ou fadiga;
- Sentimento de inutilidade ou culpa;
- Concentração prejudicada ou indecisão;
- Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida ou tentativa de suicídio.

b) Os sintomas causam sofrimento significativo ou diminuição da capacidade;

c) O episódio não é atribuído a uma substância ou outra condição médica;

d) O episódio não pode ser mais bem explicado como transtorno psicótico;

e) Nunca houve um episódio maníaco ou hipomaníaco. A exclusão e) não se aplicará se um episódio (hipo) maníaco tiver sido induzido por uma substância ou puder ser atribuído a outra condição médica.

A CID-10 reconhece apenas a categoria "Transtornos mentais e de comportamento associados ao puerpério, não classificados em outro lugar", que começam em até 6 semanas após o parto.

Em uma revisão sistemática e meta-análise foi encontrada uma prevalência de DPP entre 10 e 22%, (Gaynes *et al.*, 2005); no Brasil, os dados de prevalência também mostram uma ampla variação entre 7,2 e 44,2 % (Hasselmann, Werneck e Silva, 2008; Cantilino *et al.*, 2010). Estas variações parecem depender do método de avaliação utilizado, do período puerperal avaliado e das características culturais da população. Na região de Ribeirão Preto, a DPP mostrou-se altamente prevalente acometendo 23,7% de uma amostra de 1.083 puérperas (De Figueiredo *et al.*, 2014).

Uma condição menor e mais transitória de alteração do humor no puerpério é a disforia pós-parto, ou Blues, que ocorre no puerpério imediato (primeiros 10 dias após o parto) e acomete de 15 a 85% das mulheres (Henshaw, 2003). O Blues caracteriza-se por irritabilidade, leve exaltação, choro fácil, cansaço, ansiedade, redução do apetite e certa confusão mental (Stein, Marsh e Morton, 1981; Henshaw, 2003). A disforia pré-menstrual e a história prévia de depressão são fatores de risco para a ocorrência do Blues pós-parto (Henshaw, 2003). A presença de Blues parece aumentar a probabilidade de desenvolver DPP, conforme relatado numa amostra de 853 puérperas alemãs das quais 55,2% que tiveram Blues apresentaram uma chance 3,8 vezes maior de ter DPP (Reck *et al.*, 2009).

Assim, enquanto quadros depressivos mais leves como o Blues pós-parto acometem uma parcela significativa das mães, episódios depressivos maiores também apresentam uma

prevalência relevante, justificando uma intervenção mais precoce com uma maior atenção aos sintomas depressivos durante este período (Stowe, Hostetter e Newport, 2005).

Inúmeros outros fatores indicam uma predisposição para o desenvolvimento de DPP, como história passada de transtorno disfórico pré-menstrual e de episódios depressivos, DPP prévia, presença de depressão ou ansiedade na gestação, história familiar de depressão, eventos de vida estressantes, baixo suporte social e pobreza (Hobfoll *et al.*, 1995; Ritter *et al.*, 2000; Wisner, Parry e Piontek, 2002; Robertson *et al.*, 2004). Também, podem contribuir para depressão puerperal a baixa idade materna (Petrosyan, Armenian e Arzoumanian, 2011), transtornos de personalidade (Akman, Uguz e Kaya, 2007) e a condição de imigrante da mulher (Falah-Hassani *et al.*, 2015). Blom e colaboradores (Blom *et al.*, 2010) constataram que as mulheres que experimentaram complicações obstétricas, incluindo a pré-eclâmpsia, a internação pré-natal e emergência cesariana, eram mais prováveis de ter sintomas depressivos aos dois meses do pós-parto. Todavia, o tipo de parto não parece ser um fator de risco para DPP (Carter, Frampton e Mulder, 2006). No mais, há evidências de que a sintomatologia da DPP pode ser influenciada pela saúde (Blom *et al.*, 2010) e temperamento (Vik *et al.*, 2009) do bebê.

Como visto, embora haja muitos riscos contextuais externos contribuindo para a DPP, este parece ser um complexo transtorno do humor que também compreende fatores internos como a vulnerabilidade genética, neuroquímica e alterações hormonais que, por serem alvos deste estudo, serão destacados a seguir.

1.1.2 Alterações hormonais na depressão pós-parto

Após o parto ocorrem mudanças abruptas no ambiente hormonal, com a queda de vários hormônios esteroides como progesterona, estradiol e cortisol. Ao redor do terceiro mês de gravidez, os níveis de estradiol e progesterona estão cerca de, respectivamente, 50 e 10 vezes mais elevados em comparação com os picos máximos do ciclo menstrual, e após o parto os valores retornam ao normal entre 1 e 3 dias para o estradiol e entre 3 e 7 dias para a progesterona; por sua vez, os níveis de cortisol aumentam de 3 a 4 vezes durante o trabalho de parto (Bloch, Daly e Rubinow, 2003; Kammerer, Taylor e Glover, 2006). De forma geral estes hormônios caem abruptamente nas primeiras 12 horas após o nascimento, conforme demonstrado na **Figura 1.1**, causando uma mudança drástica no ambiente hormonal.

Todavia, enquanto todas as mulheres experimentam essas mudanças extremas dos níveis hormonais após o parto, apenas algumas desenvolvem DPP, fazendo supor que existe uma sensibilidade biológica individual a estas alterações. Para avaliar a existência desta vulnerabilidade individual, foi proposto um modelo no qual 8 mulheres sem e 8 mulheres com história passada de DPP receberam suplemento adicional de esteroides gonadais (Bloch *et al.*, 2000). Quando os níveis séricos dos esteroides gonadais assemelhavam-se aqueles encontrados no final da gestação, os hormônios foram retirados e então 5 das 8 mulheres eutímicas com história passada de DPP passaram a apresentar sintomas depressivos, enquanto nenhuma das outras 8 mulheres eutímicas sem história de DPP apresentaram alteração de humor. Os autores concluíram que estes resultados apontam para a importância de níveis de esteroides gonadais na etiologia da DPP por identificar mulheres que são particularmente sensíveis às variações destes hormônios. No entanto, este trabalho não esclarece qual é o mecanismo que liga a retirada de estradiol e progesterona à depressão em mulheres vulneráveis.

Figura 1.1 - Queda natural dos níveis hormonais de 14 mulheres saudáveis, medidos imediatamente após o parto (T0) e em 1 hora (T1), 2 horas (T2), 6 horas (T6) e 12 horas (T12) após o parto; *p < 0,05 comparado com a medida anterior; †p < 0,05 para T12 comparado com T0. (Fonte: de Rezende et al., em preparação).

Um estudo replicando o modelo de retirada de esteroides gonadais propostos por Block et al., 2000, mostrou que estradiol e progesterona estavam associados com índices mais elevados de cortisol em mulheres com história de DPP comparadas com mulheres sem história de DPP (Bloch *et al.*, 2005). Posteriormente, estes achados foram apoiados por modelos de depressão que encontraram alterações nos níveis de cortisol (Brummelte e Galea, 2010). Ainda, estudos com animais indicam um papel antidepressivo do estrógeno e que a

queda abrupta deste hormônio parece estar relacionada à presença de sintomas depressivos (Molina-Hernandez e Tellez-Alcantara, 2001; Frye e Walf, 2002; Suda *et al.*, 2008). Também foi mostrado que mulheres com DPP apresentavam níveis mais baixos de serotonina do que controles não deprimidas (Gu *et al.*, 2003).

1.2 Fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é composto de hormônios regulados por feedback negativo. Estes hormônios são o hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin-releasing hormone*, CRH), produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo, que, atuando sobre a hipófise anterior, induz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotrophic hormone*, ACTH) que, por sua vez, atua sobre os receptores localizados no córtex da glândula adrenal, onde é sintetizado e liberado o cortisol - um hormônio glicocorticoide (Miller e O'callaghan, 2002). O eixo HHA é marcado por um ritmo circadiano, cujos níveis de cortisol são mais elevados ao despertar, pela manhã, e vão caindo ao longo do dia em um ciclo de 24 horas (Young, Carlson e Brown, 2001). No entanto, este declínio é intercalado por episódios agudos de secreção, entre os quais se destaca a resposta do cortisol ao despertar (*cortisol awakening response*, CAR), que ocorre na parte da manhã, cerca de 30 minutos após o despertar (**Figura 1.2**). O CAR é caracterizado por um pico secretório no qual são encontradas concentrações máximas de cortisol (Wilhelm *et al.*, 2007), ele é um modelo natural de resposta ao estresse endógeno, e é usado para verificar a reatividade do eixo HHA (Duan *et al.*, 2013).

Figura 1.2 - Atividade rítmica do eixo HHA: níveis de cortisol verificados durante 24 horas em mulheres deprimidas (linha descontinua) e mulheres controles (linha contínua); o período claro do dia está representado em amarelo, o período noturno em cinza, e a transição entre períodos é representada pela mescla de cinza com amarelo; o intervalo do pico secretório do CAR está destacado com um retângulo vermelho. (Figura modificada de Young, Carlson e Brown, 2001).

1.2.1 Avaliação da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

A atividade do eixo HHA pode ainda ser avaliada de maneira induzida. As formas mais comuns são por indução farmacológica através do teste de supressão de dexametasona (DEX) (*dexamethasone suppression test*, DST) apenas, ou com dexametasona combinada com CRH no teste *dexamethasone/cortisol-releasing hormone* (DEX/CRH) (Spijker e Van Rossum, 2012); e, também, por exposição a estressores que possibilitam verificar a reatividade do eixo, por provocarem aumentos em cortisol e ACTH (Kirschbaum, Pirke e Hellhammer, 1993; Gerra *et al.*, 2001).

A dexametasona é um glicocorticoide sintético com afinidade para receptores glicocorticoides, sua ligação ao receptor normalmente promove um feedback negativo no eixo HHA, com diminuição na liberação de cortisol, mas se o eixo HHA estiver desregulado, tal supressão não ocorre. Assim, o DST foi desenvolvido, na década de 1960, para avaliar a função do eixo HHA em pacientes com doença de Cushing e, posteriormente, foi usado nos estudos para depressão (Carroll, Martin e Davies, 1968). O protocolo do DST requer uma dose oral de 1,0mg de DEX às 23:00 horas, seguido por coleta de amostras ao longo do dia

seguinte. Todavia, este teste é pouco sensível para diagnóstico de Transtorno Depressivo Maior (TDM), detectando baixa porcentagem de pacientes não supressores (12 a 44%), quando comparado, por exemplo, com a sensibilidade para pacientes com transtornos depressivos graves, como a depressão psicótica, 64 a 78% (Arana, Baldessarini e Ornstein, 1985; Nelson e Davis, 1997) que é um tipo de TDM. Para superar as limitações do DST, foi desenvolvido o teste DEX/CRH (Heuser, Yassouridis e Holsboer, 1994). A administração apenas de CRH já havia demonstrado eficácia diagnóstica ao causar uma menor resposta de ACTH em pacientes deprimidos comparados com controles (Kathol *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1990). Para a realização do teste DEX/CRH deve ser administrada uma dose de 1,5 mg de DEX às 23:00, seguida por administração de 100 µg de CRH às 15:00 horas do dia seguinte. Amostras de sangue para dosar cortisol e ACTH devem ser coletadas a cada 15 minutos entre 14:00 e 18:00 horas. O teste DEX/CRH mostrou uma sensibilidade de 80% para o diagnóstico de depressão (Heuser, Yassouridis e Holsboer, 1994). Todavia, devido ao uso de fármacos e a necessidade de coletas seriadas seu emprego é dificultado em pacientes não hospitalizados e em grande coortes (Spijker e Van Rossum, 2012).

Por sua vez, testes de estresse podem provocar a reatividade do eixo sem a necessidade de fármacos. O Trier Social Stress Test (TSST), desenvolvido por (Kirschbaum, Pirke e Hellhammer, 1993), é um dos modelos mais utilizados na atualidade. Seguindo o protocolo do TSST, o participante é convidado a realizar um discurso seguido por uma tarefa aritmética mental, ambos durando cerca de 5 minutos, em frente a uma plateia usando jaleco branco e que não exhibe sinais de reforço positivo. O TSST leva a uma moderada resposta do eixo com elevação do cortisol e ACTH em voluntários saudáveis. (Dietz *et al.*, 2013; Petrowski *et al.*, 2013; Pruessner *et al.*, 2013).

Dados estes aspectos, o CAR se apresenta como uma forma mais natural de se medir a atividade do eixo HHA. Sua realização pode ser feita em domicílio, com aparato simples, e a coleta é de fácil entendimento, alcançando quase toda a população. Em voluntários saudáveis é esperado um aumento entre 50% e 160% dos níveis de cortisol em cerca de 30 minutos após o despertar, fazendo deste um importante biomarcador do funcionamento do eixo HHA (Pruessner *et al.*, 1997; Clow *et al.*, 2004). Uma revisão mostrou que estudos avaliando o CAR em transtornos depressivos revelam uma importante, embora complexa, associação entre CAR e vulnerabilidade à depressão (Dedovic e Ngiam, 2015).

O CAR parece ser influenciado por uma série de fatores, o que torna importante a adequada instrução para sua coleta. Estes fatores incluem o padrão do sono (duração, e horário de acordar), o período sazonal da coleta, atividade física, tabagismo, doença

cardiovascular e outras condições médicas (Vreeburg, Kruijtzer, *et al.*, 2009). Além disso, enquanto o estresse no trabalho parece aumentar o CAR, o burnout e a exaustão tem um efeito oposto (Chida e Steptoe, 2009). No entanto, Wust e colaboradores (Wust *et al.*, 2000) não encontraram influência de idade, uso de contraceptivos orais, tabagismo, hora de despertar ou duração do sono, sobre os níveis de cortisol livre após o despertar; concluindo que o CAR pode ser utilizado em inúmeros contextos clínicos, além de ser barato e fácil de empregar. Por fim, (Stalder *et al.*, 2016), fornecem uma revisão atualizada e rica em detalhes especificando as instruções e as variáveis que devem ser consideradas na avaliação do CAR.

Mudanças na regulação do eixo HHA têm sido associadas a vários transtornos psiquiátricos, especialmente com transtornos do humor (Gold e Chrousos, 2002). Entre os hormônios do eixo HHA, o cortisol aparece como um dos biomarcadores mais estudados na depressão (Mossner *et al.*, 2007; Foland-Ross, Hardin e Gotlib, 2013). Em transtornos depressivos, embora não tenham sido encontradas elevações de CRH, foram notados níveis mais altos de cortisol e de ACTH e a não supressão do cortisol pelo DST (Stetler e Miller, 2011). Elevados níveis de cortisol parecem estar relacionados com a idade avançada, hospitalização, depressão melancólica, e com características psicóticas e endógenas (Stetler e Miller, 2011). Na depressão maior, a hora do dia e o tipo de coleta são aspectos importantes para detectar altos níveis de cortisol, este achado é revelado principalmente em estudos conduzidos no período da tarde, com várias coletas, ou na observação da reatividade em paradigmas de estresse (Burke *et al.*, 2005; Stetler e Miller, 2011).

1.2.2 Funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na depressão pós-parto

O funcionamento do eixo HHA sofre modificações drásticas durante a gestação devido ao aumento dos níveis do CRH que, normalmente sintetizado no hipotálamo, passar a ser produzido pela placenta de onde é liberado na corrente sanguínea, aumentando conforme a gestação evolui (Frim *et al.*, 1988; Kalantaridou *et al.*, 2003). Os níveis de cortisol encontrados no final da gestação são semelhantes aos observados na Síndrome de Cushing (Magiakou *et al.*, 1997), e, como já posto no **subitem 1.1.2**, logo após o parto caem drasticamente. Esta queda abrupta parece predispor ao surgimento da DPP (Kammerer, Taylor e Glover, 2006).

Conforme exposto na **Tabela 1.1**, os resultados dos estudos que avaliaram a associação entre níveis de hormônios do eixo HHA e sintomas depressivos no pós-parto são

bastante controversos. Enquanto a maioria (26; 63,4%) não encontrou nenhuma associação entre humor depressivo e alterações do eixo HHA (avaliada principalmente pelos níveis de cortisol), os demais (15; 36,6%) encontraram associação. Esta tabela é parte de uma revisão que objetivou investigar se vieses metodológicos estariam influenciando esta discrepância dos resultados. A análise das variáveis encontrou grande variabilidade metodológica entre os estudos, como o país de origem e tamanho da amostra, a diversidade de questionários e/ou entrevistas utilizadas na avaliação diagnóstica, o período do puerpério em que foram realizadas as coletas, e as características dos procedimentos de coleta, como tipo de material coletado, horário e quantidade de amostras.

O puerpério pode ser dividido em 3 períodos de acordo com os dias decorridos do nascimento: até 10 dias (período imediato), entre 10 e 42 dias (período tardio) e a partir de 42 dias (período remoto). Assim, houve uma grande variação no tamanho da amostra (18 a 247) e, a maioria dos estudos teve depressão como condição diagnóstica (20; 48,8%), foram realizados na Europa (20; 48,8%), no período imediatamente após o parto (30; 73,1%), de manhã (30; 73,1%), com uma única medida por dia (17; 41,5%) e o sangue foi o fluido corpóreo mais recolhido (29; 70,7%).

Enquanto uma metanálise encontrou associação entre transtorno bipolar e disfunção no eixo HHA (Belvederi Murri *et al.*, 2016), em DPP não é possível fazer este tipo de análise estatística devido à heterogeneidade metodológica. No entanto, de acordo com achados da literatura, já mostrados anteriormente para o funcionamento e avaliação do eixo HHA, é possível inferir que coletas seriadas de saliva e testes de reatividade, incluindo o CAR, sejam procedimentos com resultados mais confiáveis na associação do eixo com DPP. Neste sentido nós não apenas conduzimos o estudo atual de acordo com um desenho mais adequado (Taylor *et al.*, 2009), como também padronizamos nossa coleta para evitar vieses nos dados da reatividade natural do eixo (Stalder *et al.*, 2016).

Tabela 1.1 – Características das amostras e dos métodos de coletas em estudos avaliando o funcionamento do eixo HHA em transtornos depressivos puerperais.

(Autor, ano)	País	Amostra (total)	Idade	Instrumento de avaliação	Diagnóstico /Condição	Pós-parto (data)	Pós-parto (período)	Características das coletas	Período do dia	Material coletado	Alterações no eixo HHA
(Handley <i>et al.</i> , 1977)	UK	18	18 - 31	MAACL, BDI (C)	Depressão	2º – 5º dias	I	1 medida por dia / dias consecutivos	9 – 9:30 am	sangue	NS
(Handley <i>et al.</i> , 1980)	UK	71	26,4 (17 - 39)	Blues Index BDI; MAACL; VAS (80th percentil)	Blues	1º - 5º dias 6ª semana	I/T	1 medida por dia / dias consecutivos	9 - 9:30 am	sangue	↑ níveis de cortisol (período imediato)
(Kuevi <i>et al.</i> , 1983)	UK	44	24,7 (0,8)	VAS; self-rating mood scale, frequency of crying	Blues Depressão	2º – 5º dias	I	1 medida por dia / dias consecutivos	10 am - meio dia	sangue	NS
(Greenwood e Parker, 1984)	Austrália	45	29,6 (19 - 40)	GHQ > 5 BDI	Blues (ou estado depressivo/melancolia)	3º – 5º dias 6ª semana	I	DST	4 / 11 pm	sangue	NS
(Feksi <i>et al.</i> , 1984)	UK	40	Não descrita	Symptom checklist of Pitt; VAS; ACL	Blues	1º – 5º dias	I	4 medidas por dia / dias consecutivos	6 am /meio dia / 6 pm / 10 pm	saliva	NS
(Brinsmead <i>et al.</i> , 1985)	Austrália	19	não descrita	POMS, VAS, Blues Index by Handley / Carrol Depressão Inventory (C)	Distúrbio do humor Depressão	4º dia 8ª semana	I	medida única	não descrito	sangue	NS
(Gard <i>et al.</i> , 1986)	UK	52	28,04 (17 - 36)	MAACL > 21 BDI > 4 Interview	Blues Depressão	1º – 5º dias 9º mês	I/T	1 medida por dia / dias consecutivos	manhã	sangue	NS
(Harris <i>et al.</i> , 1989)	UK	126	24,6 (17 - 40)	EPDS ≥ 12 Raskin > 7 MADRS > 11	Depressão	6ª – 8ª semana	R	3 medidas por dia / único dia medida única	8 am / 3 pm / 22 pm 3 pm	saliva sangue	NS

(Autor, ano)	País	Amostra (total)	Idade	Instrumento de avaliação	Diagnóstico /Condição	Pós-parto (data)	Pós-parto (período)	Características das coletas	Período do dia	Material coletado	Alterações no eixo HHA
(Smith <i>et al.</i> , 1990)	Austrália	97	26,2 (3,5)	POMS MADRS	Distúrbio do humor	2º dia	I	medida única	8– 10 am	sangue	NS
						3º – 27º / 35º dia	T	DST	4 pm		
(Ehlert <i>et al.</i> , 1990)	Alemanha	70	27,5	BFS ≥ 26	Blues	1º – 5º dias	I	3 medidas por dia / dias consecutivos	8 am / 3 pm / 8 pm	saliva	↑ níveis de cortisol pela manhã
(O'hara <i>et al.</i> , 1991)	EUA	182	27,0 (4,7)	Handley Blues Criteria VAS Blues, BDI RDC/SADS)	Blues	1º – 4º / 6º / 8º dias	I	1 medida por dia/dias consecutivos	antes do café da manhã	sangue	NS
						4º dia		DST	4 pm		
						2º / 4º dias			24 horas	urina	
(Okano e Nomura, 1992)	Japão	47	27,3 (3,4)	Stein Scale ≥ 8 RDC SADS	Blues	3º ou 4º dia	I	1 medida por dia/ não consecutivos	7 am	sangue	↑ níveis de cortisol no período imediato
						30º dia	T		10 am		
(Maes <i>et al.</i> , 1992)	Bélgica	31	28,3 (0,7)	Zung Depressão Scale BDI (C)	Depressão	3º dia	I	medida única	8 am	sangue	NS
								DST	DST		
(Bonnin, 1992)	França	22	20 a 39	Zerssen Scale	Blues	2º – 7º dias	I	1 medida por dia/dias consecutivos	8 – 9 am	saliva	/ (mulheres que não amamentavam no peito)
(Pedersen <i>et al.</i> , 1993)	EUA	26	20 a 38	HRSD VAMS SCID	Humor disfórico	1ª / 3ª / 6ª / 9ª / 12ª semanas	I/T/R	medida única	8:30 – 9 am	sangue	↑ níveis de cortisol sanguíneo (6 semanas)
									24 h	urina	
(Dorn, Susman e Petersen, 1993)	EUA	40	17,3 (1,3)	DISC (C)	Depressão	2ª – 3ª semanas	L	teste de reatividade	8:00 - 08:30 am	sangue	NS

(Autor, ano)	País	Amostra (total)	Idade	Instrumento de avaliação	Diagnóstico /Condição	Pós-parto (data)	Pós-parto (período)	Características das coletas	Período do dia	Material coletado	Alterações no eixo HHA
(Taylor <i>et al.</i> , 1994)	UK	163	não descrita	KBS ≥ 8 EPDS ≥ 10	Blues Depressão	3º dia	I	medida única	10:30 - meio dia	sangue	↑ níveis de cortisol (em Blues)
(Hucklebridge <i>et al.</i> , 1994)	UK	75	18-41 (32,0)	HADS Stein Blues Scale EPDS (C)	Disforia	4º dia	I	medida única	9:30 – 11 am	sangue	NS
(Harris <i>et al.</i> , 1994)	UK	120	26,4 (4,4)	Stein Questionnaire for Blues ≥ 8 Montgomery Asberg Depressão Rating Scale, EPDS	Blues	≤35 dias	I/T	2/3 medidas por dia/ dias distintos	8 am / 2 pm / 10 pm	saliva sangue	NS
(Taylor, Dore e Glover, 1996)	UK	50	18-40	KBS ≥ 8	Blues	2º – 3º dias	I	medida única	24-h	urina	NS
(Magiakou <i>et al.</i> , 1996)	EUA	17	32,0 (1,1)	HRSD >11	Blues Depressão	3ª/ 6ª/ 12ª semanas	T/R	teste de reatividade / 3 períodos distintos	8 pm	sangue	Menor resposta de ACTH ao CRH. Cortisol: NS
(Harris <i>et al.</i> , 1996)	UK	120	26,4 (4,4)	Stein ≥ 8 MADRS EPDS RaskinDSM-III-R	Depressão	≤40 dias	I/T	2/3 medidas por dia/ dias distintos	8 am / 2 pm / 10 pm	saliva sangue	↓ níveis de cortisol, à noite, no período imediato
(Ijuin <i>et al.</i> , 1998)	Japão	40	B: 28,3 (3,4) NB:29,8 (3,5)	Okano's Self-rating Scale > 12; Zung Depressão ≥ 40	Blues	5º dia / 1º mês	I/T	1 medida por dia/períodos distintos	não descrito	sangue	NS

(Autor, ano)	País	Amostra (total)	Idade	Instrumento de avaliação	Diagnóstico /Condição	Pós-parto (data)	Pós-parto (período)	Características das coletas	Período do dia	Material coletado	Alterações no eixo HHA
(Abou-Saleh <i>et al.</i> , 1998)	Emirados Árabes	34	30,8 (6,2)	EPDS > 11 PSE ≥ 5	Depressão	7º dia 8ª ±2 semana	I R	medida única	9 – 10 am	sangue	NS
(Abou-Saleh <i>et al.</i> , 1999)	Emirados Árabes	62	30,8 (6,2)	EPDS ≥ 11	Depressão	7º dia	I	medida única	9 - 10 am	sangue	NS
(Hohlagschwandtn er <i>et al.</i> , 2001)	Áustria	193	28,2 (5,1)	POMS (C)	Estado do humor	1º e 3º dias	I	2 dias	não descrito	sangue	NS
(Nappi <i>et al.</i> , 2001)	Itália	40	30,3 (3,6)	HRSD ≥ 11 Stein Questionnaire >8	Blues	3º dia	I	medida única	8:30 am	sangue	NS
(Corwin <i>et al.</i> , 2005)	EUA	42	21-35	CES-D ≥ 11	Depressão	7º / 14º / 28º dias	I/T	1 medida por dia/períodos distintos	9 -10 am	saliva	NS
(Krpan <i>et al.</i> , 2005)	Canadá	119	(16,7/ 21,1/ 30,9)	6-point likert scale (C)	Depressão	6.93ª ±2.41 semana	R	teste de reatividade	10 am – 2 pm	saliva	adolescentes: \ maduras: /
(Lommatzsch <i>et al.</i> , 2006)	Alemanha	40	28,0 (média)	EPDS > 9	Depressão	1ª / 8ª semanas	I/R	1 medida por dia/períodos distintos	3 -7 pm	sangue	↑ níveis de cortisol
(Jolley <i>et al.</i> , 2007)	EUA	22	20-40	PDSS ≥ 60	Depressão	6ª/12ª semanas	R	teste de reatividade / períodos distintos	início da tarde	sangue	reatividade: NS cortisol: ↓ ACTH: ↑
(Groer e Morgan, 2007)	EUA	194	D: 23,6 (0,9) ND:25,9 (0,4)	POMS-D ≥ 21	Depressão	4ª – 6ª semana	T	medida única	Início da manhã 8 -11 am	saliva sangue	↓níveis de cortisol salivar
(Davis <i>et al.</i> , 2007)	EUA	247	30,7 (5,4)	CES-D (C)	Depressão	8.0ª ±2.1 semana	R	medida única	2:20 pm ±1.5	saliva	NS
(Taylor <i>et al.</i> , 2009)	Suíça	51	D: 32,5 (3,3) ND:32,2 (4,2)	EPDS ≥ 13	Depressão	6ª – 8ª semana	R	2 medidas por dia / único dia CAR	despertar, +30 min, +3 horas, e +12 horas após despertar	saliva	Ao despertar: ↑ CAR: ↓
(Figueiredo e Costa, 2009)	Portugal	91	16-40	EPDS ≥ 10	Depressão	3º mês	R	medida única	urina-24h	urina	NS

(Autor, ano)	País	Amostra (total)	Idade	Instrumento de avaliação	Diagnóstico /Condição	Pós-parto (data)	Pós-parto (período)	Características das coletas	Período do dia	Material coletado	Alterações no eixo HHA
(Fan <i>et al.</i> , 2009)	China	77	Não descrita	HAMD (C)	Depressão	7º dia	I	medida única	9 -10 am	sangue	NS
(Cheng e Pickler, 2010)	EUA	41	26,9 (6,0)	CES-D (C)	Depressão	4ª – 6ª semana	T	CAR	despertar e +30 min	saliva	NS
(O'keane <i>et al.</i> , 2011)	UK	70	33,1 (0,5)	EPDS > 11 Blues Questionnaire (C)	Blues	1º – 6º dia	I	1 medida por dia/dias alternados	11 am-3 pm	sangue	Correlação positiva com o CRH (valores delta) e com o ACTH (pós-parto)
(Saleh El <i>et al.</i> , 2013)	Egito	120	D:28,9 (5,0) D:28,0 (5,9)	EPDS ≥ 13	Depressão	1ª semana	I	medida única	manhã	sangue	↓ níveis de cortisol /
(Castral <i>et al.</i> , 2015)	Brasil	42	24,5 (5,9)	BDI ≥ 18	Depressão	5º ou 30º dia	I ou T	medida única teste de reatividade	10 -11 pm 6 -11 am	saliva	NS
(Shimizu <i>et al.</i> , 2015)	Japão	65	30,7 (5,1)	EPDS ≥ 9 GHQ ≥ 6 (C)	Depressão	1º / 4º meses	T/R	1 medida por dia/períodos distintos	24h	urina	NS

Notas: Períodos Imediato (I), Tardio (T) e Remoto (R); amostra não estratificadas em grupos (C); hormônio liberador de corticotrofina (CRH); hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); deprimida (D); não deprimida (ND); blues (B); não blues (NB); Multiple Affect Adjective Check List (MAACL);; Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS); Beck Depression Inventory (BDI); Research Diagnostic Criteria (RDC); Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia (SADS); Center for Epidemiological Studies Depression Scale (CES-D); General Health Questionnaire (GHQ); Kennerley Blues Scale (KBS); Hamilton Rating Scale for Depression (HAMD); Postpartum Depression Screening Scale (PDSS); Profile of Mood States-Depression (POMS D); Hamilton Rating Scale for Depression (HRSD); adjective check-list (BFS); Present State Examination (PSE); Montgomery Asberg Depressive Rating Scale (MADRS); Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-III-R); Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS); Visual Analogue Mood Scales (VAMS); Visual Analogue Scale (VAS); Adjective Check Lists (ACL) Raskin 3 Area Scale for Depression (Raskin); Diagnostic Interview Schedule for Children (DISC). ant meridiem (a.m.); post meridiem (p.m.); não significativo (NS); nível hormonal elevado (↑) e diminuído (↓); correlação positiva (/) e negativa (\) entre sintomas depressivos e níveis hormonais.

1.3 Anatomia e função do Giro do Cíngulo Anterior

Estudos de neuroimagem têm evidenciado a associação de alterações em estruturas cerebrais com transtornos depressivos, entre estas estruturas destacam-se o giro do cíngulo anterior (GCA), os gânglios da base, hipocampo, amígdala, e o córtex pré-frontal dorsolateral (Videbech e Ravnkilde, 2004; Hamilton, Siemer e Gotlib, 2008; Koolschijn *et al.*, 2009; Kempton *et al.*, 2011). Estes achados mais recentes reforçam as propostas de que estas regiões comporiam um circuito responsável pelas emoções - o sistema límbico (Catani, Dell'acqua e Thiebaut De Schotten, 2013). Todavia, como alvo do presente trabalho, abordaremos o GCA, especificamente o envolvimento da sua neuroquímica com os transtornos depressivos e com o funcionamento do eixo HHA.

O GCA faz parte do córtex límbico, processa informações emocionais, cognitivas, sensoriais e motoras e, ainda, modula respostas viscerais e endócrinas. De acordo com sua funcionalidade, o GCA pode ser anatomicamente subdividido em duas regiões: uma dorsal (cognitiva), áreas 24 e 32 de Brodmann, e outra rostral-ventral (emocional), áreas 24, 25, 32 e 33 de Brodmann. A subdivisão cognitiva mantém conexões com o córtex pré-frontal lateral, córtex parietal e com áreas motoras suplementares. E a subdivisão emocional está conectada com a amígdala, matéria cinzenta periaquedutal, núcleo accumbens, hipotálamo, insula anterior, hipocampo e córtex orbitofrontal (Devinsky, Morrell e Vogt, 1995; Bush, Luu e Posner, 2000). A **Figura 1.3** representa estas subdivisões.

Figura 1.3 – Em (A) está representada uma visão esquemática do GCA com a subdivisão rostral-ventral (emocional) marcada em azul, e a subdivisão dorsal (cognitiva) marcada em vermelho. Em (B) é destacada a localização neuroanatômica do GCA. (Bush, Luu e Posner, 2000).

Trabalhos pioneiros já mostravam que o GCA tinha implicações no afeto e na motivação. Por exemplo, lesões do GCA causam sintomas como agressividade, desatenção, desinibição, apatia e desregulação autonômica (Tow e Whitty, 1953; Kennard, 1955). Posteriormente, foi-se confirmando seu papel no comportamento, cognição, dor, afeto negativo e em mecanismos afetivos, atestando ser esta uma região de grande relevância nos neurocircuitos de transtornos psiquiátricos (Devinsky, Morrell e Vogt, 1995; Shackman *et al.*, 2011).

Este avanço no entendimento da implicação do GCA em transtornos psiquiátricos deve-se, em grande parte, aos progressos das técnicas em neuroimagem, como a espectroscopia que será abordada abaixo.

1.4 A espectroscopia por ressonância magnética de emissão de próton, e os metabólitos avaliados

Estudos em estruturas cerebrais envolvem técnicas como a de Ressonância Magnética (RM) que têm a vantagem de não ser invasiva, pois não há necessidade de contraste exógeno, e os sinais são gerados a partir de campo magnético que não utilizam raio X ou qualquer outro tipo de radiação. Contudo, há limitações para a realização do exame, como o uso de próteses metálicas e marca-passo. Além do mais, o ruído gerado pelo aparelho pode elevar o nível de ansiedade, especialmente em pacientes psiquiátricos. A claustrofobia também é uma contraindicação caso o paciente precise estar acordado, e a movimentação durante o exame pode prejudicar a qualidade das imagens (Shellock e Crues, 2004).

No entanto, estas limitações são poucas se comparadas com os benefícios e descobertas agregadas ao campo da investigação clínica e científica. A incorporação da espectroscopia à RM tradicional foi um avanço bastante considerável por permitir estudar a neuroquímica cerebral diretamente em organismos vivos. Tecnicamente, a espectroscopia por ressonância magnética (ERM) e a RM usam os mesmos princípios físicos, e ambas não são invasivas. Os núcleos atômicos obtidos na ERM podem ser de hidrogênio, fósforo, carbono, sódio e flúor. No tecido cerebral o átomo mais abundante é o hidrogênio (^1H) sendo, portanto, o mais fácil de ser detectado e por isso é o mais utilizado na ERM (Howe *et al.*, 1993). A espectroscopia por ressonância magnética de emissão de próton (^1H -ERM) analisa amostras tridimensionais (voxel).

A ^1H -ERM gera sinais de metabólitos presentes no tecido cerebral, estes sinais são representados na forma de gráficos com picos de metabólitos em diferentes intensidades, conforme ilustra a **Figura 1.4**. De acordo com a intensidade do espectro, ou área dos picos metabólitos, é possível avaliar quantitativamente a integridade dos tecidos neuronais, fazendo a distinção entre normais e alterados (Howe *et al.*, 1993; Rudkin e Arnold, 1999).

Figura 1.4 - Típico espectro de metabólitos no GCA. A área abaixo de cada pico indica a quantidade relativa do metabólito particular. Os picos maiores representam o n-acetil-aspartato (NAA); creatina (Cr); colina (Cho); mioinositol (m-ino) e complexo glutamina-glutamato (Glx). (Fonte: Zheng *et al.*, 2015).

Os metabólitos mais frequentemente identificados pela espectroscopia são: glutamato (Glu), mio-inositol (mI), glicerofosfocolina + fosfocolina + colina (Cho), N-acetil-aspartato + N-acetil-aspartil-glutamato (NAA), o complexo glutamato + glutamina (Glx), e creatina (Cr) + fosfocreatina (PCr). Estes metabólitos, com relevância para o presente estudo, são apresentados a seguir de acordo com sua função em tecidos neuronais e implicação em psicopatologia.

1.4.1 Complexo glutamato + glutamina

No sistema nervoso central (SNC), o glutamato é o aminoácido mais abundante e é o principal neurotransmissor excitatório (Bennett e Balcar, 1999). A concentração intracelular de glutamato é maior do que a extracelular, e ele parece estar envolvido em quase todas as atividades do cérebro, tanto em neuropatologias quanto durante o funcionamento normal (Danbolt, 2001). No cérebro normal é aceitável interpretar que o aumento dos níveis de glutamato esteja relacionado com o aumento da atividade metabólica (Rae, 2014). A ligação do glutamato ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) pode causar apoptose mitocondrial, um efeito neurotóxico (Choi, 1987).

A glutamina é sintetizada a partir do glutamato. Como os sinais da glutamina coincidem com os do glutamato, estes dois aminoácidos frequentemente são agrupados num só pico, representado como GLx (Prescot *et al.*, 2012), por isso há poucos dados disponíveis do desempenho da glutamina nas funções cerebrais. O que se pode afirmar é que em tecidos saudáveis, *in vitro*, glutamina e glutamato são altamente correlacionados, sendo que variações nos níveis de glutamina são interpretadas como alterações glutamatérgicas. Rowland e colaboradores (Rowland *et al.*, 2005) avaliaram a atividade metabólica do GCA em 10 sujeitos saudáveis e observaram que após a administração de ketamina, um antagonista de receptor NMDA, houve aumento de glutamina. Os autores concluíram que a hipofunção do receptor NMDA estaria associada com a função glutamatérgica no GCA. Desta forma, variações nos níveis de glutamina foram interpretadas como alterações glutamatérgicas.

Níveis menores de Glx foram encontrados no córtex pré-frontal dorsolateral de pacientes deprimidos (Michael *et al.*, 2003). Em outro estudo, foram observados níveis elevados de glutamato no córtex occipital de pacientes deprimidos (Sanacora *et al.*, 2004). E uma revisão apontou que, enquanto os níveis de GLx estavam reduzidos em pacientes deprimidos, em pacientes com transtorno bipolar eles estavam aumentados (Yuksel e Ongur, 2010).

1.4.2 Compostos de colina

O pico de Cho mede a colina livre, a glicerofosfocolina e a fosfocolina (Miller *et al.*, 1996). Como o cérebro não sintetiza Cho, é necessário a sua captação a partir de fluidos

extracelulares. Sinais espectroscópicos da Cho refletem a integridade das membranas celulares (Bhakoo *et al.*, 1996), especialmente quando estão ocorrendo processos de desmielinização, o que aumenta a sua concentração (Laule *et al.*, 2007).

Sujeitos saudáveis mostraram correlação negativa entre Cho e quociente de inteligência (Jung *et al.*, 1999). E, em mulheres a supressão de hormônios ovarianos teve relação com o aumento nas concentrações de Cho e Cho/Cr, reforçando a ideia de que o metabolismo da membrana neuronal/glial é afetado pelos hormônios sexuais femininos, e que, por extensão, estes hormônios interferem com os resultados de ¹H-ERM (Craig *et al.*, 2007). Uma metanálise mostrou que pacientes adultos com transtornos depressivos tinham valores mais elevados de Cho/Cr nos gânglios basais, em comparação com controles (Yildiz-Yesiloglu e Ankerst, 2006).

1.4.3 N-acetil-aspartato

O maior pico observado no espectro normal é o da combinação do principal representante o N-acetil-aspartato (NAA) com o N-acetil-aspartil-glutamato. Entre os aminoácidos presentes no cérebro, o NAA apresenta uma das maiores concentrações, abaixo apenas do glutamato. Ele é sintetizado na mitocôndria e citoplasma de neurônios, bem como em oligodendrócitos (Bhakoo e Pearce, 2000; Ariyannur *et al.*, 2010). O NAA é catabolizado nas células gliais, principalmente em oligodendrócitos onde ocorre a síntese de mielina (Chakraborty *et al.*, 2001). Os níveis de NAA podem ser reduzidos por inibição da respiração mitocondrial (Bates *et al.*, 1996).

O NAA apresenta correlação negativa com a idade (Brooks *et al.*, 2001), e a redução dos níveis de NAA é um indicativo de perda neuronal e disfunção, como encontrado em transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Maltezos *et al.*, 2014), na doença de Alzheimer (Huang *et al.*, 2001), esquizofrenia (Deicken, Pegues e Amend, 1999) e em retardo mental (Hashimoto *et al.*, 1995).

Ainda, embora uma metanálise não tenha mostrado diferenças significativas nos valores de NAA, nos gânglios basais e em estruturas do lobo frontal, entre controles saudáveis e pacientes deprimidos (Yildiz-Yesiloglu e Ankerst, 2006), estudos encontraram NAA/Cr diminuído no tálamo (Mu *et al.*, 2007) e no núcleo caudado (Vythilingam *et al.*, 2003) em pacientes deprimidos, comparados com controles.

1.4.4 Mio-inositol

O mI compreende a maioria dos inositóis (Holub, 1986), foi proposto que ele seja um importante marcador glial (Brand, Richter-Landsberg e Leibfritz, 1993) e que altos níveis de mI provavelmente refletem gliose (Jones e Waldman, 2004). As maiores concentrações de mI estão presentes nos astrócitos e em alguns tipos de neurônios (Novak *et al.*, 1999). Além de constituir biomembranas, o mI também age como segundo mensageiro intracelular sob estimulação de receptores de sistemas como o glutamatérgico (metabotrópico) e o serotoninérgico, entre outros (Rae, 2014).

1.4.5 Compostos de Creatina

Picos de Cr são gerados a partir dos compostos Cr e PCr. O cérebro é capaz de sintetizar Cr a partir de enzimas presentes em neurônios e em células da glia (Braissant *et al.*, 2001). A concentração de Cr no cérebro, assim como a de mI e Glx, é menor na substância branca do que na cinzenta (Pouwels e Frahm, 1998). A Cr tem um papel chave na homeostase energética do cérebro (Wallimann *et al.*, 1992) e também pode estar relacionada à estimulação do receptor NMDA pelo glutamato (Royes *et al.*, 2008). De forma geral, o aumento de Cr está associado com o aumento de atividade cerebral (Watanabe, Kato e Kato, 2002). No TDAH foram encontrados níveis reduzidos de Cr nos gânglios da base e no córtex pré-frontal dorsolateral (Maltezos *et al.*, 2014).

Dada a sua ampla distribuição no cérebro e seu papel nas atividades metabólicas energéticas em geral, a Cr tem sido usada como um denominador de referência interna para os demais metabólitos. No entanto, seu uso como um composto padrão tem sido questionado, dado que os níveis de Cr parecem estar mais relacionados com a intensidade da atividade em uma determinada região, ou com o grau de vascularização (Rae, 2014).

1.5 Associação entre níveis de metabólitos e o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Estudos de ERM avaliando associações entre níveis de metabólitos e hormônios do eixo HHA são escassos, de metodologia diversa, e apresentam uma ampla variação de resultados.

As pesquisas em animais mostraram associação de hipercortisolemia com níveis elevados de glutamato, e com níveis menores de mI, no hipocampo (Schubert *et al.*, 2008), e ratos exibindo alta reatividade ao estresse, com o eixo HHA desregulado, exibiam diminuição nos níveis de NAA no hipocampo e no córtex pré-frontal (Knapman *et al.*, 2012). Macacos apresentaram correlação positiva entre os níveis de CRH presente no fluido cérebro-espinhal e as concentrações de NAA no hipocampo direito (Coplan *et al.*, 2011).

Em humanos, os resultados são ainda mais diversos. Embora a maioria dos estudos apresentados a seguir tenha avaliado o hipocampo bilateral, a heterogeneidade de condições médicas é grande. Assim, em avaliação de metabólitos presentes na região hipocampal de 26 pacientes com transtorno depressivo comparados com controles, não houve correlação entre os níveis séricos de cortisol medidos pela manhã e NAA/Cr e Cho/Cr (Wang *et al.*, 2012). E, em 350 pacientes com transtorno depressivo que foram avaliados com relação aos efeitos dos polimorfismos do gene do receptor do glutamato, aqueles que eram homozigotos para os genótipos não associados com risco de depressão mostraram níveis reduzidos de glutamato e uma melhor normalização da hiperatividade do eixo HHA (Menke *et al.*, 2012). Por sua vez, 15 pacientes com a síndrome do cólon irritado, uma doença que apresenta o eixo HHA desregulado, comparados com controles, apresentaram níveis elevados de (mI)/NAA, mas nenhuma diferença com relação ao Glx (Niddam *et al.*, 2011). Já, em 21 pacientes com transtorno bipolar estabilizado por lítio, foi notada uma relação inversa entre níveis de cortisol diurno e ambos glutamato e NAA (Colla *et al.*, 2009). A espectroscopia também revelou que 17 pacientes sob terapia com corticosteroides, comparados com controles, tinham menor volume hipocampal e menores níveis de NAA; mas não houve diferença para Cho (Brown *et al.*, 2004). E, 18 crianças em tratamento com hidrocortisona não apresentaram diferença nos níveis de NAA/(Cho+Cr), comparadas com controles saudáveis sem tratamento (Rademaker *et al.*, 2006). Ainda, níveis de NAA presentes no hipocampo esquerdo de 17 pacientes com transtorno de estresse pós-traumático apresentaram correlação positiva com os níveis de cortisol salivar pré e pós DST (Neylan *et al.*, 2003).

Em comparação com controles saudáveis, 13 pacientes com doença de Cushing, tinham baixos níveis de Cho/Cr nas áreas frontal e talâmica, mas não na temporal; nenhuma diferença foi encontrada para NAA/Cr (Khiat *et al.*, 1999).

Finalmente, estudos avaliando voluntários saudáveis mostraram que 12 homens recebendo complemento de triptofano durante sete dias exibiram uma associação funcional entre depleção de Glx hipotalâmico e ativação do eixo HHA medido por ACTH e cortisol; mas não houve associação com NAA e Cho (Jacobs *et al.*, 2010). Já, outro trabalho não encontrou alterações de NAA, Cr, Cho, mI e glutamato no giro do cíngulo posterior, substância branca frontal e hipocampo de 21 voluntários recebendo suplemento de cortisol durante 4 dias (Scheel, Ströhle e Bruhn, 2010). Noutra abordagem metodológica, após indução de ataque de pânico por cholecystokinin-tetrapeptide (CCK-4), 18 homens saudáveis apresentaram um aumento significativo nos níveis de GLx/Cr medido no GCA e também de cortisol sanguíneo (Zwanzger *et al.*, 2013).

Resumindo os dados apresentados acima: de 11 estudos em humanos, oito encontraram algum tipo de associação entre metabólitos e hormônios do eixo HHA; sendo que dois encontraram associações para Glx, dois para NAA, um para glutamato, um para glutamato e NAA, um para mI e um para Cho. A região de interesse mais estudada foi o hipocampo (8), seguida do giro do cíngulo (2) e das áreas frontal e talâmica (1). De forma geral as associações ocorreram mais frequentemente para compostos GLx e NAA.

1.6 Estudos de espectroscopia no giro do cíngulo anterior em transtornos depressivos

Uma revisão mostrou que técnicas de ERM confirmam anormalidades metabólicas no GCA em transtornos depressivos (Rao, Venkatasubramanian e Gangadhar, 2011). A Tabela 1.2 - Resultados de estudos de ¹H-ERM que avaliaram metabólitos no GCA de pacientes adultos com transtornos depressivos comparados com controles. **Tabela 1.2** resume os achados da neuroquímica no GCA de pacientes adultos com transtornos depressivos comparados com controles.

Tabela 1.2 - Resultados de estudos de ^1H -ERM que avaliaram metabólitos no GCA de pacientes adultos com transtornos depressivos comparados com controles.

Autor, ano	N, P/C (H)	Idade, P/C (M $\pm$ SD)	Metabólitos							
			Glx	Glu	NAA	NAA/ Cr	Cho /Cr	Cr	mI /Cr	
(Auer <i>et al.</i> , 2000)	19 (6)/ 18 (8)	50,2 ($\pm$ 12,2)/ 43,2 ($\pm$ 14,6)	↓	↓	↔	0	↔	0	↔	↔
(Kumar <i>et al.</i> , 2002)	20 (6)/ 18 (5)	70,0 ($\pm$ 8,9)/ 72,4 ($\pm$ 5,7)	0	0	↔	↔	↔	↔	↔	↔
(Pfleiderer <i>et al.</i> , 2003)	17 (5)/ 17 (5)	61,0 ($\pm$ 11,2)/ 60,1 ($\pm$ 10,9)	↓	0	↔	0	↔	0	↔	0
(Coupland <i>et al.</i> , 2005)	13 (6)/ 13 (6)	37 (24-53)/ 32 (21-54)	0	0	↔	↔	↔	↔	0	↓
(Hasler <i>et al.</i> , 2007)	20 (7)/ 20 (7)	34,0 ($\pm$ 11,2)/ 34,8 ($\pm$ 12,4)	↓	0	0	↔	↔	0	↔	0
(Merkl <i>et al.</i> , 2011)	25 (5)/27 (7)	51,7 ($\pm$ 13,1)/ 36,3 ($\pm$ 14,0)	0	↓	↓	0	↔	0	↔	0

N = tamanho da amostra; P = paciente; C = controle; (H) = homens; (M $\pm$ SD) = média e desvio padrão; níveis de metabólitos de pacientes em comparação com controles: (↓) reduzido, (↑) aumentado; (↔) sem diferença; 0 = medida não reportada; Glx = glutamato + glutamina; Glu = glutamato; NAA = N-acetil-aspartato + N-acetil-aspartil-glutamato; Cho = glicero-fosfolina + fosfocolina + colina; Cr = creatina; mI = mio-inositol; (/Cr) = normalizado para creatina.

Conforme ilustra a tabela, os resultados de metabólitos no GCA são mais consistentes para níveis reduzidos de glutamato e glutamina em pacientes deprimidos.

Com relação à DPP, até o momento, apenas três estudos investigaram alterações de metabólitos por meio de ^1H -ERM e apenas dois destes em áreas envolvendo o cíngulo anterior. Epperson e colaboradores (Epperson *et al.*, 2006) detectaram que na região occipital de mulheres no sexto mês pós-parto, houve uma tendência estatística de puérperas deprimidas em comparação com puérperas controles apresentarem níveis mais elevados de ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso; e McEwen e colaboradores (McEwen *et al.*, 2012) observaram que mulheres entre 3 e 9 semanas pós-parto tinham aumento de glutamato no córtex medial pré-frontal. O estudo mais recente, ao qual este se vincula, não encontrou diferença em metabólitos do GCA, entre puérperas eutímicas e deprimidas, mas encontrou que deprimidas tinham menores níveis de glutamato e NAA no córtex frontal dorsolateral esquerdo (Rosa *et al.*, submetido).

1.7 A regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo giro do cíngulo anterior

A **Figura 1.5** mostra que o GCA está entre as principais estruturas límbicas envolvidas na regulação do eixo HHA. É pensado que a influência do sistema límbico sobre o eixo seja

provavelmente o resultado final de respostas a estímulos e glicocorticoides, sendo a magnitude da resposta secretora determinada pela contribuição relativa das várias estruturas (Herman *et al.*, 2005; Dedovic *et al.*, 2009).

Figura 1.5 - Representação em corte sagital do cérebro, destacando as áreas que processam estressores físicos e psicológicos; dentre estas encontra-se o GCA (ACC) que expressando receptores para corticoides tem papel na regulação do eixo HHA (Dedovic *et al.*, 2009).

Em ratos e primatas, a porção medial do córtex pré-frontal (CPFm) corresponde a regiões corticais como o cíngulo anterior (Kolb, 1984; Zilles e Wree, 1985). Nos modelos murinos o CPFm está implicado na regulação do estresse e na secreção de corticosterona, glicocorticoide análogo ao cortisol em humanos, e de ACTH (Diorio, Viau e Meaney, 1993; Figueiredo *et al.*, 2003).

Em mulheres saudáveis, a partir de achados onde medidas de ACTH foram positivamente correlacionadas com o fluxo sanguíneo no GCA esquerdo avaliado pela técnica de tomografia por emissão de fóton único (Single Photon Computed Emission Tomography – SPECT), os autores sugeriram que esta região pode regular a atividade do eixo HHA em episódios de transtorno depressivo (Ottowitz *et al.*, 2004). Outra investigação com uma amostra de 20 homens e 20 mulheres saudáveis, submetidos a mudanças na ativação do SNC por meio de um estressor psicológico envolvendo tarefa aritmética; encontrou, através do emprego de ressonância magnética funcional (RMf), menor atividade em estruturas límbicas, incluindo o GCA, associadas com aumento nos níveis de cortisol em resposta ao estressor

(Pruessner *et al.*, 2008). Além do mais, Maclullich e colaboradores (Maclullich *et al.*, 2006) avaliaram homens saudáveis com idade entre 65 e 70 anos divididos em dois grupos de 10 indivíduos, de acordo com a supressão ou não dos níveis de cortisol após DST. E verificaram pela técnica de RM que o grupo de homens que não apresentavam supressão tinha menor volume de cíngulo anterior, no hemisfério esquerdo, do que os supressores. Assim, postularam que o volume reduzido estaria associado com a desregulação do eixo HHA.

Ainda, há outros estudos em RM mostrando alterações funcionais e estruturais do GCA em desordens nas quais são observadas desregulação do eixo HHA. Na doença de Cushing, ao comparar controles com 25 pacientes remitentes, sendo 21 mulheres, que tiveram a doença por um período de aproximadamente 7 anos, observou-se que pacientes apresentavam menor volume de matéria cinzenta no GCA, mesmo após 11 anos de remissão (Andela *et al.*, 2013). Outro estudo também encontrou diminuição de espessura cortical do GCA em uma amostra de pacientes cuja maioria estava em remissão da doença de Cushing (Crespo *et al.*, 2014). Em pacientes com doença de Alzheimer, a atrofia do córtex do cíngulo foi preditora para a progressão dos sintomas (Chetelat e Baron, 2003); e a expressão de genes envolvidos no controle para o ritmo circadiano estava alterada no GCA (Cermakian *et al.*, 2011).

Desta forma, tem-se consolidado o papel do GCA no controle da atividade do eixo HHA.

1.8 Influência dos fatores genéticos na DPP

Em uma revisão sistemática avaliando a influência de fatores genéticos na depressão perinatal, Figueiredo e colaboradores (Figueiredo *et al.*, 2014) observaram que a interação de fatores ambientais influenciam variáveis gênicas nos estados depressivos periparto. De fato, interações gene-ambiente podem estar operando sempre que houver evidência de variação nas respostas aos riscos ambientais (Moffitt, Caspi e Rutter, 2005). O pós-parto é um período com ambiente estressor e demandas específicas, onde a reatividade aos desafios inerentes ao puerpério parece ser regulada por fatores gênicos (Mitchell *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2013).

Sendo assim, e sabendo que a resposta do organismo ao estresse é mediada pelo eixo HHA (Smith e Vale, 2006) nós elegemos polimorfismos de um gene candidato tanto para associações com sintomas depressivos, quanto para medidas da atividade do eixo HHA: o gene do subtipo 1 do receptor do CRH (CRHR1).

1.8.1 O gene promotor do receptor 1 do hormônio liberador de corticotrofina

Há dois subtipos de receptores de CRH, os subtipos 1 e 2, sendo que o receptor 1 de CRH (*corticotropin releasing hormone receptor 1*, CRHR1) está mais relacionado com a depressão e é expresso principalmente na hipófise (Steckler e Holsboer, 1999; Dautzenberg *et al.*, 2001), mas também pode ser localizado em outras regiões cerebrais como o GCA, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (Aguilera *et al.*, 2004). Dado seu envolvimento na depressão, estudos sugerem o uso de antagonistas CRHR1 como terapia para moderar os sintomas depressivos (Thomson e Craighead, 2008). Além da associação com transtornos do humor, a ligação do CRH ao CRHR1 tem relação com a ansiedade, funções executivas, atenção, experiência consciente das emoções, aprendizado e consolidação de memória relacionada a essas emoções (Steckler e Holsboer, 1999).

O gene promotor do CRHR1 está localizado no cromossomo 17q21.31, ele apresenta diversos polimorfismos (*single nucleotide polymorphism*, SNPs), que têm sido descritos como fatores de risco para depressão (Liu *et al.*, 2006; Ching-Lopez *et al.*, 2015). SNPs são variações resultantes de mutações nas sequências de DNA que se mantêm nas gerações futuras. SNPs são as mais frequentes formas de variações genéticas. Um conjunto de SNPs transmitidos juntos e que estão associados num mesmo cromossomo formam um haplótipo. Dentre os polimorfismos do gene promotor do CRHR1, destacam-se os do haplótipo TAT formado pelos SNPs rs7209436, rs110402 e rs242924. O cromossomo 17 com o *locus* gênico do promotor do CRHR1 e a localização dos SNPs do haplótipo TAT, estão ilustrados na **Figura 1.6**. Os dados referentes ao haplótipo TAT relatam-no como moderador de estados depressivos, ora como fator de risco para a depressão em indivíduos com história de maus-tratos (Laucht *et al.*, 2013), ora como protetor (Bradley *et al.*, 2008; Polanczyk *et al.*, 2009).

A contradição dos resultados em abordagem genética tem como cerne os mecanismos epigenéticos atuantes. Neste sentido Kranzler e colaboradores (Kranzler *et al.*, 2011) mostraram a influência da etnia, do gênero e da presença de adversidades na infância sobre o papel moderador do haplótipo TAT para TDM. Ao investigarem amostras de homens e mulheres de descendência afro-americana e europeia, os autores encontraram que, em mulheres afro-americanas que passaram por adversidades na infância o haplótipo TAT reduziu as chances para TDM (OR = 0,63); e aquelas que não passaram por adversidade e que tinham duas cópias do haplótipo TAT, o risco para TDM aumentou (OR = 1,51). Este efeito não ocorreu nos demais grupos.

Figura 1.6 - Locus gênico da região promotora do CRHR1 no cromossomo 17q21.31; os pontos vermelhos indicam os SNPs de interesse (rs7209436, rs110402 e rs242924) que constituem o haplótipo TAT. Figura modificada de Binder e Nemeroff, 2010.

1.8.2 Polimorfismos do gene promotor do CRHR1 na depressão pós-parto

Apesar dos achados evidenciando o envolvimento de polimorfismos do CRHR1 na depressão, até o momento poucos estudos avaliaram a sua influência na DPP (Engineer *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2015). No primeiro estudo, Engineer e colaboradores (Engineer *et al.*, 2013) verificaram os SNPs rs1876828, rs242939 e rs242941, de 140 caucasianas diagnosticadas por meio da EPDS, entre 2 e 8 semanas pós-parto, e encontraram associação dos sintomas depressivos com o SNP rs242941; puérperas deprimidas também apresentavam maior frequência do haplótipo GGT formado pelos 3 SNPs avaliados. No ano seguinte, Schneider e colaboradores (Schneider *et al.*, 2014) também avaliaram caucasianas por meio da EPDS, porém numa amostra maior contando 361 voluntárias investigadas no

puerpério imediato, 48 a 72 horas, e no puerpério remoto, 6 a 8 meses, e não encontraram nenhuma associação entre sintomas depressivos e os SNPs rs7209436 e rs110402. Mais recentemente, Tan e colaboradores (Tan *et al.*, 2015) analisaram a influência dos SNPs rs242939 e rs1876828 na depressão perinatal, numa amostra chinesa de 147 casos diagnosticados de acordo com os critérios do DSM-IV, comparadas com 549 controles (EPDS ≤ 7) e também não encontraram associação entre marcador genético e depressão perinatal. Apesar de contar com uma amostra grande, este estudo usou o termo perinatal de maneira genérica, não especificando o período da gestação e puerpério em que as coletas foram realizadas.

1.9 O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como endofenótipo e o gene de interesse

Em paralelo com as interações gene-ambiente, a avaliação de fenótipos intermediários como alterações do eixo HHA podem fornecer um valioso meio de esclarecer os mecanismos pelos quais fatores de risco biológicos e/ou ambientais concorrem para a ocorrência de transtornos psiquiátricos (Goldstein e Klein, 2014). Desta forma, endofenótipos são apoiados para ocupar uma posição intermediária na via entre o genótipo e o fenótipo em desordens geneticamente complexas, tais como a depressão (Gottesman e Gould, 2003). Neste sentido o CAR preenche os critérios propostos para ser um promissor endofenótipo (Goldstein e Klein, 2014). Sendo assim, a seguir serão exploradas, as influências do gene promotor do CRHR1 no funcionamento do eixo HHA que tem sido encontrado alterado em uma variedade de amostras (Heim *et al.*, 2009; Tyrka *et al.*, 2009; Hankin *et al.*, 2015).

1.9.1 Polimorfismos do gene promotor do CRHR1 e o eixo HHA

Conforme disposto anteriormente, o CRHR1 é amplamente expresso na hipófise e tem um papel central na regulação do eixo HHA, pois da sua ligação com o CRH ocorre a liberação de ACTH que, por sua vez, irá influenciar a secreção de cortisol. Também foi relatado que o eixo HHA é um propício endofenótipo em neuropsiquiatria, e que polimorfismos na região do gene promotor do CRHR1, sob diferentes contextos, parecem

influenciar os níveis de cortisol. Contudo, há poucos trabalhos avaliando polimorfismos no gene do CRHR1 e funcionamento do eixo HHA.

Na síndrome de fadiga crônica, os níveis basais de cortisol sanguíneo de 76 pacientes não mostraram associação com o SNP rs12944712 (Lobel *et al.*, 2015). Adolescentes com histórico de maus-tratos na infância tinham uma tendência de associação entre hiporeatividade do eixo HHA, durante o TSST, e a presença de alelo G no SNP rs110402 (Sumner *et al.*, 2014). Em 368 adultos saudáveis submetidos ao TSST, os SNPs rs7209436, rs110402 e rs242924 foram associados com a resposta do cortisol ao estresse psicossocial, mas não tiveram associação com os níveis basais de cortisol; os pesquisadores encontraram ainda relação entre ansiedade e altos níveis basais apenas em homozigotos dos SNPs rs110402 e rs242924, mas os escores de depressão e de estresse percebido não foram modificadores da relação entre polimorfismos e resposta do cortisol (Mahon *et al.*, 2013). E, ainda, em crianças saudáveis, a avaliação de sete SNPs do CRHR1 mostrou que diferenças na reatividade individual do cortisol foram relacionadas com a variação genética em regiões que codificam genes do sistema CRH (Sheikh *et al.*, 2013).

Estes estudos ilustram a variedade dos SNPs que são testados, mas, até o momento, nenhum deles foram avaliados como preditores para níveis de cortisol na DPP.

1.10 Justificativa

A DPP, apesar da alta prevalência e dos impactos negativos para a mãe e seu filho, continua sendo um transtorno mental subdiagnosticado, subtratado e pouco compreendido. Alguns estudos desenvolvidos até o presente apontam para além das alterações hormonais, o papel moderador dos genes e alterações cerebrais na fisiopatogenia da DPP. No entanto não há, até o momento, estudo que tenha avaliado estas três dimensões em uma mesma amostra.

Entre os poucos estudos avaliando a reatividade do eixo HHA no período pós-parto, o conjunto dos dados apresenta resultados contraditórios. Estas inconsistências, além de passarem pelo crivo da análise das diferentes metodologias utilizadas, também levantam a questão de que outros fatores biológicos e ambientais estejam interagindo para os diferentes desfechos. Estes fatores devem ser ponderados devido ao fato de que a etiologia da DPP, a exemplo de outros transtornos psiquiátricos, parece depender de uma interação complexa com

multicausalidade envolvendo estressores ambientais, queda abrupta dos hormônios no pós-parto, alterações no eixo HHA, fatores genéticos e alterações dos substratos neuronais.

Embora estes fatores possam ser estudados separadamente, as hipóteses atuais conclamam uma integração entre eles, de forma que o fenômeno da depressão puerperal congregue além da área da psiquiatria, áreas da biologia, da clínica e da sociologia. Esta integração poderá possibilitar a formulação de modelos e constructos teóricos cada vez mais abrangentes e concisos acerca da fisiopatogenia dos transtornos psiquiátricos.

Neste sentido, até onde é do nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a avaliar o funcionamento do eixo HHA em mulheres deprimidas e eutímicas no sexto mês do puerpério, comparando-as com mulheres não puérperas. Também, é o primeiro a correlacionar medidas de cortisol com a neuroquímica funcional do GCA e a avaliar interações entre polimorfismos de um gene específico do eixo HHA com sintomas depressivos no puerpério para prever a reatividade natural do eixo.

Desta forma, analisando a vulnerabilidade genética, a percepção de eventos estressores, e as medidas de cortisol que é o produto final do eixo HHA em resposta ao estresse ambiental, e considerando que o eixo HHA além de estar conectado com estruturas límbicas também sofre a influência de polimorfismos gênicos, estaremos contribuindo para o avanço do entendimento da fisiopatologia da depressão, em específico da depressão que ocorre no período puerperal.

1.11 Objetivos

Este estudo objetivou avaliar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) de puérperas eutímicas e deprimidas e de controles saudáveis não-puérperas, e investigar se alterações do eixo HHA na depressão pós-parto (DPP) tem correlações com a neuroquímica do giro do cíngulo anterior (GCA) e se são moderadas por polimorfismos do gene promotor do receptor 1 de CRH (CRHR1).

Especificamente, pretendeu-se:

- a) Identificar alterações no eixo HHA, durante o puerpério remoto, através de avaliações da reatividade do eixo HHA, por meio da medida da resposta do cortisol ao

- despertar (CAR) e da variação diurna dos níveis de cortisol salivar de puérperas deprimidas comparadas com puérperas eutímicas e controles saudáveis não-puérperas;
- b) Analisar a contribuição de fatores psicossociais e demográficos para mudanças na atividade normal do eixo HHA em puérperas deprimidas comparadas com puérperas eutímicas;
 - c) Investigar se características da depressão pós-parto estão associadas com o funcionamento do eixo HHA;
 - d) Avaliar a neuroquímica do giro do cíngulo anterior (GCA) de puérperas deprimidas comparadas com puérperas eutímicas e verificar a ocorrência de correlações entre metabólitos e medidas do CAR e da variação diurna dos níveis de cortisol.
 - e) Verificar se polimorfismos da região promotora do gene para o receptor de CRH1 influenciam os níveis diurnos de cortisol e a reatividade do eixo HHA em puérperas deprimidas comparadas com puérperas eutímicas;

1.12 Hipóteses

1. A associação de alterações hormonais e as demandas psicossociais inerentes ao período de gravidez/pós-parto irão causar uma desregulação do eixo HHA em mulheres deprimidas avaliadas vários meses após o parto. Assim, puérperas deprimidas apresentarão uma atenuação na reatividade e uma reduzida variação diurna dos níveis de cortisol em comparação com puérperas eutímicas e com mulheres controles saudáveis não-puérperas.
2. Em comparação com puérperas eutímicas, puérperas deprimidas apresentaram correlações entre metabólitos do GCA e medidas do funcionamento do eixo HHA.
3. Puérperas portadoras de polimorfismos nos genes do CRHR1 apresentarão maior probabilidade de desenvolvimento de DPP e de alterações no eixo HHA.

2 - Alterações no funcionamento do eixo HHA em mulheres com depressão pós-parto

2 ALTERAÇÕES NO FUNCIONAMENTO DO EIXO HHA EM MULHERES COM DEPRESSÃO PÓS-PARTO

2.1 Resumo

Introdução: O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e episódio depressivo maior no período pós-parto remoto.

Métodos: A amostra (idade média, $28,0 \pm 5,3$ anos) foi constituída por 37 mulheres com depressão pós-parto (DPP), 42 mulheres eutímicas no pós-parto (EPP) e 25 mulheres controles saudáveis não-puérperas (CS). Amostras de cortisol salivar foram coletadas imediatamente após o despertar e em 30 min, 3 e 12 horas após o despertar, aproximadamente no sexto mês pós-parto (média, $169,6 \pm 60,3$ dias).

Resultados: Foram observadas diferenças nos níveis de cortisol no despertar ($DPP < EPP = CS$) e em 30 min ($DPP < EPP < CS$), 3 horas ($DPP = EPP < CS$) e 12 horas ($DPP > EPP = CS$) após o despertar. O incremento relativo da resposta do cortisol ao despertar foi significativamente maior nas CS ($113,5 \pm 94,3$) do que nas EPP ($63,1 \pm 69,8$) e nas DPP ($32,2 \pm 49,6$). A diminuição relativa da variação diurna foi menor nas DPP ($56,5 \pm 41,8$) do que nas EPP ($75,6 \pm 22,4$) e HC ($75,1 \pm 13,0$).

Limitações: A principal limitação foi a coleta de cortisol em um único dia e ausência de amostra à meia-noite.

Conclusões: Nossos resultados sugerem que o período pós-parto remoto envolve a atenuação da reatividade do eixo HHA; esta desregulação é mais pronunciada na presença de DPP, que está associada com uma redução na variação diurna do cortisol. Anormalidades no sistema neuroendócrino relacionado com o processamento de estresse, presente vários meses após o parto, podem representar uma vulnerabilidade aos transtornos mentais. Assim, são necessários melhoramentos nos cuidados de saúde mental das mulheres no pós-parto.

Palavras-chave: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Depressão. Resposta do cortisol ao despertar. Variação diurna do cortisol. Pós-parto. Puerpério.

2.2 Introdução

A depressão pós-parto (DPP) é uma condição prevalente (Gavin *et al.*, 2005) com consequências graves não só para as mulheres, como também para toda a família e especialmente para a criança. No bebê, o estado depressivo da mãe pode desencadear consequências futuras como problemas cognitivos, comportamentais e emocionais (Brand e Brennan, 2009).

Vários fatores ambientais, tais como eventos estressantes de vida e baixo suporte social, representam um risco para o desenvolvimento de DPP (Robertson *et al.*, 2004). Além disso, fatores biológicos, tais como as mudanças drásticas no ambiente hormonal durante a gravidez e no período pós-parto, parecem desempenhar um papel na etiologia da depressão puerperal (Skalkidou *et al.*, 2012). Em particular, a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é alterada durante a gravidez e no puerpério. O hormônio liberador de corticotrofina (*corticotrophin-releasing hormone*, CRH), que normalmente é liberado pelo hipotálamo e é indetectável no plasma, é também produzido pela placenta (Kalantaridou *et al.*, 2003). Em resposta ao aumento dos níveis de CRH, os níveis de cortisol aumentam progressivamente durante a gravidez, alcançando níveis semelhantes aos observados na síndrome de Cushing (Magiakou *et al.*, 1997). Os níveis de CRH e cortisol diminuem em aproximadamente 4 dias após o parto (Mastorakos e Ilias, 2003).

Há evidências sugerindo que a desregulação do eixo HHA pode ser correlacionada com transtornos depressivos (Stetler e Miller, 2011), mas a associação entre a desregulação do eixo HHA e a DPP ainda é controversa. No período pós-parto imediato (até 10 dias após o nascimento), os níveis de cortisol sanguíneo estavam elevados em puérperas deprimidas (Okano e Nomura, 1992) e os níveis de cortisol salivar estavam mais altos no período da manhã, mas não à tarde ou à noite (Ehlert *et al.*, 1990). No entanto, em outro estudo, no período pós-parto imediato, não foram encontradas diferenças significativas (Fan *et al.*, 2009). No puerpério tardio (a partir do 10^o ao 42^o dias após o parto), mulheres deprimidas apresentaram níveis de cortisol mais baixos em comparação com controles saudáveis (Groer e Morgan, 2007), mas outros estudos não encontraram diferenças significativas nos níveis de cortisol sanguíneo (Okano e Nomura, 1992) ou salivar (Corwin *et al.*, 2005). Estudos em mulheres no puerpério remoto (a partir do 43^o dia pós-parto) mostraram níveis normais de cortisol salivar (Davis *et al.*, 2007) e urinário (Pedersen *et al.*, 1993; Figueiredo e Costa,

2009), mas Pedersen e colaboradores (Pedersen *et al.*, 1993), encontraram níveis elevados de cortisol sanguíneo em mulheres deprimidas no pós-parto.

As discrepâncias nos resultados descritos acima podem ser atribuídas às características metodológicas dos estudos que não consideram as especificidades do funcionamento do eixo HHA. O eixo HHA tem um ritmo circadiano com o nadir das concentrações de cortisol ocorrendo à meia-noite (Young, Carlson e Brown, 2001), sendo o declínio no decorrer do dia pontuado por picos de cortisol. A resposta do cortisol ao despertar (*cortisol awakening response*, CAR) é um aumento significativo nos níveis de cortisol, que ocorre cerca de 30 minutos após o despertar e serve como um sincronizador para o ritmo circadiano do eixo HHA (Wilhelm *et al.*, 2007). A presença do CAR é estabelecida a partir de um aumento de pelo menos 50% nos níveis de cortisol em 30 ou 60 min após o despertar, o que é considerado como uma medida da reatividade do eixo HHA em indivíduos saudáveis (Pruessner *et al.*, 1997). Embora haja uma grande variação individual nos níveis de cortisol no período da manhã, o CAR apresenta uma estabilidade intra-individual que suporta o seu uso como um biomarcador (Pruessner *et al.*, 1997).

Estudos avaliando o CAR encontraram aumento na reatividade do eixo HHA em transtornos depressivos (Vreeburg, Hoogendijk, *et al.*, 2009; Lamers *et al.*, 2013), mas resultados contraditórios também foram relatados (Stetler e Miller, 2005). Especificamente com respeito à DPP, um estudo demonstrou que mulheres deprimidas avaliadas entre seis e oito semanas do puerpério mostravam ausência do CAR em comparação com mulheres eutímicas e controles saudáveis do sexo feminino (Taylor *et al.*, 2009). Todavia, em outro estudo, não houve correlação entre o CAR e os sintomas depressivos em um grupo de mulheres avaliadas durante a gravidez (36 semanas) e entre quatro e seis semanas pós-parto (Cheng e Pickler, 2010).

No presente estudo, objetivou-se investigar a relação da função do eixo HHA e transtorno depressivo maior diagnosticado durante o puerpério. Mais especificamente, tivemos como objetivo avaliar se a desregulação do eixo HHA observada entre seis e oito semanas do período pós-parto em mulheres deprimidas (Taylor *et al.*, 2009) persistiria por mais tempo. Assim, nós formulamos a hipótese de que a associação de alterações hormonais e as demandas psicossociais inerentes ao período de gravidez e pós-parto iriam causar uma desregulação do eixo HHA por um período maior. Deste modo, mulheres deprimidas avaliadas vários meses após o parto teriam uma reatividade do eixo HHA atenuada e uma reduzida variação diurna dos níveis de cortisol em comparação com mulheres eutímicas no pós-parto e com mulheres controles saudáveis não-puérperas.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Desenho do estudo e protocolo

Este foi um estudo transversal realizado em uma amostra de projetos maiores, o "BRISA": *The Brazilian Ribeirao Preto and Sao Luis prenatal cohort*, desenvolvido para avaliar as consequências de fatores perinatais para a saúde da criança (FAPESP, processo nº 2008/53593-0) e de projeto destinado à avaliação da interação genético-ambiental nos estados depressivos pós-parto (FAPESP, processo nº 2010/09066-6).

Mulheres com gravidez única, usuárias de serviços clínicos de ambulatório pré-natal das redes pública e privada, que tinham realizado o primeiro exame de ultrassom gestacional em menos de 20 semanas da idade gestacional, foram convidadas a participar do estudo BRISA. As mulheres foram entrevistadas entre a 22^a e a 25^a semanas de idade gestacional e variáveis socioeconômicas, de rede de suporte, obstétricas, ginecológicas e de saúde mental, foram avaliadas durante a gravidez como parte do protocolo original. As participantes foram reavaliadas no momento do parto, quando informações sobre paridade, idade gestacional, tipo de parto, gênero e condições clínicas do recém-nascido foram coletadas (Da Silva et al., 2014).

Mulheres que participaram na coorte BRISA foram incluídas no presente estudo, a fim de verificar a associação de fatores ambientais e biológicos com sintomas depressivos durante o primeiro ano após o parto. O processo de diagnóstico de episódios depressivos foi descrito em detalhes em outro estudo (De Figueiredo *et al.*, 2014). Brevemente, durante o período pós-parto, as mulheres foram inicialmente avaliadas por uma entrevista por telefone para o rastreamento de sintomas depressivos, usando a Escala de Depressão Pós-Parto de Edimburgo (Edinburgh Postnatal Depression Scale, EPDS) (Cox, Holden e Sagovsky, 1987; Santos *et al.*, 2007) (ANEXO A). A EPDS administrada por uma entrevista telefônica mostrou boa validade preditiva (De Figueiredo *et al.*, 2014). Mulheres com uma pontuação positiva (EPDS ≥ 10 , n = 257) foram pareadas com controles por idade e período do parto (EPDS < 10 , n = 239) e as mulheres de ambos os grupos (rastreamento positivo e negativo) foram convidadas a participar de uma entrevista diagnóstica clínica realizada face a face (descrita em detalhes abaixo). Uma parcela significativa das mulheres se recusou a participar da entrevista face a face, da qual tomaram parte 199 voluntárias (De Figueiredo *et al.*, 2014). Puérperas com

diagnóstico confirmado de episódio depressivo maior atual e as controles pareadas foram convidadas a participar do presente estudo.

2.3.2 Indicadores de saúde mental durante a gravidez e pós-parto

Como parte do protocolo BRISA, a ocorrência de sintomas depressivos durante a gravidez foi avaliada utilizando a escala de depressão do centro de estudos epidemiológicos (Center for Epidemiologic Studies Depression Scale, CES-D) (Weissman *et al.*, 1977; Silveira e Jorge, 1998) (ANEXO B). Na CES-D, adotamos um ponto de corte ≥ 24 para definir pacientes com prováveis transtornos depressivos durante a gravidez. A percepção de estresse e a ansiedade foram avaliadas usando, respectivamente, o inventário de ansiedade de Beck (Beck Anxiety Inventory, BAI) (Beck *et al.*, 1988; Cunha, 2001) (ANEXO C) e a escala de estresse percebido (*Perceived Stress Scale*, PSS-14) (Cohen, Kamarck e Mermelstein, 1983; Luft, C.D. *et al.*, 2007) (ANEXO D).

O diagnóstico de episódio depressivo maior, durante o período pós-parto, foi feito usando a entrevista clínica estruturada para o DSM-IV, versão clínica (SCID-CV) (First *et al.*, 1997) traduzida para o Português (Del-Ben *et al.*, 2001). A gravidade dos sintomas depressivos foi medida usando a escala de avaliação de Hamilton para depressão (HAM-D) (Hamilton, 1960) (ANEXO E); depressão grave foi definida para escores ≥ 22 . Ambos os instrumentos foram aplicados por psiquiatras ou por psicólogos clínicos treinados.

Durante a entrevista diagnóstica, as mães foram convidadas a preencher dois instrumentos de auto-relato: a EPDS, que avalia a severidade dos sintomas depressivos e a Escala de Sonolência de Epworth (*Epworth Sleepiness Scale*, ESS) (ANEXO F), que avalia a sonolência diurna em adultos (Johns, 1991; Bertolazi *et al.*, 2009). Na mesma ocasião, as participantes também foram convidadas a dar informações sobre sua altura e peso, uso de medicamentos contraceptivos ou psicotrópicos e se estavam amamentando.

2.3.3 Participantes

Um total de 199 puérperas foram avaliadas na entrevista face a face, usando a SCID-CV. Destas, 90 puérperas tiveram confirmado o diagnóstico de episódio depressivo maior

atual e 109 foram consideradas eutímicas (De Figueiredo *et al.*, 2014). Os critérios de exclusão foram condições médicas ou tratamentos que alteram os níveis de cortisol, exceto agentes psicotrópicos, e outros transtornos mentais, exceto transtornos de ansiedade, uma condição co-mórbida comum entre mulheres deprimidas após o parto. Assim, das 199 participantes foram inicialmente excluídas nove: uma, devido a condição médica e oito devido a transtornos mentais graves (duas com transtorno bipolar, uma com depressão psicótica, duas com transtornos de personalidade e três com transtornos mentais relacionados com abuso de substância). Por fim, entre as convidadas para tomar parte no presente estudo, 86 recusaram. Deste modo, 51 mulheres deprimidas e 53 mulheres eutímicas concordaram em participar. Entre a amostra que aceitou participar e a amostra que recusou, não houve diferença com relação às características demográficas: idade ($p = 0,365$), anos de estudo ($p = 0,305$), coabitando com o parceiro ($p = 0,394$), renda familiar mensal ($p = 0,170$); características pós-natal: primiparidade ($p = 0,767$), semanas de idade gestacional no nascimento ($p = 0,310$), aleitamento materno ($p = 0,842$), índice de massa corporal ($p = 0,278$); características do recém-nascido: gênero masculino ($p = 0,720$), Apgar no 1º minuto ($p = 0,806$), Apgar no 5º minuto ($p = 0,964$); e com relação à saúde mental durante a gravidez e pós-parto: CES-D ($p = 0,331$), BAI ($p = 0,742$), EPDS ($p = 0,592$), ESS ($p = 0,907$), PSS ($p = 0,313$). Houve uma proporção maior de parto vaginal entre as mulheres que completaram o estudo do que entre aquelas que se recusaram a participar ($p = 0,022$).

Quarenta e cinco mulheres saudáveis não-puérperas com idades entre 20 e 40 anos, que não estavam fazendo uso de medicamentos, exceto contraceptivos hormonais, e que eram, portanto, elegíveis para participar do estudo, foram recrutadas da população local. Dentre estas mulheres, 40 que foram pareadas com as puérperas, de acordo com o uso de anticoncepcional hormonal, concordaram em participar. A saúde mental das controles foi avaliada usando a versão brasileira do *Self-Reporting Questionnaire* (SRQ-20) (Mari e Williams, 1985), para a exclusão de transtornos mentais comuns (ponto de corte ≤ 7) (ANEXO G). As controles também completaram a ESS para caracterização de eventuais distúrbios do sono, e a EPDS para verificar a presença de sintomas depressivos subclínicos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética local (ANEXO H), todas as participantes convidadas foram informadas dos objetivos do estudo e metodologia, e assinaram, em duplicata, um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO I).

2.3.4 Coleta do cortisol salivar

As participantes foram convidadas a recolher amostras de saliva em casa para a determinação dos níveis de cortisol. Uma cópia do formulário de consentimento informado e orientações escritas sobre os procedimentos para a coleta de amostra salivar foram dadas para as voluntárias, juntamente com uma lista de checagem (ANEXO J) para registrar a data, a hora e os cuidados antes de cada coleta, bem como para informar sua condição médica geral, uso de medicação, ou, no caso das mulheres após o parto, se elas estavam amamentando.

As participantes receberam quatro, tubos de plástico contendo um chumaço de algodão (salivettes), identificados com seu nome e os tempos de coleta. As amostras de cortisol salivar foram colhidas imediatamente após o despertar e em 30 min, 3 horas e 12 horas após despertar, como anteriormente proposto (Taylor *et al.*, 2009). As voluntárias foram instruídas a executar a primeira coleta no momento do despertar, ainda na cama, antes de levantar. Antes das três outras coletas elas foram instruídas a apenas realizar um bochecho com água, e a não escovar os dentes, não fumar ou ingerir bebidas (exceto água), e a não comer uma hora antes ou executar tarefas estressantes. As participantes também foram instruídas a manter as amostras de saliva no congelador até que fossem entregues ao laboratório.

Para controlar os níveis de progesterona, as participantes não-puérperas, que não usavam contraceptivos, foram convidadas a realizar a coleta de saliva entre 5 e 8 dias após seu período menstrual.

2.3.5 Dosagem do cortisol salivar

As amostras de saliva foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos e armazenadas a -30° C. A dosagem do cortisol salivar foi feita no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Alíquotas de saliva (25 µL) foram submetidas a radioimunoensaio de acordo com método descrito anteriormente (Castro e Moreira, 2003). A sensibilidade do teste foi de 60 ng/dL. Os coeficientes de variação intra- e entre-ensaios foram, respectivamente, 2,1% e 9,3%. Os valores foram expressos como nanomoles por litro (nmol/L). Todas as amostras foram analisadas em duplicata no mesmo ensaio.

2.3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0. As variáveis demográficas e clínicas foram analisadas por variância de uma via - ANOVA (variáveis contínuas) ou por qui-quadrado ou teste exato de Fisher (variáveis categóricas).

Para as análises estatísticas, os valores de cortisol foram log-transformados, mas as figuras mostram os valores brutos. A variação dos níveis de cortisol salivar livre durante o dia foi submetida a MANOVA de medidas repetidas, com um fator entre-grupos [diagnóstico (mulheres pós-parto deprimidas, mulheres pós-parto eutímicas e controles saudáveis não-puérperas)] e um fator intra-grupo [tempo (despertar e 30 min, 3 horas e 12 horas após o despertar)]. Os graus de liberdade dos fatores repetidos foram corrigidos usando o Épsilon Huynh-Feldt. Comparações *post hoc* foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. O tamanho do efeito foi determinado pelo teste "d" de Cohen, definido como "pequeno" para valores de "d" igual ou inferior a 0,20; "médio" para valores ao redor ou superiores a 0,50 e "grande" para valores superiores a 0,80 (Cohen, 1988). Como uma análise secundária, realizamos uma análise multivariada de covariância (MANCOVA), incluindo como covariáveis idade, anos de escolaridade, estado civil, escores da ESS, índice de massa corporal e uso contraceptivo.

As alterações nos níveis de cortisol também foram determinadas utilizando dois índices auxiliares: a porcentagem do incremento nos níveis de cortisol salivar livre obtidos em 30 minutos após o despertar, em comparação com os níveis de cortisol obtidos imediatamente após o despertar, ou seja, o incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar (CARI%) (Clow *et al.*, 2004), e a redução relativa dos níveis de cortisol obtidos 12 horas após o despertar, em comparação com os níveis de cortisol no momento do despertar, isto é, a redução relativa das concentrações de cortisol na variação diurna (VDr%) (Edwards *et al.*, 2003). No CARI%, um incremento a partir do basal (despertar) de pelo menos 50% foi estabelecido para representar a presença de reatividade do eixo HHA (Pruessner *et al.*, 1997). ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni, foi usada para comparar a média do CARI% e da VDr% dos três grupos. Análises adicionais usando ANOVA de uma via e o coeficiente de correlação de Pearson foram realizadas considerando apenas puérperas deprimidas, a fim de determinar possíveis associações entre o estresse percebido durante a gravidez, e as características e a gravidade do episódio depressivo com o CARI% e a VDr%.

A normalidade da amostra foi confirmada e valores atípicos (outliers) foram identificados pelo teste de Shapiro-Wilk.

Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.4 Resultados

2.4.1 Variáveis clínicas e sociodemográficas

A amostra final consistiu-se de 104 voluntárias divididas em três grupos: mulheres eutímicas no pós-parto ($n = 42$), mulheres deprimidas no pós-parto ($n = 37$) e mulheres controles saudáveis não-puérperas ($n = 25$). A **Figura 2.1** mostra o fluxograma do recrutamento e composição da amostra final.

Figura 2.1 - Fluxograma mostrando o recrutamento de voluntárias elegível e a composição da amostra final.

A **Tabela 2.1** traz as características da amostra. Os três grupos não diferiram significativamente com relação à idade ($p = 0,702$), uso de contraceptivos ($p = 0,304$), sonolência diurna (escores totais da ESS; $p = 0,689$) e horário de acordar ($p = 0,430$). No entanto, as mulheres não-puérperas tinham mais anos de escolaridade ($p = 0,014$) do que as puérperas deprimidas e eutímicas, menor proporção de participantes coabitando com parceiros ($p < 0,001$) e menor índice de massa corporal (IMC) ($p < 0,001$).

Como esperado, os escores da EPDS foram mais elevados nas deprimidas pós-parto ($p < 0,001$), mas não diferiu entre as controles não-puérperas e as puérperas eutímicas ($p = 0,720$).

Em comparação com as mulheres eutímicas no pós-parto, as mulheres deprimidas no pós-parto pontuaram mais alto nas medidas de saúde mental (CES-D, BAI, PSS) obtidas durante a gravidez, e tiveram maior ocorrência de episódios depressivos ao longo da vida. Não houve diferença entre os grupos pós-parto com relação às variáveis demográficas ou do parto, ou nas características pós-natal e do recém-nascido.

A maioria das mulheres deprimidas no pós-parto (68,0%) estava deprimida durante a gravidez ($\text{CES-D} \geq 24$). Sobre o episódio atual, 67,6% das mulheres deprimidas no pós-parto exibiam o subtipo melancólico. Transtornos de ansiedade foram detectados em 32,4% das puérperas deprimidas, e 45,7% delas tiveram um episódio depressivo grave. Apenas 2 mulheres estavam fazendo uso de psicotrópico (antidepressivo: sertralina).

Tabela 2.1 - Características clínicas e demográficas das participantes do estudo.

	Mulheres eutímicas no pós-parto (n = 42)	Mulheres deprimidas no pós-parto (n = 37)	Mulheres saudáveis controles não-puérperas (n = 25)	p
Características demográficas				
Idade: média (DP)	27,7 (5,3)	27,7 (5,3)	28,7 (5,2)	0,702
Anos de estudo: ≥ 9 anos (%)	71,4	81,1	100,0	0,014*
Coabitando com um parceiro (%)	85,7	81,1	36,0	< 0,001*
Renda familiar mensal: média (DP)	964,9 (538,5)	898,9 (1182,8)	NA	0,761
Características do parto e pós-natal				
Primíparas (%)	33,3	24,3	NA	0,379
Idade gestacional ao nascer, semanas: média (DP)	39,6 (1,4)	38,8 (2,1)	NA	0,058
Parto vaginal (%)	61,9	59,5	NA	0,357
Aleitamento materno (%)	88,1	91,9	NA	0,717
Uso de anticoncepcional (%)	59,5	75,0	72,0	0,304
Índice de massa corporal, kg/m ² : média (DP)	27,5 (4,6)	27,3 (4,3)	22,7 (3,3)	< 0,001*
Características do recém-nascido				
Masculino (%)	50,0	43,2	NA	0,548
APGAR 1º minuto: média (DP)	8,2 (1,4)	8,0 (1,7)	NA	0,601
APGAR 5º minuto: média (DP)	9,5 (0,6)	9,4 (0,8)	NA	0,610
Saúde mental na gravidez				
CES-D: média (DP)	16,6 (10,4)	26,1 (12,8)	NA	< 0,001*
BAI: média (DP)	15,0 (11,0)	21,0 (12,0)	NA	0,029*
Escala de Estresse Percebido: média (DP)	23,9 (9,0)	29,5 (8,8)	NA	0,009*
Saúde mental no pós-parto				
ESS: média (DP)	8,3 (5,2)	8,8 (5,8)	7,7 (3,3)	0,689
EPDS: média (DP)	5,3 (4,4)	16,5 (5,3)	4,0 (2,7)	< 0,001*
Episódio depressivo ao longo da vida (%)	43,0	65,7	NA	0,045*
Depressão durante a gravidez (%)	NA	68,0	NA	
Uso atual de drogas psicotrópicas (%)	NA	5,2	NA	
Depressão severa (%)	NA	45,7	NA	
Subtipo melancólico (%)	NA	67,6	NA	
Comorbidade com ansiedade (%)	NA	32,4	NA	
Períodos de coleta do cortisol				
Dias após o nascimento: média (DP)	170,7 (56,8)	169,4 (64,8)	NA	0,927
Horário de coleta ao despertar: média (DP)	07:07 (01:24)	07:33 (01:36)	07:24 (01:11)	0,430

DP = desvio padrão; NA = não se aplica; ESS = Escala de Sonolência de Epworth; CES-D = Escala de Depressão do Centro de Estudos Epidemiológicos; BAI = Inventário de Ansiedade de Beck; EPDS = Escala de Depressão Pós-Parto de Edinburg;
 * valor de p significativo ($p < 0,05$).

2.4.2 Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

As puérperas coletaram amostras de saliva ao redor do 6º mês pós-parto (média = $169,6 \pm 60,5$ dias) e, em média, 5 semanas ($37,5 \pm 45,3$ dias) após a entrevista diagnóstica.

Como observado na **Figura 2.2**, houve uma diferença significativa nos níveis de cortisol dos três grupos durante o período de 12 horas [interação tempo x grupo diagnóstico $F(5,11; 258,50) = 6,34$; $p < 0,001$]. Análises *post hoc* mostraram diferenças significativas no despertar, quando controles saudáveis tinham níveis significativamente mais altos de cortisol do que mulheres deprimidas no pós-parto ($p = 0,050$; $d = 0,670$), mas sem diferenças quando comparadas com mulheres eutímicas no pós-parto ($p = 0,952$; $d = 0,250$). Não houve diferença significativa entre os níveis de cortisol de puérperas deprimidas e eutímicas ao despertar ($p = 0,307$; $d = 0,366$). Em 30 minutos após o despertar, as mulheres deprimidas no pós-parto tinham níveis significativamente mais baixos de cortisol do que as mulheres eutímicas no pós-parto ($p = 0,002$; $d = 0,775$) e as controles ($p < 0,001$; $d = 1,594$); e as mulheres eutímicas no pós-parto tinham níveis significativamente mais baixos de cortisol quando comparados com mulheres controles saudáveis ($p < 0,001$; $d = 0,846$). Às 3 horas após o despertar, as controles tinham níveis significativamente mais altos de cortisol do que as mulheres eutímicas ($p < 0,001$; $d = 0,912$) e as mulheres deprimidas no pós-parto ($p < 0,001$; $d = 1,265$), não havendo, todavia, diferença entre as puérperas ($p = 0,351$; $d = 0,350$). Finalmente, 12 horas após o despertar, as participantes deprimidas no pós-parto tinham níveis mais altos de cortisol do que as puérperas eutímicas ($p = 0,060$; $d = 0,500$), mas sem diferença em relação às controles saudáveis ($p = 1,000$; $d = 0,144$). Também, em 12 horas após o despertar, as mulheres eutímicas no pós-parto tinham níveis de cortisol semelhantes às controles saudáveis ($p = 1,000$; $d = 0,506$).

Figura 2.2 - Média e erro padrão dos níveis de cortisol salivar em mulheres eutímicas (n = 42) e deprimidas (n = 37) no pós-parto e nas mulheres controles saudáveis não-puérperas (n = 25), imediatamente após o despertar (0) e em 30 minutos, 3 horas e 12 horas depois de despertar. Resposta do cortisol ao despertar (CAR: despertar (0) → 30 min); *p = 0,05 nas mulheres controles saudáveis não-puérperas em comparação com as mulheres deprimidas após o parto; †p < 0,001 nas mulheres controles saudáveis não-puérperas em comparação com as mulheres eutímicas e deprimidas no pós-parto; **p < 0,05 nas mulheres deprimidas no pós-parto em comparação com as mulheres eutímicas no pós-parto.

As diferenças significativas observadas na ANOVA de medidas repetidas permaneceram quando as medidas repetidas foram covariadas pela idade, anos de escolaridade, sonolência diurna (escores da ESS), IMC, uso de contraceptivo e estado civil [interação tempo x grupo diagnóstico $F(5,42, 254,90) = 6,22$; $p < 0,001$]. Notavelmente, a análise estatística após a exclusão das participantes que tinham comorbidade com transtornos de ansiedade e daquelas que recebiam tratamento, não mostrou alteração na significância dos resultados.

A **Figura 2.3** ilustra a média e o erro padrão dos valores médios do CARi% e da VDr% nos três grupos. Um aumento de 50% no CARi % ocorreu em 72,0% das controles saudáveis, em 47,6% das mulheres eutímicas no pós-parto, e em 32,4% das mulheres

deprimidas no pós-parto. ANOVA de uma via seguida por comparações *post hoc* pelo teste de Bonferroni revelou que valores do CARi% eram significativamente maiores no grupo de controles saudáveis ($113,5\% \pm 94,3$) do que em mulheres eutímicas ($63,1\% \pm 69,8$; $p = 0,017$; $d = 0,606$) e em mulheres deprimidas no pós-parto ($32,2\% \pm 49,6$; $p < 0,001$; $d = 1,078$). As mulheres eutímicas no pós-parto mostraram maior CARi% do que as mulheres deprimidas, embora os valores não tenham sido estatisticamente significantes ($p = 0,165$; $d = 0,509$).

A redução relativa nas concentrações de cortisol ao longo de 12 horas (VDr%) foi significativamente menor nas mulheres deprimidas ($56,5\% \pm 41,8$) em comparação com as mulheres eutímicas no pós-parto ($75,6\% \pm 22,4$; $p = 0,015$; $d = 0,567$) e com as controles saudáveis ($75,1\% \pm 13,0$; $p = 0,05$; $d = 0,599$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as mulheres eutímicas no pós-parto e as controles ($p = 1,000$; $d = 0,026$).

Figura 2.3 - Média e erro padrão da média do incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar (CARi%) e da redução relativa das concentrações de cortisol na variação diurna (% de VDr); * $p < 0,05$ comparado com as mulheres eutímicas no pós-parto, e $p < 0,001$ comparado com as mulheres deprimidas no pós-parto; ** $p < 0,05$ comparado com as mulheres eutímicas no pós-parto, e $p = 0,05$ comparado com as mulheres saudáveis controles não-puérperas.

Nas mulheres deprimidas, avaliamos a reatividade do eixo HHA de acordo com as características e o subtipo do episódio depressivo maior atual. Como observado na **Tabela 2.2**, nenhuma diferença significativa nos índices de cortisol foi encontrada em relação à gravidade, presença de distúrbios do sono ou comorbidade com transtornos de ansiedade, e

com a ocorrência de depressão durante a gravidez. Mulheres diagnosticadas com o tipo melancólico de depressão mostraram um menor CARi% quando comparada com mulheres com episódios depressivos de características atípicas ($p = 0,042$ $d = 0,697$).

Nas puérperas deprimidas, os escores da EPDS tiveram correlação negativa com o CARi % ($r = -0,365$; $p = 0,001$), mas não com a VDr% ($r = -0,179$, $p = 0,115$). Não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre os escores da PSS e o CARi% ($r = -0,303$; $p = 0,072$) ou a VDr% ($r = 0,206$; $p = 0,288$).

Tabela 2.2 - Média e desvio padrão do incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar (CARi%) e da redução relativa das concentrações de cortisol na variação diurna (VDr%) de acordo com as características do episódio depressivo maior atual.

	n	CARi% média (DP)	P	d	VDr% média (DP)	p	d
Gravidade							
Alta	16	37,0 (53,1)	0,559	0,199	53,5 (35,2)	0,491	0,238
Leve/moderada	19	26,7 (49,9)			63,1 (44,7)		
Subtipo							
Melancólico	25	20,8 (42,0)	0,042*	0,697	60,1 (35,0)	0,465	0,240
Atípica	12	55,9 (57,4)			49,1 (54,5)		
Distúrbios de sonolência							
Sim (ESS ≥ 12)	15	36,9 (54,0)	0,642	0,155	47,4 (53,0)	0,277	0,351
Não (ESS < 12)	22	29,0 (47,4)			62,8 (32,0)		
Comorbidade com ansiedade							
Sim	12	42,1 (49,7)	0,408	0,293	54,0 (57,8)	0,802	0,078
Não	25	27,5 (49,8)			57,7 (33,0)		
Depressão durante a gravidez							
Sim	25	25,0 (43,5)	0,203	0,427	61,1 (34,9)	0,342	0,310
Não	12	47,3 (59,5)			47,0 (54,0)		

DP = desvio padrão; d = tamanho do efeito ou 'd' de Cohen; ESS = Escala de sonolência de Epworth; * valor de p significativo ($p < 0,05$).

2.5 Discussão

No presente estudo, avaliamos a função do eixo HHA de mulheres diagnosticadas com um transtorno depressivo maior atual no período pós-parto remoto (6 meses, em média) em comparação com mulheres não-deprimidas no pós-parto e com mulheres saudáveis não-puérperas. Encontramos uma atenuação da reatividade do eixo HHA no período pós-parto remoto, independente do diagnóstico de um transtorno depressivo, mas essa atenuação foi mais pronunciada em mulheres deprimidas no pós-parto. Por outro lado, a variação diurna dos

níveis de cortisol salivar foi reduzida apenas entre as puérperas com diagnóstico de episódio depressivo maior atual.

Nossos resultados mostraram que as mulheres no pós-parto, independentemente do diagnóstico de episódio depressivo atual, apresentaram uma atenuação da resposta do cortisol ao despertar, quando comparadas com as mulheres saudáveis não-puérperas. Mulheres no pós-parto também apresentaram níveis mais baixos de cortisol em 3 horas após o despertar. Estes dados sugerem que o período puerperal, por si só, provoca alterações na função do eixo HHA, mesmo muito tempo após o parto. Uma provável explicação para os mecanismos subjacentes à desregulação da função do eixo HHA no puerpério inclui a exposição contínua a elevações sustentadas dos níveis de CRH durante a gravidez, que pode dessensibilizar os receptores de CRH na hipófise anterior (Glynn, Davis e Sandman, 2013). Além disso, a diminuição da sensibilidade dos receptores no nível do hipotálamo e sua hiper-regulação pode estar associada com diminuição da secreção de CRH que, por sua vez, pode levar a uma supressão adrenal moderada após o parto (Glynn, Davis e Sandman, 2013). Uma resposta atenuada do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH) à administração de CRH ovino foi observada em 3 e 6 semanas após o parto, independentemente do diagnóstico de Blues ou DPP, mas quando as mulheres deprimidas no pós-parto foram analisadas separadamente, elas apresentaram uma atenuação mais pronunciada e duradoura (12 semanas após o parto) da resposta de ACTH (Magiakou *et al.*, 1996).

A hiporreatividade do eixo HHA durante o período pós-parto pode ter funções adaptativas, tais como a conservação de energia para lactação, proteger contra a inibição da lactação associada ao estresse, incremento da função imunológica e aumento da defesa materna e, conseqüentemente, da proteção da prole (Lightman *et al.*, 2001). Tem sido sugerido que, em mulheres vulneráveis genética e epigeneticamente, o atraso no retorno do eixo HHA ao seu funcionamento normal durante o período pós-parto pode contribuir para o aparecimento ou agravamento da depressão pós-parto (Kammerer, Taylor e Glover, 2006; Glynn, Davis e Sandman, 2013).

Apenas 32% das mulheres deprimidas no pós-parto exibiram um incremento igual ou superior a 50% no CAR, portanto a maioria está abaixo do intervalo encontrado em indivíduos normais (Clow *et al.*, 2004). Nossos resultados são consistentes com os dados da supressão da resposta do cortisol ao despertar em mulheres deprimidas entre 6 e 8 semanas pós-parto (Taylor *et al.*, 2009). Uma vez que nossas pacientes foram estudadas 6 meses após o parto, no presente estudo, demonstramos que a desregulação da reatividade do eixo HHA

persiste por longos períodos de tempo durante o puerpério. O comprometimento do eixo HHA em mulheres deprimidas no pós-parto também foi confirmado pela menor variação diurna dos níveis de cortisol nestas em comparação com mulheres eutímicas no pós-parto e com mulheres saudáveis não-puérperas.

O incremento de 50% ou mais no CAR foi observado em 46,7% das mulheres eutímicas no pós-parto e em 72% das mulheres saudáveis não-puérperas. Curiosamente, embora sem significância estatística, mas com um tamanho de efeito médio, as mulheres eutímicas no pós-parto mostraram, na média, um CARi% que foi intermediário entre aquele das mulheres saudáveis não-puérperas e das mulheres deprimidas no pós-parto. Por outro lado, a VDr % dos níveis de cortisol foi reduzida em mulheres deprimidas pós-parto mas não nas mulheres eutímicas pós-parto ou nas mulheres saudáveis não-puérperas. Vale ressaltar que o eixo HHA está sob o controle de receptores glicocorticoides (GRs) e de receptores mineralocorticoides (MRs) (De Kloet *et al.*, 1998). Enquanto GRs tem uma baixa afinidade para o cortisol endógeno e regulam os picos de cortisol que ocorrem, por exemplo, durante o CAR e em resposta ao estresse, MRs têm uma afinidade elevada para corticosteroides endógenos e regulam a variação circadiana (Pariante, 2004; Joëls *et al.*, 2008). Assim, tomados em conjunto, nossos dados relativos à reatividade e à variação diurna sugerem um comprometimento mais amplo da função do eixo HHA na presença de depressão no período remoto do puerpério, que pode envolver ambos os receptores corticosteroides.

Não podemos descartar o impacto do estresse psicológico que é inerente ao período pós-parto e do cuidado parental sobre a desregulação do eixo HHA. Há evidências de que fatores psicossociais podem diferentemente afetar a magnitude do CAR. Uma metanálise mostrou que eventos estressantes relacionados ao trabalho e de vida em geral estão associados com o aumento do CAR, ao passo que outros tipos de fatores psicossociais, tais como fadiga, burnout, e exaustão, estão associados com uma diminuição no CAR (Chida e Steptoe, 2009). Uma provável explicação para a atenuação do CAR observada, em nosso estudo, em mulheres no pós-parto, particularmente em mulheres clinicamente deprimidas, poderia ser uma resposta para a exaustão causada pelas demandas relacionadas aos cuidados parentais durante o período pós-parto. A atenuação do CAR também é observada para outras causas de hipocortisolismo e parece estar associado com estresse crônico e distúrbios do sono (Chida e Steptoe, 2009).

Nós encontramos uma correlação negativa entre a resposta do cortisol ao despertar, usando como medida o CARi%, e a severidade dos sintomas depressivos dada pelos escores da EPDS, em mulheres deprimidas pós-parto, que não foi relatado em estudo anterior (Cheng

e Pickler, 2010). Esta discrepância pode estar relacionada às diferenças entre as amostras estudadas, já que o primeiro estudo avaliou a presença/severidade das queixas depressivas em 21 puérperas saudáveis, sem um diagnóstico formal de transtorno depressivo maior.

A VDr% não mostrou nenhuma correlação com os sintomas depressivos. Esta falta de correlação pode ser atribuída ao tempo de coleta de 12 horas após o despertar, pois este período não incluiu o nadir do ritmo circadiano que é normalmente medido à meia-noite (Castro *et al.*, 1999).

Nenhuma diferença significativa foi observada para o CARi% e a VDr% com relação às características clínicas das mulheres deprimidas no pós-parto, com exceção de uma atenuação mais pronunciada do CAR no subtipo de depressão melancólica, em comparação com o subtipo de depressão atípica. Estes dados são consistentes com as conclusões anteriores relatando uma associação entre o subtipo de depressão melancólica e desregulação de eixo HHA (Lamers *et al.*, 2013). Outros resultados negativos podem ser atribuídos ao pequeno tamanho da amostra ou, no caso de distúrbios do sono à escala adotada neste estudo, pois a escala de sonolência de Epworth pode não ser o instrumento mais adequado para avaliar a qualidade do sono noturno (Sil e Barr, 2012).

Este estudo tem algumas limitações, como o pequeno tamanho da amostra e a presença de comorbidades em algumas mulheres deprimidas no pós-parto, embora a análise excluindo deprimidas com ansiedade não tenha alterado o significado dos resultados. Nós também não coletamos dados relativos à história familiar das mulheres com depressão. Como já discutido, a medição de cortisol salivar à meia-noite forneceria um melhor parâmetro para avaliar o ritmo circadiano, e avaliações subsequentes do CAR em dias diferentes iria nos permitir confirmar as mudanças observadas na função do eixo HHA. Além disso, a amostragem do cortisol foi realizada cinco semanas após a avaliação psiquiátrica e, embora improvável, alguma mudança no diagnóstico pode ter ocorrido.

Outra limitação do estudo é a diferença em anos de escolaridade das participantes, onde as mulheres saudáveis não-puérperas apresentaram níveis educacionais mais elevados do que as mulheres no pós-parto. Embora tenha sido demonstrado que, em amostras de comunidade, mulheres saudáveis altamente funcionais de classe média têm uma acentuada variação diurna dos níveis de cortisol comparados com mulheres menos funcionais (Adam e Gunnar, 2001), nós não encontramos diferenças significativas na variação diurna dos níveis de cortisol entre as mulheres saudáveis não-puérperas e as mulheres eutímicas no pós-parto. Dados sobre as associações entre características socioeconômicas e o CAR são controversos, com estudos apontando para uma associação negativa entre o CAR e o status socioeconômico

(Kunz-Ebrecht *et al.*, 2004; Wright e Steptoe, 2005), uma associação positiva entre o CAR e características socioeconômicas (Karlmanangla *et al.*, 2013), ou a ausência de associação com o nível de escolaridade e outros parâmetros de posição social (Kumari *et al.*, 2010). Vale ressaltar que em nossas análises a inclusão dos anos de escolaridade como uma covariável não alterou a significância estatística do resultado principal.

Por outro lado, este estudo tem vários pontos fortes: foi conduzido em pacientes isentas de medicação (apenas duas estavam tomando antidepressivos no momento da coleta de saliva), o diagnóstico de episódio depressivo maior baseou-se em entrevista clínica estruturada realizada por profissionais de saúde mental treinados, e incluiu uma avaliação de eventuais associações entre o funcionamento do eixo HHA e características clínicas do episódio depressivo maior.

Concluindo, nós mostramos que o período pós-parto remoto está associado com uma desregulação do eixo HHA, indicado por uma atenuação de reatividade do eixo HHA. A desregulação do eixo HHA é mais pronunciada na presença do diagnóstico de um episódio depressivo maior, que, por sua vez, é associado com uma atenuação da resposta do cortisol ao despertar e a uma redução da variação diurna do cortisol. A depressão pós-parto é altamente prevalente em nossa amostra, um rastreio positivo (EPDS ≥ 10) foi observado em 23,7% das 1.083 mulheres após o parto (De Figueiredo *et al.*, 2014). No entanto, estima-se que menos de 50% das mulheres com depressão pós-parto sejam identificadas e tratadas (Hendrick, 2003). Nossos achados enfatizam a necessidade de melhorias no cuidado das mulheres durante o período pós-parto. Mesmo seis meses após o parto, as mulheres apresentaram alterações no sistema neuroendócrino relacionado com o processamento de estresse, o que pode representar uma vulnerabilidade à depressão e a outros transtornos mentais.

3 - Alterações do eixo HHA na Depressão Pós-Parto e associações com a neuroquímica funcional do Giro do Cíngulo Anterior

3 ALTERAÇÕES DO EIXO HHA NA DEPRESSÃO PÓS-PARTO E ASSOCIAÇÕES COM A NEUROQUÍMICA FUNCIONAL DO GIRO DO CÍNGULO ANTERIOR

3.1 Resumo

Introdução: O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre metabólitos no Giro do Cíngulo Anterior (GCA) e o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), em mulheres com episódio depressivo maior no puerpério.

Métodos: A amostra foi composta por 22 mulheres com depressão pós-parto (DPP) e por 19 puérperas eutímicas (EPP), a média de idade das participantes foi de $28,5 \pm 4,9$ anos. As coletas de cortisol salivar foram feitas imediatamente após o despertar e em 30 min, 3 e 12 horas após o despertar, e os metabólitos foram avaliados em exame de espectroscopia por ressonância magnética de emissão de próton (^1H -ERM) em, respectivamente, $22,7 \pm 7,8$ e $18,9 \pm 4,7$ semanas após o parto.

Resultados: Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis de metabólitos no GCA. O incremento relativo da resposta do cortisol ao despertar (CARi%) não diferiu entre os grupos, mas DPP tiveram menor variação diurna relativa (VDr%) dos níveis de cortisol. Correlações positivas entre medidas do eixo HHA e metabólitos do GCA, foram observadas na amostra total e apenas no grupo de DPP, onde a VDr% teve correlação com os níveis de mI (mio-inositol) e o CARi% correlacionou-se com os níveis de glutamato+glutamina (Glx/Cr) e de glutamato (Glu/Cr). Estas correlações permaneceram significativas mesmo após controle para idade, período decorrido entre coleta de cortisol e exame de ^1H -ERM, e uso de contraceptivos.

Limitações: O tamanho relativamente pequeno da amostra é uma limitação ao nosso estudo.

Conclusões: Nossos dados apontam para uma associação entre alterações metabólicas no GCA e anormalidades no funcionamento do eixo HHA na depressão puerperal. A especificidade da correlação entre determinados metabólitos para diferentes medidas do eixo HHA sugere uma interação entre tipo de receptor corticosteroide e metabólito.

Palavras-chave: Depressão pós-parto. Giro do cíngulo anterior. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Resposta do cortisol ao despertar. Variação diurna do cortisol. Espectroscopia de ressonância magnética

3.2 Introdução

Episódios depressivos maiores durante o puerpério são prevalentes (Gaynes *et al.*, 2005) e causam prejuízos não só na mulher, mas também no vínculo com o bebê, acarretando neste prejuízos cognitivos e comportamentais (Murray *et al.*, 1996; Grace, Evindar e Stewart, 2003; Herrera, Reissland e Shepherd, 2004). Assim, o entendimento da fisiopatogenia da Depressão Pós-Parto (DPP) pode ter grandes implicações para a prevenção e atenuação dos danos no binômio mãe-bebê.

A etiologia da DPP é multifatorial, mas estudos têm mostrado a influência de alterações hormonais na dinâmica da DPP (Bloch *et al.*, 2000; Kammerer, Taylor e Glover, 2006), especialmente alterações no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Harris *et al.*, 1996; Jolley *et al.*, 2007; O'keane *et al.*, 2011; Saleh El *et al.*, 2013).

Anormalidades no funcionamento do eixo HHA também são observadas em transtornos depressivos que ocorrem fora do período puerperal (Parker, Schatzberg e Lyons, 2003) e, recentemente, nós demonstramos uma redução da reatividade do eixo HHA em puérperas comparadas com controles saudáveis, sendo essas anormalidades mais pronunciadas em puérperas deprimidas, comparadas com puérperas eutímicas (De Rezende *et al.*, 2015).

Estudos de neuroimagem sugerem o envolvimento de diversas regiões cerebrais na fisiopatogenia dos transtornos depressivos, incluindo hipotálamo, amígdala, hipocampo, córtex medial pré-frontal (mPFC), córtex orbitofrontal (OFC) e giro do cíngulo anterior (GCA) (Dougherty e Rauch, 1997; Mayberg, 1997), que são estruturas ricas em receptores glicocorticoides (McEwen, De Kloet e Rostene, 1986) e que exercem influência sobre o funcionamento do eixo HHA (Whitnall, 1993; Smith e Vale, 2006).

Em indivíduos saudáveis, os níveis séricos do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH) foram positivamente correlacionados com o fluxo sanguíneo, avaliado por meio de tomografia por emissão de fóton único (Single Photon Computed Emission Tomography –SPECT), no GCA esquerdo e na ínsula direita (Ottowitz *et al.*, 2004). Também, em sujeitos saudáveis, foi demonstrada uma relação entre aumento nos níveis de cortisol, após paradigma estressor, e uma menor atividade no GCA (Pruessner *et al.*, 2008). Além do mais, MacLulich e colaboradores (MacLulich *et al.*, 2006) demonstraram que idosos saudáveis que não apresentaram supressão dos níveis de cortisol ao teste de dexametasona tinham menor volume do cíngulo anterior no hemisfério esquerdo do que supressores.

Alterações funcionais e estruturais do GCA também foram notadas em condições médicas nas quais são observadas alterações do eixo HHA, como na doença de Cushing (Andela *et al.*, 2013) e Alzheimer (Chetelat e Baron, 2003; Cermakian *et al.*, 2011).

Em neuroimagem, além de alterações funcionais e estruturais, é possível analisar a bioquímica de regiões de interesse (ROI) através da técnica de espectroscopia por ressonância magnética de emissão de próton (^1H -ERM). A ^1H -ERM registra os sinais dos metabólitos presentes no tecido cerebral (Rudkin e Arnold, 1999), fornecendo assim parâmetros de metabolismo energético, integridade neuronal e disponibilidade de neurotransmissores, o que possibilita investigar o papel de metabólitos na fisiopatogenia da depressão (Grimm *et al.*, 2012; Bustillo, 2013). Os metabólitos mais consistentemente estudados por meio de ^1H -ERM são glutamato (Glu), mio-inositol (mI), glicerofosfocolina + fosfocolina + colina (Cho), N-acetil-aspartato + N-acetil-aspartil-glutamato (NAA), glutamato + glutamina (Glx), e creatina + fosfocreatina (Cr). As concentrações de Cr são relativamente constantes e resistentes a mudanças, e por isso são utilizadas como referência para quocientes metabólicos (/Cr) (Malhi *et al.*, 2002).

Alterações metabólicas no GCA de pacientes deprimidos em comparação com controles saudáveis tem sido descritas em estudos de ^1H -ERM, como redução dos níveis de metabólitos do complexo glutamatérgico (Glu e Glx) (Auer *et al.*, 2000; Pfleiderer *et al.*, 2003; Hasler *et al.*, 2007; Luykx *et al.*, 2012) e redução do mI/Cr (Coupland *et al.*, 2005). Até o momento, poucos estudos investigaram alterações de metabólitos por meio de ^1H -ERM na DPP, mas foi demonstrada redução dos níveis do ácido gama-aminobutírico (GABA) na região occipital, em mulheres no sexto mês pós-parto, em comparação com mulheres fora do período puerperal (Epperson *et al.*, 2006), e aumento de Glu no córtex medial pré-frontal de mulheres entre três e nove semanas pós-parto, em comparação com puérperas eutímicas (Mcewen *et al.*, 2012). Nós demonstramos uma redução dos níveis dos metabólitos do complexo glutamatérgico (Glu/Cr, Glx and Glx/Cr) e de N-acetil-aspartato (NAA and NAA/Cr) no córtex frontal dorsolateral esquerdo de puérperas deprimidas comparadas com puérperas eutímicas, mas não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto aos níveis de metabólitos no GCA (Rosa *et al.*, submetido).

Até onde é do nosso conhecimento, não há estudos investigando se mulheres com DPP demonstram anormalidades nas relações entre os níveis de cortisol endógenos e a neuroquímica funcional do GCA. Assim, no presente estudo nós objetivamos verificar a existência de correlações entre o funcionamento do eixo HHA e metabólitos do GCA medidos por ^1H -ERM. Para isso, nós reanalisamos os dados de subamostra de mulheres com DPP

comparadas com mulheres eutímicas no pós-parto (EPP) que foram submetidas a exame de ressonância magnética (Rosa et al., submetido) e avaliação do eixo HHA (De Rezende *et al.*, 2015).

Para verificar a funcionalidade do eixo HHA nós utilizamos dois índices auxiliares, a reatividade do eixo HHA, avaliada por meio da resposta do cortisol ao despertar (*cortisol awakening response*, CAR) e a variação diurna (VD) dos níveis de cortisol. O eixo HHA é marcado por um ritmo circadiano, cuja secreção de cortisol apresenta picos ao longo do dia (Young, Carlson e Brown, 2001). O CAR é o mais significativo destes picos, e ocorre em aproximadamente 30 minutos após o despertar (Wilhelm *et al.*, 2007). Em indivíduos saudáveis, é esperado um incremento maior que 50% nos níveis de cortisol durante o CAR (Pruessner *et al.*, 1997), e queda nos níveis de cortisol ao longo do dia (Spiga *et al.*, 2014).

Nossa hipótese, de acordo com os achados prévios, onde pacientes deprimidos apresentam menores níveis de metabólitos do complexo glutamatérgico no GCA, e anormalidades no eixo HHA, é de que haveria correlações entre metabólitos do GCA e as medidas de reatividade e variação dos níveis de cortisol em puérperas deprimidas.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Participantes

As participantes do presente estudo transversal foram recrutadas de um estudo maior em duas cidades brasileiras, o BRISA (Brazilian, Ribeirão Preto e São Luís, Birth Cohort Studies) (Da Silva *et al.*, 2014), a partir de uma amostra de puérperas submetidas a avaliações diagnósticas para o rastreamento de depressão pós-parto (para detalhes ver, De Figueiredo *et al.*, 2014) e que realizaram tanto coleta de cortisol salivar, quanto ^1H -ERM. A composição da amostra para ^1H -ERM e dosagem de cortisol está melhor descrita em, respectivamente, Rosa et al., submetido, e (De Rezende *et al.*, 2015).

Brevemente, foram incluídas mulheres que se encontravam em até 6 meses de puerpério, com gravidez única, e que eram procedentes da cidade de Ribeirão Preto. Foram excluídas puérperas com outros transtornos psiquiátricos, exceto transtornos de ansiedade, devido à alta comorbidade entre depressão e ansiedade, em uso de medicações (exceto antidepressivos) ou de substâncias psicoativas, com condições médicas levando a alterações anatômicas e/ou

funcionais no sistema nervoso central e com contraindicações para a realização de exame de ressonância magnética.

O termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I), aprovado pelo comitê de ética local (ANEXO H), foi assinado na ocasião da coleta de cortisol ou da ^1H -ERM.

O diagnóstico de episódio depressivo maior foi confirmado ou descartado por meio da entrevista clínica estruturada para o DSM-IV, versão clínica – SCID-CV (First et al., 1997; (Del-Ben *et al.*, 2001), aplicada por profissionais de saúde mental treinados no instrumento.

Características demográficas do parto e do período puerperal foram coletadas a partir de questionário desenvolvido especificamente para essa finalidade. O questionário de lateralidade de Edimburg (Oldfield, 1971) (ANEXO L) foi aplicado para estabelecer a dominância hemisférica cerebral.

3.3.2 Coleta de cortisol e medidas auxiliares

Os níveis de cortisol foram dosados a partir de amostras de salivas coletadas em um único dia pelas próprias participantes, em domicílio, conforme descrito previamente (De Rezende *et al.*, 2015) e item 2. Cada participante recebeu quatro salivettes e orientações impressas (ANEXO J) a respeito dos procedimentos para coleta em quatro períodos: imediatamente ao despertar (T1) e, em 30 minutos (T2), 3 horas (T3) e 12 horas (T4) após o despertar. As voluntárias foram instruídas a fazer a primeira coleta de saliva imediatamente ao acordar, ainda na cama. Antes das outras coletas, as participantes foram orientadas a lavar a boca apenas com água, sem escovar os dentes e a evitar fumar e tomar bebidas, e a não comer uma hora antes e evitar tarefas estressantes. As participantes também foram instruídas a manter a saliva no freezer até sua entrega no laboratório.

A dosagem de cortisol salivar foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As amostras de saliva foram centrifugadas por 10 minutos, a 3.000 rpm e armazenadas a -30°C . As alíquotas de saliva foram submetidas ao teste de radioimunoensaio de acordo com o método descrito por (Castro e Moreira, 2003). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, 2,1% e 9,3%. Os valores são expressos em nanomoles por litro (nmol/L).

Para este estudo, as mudanças nos níveis de cortisol foram determinadas por meio de duas medidas auxiliares: o percentual de incremento nos níveis de cortisol salivar entre o despertar e 30 minutos após o despertar (CARi%) (Clow *et al.*, 2004), dado pela expressão: $CARi\% = \{(T2-T1)/T1\} \times 100$; e a diminuição relativa dos níveis de cortisol entre o despertar e 12 horas após o despertar, ou variação diurna relativa (VDr%) (Edwards *et al.*, 2003), foi dada pela expressão: $VDr\% = \{(T1-T4)/T1\} \times 100$.

3.3.3 Aquisição de neuroimagem e quantificação de metabólitos

Os procedimentos de aquisição de neuroimagem e quantificação de metabólitos foram descritos previamente (Rosa *et al.*, submetido). Para a aquisição de imagens, as participantes foram submetidas a uma única sessão em unidade de ressonância magnética 3T (Philips, Achieva, Holanda). Após as imagens exploratórias, os dados espectrocópicos foram obtidos com ^1H -ERM incluindo voxel em point-resolved spectroscopy (PRESS), com tempo de repetição (TR) de 2000 ms e tempo de eco (TE) de 20 ms. Com base em estudos anteriores nós escolhemos o GCA bilateral, pois enquanto alguns trabalhos encontraram alteração da sua neuroquímica funcional em transtornos depressivos (Pfleiderer *et al.*, 2003; Coupland *et al.*, 2005; Hasler *et al.*, 2007), também foi verificada sua implicação em anormalidades da dinâmica do eixo HHA (Treadway *et al.*, 2009; Ottowitz *et al.*, 2004).

Assim, a ^1H -ERM foi adquirida a partir de 1 volume de interesse (VOI) definido por imagens estruturais. O VOI de 3 x 2 x 1 cm (6 cm³) foi posicionado ao redor da volta do GCA, correspondente às áreas 24 a e 24 b de Brodmann, evitando sobreposição com o ramo da artéria anterior e interferência de ar do seio frontal. O tempo de aquisição total variou entre 45 e 50 minutos. O VOI foi dividido em diferentes compartimentos espaciais, líquido, matéria cinzenta e matéria branca, com distintos teores de água diferenciados (Kreis, Ernst e Ross, 1993; Knight-Scott *et al.*, 2003) para processamento dos ajustes das concentrações de metabólitos considerando o volume de água.

Os espectros foram processados e analisados utilizando o software *Linear Combination Model* (LCModel) que realiza ajustes das áreas sob os picos significativos (Provencher, 1993). Foram incluídos na análise apenas os metabólitos com nível de confiança, isto é, com Cramer-Rao Limite Inferior < 20% (Kreis, 2004).

Todos os procedimentos de aquisição e processamento foram realizados por técnicos experientes.

3.3.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0.

Os níveis dos metabólitos foram quantificados em relação à creatina (/Cr). Para comparar as características sociodemográficas e clínicas, entre os grupos, foram utilizados o teste exato de Fisher, para variáveis categóricas, e o teste de Mann-Whitney, para as variáveis contínuas. Para a normalidade da distribuição dos erros e homogeneidade das variâncias das medidas do eixo HHA e dos metabólitos do GCA, foi aplicada transformação logarítmica - as figuras ilustram os valores brutos. As variáveis log transformadas (medidas do cortisol e metabólitos) foram comparadas entre os grupos pelo teste t de student e correlacionadas pelo coeficiente de Pearson (r). Correlações parciais também foram feitas para controlar os efeitos da idade, do período entre a coleta do cortisol e a realização do exame de ressonância magnética, e do uso de contraceptivos.

A significância estatística foi definida por valores de $p < 0,05$.

3.4 Resultados

3.4.1 Características clínicas e demográficas da amostra

Das 45 puérperas que completaram a coleta de cortisol salivar e realizaram a ^1H -ERM, quatro foram excluídas devido à má qualidade dos gráficos de espectroscopia. Assim, a amostra final foi composta por 41 puérperas: 19 eutímicas (EPP) e 22 deprimidas (DPP). Entre as deprimidas, apenas duas estavam em uso de antidepressivo (sertralina).

As características clínicas e demográficas estão resumidas na **Tabela 3.1**, bem como os períodos de coleta dos dados. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos

quanto às características demográficas, características do parto e puerpério, lateralidade e períodos de coleta de cortisol salivar e realização de exames de ressonância magnética.

Tabela 3.1 - Características demográficas e clínicas das puérperas eutímicas e deprimidas.

	Eutímicas (n = 19)	Deprimidas (n = 22)	p
Características demográficas			
Idade: média (DP)	28,8 (4,3)	28,1 (5,4)	0,824
Anos de estudo: média (DP)	9,5 (2,8)	9,6 (1,9)	0,967
Coabitando com o parceiro: % (n)	94,7 (18)	86,4 (19)	0,361
Rendimento mensal: média (DP)	1050,0 (575,1)	1026,6 (775,0)	0,423
Características do parto e pós-parto			
Primíparas: % (n)	31,6 (6)	22,7 (5)	0,387
Parto vaginal: % (n)	63,2 (12)	77,3 (17)	0,259
Aleitamento materno: % (n)	89,5 (17)	100 (22)	0,209
Uso de anticoncepcional: % (n)	57,9 (11)	76,2 (16)	0,185
Índice de massa corporal, em kg/m ² : média (DP)	28,5 (5,0)	28,5 (4,3)	0,676
Lateralidade direita dominante: % (n)	100,0 (19)	89,0 (16)	0,273
Períodos de coleta ¹H-MRS e cortisol			
Semanas entre o parto e ¹ H-MRS: média (DP)	19,5 (5,0)	18,5 (4,4)	0,448
Semanas entre o parto e cortisol: média (DP)	23,0 (7,4)	22,4 (8,5)	0,574
Semanas entre o cortisol e ¹ H-MRS: média (DP)	3,6 (6,2)	3,9 (6,0)	0,824
Horário de coleta do cortisol ao despertar: média (DP)	6:52 (1:24)	7:29 (1:44)	0,354

¹H-ERM = espectroscopia por ressonância magnética de emissão de próton.

3.4.2 Resultados das medidas do cortisol e metabólitos

A **Tabela 3.2** mostra que, embora o incremento do cortisol ao despertar (CARi%) tenha sido maior nas eutímicas em relação às deprimidas, não houve significância estatística ($p = 0,187$). Com relação à queda dos níveis de cortisol no decorrer do dia, medidos pela VDr%, houve uma maior queda nas puérperas eutímicas comparadas com as deprimidas ($p = 0,009$). Em relação aos metabólitos do GCA, não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3.2 - Níveis de metabólitos, normalizados pela creatina, no GCA de puérperas eutímicas e deprimidas, e medidas do eixo HHA.

	EPP (n = 19) média (DP)	DPP (n = 22) média (DP)	p
Metabólitos			
Glu/Cr	2,1 (0,3)	2,0 (0,4)	0,442
Myo/Cr	1,7 (0,2)	1,6 (0,4)	0,561
Cho/Cr	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,804
NAA/Cr	1,6 (0,2)	1,5 (0,2)	0,663
Glx/Cr	2,2 (0,4)	2,2 (0,4)	0,707
Medidas do eixo HHA			
CARi%	54,6 (55,3)	31,6 (54,4)	0,187
VDr%	79,5 (14,7)	47,6 (50,8)	0,009*

EPP = eutímicas pós-parto; DPP = deprimidas pós-parto; DP = desvio padrão; CARi% = incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar; VDr% = redução relativa das concentrações de cortisol na variação diurna; Glu = glutamato; mI = mio-inositol; Cho = compostos de colina; NAA = N-acetil-aspartato; Glx = complexo glutamato + glutamina; Cr = creatina; /Cr = normalizado para creatina; * valor de p significativo ($P < 0,05$).

3.4.3 Correlações entre metabólitos e medidas do cortisol

Conforme apresentado na **Tabela 3.3**, houve uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre o CARi% e metabólitos do complexo glutamatérgico (Glu/Cr e Glx/Cr) e entre o VDr% e os níveis de mI/Cr, tanto na amostra total ($n = 41$), quanto entre as puérperas deprimidas ($n = 22$) (**Figura 3.1**). Após o controle para a idade, a correlação entre CARi% e metabólitos do complexo glutamatérgico permaneceram significativas na amostra total (Glu/Cr: $r = 0,313$; $p = 0,05$ e Glx/Cr: $r = 0,394$; $p = 0,012$) e também entre as deprimidas (Glu/Cr: $r = 0,492$; $p = 0,024$ e Glx/Cr: $r = 0,598$; $p = 0,004$). Esta correlação também se manteve significativa após o controle para o período entre coleta de cortisol e realização de $^1\text{H-ERM}$ na amostra total (Glu/Cr: $r = 0,319$; $p = 0,045$ e Glx/Cr: $r = 0,415$; $p = 0,008$) e entre apenas as deprimidas (Glu/Cr: $r = 0,522$; $p = 0,015$) e (Glx/Cr: $r = 0,607$; $p = 0,004$). A correlação entre mI/Cr e VDr% continuou estatisticamente significativa, em ambos os grupos, tanto após o controle para idade (total: $r = 0,443$; $p = 0,004$ e deprimidas: $r = 0,483$; $p = 0,026$) quanto após o controle do período entre coleta de cortisol e realização de $^1\text{H-ERM}$ (total: $r = 0,443$; $p = 0,004$ e deprimidas: $r = 0,475$; $p = 0,030$). Após o controle para uso de contraceptivos, as correlações entre CARi% e metabólitos do complexo glutamatérgico mantiveram-se significativas para a amostra total (Glu/Cr: $r = 0,348$; $p = 0,030$ e Glx/Cr: $r = 0,443$; $p = 0,005$) e para o grupo de puérperas deprimidas (Glu/Cr: $r = 0,465$; $p = 0,039$ e Glx/Cr: $r = 0,586$; $p = 0,007$). A correlação entre VDr% e mI se manteve significativa na amostra total ($r = 0,427$; $p = 0,007$), com uma tendência à significância no grupo de

puérperas deprimidas ($r = 0,423$; $p = 0,063$). Entre o grupo de puérperas eutímicas, não houve correlações significativas entre níveis de metabólitos e medidas do cortisol.

Tabela 3.3 – Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre metabólitos presentes no GCA de puérperas eutímicas (EPP) e deprimidas (DPP), e medidas do eixo HHA.

		Glu/Cr	Myo/Cr	Cho/Cr	NAA/Cr	Glx/Cr
Total (n = 41)						
	CARi%	0,327*	0,245	0,183	0,089	0,420*
	VDr%	0,215	0,443*	-0,034	0,126	0,123
DPP (n = 22)						
	CARi%	0,459*	0,187	0,190	0,207	0,572*
	VDr%	0,246	0,483*	-0,051	0,178	0,154
EPP (n = 19)						
	CARi%	-0,237	0,440	0,213	-0,154	-0,057
	VDr%	-0,338	-0,265	-0,177	0,113	-0,311

EPP = eutímicas pós-parto; DPP = deprimidas pós-parto; CARi% = incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar; VDr% = redução relativa das concentrações de cortisol na variação diurna; Glu = glutamato; ml = mio-inositol; Cho = compostos de colina; NAA = N-acetil-aspartato; Glx = complexo glutamato + glutamina; Cr = creatina; /Cr = normalizado para creatina; * valor de p significativo ($P < 0,05$).

Figura 3.1 - Correlações, em mulheres deprimidas pós-parto, entre aumento de CARi% e Glu/Cr (A) e Glx/Cr (B); e entre aumento de VDr% e ml (C).

Nota: CARi% = incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar; VDr% = redução relativa das concentrações de cortisol na variação diurna; Glu = glutamato; Glx = complexo glutamina + glutamato; ml = mio-inositol.

3.5 Discussão

Este estudo objetivou avaliar a existência de correlações entre metabólitos do GCA, medidos por meio de ^1H -ERM, e indicadores do funcionamento do eixo HHA, a reatividade do eixo (CARi%) e a variação diurna dos níveis de cortisol (DVR%). Na análise global da amostra nós encontramos uma correlação positiva entre o CARi% e os níveis de Glx/Cr e de Glu/Cr e entre VDr% e mI/Cr. Quando as amostras foram analisadas separadamente, as correlações se mantiveram estatisticamente significantes apenas no grupo de pacientes deprimidas. Ou seja, quanto menor a reatividade do eixo HHA, menores foram os níveis dos metabólitos do complexo glutamatérgico e, quanto menor a variação diurna dos níveis de cortisol, menores foram os níveis de mio-inositol no GCA.

As correlações entre medidas de cortisol e os níveis de Glu/Cr e de Glx/Cr presentes no GCA, podem ser entendidas com base nas projeções glutamatérgicas entre o GCA e estruturas relacionadas com o controle do eixo HHA. Em roedores, assim como em primatas, a porção medial do córtex pré-frontal (CPFm) corresponde ao córtex do cíngulo anterior, córtex pré-límbico e parte do córtex frontal (Kolb, 1984; Zilles e Wree, 1985). A principal eferência do CPFm dá-se através dos neurônios piramidais glutamatérgicos, os quais são regulados por um complexo sistema de neurotransmissão que se encontra conectado a inúmeras regiões como amígdala, hipocampo e hipotálamo (Steketee, 2003). Em estudos com ratos foi demonstrado que o CPFm está envolvido na inibição do HHA durante a exposição ao estresse (Diorio, Viau e Meaney, 1993; Figueiredo *et al.*, 2003). No mais, é sabido que o GCA é rico em receptores glicocorticoides (Dedovic *et al.*, 2009) cujos níveis elevados potencializam o acúmulo de glutamato em outras estruturas cerebrais, como o hipocampo (Stein-Behrens, Lin e Sapolsky, 1994).

Apesar dos achados em estudos com animais, há poucos estudos avaliando correlação entre níveis periféricos de cortisol e metabólitos em indivíduos saudáveis ou com transtornos psiquiátricos. Boehringer e colaboradores (Boehringer *et al.*, 2015) investigaram a regulação neuronal do CAR em voluntários saudáveis e demonstraram, por meio de ressonância magnética funcional, uma conectividade funcional entre o GCA e o hipotálamo, sendo que um CAR menor associou-se a um aumento da atividade cerebral relacionada ao estresse, no GCA. Zwanzger e colaboradores (Zwanzger *et al.*, 2013) considerando as implicações do glutamato nos transtornos de ansiedade, avaliaram os níveis de Glx no GCA e de cortisol sanguíneo em 18 homens saudáveis após injeção de Colecistocinina-Tetrapeptídeo (CCK-4) para induzir ataques de pânico, e verificaram uma tendência de correlação positiva entre os níveis de

cortisol e Glx no GCA. Pacientes com doença de Cushing ativa, que geralmente sofrem de manifestações psiquiátricas como transtornos depressivos, além de marcantes alterações funcionais e estruturais no sistema nervoso central, também apresentam acúmulo de glutamato no hipocampo (Chen *et al.*, 2013). E na depressão, de forma geral, há coocorrência de aumento da transmissão glutamatérgica com hipersecreção de cortisol (Drevets, 2004). Além do mais, tem sido relatada uma interação entre glutamato e a secreção do ACTH, e que alguns medicamentos antidepressivos que modulam a liberação de ACTH, parecem interferir com o sistema glutamatérgico cerebral (Jezova, 2005). Esta suscetibilidade pode ser devido à variabilidade genética, já que variações gênicas parecem modular a atividade glutamatérgica no GCA durante estados agudos de estresse e ansiedade em homens saudáveis submetidos à injeção de CCK-4 (Ruland *et al.*, 2015).

O mI é um segundo mensageiro liberado no meio intracelular a partir da hidrólise da ligação fosfodiéster do fosfoinositídeo (PI) (Berridge, 1989). A elevação de mI está associada à gliose (Brand, Richter-Landsberg e Leibfritz, 1993; Cecil e Jones, 2001), que na doença de Alzheimer reflete a gliose astrocítica e a interrupção da conversão de mI em inositol trifosfato (IP3) presente na membrana lipídica (Miller *et al.*, 1993).

Em estudos avaliando níveis de mI no GCA de pacientes deprimidos comparados com controles saudáveis, os achados foram contraditórios. Enquanto um estudo não encontrou diferença entre os grupos (Kumar *et al.*, 2002), outro verificou menores níveis nos pacientes (Coupland *et al.*, 2005), sendo sugerido que a disfunção glial tem relevância na patofisiologia dos transtornos depressivos, devido ao papel crítico da glia na neurotransmissão por meio da captação e ciclo metabólico do glutamato (Auld e Robitaille, 2003; Valentine e Sanacora, 2009). Em acordo com esta inferência, nós encontramos correlações entre medidas do eixo HHA e os metabólitos Glu/Cr ou Glx/Cr e mI/Cr, mas não entre os demais metabólitos.

Há na literatura poucos estudos investigando associação do mI com o funcionamento do eixo HHA. A expressão de genes que codificam o receptor de inositol trifosfato (IP3R) são regulados positivamente pela dexametasona (Davis *et al.*, 2008). Levine e colaboradores (Levine *et al.*, 2001) avaliaram cinco pacientes com TDM e três controles saudáveis submetidos ao teste de supressão de dexametasona (DST) antes e após uma e duas semanas de tratamento com 12 gramas de inositol por dia, e observaram que o tratamento com inositol não teve efeito sobre os níveis plasmáticos de cortisol pós-dexametasona em pacientes ou controles saudáveis. Também não foram encontradas alterações de mI no giro do cíngulo posterior, substância branca frontal e hipocampo de 21 sujeitos saudáveis recebendo suplemento de cortisol durante quatro dias (Scheel, Ströhle e Bruhn, 2010).

Em nosso estudo, Glx/Cr e Glu/Cr tiveram correlação positiva com CARi%, mas não com VDr%; e o mI teve correlação positiva com a VDr%, mas não com o CARi%. Esta diferença de resultados entre CARi% e VDr% pode ser devido à implicação dos receptores que controlam a atividade do eixo HHA. É sabido que o ritmo circadiano do eixo HHA é controlado pelos receptores glicocorticoides que são menos sensíveis ao cortisol e, portanto, regulam sua secreção durante picos mais elevados, como no CAR, em situações de estresse, ou após administração exógena de corticoide como em paradigmas usando o DST. Por outro lado, os receptores mineralocorticoides são mais sensíveis aos níveis de glicocorticoides e atuam no controle basal do eixo HHA ao longo do dia (Pariante, 2004; Joëls *et al.*, 2008). O desequilíbrio entre estes dois receptores parece estar relacionado com a desregulação do eixo HHA na depressão (Jurueña *et al.*, 2015). Comportamentos depressivos foram associados a uma diminuição da expressão do RNAm de receptores glicocorticoides e do transportador de glutamato no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos que receberam dexametasona (Skupio *et al.*, 2015), e o inositol também parece estar sob controle de receptores glicocorticoides (Davis *et al.*, 2008). Além disso, glicocorticoides atuando através de receptores mineralocorticoides parecem diminuir a resistência ao estresse através de regulação de receptores glutamatérgicos (Nasca *et al.*, 2015), os receptores mineralocorticoides também mostram relação com inositol (Funder, 2001). Também, em análise *post mortem* do tecido cerebral de seis indivíduos com diagnóstico de depressão maior e de seis indivíduos saudáveis, foi observado que os pacientes expressavam níveis significativamente mais baixos (30-50%) de receptores glicocorticoides e mineralocorticoides no hipocampo, no giro frontal inferior e no giro do cíngulo (Klok *et al.*, 2011). Por sua vez, (Qi *et al.*, 2013), em análise *post mortem* de 12 indivíduos que tiveram depressão comparados com 12 indivíduos que eram saudáveis, observaram que no GCA dos deprimidos os níveis de transcrição do receptores mineralocorticoides foi significativamente menor, enquanto que a proporção de receptores glicocorticoides foi maior.

Embora tenhamos utilizado indicadores que levam em consideração a dinâmica do eixo HHA, aplicando transformação logarítmica para análise dos nossos dados, e controlado as correlações para idade, uso de contraceptivos, e período entre coleta de cortisol e realização de ¹H-ERM, este estudo tem algumas limitações, como o tamanho amostral relativamente pequeno. Também, duas participantes deprimidas faziam uso de sertralina, todavia a exclusão destas duas participantes da análise não alterou a significância dos resultados. Por fim, nossos dados não permitem dizer se os receptores estão influenciando a atividade metabólica no GCA ou vice-versa, ou se estas correlações estão sendo mediadas por outros

neuromoduladores, o que é provável dadas as interações que ocorrem entre diferentes vias aminérgicas e conexões de distintas estruturas límbicas.

Em conclusão, nossos achados apontam para uma associação entre alterações metabólicas no GCA e anormalidades no funcionamento do eixo HHA na depressão puerperal. Mais especificamente, nós demonstramos uma correlação positiva entre reatividade do eixo HHA e os níveis dos metabólitos do complexo glutamatérgico e entre a variação diurna dos níveis de cortisol e os níveis de mio-inositol no GCA. Acreditamos que estudos futuros devam ser desenhados para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a atividade metabólica cerebral pode influenciar no funcionamento do eixo HHA, contribuindo, assim, para o construto de modelos investigando os fatores biológicos na etiologia da depressão puerperal.

4 - Implicações de polimorfismos do gene do CRHR1 no funcionamento do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal na Depressão Pós-Parto

4 IMPLICAÇÕES DE POLIMORFISMOS DO GENE DO CRHR1 NO FUNCIONAMENTO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL NA DEPRESSÃO PÓS-PARTO

4.1 Resumo

Introdução: O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação do haplótipo TAT do gene do CRHR1 com a presença de depressão maior em mulheres no puerpério remoto, para prever o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).

Métodos: A amostra (idade média, $27,9 \pm 5,3$ anos) consistiu de: 26 puérperas deprimidas com (D-TAT^{1/2}) e 11 sem o haplótipo TAT (D-TAT⁰) e de 21 puérperas eutímicas com (E-TAT^{1/2}) e 20 sem haplótipo TAT (E-TAT⁰). Amostras de cortisol salivar foram coletadas imediatamente após o despertar e em 30 min, 3 e 12 horas após o despertar, aproximadamente no sexto mês pós-parto (média, $169,6 \pm 60,3$ dias), e o DNA para genotipagem foi extraído entre 22 e 25 semanas de gestação.

Resultados: Ao despertar, puérperas E-TAT⁰ tinham níveis de cortisol mais elevados que os demais grupos, em 30 min após o despertar puérperas D-TAT^{1/2} tiveram embotamento na reatividade do eixo HHA comparadas com puérperas E-TAT^{1/2} e com puérperas E-TAT⁰, e em 12 horas após o despertar puérperas E-TAT^{1/2} apresentavam quedas maiores nos níveis de cortisol do que puérperas D-TAT^{1/2} e puérperas D-TAT⁰. Independentemente do diagnóstico de depressão, apenas puérperas portadoras de haplótipo TAT apresentaram correlação negativa entre a reatividade do eixo HHA e os escores de sintomas depressivos durante o puerpério e de estresse percebido durante a gestação.

Limitações: A principal limitação deste estudo foi o pequeno tamanho das amostras que não permitiram análises mais robustas como em modelos preditores.

Conclusões: Nossos resultados mostrando que puérperas deprimidas portadoras do haplótipo TAT tem um maior embotamento do eixo HHA, sugerem uma associação entre polimorfismos do gene do CRHR1 e sintomas depressivos moderando o funcionamento do eixo HHA. Além disso, a presença do haplótipo TAT relacionou-se com maior vulnerabilidade da reatividade do eixo HHA diante da percepção de estresse e de sintomas depressivos.

Palavras-chave: Depressão pós-parto. Resposta do cortisol ao despertar. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Gene do CRHR1. Haplótipo TAT. Estresse.

4.2 Introdução

Episódios depressivos durante o puerpério são altamente prevalentes e, embora ocorram independentemente da cultura, é notável as diferenças de prevalência entre puérperas da Europa Ocidental /América do Norte (10% a 15%) com puérperas de outras regiões (até 40%), evidenciando uma contribuição ambiental para sua ocorrência (Evagorou, Arvaniti e Samakouri, 2015).

As flutuações nos níveis hormonais que ocorrem durante a gravidez podem contribuir para o aumento da sensibilidade para o estresse e vulnerabilidade para a depressão pós-parto (DPP) (Brummelte e Galea, 2010). Em modelos animais, o estresse moderado crônico induziu aumento dos níveis de corticosterona e de estrogênio no final da gravidez, sendo sugerido que tais variações hormonais, na gestação, podem contribuir para alterações de humor no pós-parto (Misdrahi *et al.*, 2005). Em humanos, alterações hormonais estão relacionadas com sintomas depressivos em puérperas (Bloch *et al.*, 2000; Kammerer, Taylor e Glover, 2006), com destaque para alterações neuroendócrinas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) que tem sido encontrado alterado na DPP (Jolley *et al.*, 2007; O'keane *et al.*, 2011; Saleh El *et al.*, 2013).

O funcionamento do eixo HHA está sob controle de mecanismos de feedback, a partir de impulsos transmitidos para o núcleo paraventricular do hipotálamo, o que induz a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin-releasing hormone*, CRH) que estimula a secreção, pela hipófise, do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotrophic hormone*, ACTH) que, por sua vez, leva à produção e secreção de cortisol pelo córtex da adrenal (Vale *et al.*, 1981; Miller e O'callaghan, 2002). O feedback negativo induzido pela liberação de cortisol dá-se de maneira direta e indireta através de estruturas cerebrais como amígdala, giro do cíngulo anterior, hipocampo e CPF, que apresentam tanto receptores para glicocorticoides quanto para CRH, sendo que o receptor 1 de CRH (*corticotropin releasing hormone receptor 1*, CRHR1) parece estar mais relacionado com depressão e é o principal subtipo presente na hipófise (Holsboer, 2000; Aguilera *et al.*, 2004). De maneira geral, o eixo HHA tem um papel central na manutenção da homeostase, dada a função regulatória do CRH que é fundamental na resposta ao estresse tendo repercussões neurocomportamentais, como na depressão e na ansiedade (Smith e Vale, 2006; Kinlein, Wilson e Karatsoreos, 2015).

Vários polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) de CRHR1, como o rs7209436, rs110402 e rs242924, têm sido implicados na depressão em adultos que sofreram maus-tratos na infância (Bradley *et al.*, 2008; Heim *et al.*, 2009; Polanczyk *et al.*, 2009; Laucht *et al.*, 2013). SNPs do CRHR1 também tem sido associados com a gravidade da depressão e suicídio (Wasserman *et al.*, 2008; Wasserman *et al.*, 2009) e com a resposta de antidepressivos (Licinio *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). Ching-Lopez e colaboradores (Ching-Lopez *et al.*, 2015) encontraram que cinco polimorfismos do CRHR1 (rs17689966, rs173365, rs7209436, rs110402 e rs242924) tiveram associação com transtorno depressivo maior (TDM), sendo que em três destes SNPs (rs7209436, rs110402 e rs242924) a presença de haplótipo TAT foi mais frequente entre casos do que entre controles. Na DPP, estudos avaliando polimorfismos do gene do CRHR1 são escassos e os resultados contraditórios, enquanto dois estudos não encontraram associação entre depressão perinatal e polimorfismos do CRHR1 (Schneider *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2015), outro identificou associação do SNP rs242939 com depressão gestacional e pós-parto (Engineer *et al.*, 2013).

Em geral, há poucos trabalhos avaliando polimorfismos no gene do CRHR1 e funcionamento do eixo HHA. SNPs do gene do CRHR1 não contribuíram para os níveis de cortisol em pacientes com TDM (Schatzberg *et al.*, 2014), mas SNPs do CRHR1, interagindo com história de maus tratos na infância, foram preditores do aumento dos níveis de cortisol induzido farmacologicamente em adultos saudáveis (Tyrka *et al.*, 2009) e com a desregulação nos níveis diurnos de cortisol em crianças que sofreram maus-tratos (Cicchetti, Rogosch e Oshri, 2011); e, ainda, em crianças saudáveis, SNPs tiveram efeito em interação epistática predizendo aumento na reatividade do cortisol (Sheikh *et al.*, 2013).

Embora fatores etiológicos para DPP pareçam incluir uma combinação de predisposição genética, fatores ambientais e vulnerabilidade a alterações hormonais, especialmente anomalias no eixo HHA, o impacto de polimorfismos em genes associados ao eixo HHA ainda não foram explorados neste transtorno. Assim, nós reanalisamos dados previamente publicados (De Rezende *et al.*, 2015), com o objetivo de investigar as implicações de variáveis gênicas nas variações dos níveis de cortisol ao longo do dia e na resposta do cortisol ao despertar (CAR) em estados depressivos puerperais. Especificamente, este estudo objetivou avaliar se polimorfismos do gene do CRHR1 seriam preditores dos níveis de cortisol em mulheres deprimidas e eutímicas no pós-parto. Nós avaliamos um haplótipo em três dos mais significantes SNPs (rs7209436, rs110402 e rs242924) do gene promotor do CRHR1, que foram selecionados devido aos efeitos protetores da presença de

uma ou duas cópias do haplótipo TAT no desenvolvimento da depressão em indivíduos submetidos a maus-tratos na infância (Polanczyk *et al.*, 2009) e também por estarem implicados na regulação do eixo HHA (Cicchetti, Rogosch e Oshri, 2011).

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Participantes

Este estudo transversal, avaliando o eixo HHA e genes de interesse, faz parte do projeto de coorte prospectiva conhecido pelo acrônimo “BRISA”: The Brazilian Ribeirao Preto and São Luis prenatal cohort (Da Silva *et al.*, 2014). De acordo com o projeto original, voluntárias gestantes foram convidadas a preencher questionários e a responder entrevistas clássicas, e a coletar sangue para análise genética. E, também, no pós-parto, puérperas previamente selecionadas, conforme descrito anteriormente (De Figueiredo *et al.*, 2014; De Rezende *et al.*, 2015) e item 2, foram convidadas, durante visita agendada, a realizar coleta de cortisol em domicílio. Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (ANEXO M) e as voluntárias foram esclarecidas quanto à metodologia e objetivos, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I).

Foram incluídas puérperas com gravidez única, cujas crianças nasceram na cidade de Ribeirão Preto. Foram excluídas puérperas em uso de substâncias psicoativas (exceto psicotrópicos para as deprimidas), com outras condições médicas que alteram a concentração de cortisol, e com outros transtornos mentais, exceto ansiedade dado sua alta comorbidade com a depressão (Halbreich e Kahn, 2007).

As variáveis para a caracterização da amostra foram obtidas em três ocasiões distintas: 1) entre 22 e 25 semanas de gestação, a partir de um complexo banco de dados do projeto original incluindo coleta de sangue para análise gênica; 2) no parto, por meio de prontuário médico-hospitalar; 3) no pós-parto com entrevistas diagnósticas e a coleta da saliva para dosagem de cortisol. Assim, os dados foram selecionados dentro de um contexto clínico e demográfico de acordo com sua relevância como preditores para DPP, implicação no funcionamento do eixo HHA e interação com polimorfismos.

Dentre as escalas aplicadas durante o puerpério, foram selecionadas a Escala de Sonolência de Epworth (*Epworth Sleepiness Scale*, ESS) (ANEXO F), que avalia a sonolência diurna em adultos (Johns, 1991; Bertolazi *et al.*, 2009), devido ao fato de que alterações dos ciclos de sono e vigília podem modificar a regulação do eixo HHA; a Escala de Depressão Pós-Parto de Edimburgo (*Edinburgh Postnatal Depression Scale*, EPDS) (Cox, Holden e Sagovsky, 1987; Santos *et al.*, 2007) (ANEXO A) cujos escores apontam a presença ou a intensidade dos sintomas depressivos; a entrevista clínica estruturada para o DSM-IV, versão clínica – SCID-CV (First *et al.*, 1997; (Del-Ben *et al.*, 2001), aplicada para excluir ou confirmar o diagnóstico de TDM. Também foram usadas a escala de depressão do centro de estudos epidemiológicos (*Center for Epidemiologic Studies Depression Scale*, CES-D) (Weissman *et al.*, 1977; Silveira e Jorge, 1998) (ANEXO B), e a escala de estresse percebido (*Perceived Stress Scale*, PSS-14) (Cohen, Kamarck e Mermelstein, 1983; Luft, C. D. *et al.*, 2007) (ANEXO D) que mensuraram, respectivamente, a ocorrência de sintomas depressivos e a percepção de estresse materno durante a gestação.

Para composição da amostra do presente estudo, conforme o projeto original, foi previsto que seriam convidadas puérperas que participaram da validação da EPDS aplicada por telefone (De Figueiredo *et al.*, 2014) e, que, posteriormente, também participaram de uma entrevista face a face para a aplicação da SCID. Da entrevista por telefone, 257 puérperas estavam deprimidas ($EPDS \geq 10$) e 239, pareadas por idade, estavam eutímicas ($EPDS < 10$). A partir destas, 199 puérperas foram avaliadas pela SCID, sendo que 90 foram diagnosticadas com TDM e 109 foram eutímicas. Todas as mulheres que participaram da SCID foram convidadas para compor o presente estudo, exceto 9 que preencheram algum critério de exclusão e 86 que recusaram participar. Desta forma, 104 puérperas (51 deprimidas e 53 eutímicas) foram chamadas para realizar a coleta de cortisol. No entanto, 7 (5 deprimidas e 2 eutímicas) não retornaram as amostras de saliva, e 16 (9 deprimidas e 7 eutímicas) retornaram amostras insuficientes para a dosagem de cortisol. Das 81 voluntárias que coletaram a saliva corretamente, duas outliers foram excluídas por apresentarem, 12 horas após o despertar, valores de cortisol discrepantes e uma participante por ausência de genotipagem. Assim, a amostra final foi composta por 78 voluntárias (41 eutímicas e 37 deprimidas).

4.3.2 Coleta e dosagem do cortisol e medidas auxiliares do eixo HHA

Conforme descrito previamente (De Rezende *et al.*, 2015) e item 2, para a coleta do cortisol salivar, cada mãe recebeu instruções por escrito, e quatro salivettes devidamente etiquetados com o nome e períodos de coleta. As coletas de saliva foram realizadas num único dia, nos seguintes períodos: logo ao despertar, ainda na cama (T1); 30 minutos após despertar (T2); 3 horas após despertar (T3); e 12 horas após despertar (T4). No dia anterior à coleta, era feito contato telefônico a fim de lembrar a paciente da coleta, bem como enfatizar as instruções e a necessidade do preenchimento de uma lista de checagem (ANEXO J) dos cuidados tomados.

Após a coleta, os salivettes foram mantidos sob refrigeração até que fossem recolhidos por membro da equipe. Depois de recebidas, as amostras foram submetidas à centrifugação de 3.000 rpm, durante 10 minutos, e a saliva resultante foi armazenada a -30°C. A dosagem do cortisol salivar foi determinada em duplicadas, no Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pelo o método de radioimunoensaio em amostras de 25 µl de saliva (Castro e Moreira, 2003). A sensibilidade do ensaio foi de 60 ng/dL. Os coeficientes de variação intra-ensaio e entre-ensaio foram, respectivamente, 2,1% e 9,3%. Os valores foram expressos em nanomol por litro (nmol/L) a fim de facilitar a comparação com outros estudos. A transformação de ng/dL para nmol/L foi feita multiplicando-se os valores em ng/dL por 0,028.

O funcionamento do eixo HHA foi avaliado ao longo do dia por meio das quatro medidas tomadas. Com relação ao CAR, para evidenciar a sua presença e confirmar a reatividade no eixo logo após o despertar, foi calculado o seu incremento relativo (incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar, CARi%) (Clow *et al.*, 2004), dado pela fórmula: $CARi\% = \{[(T2-T1)/T1]*100\}$. Um $CARi \geq 50\%$ foi o cutoff usado para estabelecer a presença de reatividade do eixo HHA (Pruessner *et al.*, 1997).

4.3.3 Extração de DNA

Na ocasião da entrevista realizada no pré-natal foram coletados, em dois tubos contendo solução de EDTA, 4 ml de sangue venoso periférico de cada participante para a extração do DNA genômico. Imediatamente após as coletas, o material foi centrifugado para a

separação das células que foram colocadas em tubos de 2ml, devidamente identificados, e estocados em freezer a -20°C. Posteriormente, o DNA genômico foi extraído utilizando o FlexiGene DNA Kit (Cat. No.51106) (Qiagen), conforme as orientações do fabricante. Após as extrações do DNA genômico, as análises dos polimorfismos foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular em Neurociências da FMRP-USP.

4.3.4 Genotipagem de SNPs do CRHR1

Os SNPs foram genotipados pelo modo de discriminação alélica TaqMan para cada SNP, na plataforma de genotipagem 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, California), como descrito anteriormente (Bradley *et al.*, 2008).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) foi realizada sob as seguintes condições de ciclo: etapa de desnaturação (15 minutos) a 95°C, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, e uma fase de extensão final de 72°C por 15 minutos. As reações foram realizadas em tampão de reação 10X (Invitrogen), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 50ng de DNA genômico, 5 pmols de cada primer, 0,3 mM de cada base nitrogenada (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), contidas em 150mmol/L de cada primer e uma unidade de Taq polimerase (Invitrogen). Posteriormente, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% (Sigma) suplementada com brometo de etídio (0,03%), e, em seguida foram visualizados por transiluminação ultravioleta.

Os primers que iniciaram o sequenciamento foram desenhados para cada SNP selecionado, o desenho foi feito pelo programa PrimerQuest (*Integrated DNA Technologies*, IDT) e a análise da especificidade pelo programa OligoAnalyzer (IDT). As análises de discriminação alélica foram processadas no programa Taqman®Genotyper (Software Version 1.3 – Applied Biosystems).

4.3.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi feita com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0. Variáveis contínuas foram examinadas por ANOVA de

uma via, com média e desvio padrão, e variáveis categóricas foram analisadas pelo teste exato de Fisher.

Os polimorfismos do gene CRHR1 foram classificados quanto à presença (1 ou 2 cópias) ou a ausência de cópias do haplótipo TAT (0 cópia), conforme sugerido previamente (Jabbi *et al.*, 2007; Polanczyk *et al.*, 2009; Tyrka *et al.*, 2009).

Para as variáveis que não tinham distribuição normal foram realizadas transformações logarítmicas. Os valores de cortisol foram log-transformados para análises estatísticas, mas as figuras são apresentadas com os valores brutos. Os níveis de cortisol salivar (log-transformados) foram submetidos a uma MANOVA de medidas repetidas com dois fatores entre grupos: diagnóstico (deprimidas vs. eutímicas) e polimorfismos do genótipo CRHR1 (presença de pelos menos 1 cópia do haplótipo TAT vs. nenhuma cópia do haplótipo TAT) e um fator intra-grupos: tempo (despertar, 30 min, 3 horas e 12 horas após o despertar)]. Os graus de liberdade dos fatores grupo de diagnóstico, tempo de coleta e genótipo foram corrigidos usando o Hotelling's Trace, devido à característica bivariada de cada variável independente. Comparações *post hoc* foram conduzidas por meio de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. A magnitude do efeito foi determinada pelo teste de Cohen "d", definida como "pequeno" para valores de "d" igual ou inferior a 0,20; "médio" para valores ao redor de 0,50, e "grande" para valores superiores a 0,80 (Cohen, 1988). Como análise secundária, realizamos a análise multivariada de covariância (MANCOVA), incluindo como covariáveis as seguintes variáveis demográficas e clínicas: escores na PSS aplicada durante a gestação, idade, anos de escolaridade, estado civil, escore na ESS aplicada no puerpério, índice de massa corporal (IMC) e uso de contraceptivos.

O incremento do CAR acima de 50% ($CAR_i \geq 50\%$) foi tomado como uma resposta satisfatória de reatividade do cortisol ao despertar, conforme estabelecido por (Pruessner *et al.*, 1997). O teste t para amostras pareada calculou a diferença entre as médias de cortisol imediatamente e 30 minutos após o despertar.

O coeficiente de Spearman (rho) foi usado para testar a correlação entre o $CAR_i\%$ e os escores da EPDS e da PSS, em grupos de puérperas portadoras e não portadoras de pelo menos uma cópia do haplótipo TAT.

A significância estatística foi definida por valores de $p < 0,05$.

4.4 Resultados

4.4.1 Variáveis sociodemográficas e clínicas

Entre as 42 puérperas eutímicas, 21 (51,2%) possuíam 1 ou 2 cópias TAT (E-TAT^{1/2}) e 20 (48,8%) não possuíam nenhuma cópia TAT (Es/TAT⁰). Entre as puérperas com diagnóstico de depressão, 26 (70,3%) possuíam 1 ou 2 cópias TAT (D-TAT^{1/2}) e 11 (29,7%) não possuíam nenhuma cópia TAT (D-TAT⁰) (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1 – Total e porcentagem da frequência do haplótipo TAT entre puérperas eutímicas e deprimidas.

	Eutímicas	Deprimidas	Total
1 ou 2 cópias TAT	21 (51,2%)	26 (70,3%)	47 (60,3%)
Nenhuma cópia TAT	20 (48,8%)	11 (29,7%)	31 (39,7%)
Total	41 (100,0%)	37 (100,0%)	78 (100,0%)

A **Tabela 4.2** mostra que não houve diferença entre os grupos nas variáveis demográficas, obstétricas ou do pós-natal, características dos recém-nascidos e nos períodos de coleta.

Como esperado, os escores da EPDS foram maiores no grupo das puérperas deprimidas que também pontuaram mais nas medidas de saúde mental obtidas durante a gravidez (CES-D, PSS) e na ocorrência de episódios depressivos ao longo da vida. A tabela também mostra as características clínicas da depressão, e que duas mulheres estavam usando antidepressivo (sertralina).

Tabela 4.2 - Características demográficas e clínicas das participantes do estudo.

	D-TAT⁰ (n = 11)	D-TAT^{1/2} (n = 26)	E-TAT⁰ (n = 20)	E-TAT^{1/2} (n = 21)	p
Características demográficas					
Idade: média (DP)	25,4 (5,9)	28,8 (4,9)	27,9 (6,1)	27,4 (4,7)	0,350
Anos de estudo: ≥ 9 anos (%)	72,7	84,6	85,0	57,1	0,127
Coabitando com o parceiro (%)	90,9	88,5	90,0	90,5	1,000
Etnia: branca (%)	27,3	54,0	45,0	57,1	0,391
Características do parto e pós-natal					
Primíparas (%)	27,3	23,1	25,0	38,1	0,723
Idade gestacional ao nascer, semanas: média (DP)	38,8 (2,1)	38,8 (2,2)	39,6 (1,4)	39,6 (1,5)	0,335
Parto vaginal (%)	54,5	61,5	70,0	61,9	0,850
Aleitamento materno (%)	81,8	96,2	90,0	85,7	0,452
Uso de anticoncepcional (%)	81,8	72,0	65,0	52,4	0,370
Índice de massa corporal, em kg/m ² : média (DP)	26,5 (3,6)	27,6 (4,5)	27,3 (4,7)	27,4 (4,5)	0,921
Características do recém-nascido					
Masculino (%)	45,5	42,3	50,0	52,4	0,925
APGAR 5 ^a minuto: média (DP)	9,5 (1,0)	9,5 (0,8)	9,5 (0,8)	9,7 (0,6)	0,806
Saúde mental na gravidez					
Escala de Estresse Percebido: média (DP)	26,8 (7,2)	30,6 (9,2)	23,7 (11,2)	24,1 (7,0)	0,048*
Depressão durante a gravidez (CES-D > 24) (%)	50,0	65,4	30,0	16,7	0,007*
Saúde mental no pós-parto					
ESS: média (DP)	8,9 (5,3)	8,8 (6,1)	9,3 (5,1)	7,9 (5,2)	0,860
EPDS: média (DP)	15,7 (4,6)	16,8 (5,7)	7,4 (4,8)	3,5 (3,1)	<0.001*
Episódio depressivo ao longo da vida (%)	36,4	38,5	10,0	23,8	0,143
Uso atual de drogas psicotrópicas (%)	9,1	3,8	NA	NA	0,373
Períodos de coleta do cortisol					
Dias entre o parto e cortisol: média (DP)	169,1 (76,7)	169,6 (59,4)	162,0 (46,1)	170 (52,2)	0,967
Horário de coleta ao despertar: média (DP)	7:12 (1:32)	7:40 (1:38)	6:45 (1:27)	7:31 (1:20)	0,251

D-TAT⁰ = puérperas deprimidas sem cópia TAT; D-TAT^{1/2} = puérperas deprimidas com 1 ou 2 cópias TAT; E-TAT⁰ = puérperas eutímicas sem cópia TAT; E-TAT^{1/2} = puérperas eutímicas com 1 ou 2 cópias TAT; DP = desvio padrão; NA = não se aplica; CES-D = escala de depressão do centro de estudos epidemiológicos ESS = Escala de Sonolência de Epworth; EPDS = Escala de Depressão Pós-Parto de Edinburg; * valor de p significativo (P < 0,05).

4.4.2 Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

As amostras de saliva foram coletadas cerca de 6 meses após o parto (média = $169,6 \pm 60,5$ dias) e a extração do DNA entre 22 e 25 semanas de gravidez.

O modelo de medidas repetidas mostrou que, no decorrer do período de 12 horas, os níveis de cortisol diferiram entre os grupos de diagnóstico, dependendo do polimorfismo do gene do CRHR1 [interação tempo x diagnóstico x CRHR1 $F(3,0; 72,0) = 3,37$; $p = 0,023$], como observado na **Figura 4.1**.

Uma ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni, aplicada em cada momento de coleta do cortisol salivar mostrou diferenças significativas no despertar, quando puérperas eutímicas sem cópias TAT ($E-TAT^0$) tinham níveis de cortisol significativamente mais elevados do que puérperas $E-TAT^{1/2}$ ($p = 0,046$; $d = 0,602$), puérperas $D-TAT^0$ ($p = 0,033$; $d = 1,028$) e puérperas $D-TAT^{1/2}$ ($p = 0,040$; $d = 0,606$); aos 30 minutos, após o despertar, quando as puérperas $D-TAT^{1/2}$ tinham níveis de cortisol significativamente mais baixos do que as puérperas $E-TAT^{1/2}$ ($p = 0,005$; $d = 0,708$) e $E-TAT^0$ ($p = 0,001$; $d = 1,020$). Às 3 horas após o despertar, os grupos não diferiram entre si. E, por fim, 12 horas após o despertar, as puérperas $E-TAT^{1/2}$ tinham níveis de cortisol significativamente menores do que puérperas $D-TAT^{1/2}$ ($p = 0,050$; $d = 0,554$) e $D-TAT^0$ ($p = 0,026$; $d = 0,953$).

Figura 4.1 - Influência de polimorfismos do gene do CRHR1 nas medidas de cortisol em puérperas deprimidas sem cópia TAT (D-TAT⁰) e com 1 ou 2 cópias TAT (D-TAT^{1/2}), e em puérperas eutímicas sem cópia TAT (E-TAT⁰) e com 1 ou 2 cópias TAT (E-TAT^{1/2}) do polimorfismo do gene promotor do receptor 1 de CRH.

* $p < 0,050$: E-TAT⁰ > E-TAT^{1/2}, D-TAT⁰ e D-TAT^{1/2};

** $p < 0,050$: D-TAT^{1/2} < E-TAT^{1/2} e E-TAT⁰;

*** $p < 0,050$: E-TAT^{1/2} < D-TAT⁰ e D-TAT^{1/2}.

Nota: Resposta do cortisol ao despertar (CAR: despertar (0) → 30 min).

Ainda, o teste-t para amostras pareadas mostrou que houve diferença entre os níveis basais de cortisol ao despertar e os níveis de cortisol em 30 minutos após o despertar nos grupos E-TAT⁰ ($t = 3,792$; $p = 0,001$), E-TAT^{1/2} ($t = -,763$; $p < 0,001$) e D-TAT^{1/2} ($t = 6,910$; $p < 0,001$), mas não no grupo D-TAT⁰ ($t = 0,809$; $p = 0,429$).

As diferenças observadas permaneceram significativas quando foram covariadas por idade, anos de escolaridade, estado civil, escores da PSS e da ESS, IMC e uso de contraceptivos [interação tempo x diagnóstico x CRHR1 $F(0,146; 58,0) = 2,82$; $p = 0,047$]. Também, é digno de nota que a análise estatística após a exclusão das participantes que tiveram comorbidade com transtornos de ansiedade e aquelas que usavam antidepressivos não alteraram as significâncias estatísticas.

A **Tabela 4.3** informa a distribuição do haplótipo TAT por grupo diagnóstico, em relação à presença ($CAR_i \geq 50\%$) ou ausência ($CAR_i < 50\%$) de reatividade do cortisol ao despertar. Houve uma diferença significativa entre os grupos (Fisher exact test, $p = 0,018$) e

essa diferença se deu em função de uma maior proporção de mulheres sem reatividade do cortisol ao despertar entre as D-TAT^{1/2} (80,8%), em comparação com as D-TAT⁰ (36,4%; $p = 0,018$) e com as E-TAT^{1/2} (42,9%; $p = 0,014$).

Tabela 4.3- Distribuição das frequências dos polimorfismos do gene do promotor do CRHR1 de acordo com o CARi% e o diagnóstico para DPP.

	D-TAT ⁰	D-TAT ^{1/2}	E-TAT ⁰	E-TAT ^{1/2}	Total
CARi $\geq$ 50%	7 (63,6%)	5 (19,2%)	7 (35,0%)	12 (57,1)	31 (39,7%)
CARi < 50%	4 (36,4%)	21 (80,8%)	13 (65,0%)	9 (42,9%)	47 (60,3%)
Total	11 (100,0%)	26 (100,0%)	20 (100,0%)	21 (100,0%)	78 (100,0%)

D-TAT⁰ = puérperas deprimidas sem cópia TAT; D-TAT^{1/2} = puérperas deprimidas com 1 ou 2 cópias TAT; E-TAT⁰ = puérperas eutímicas sem cópia TAT; E-TAT^{1/2} = puérperas eutímicas com 1 ou 2 cópias TAT; CARi% = incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar.

Independentemente do grupo diagnóstico, nas mulheres pós-parto portadoras de haplótipo TAT, o CARi% teve correlação negativa com os escores da EPDS ($n = 47$; $\rho = -0,487$; $p = 0,001$), e com os escores da PSS ($n = 44$; $\rho = -0,442$; $p = 0,003$); porém entre aquelas que não eram portadoras de cópia TAT, não houve correlação do CARi% com a EPDS ($n = 31$; $\rho = 0,215$; $p = 0,246$), ou com a PSS ($n = 28$; $\rho = 0,183$; $p = 0,352$). A **Figura 4.2** ilustra as correlações significativas.

Figura 4.2 - Puérperas portadoras de cópia TAT apresentaram correlação do incremento relativo das concentrações de cortisol após o despertar (CARi%) com a Escala de Depressão Pós-Parto de Edinburg (EPDS) (A) e com a Escala de Estresse Percebido (PSS) (B).

4.5 Discussão

Este estudo investigou a associação de polimorfismos do gene promotor do CRHR1 e os níveis de cortisol salivar imediatamente após o despertar e ao longo do dia em puérperas deprimidas e eutímicas. Em análise de medidas repetidas, verificamos que as mudanças nos níveis de cortisol ao longo do dia foram influenciadas pela interação entre grupo diagnóstico (deprimidas vs. eutímicas) e genótipo do CRHR1 (0 cópia TAT vs. 1 ou 2 cópias TAT). A presença de pelo menos uma cópia TAT no haplótipo de três polimorfismos do gene promotor do CRHR1 associou-se a uma menor reatividade do eixo HHA em puérperas deprimidas. Além disso, puérperas portadoras de uma ou duas cópias TAT, independente do diagnóstico de depressão apresentaram correlação negativa entre os valores do incremento relativo dos níveis do cortisol ao despertar e os escores de depressão durante o puerpério e de estresse percebido durante a gestação, o que não foi observado entre as puérperas não carreadoras de cópias TAT.

Imediatamente após o despertar os níveis de cortisol foram mais elevados nas puérperas eutímicas sem cópia TAT do que nas demais puérperas. Por outro lado, em 30 minutos após o despertar, puérperas deprimidas com pelo menos uma cópia TAT apresentaram baixa reatividade do CAR e, portanto, níveis menores de cortisol em comparação com as eutímicas. No entanto, aquelas puérperas deprimidas sem cópia TAT não diferiram das eutímicas. Estes resultados sugerem que tal diferença foi devido à interação da condição diagnóstica com a presença de polimorfismo. Embora, até o momento, este seja o único estudo a realizar esta avaliação da interação de polimorfismos do gene do CRHR1 com o CAR, um estudo encontrou que variações nos SNPs rs110402 e rs242924 moderaram o efeito de maus-tratos na infância na resposta do cortisol ao teste de dexametasona e CRH, em adultos saudáveis, com uma resposta mais pronunciada entre os indivíduos homozigotos GG, que sofreram maus tratos na infância (Tyrka *et al.*, 2009).

Assim, nossos achados mostraram que variações no gene do CRHR1 estão associadas com a magnitude do CAR em mulheres deprimidas no pós-parto, sugerindo que polimorfismos neste gene podem agir como um mediador entre sintomas de depressão e atividade do eixo HHA. O efeito desta moderação também pôde ser notado em 12 horas após o despertar, quando puérperas deprimidas com ou sem cópias TAT apresentaram embotamento na queda dos níveis de cortisol se comparadas às puérperas eutímicas com TAT, mas não se comparadas com as puérperas eutímicas sem TAT. Desta forma, este achado também sinaliza interação entre condição diagnóstica e haplótipo TAT. Estes dados são, em

parte, suportados por (Cicchetti, Rogosch e Oshri, 2011), que observaram interações entre haplótipo TAT e maus-tratos e negligência na infância moderando significativamente o padrão de diminuição diurna do cortisol, ocasionando uma menor queda; todavia, em crianças que não haviam sofrido maus-tratos, não houve efeito da variação gênica no CRHR1.

Dois estudos relataram o papel moderador do haplótipo TAT que foi protetor contra a depressão em indivíduos com história de maus-tratos (Bradley *et al.*, 2008; Polanczyk *et al.*, 2009). Existem, no entanto, resultados que apontam para a direção oposta, como um maior impacto de maus-tratos na infância nos sintomas depressivos de adultos portadores de duas cópias do haplótipo TAT (Laucht *et al.*, 2013) e uma maior frequência de haplótipo TAT em indivíduos com transtornos depressivos do que em controles (Ching-Lopez *et al.*, 2015). Ainda, entre crianças portadoras de 2 cópias do haplótipo TAT, aquelas com histórias de maus-tratos apresentaram níveis significativamente mais elevados de neuroticismo, em comparação com aquelas não mal tratadas (Deyoung, Cicchetti e Rogosch, 2011). Por sua vez, Schatzberg e colaboradores (Schatzberg *et al.*, 2014) analisando pacientes deprimidos com e sem psicose, não encontraram implicação de 3 SNPs do CRHR1 (rs7209436, rs110402, rs242924) avaliados separadamente em prever depressão ou níveis de cortisol pela manhã. Assim, enquanto trabalhos prévios nos informam do papel moderador do haplótipo TAT em estados depressivos e na moderação de maus-tratos na infância, poucos analisaram a associação de SNPs do TAT com a atividade do eixo HHA, e os resultados são variáveis. Neste sentido, nossos dados contribuem apontando para uma relação da presença do haplótipo TAT com alteração na reatividade do eixo HHA, presença de alteração do humor e estresse percebido. De forma geral, nossos resultados sugerem uma interação entre estressores e polimorfismos gênicos tanto na resposta do eixo HHA, quanto na sintomatologia da depressão puerperal.

Devemos considerar que, embora tenhamos controlado o efeito de interação para inúmeras variáveis que podem influenciar tanto no eixo HHA quanto em fatores de risco para DPP, a complexidade da epigenética para atuação de polimorfismos continua um limitante, pois outras variáveis como sistemas aminérgicos, conectividade neuronal e mesmo a interação gene x gene não foram avaliadas (Pagliaccio *et al.*, 2014; 2015). De fato, a ação de polimorfismos do CRHR1 parece ser dependente de uma série de variáveis. Por exemplo, Heim e colaboradores (Heim *et al.*, 2009) avaliaram as diferenças sexuais nos efeitos do SNP rs110402 sobre a relação entre trauma na infância, depressão na idade adulta e resposta neuroendócrina ao teste de supressão por dexametasona e CRH. Os autores notaram que o alelo A do SNP rs110402 foi associado com a diminuição da resposta de cortisol ao teste,

apenas em homens com traumas de infância, enquanto que mulheres portadoras do alelo A, que sofreram maus-tratos na infância, exibiam aumento da resposta do cortisol, quando comparadas com homens. E não houve diferença, entre os sexos, em portadores do alelo A que não sofreram traumas. Kranzler e colaboradores (Kranzler et al., 2011) observaram a influência da etnia, do gênero e da presença de adversidades na infância sobre o papel moderador do haplótipo TAT para transtornos depressivos. Ao investigarem amostras de homens e mulheres de descendência afro-americana e europeia, os autores encontraram que, em mulheres afro-americanas que passaram por adversidades na infância o haplótipo TAT reduziu as chances para transtornos depressivos (OR = 0,63); e aquelas que não passaram por adversidade e que tinham duas cópias do haplótipo TAT, o risco para transtornos depressivos aumentou (OR = 1,51); este efeito não ocorreu nos demais grupos. Outro estudo mostrou que o efeito moderador de polimorfismos do CRHR1 na ocorrência de sintomas internalizantes na presença de maus tratos só foi notado em interação gene x gene, e que estas interações e fatores ambientais influenciavam o padrão de diminuição diurna do cortisol (Cicchetti, Rogosch e Oshri, 2011). De fato, já foi assinalado que o eixo HHA tem interação com outros sistemas, como o serotoninérgico (Porter *et al.*, 2004) e é sabido que ambos estão alterados na depressão (Miura *et al.*, 2008). Portanto, estes dados demonstram que o eixo HHA tem inter-relações complexas e seria importante que estudos futuros controlassem tais variáveis para prever tanto medidas do eixo HHA quanto o diagnóstico de DPP, incluindo interação gene x gene.

Finalmente, embora tenha sido observado um papel protetor para o haplótipo TAT, em contextos envolvendo maus-tratos na infância (Bradley et al., 2008; Polanczyk et al., 2009), estudos mais recentes indicam que indivíduos portadores de cópias do haplótipo TAT foram mais propensos a exibirem o fenótipo depressivo (Grabe *et al.*, 2010; Deyoung, Cicchetti e Rogosch, 2011; Laucht *et al.*, 2013). Uma das razões para estes resultados inconsistentes podem ser devido à arquitetura genética complexa do CRHR1 (Heim *et al.*, 2009).

Nosso estudo teve duas limitações importantes, uma diz respeito ao pequeno tamanho amostral que impossibilitou o uso de análises mais robustas como são os modelos preditores, e outra limitação foi a falta de coleta de cortisol à meia-noite, pois com esta medida teríamos um melhor parâmetro de avaliação do ritmo circadiano para estabelecer um ponto de corte nas variações no declínio do cortisol ao longo do dia (Castro *et al.*, 1999).

Em conclusão, o presente estudo fornece suporte para um papel moderador do haplótipo TAT em associação com sintomas depressivos no puerpério para prever menor reatividade do eixo HHA. Desta forma, nossos dados parecem apoiar resultados prévios de

que os sistemas hipotálamo-hipófise-suprarrenal, fatores genéticos e de estresse ambiental, envolvidos em outros transtornos de humor, também estejam implicados na etiopatogenia da DPP. Todavia, estudos futuros, incluindo amostras maiores, devem ser desenvolvidos para posterior validação e replicação dos achados.

5 - Conclusões

5 CONCLUSÕES

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar se havia alterações no funcionamento do eixo HHA de puérperas deprimidas e, se estas alterações estavam correlacionadas com níveis de metabólitos presentes no giro do cíngulo anterior (GCA), e, também, se variações genéticas no gene do CRHR1 previam a atividade do eixo HHA nestas puérperas. Conforme descrito no item 2, primeiro nós avaliamos a variação diurna do eixo HHA e a sua reatividade através do CAR como indicadores de alteração neuroendócrina na depressão pós-parto. Para isso, as puérperas deprimidas foram comparadas com puérperas eutímicas, e com um grupo controle de mulheres saudáveis não-puérperas para, além de investigar se as alterações do eixo HHA eram exclusivas do transtorno depressivo, também verificar se era um fenômeno inerente ao puerpério. No item 3, verificamos se alterações no eixo HHA de puérperas deprimidas tinham correlações com metabólitos presentes no GCA. Dentro do item 4, analisamos se a presença de polimorfismos de um gene do eixo HHA, o gene promotor do CRHR1, previa diferenças na atividade do cortisol de puérperas deprimidas em comparação com puérperas eutímicas; e, se em conjunto puérperas portadoras de polimorfismos apresentariam correlação entre a medida de reatividade do eixo HHA e escores de depressão e de estresse percebido.

De forma geral, puérperas deprimidas tiveram um embotamento do eixo HHA maior do que puérperas eutímicas e controles não-puérperas, mostrando que a desregulação neuroendócrina está presente no puerpério remoto sendo, porém, acentuada na presença de transtorno depressivo maior. Os resultados também demonstraram que a associação de polimorfismos do CRHR1 com sintomas depressivos previam diferenças individuais no funcionamento do eixo HHA, e que a presença de polimorfismos mediava uma correlação negativa entre reatividade do eixo e sintomas depressivos no puerpério e estresse percebido durante a gestação. Ainda observamos que medidas da reatividade e da variação diurna do cortisol tiveram correlações com a neuroquímica do GCA. Assim, os achados indicaram que a depressão no pós-parto está relacionada com alterações hormonais, atividade neuronal e polimorfismo gênico.

Finalmente, dada a alta incidência da DPP, a complexidade dos seus fatores etiológicos que envolvem desde causas endógenas até risco ambiental e a repercussão dos sintomas depressivos na interação mãe-bebê que pode acarretar prejuízos comportamentais ao longo da vida do filho, chamamos a atenção para os poucos projetos de assistência à saúde

mental da mulher, no período perinatal. Conclamamos que o presente estudo, associado a outros, gere uma consciência voltada não apenas para novas pesquisas, mas também para uma rotina de rastreamento e intervenção de depressão pós-parto nos serviços de saúde, particulares ou privados. Pois o diagnóstico e acompanhamento em momento tão específico do ciclo de vida em que o papel de mulher, genitora e cuidadora se fundem, deverão amparar e proteger a saúde e bem estar da progenitora e do seu recém-nascido, para a prosperidade.

6 - REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

ABOU-SALEH, M. T. et al. The role of pterins and related factors in the biology of early postpartum depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 4, p. 295-300, Jun 1999. ISSN 0924-977X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10422889> >.

ABOU-SALEH, M. T. et al. Hormonal aspects of postpartum depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 5, p. 465-75, Jul 1998. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802121> >.

ADAM, E. K.; GUNNAR, M. R. Relationship functioning and home and work demands predict individual differences in diurnal cortisol patterns in women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 2, p. 189-208, Feb 2001. ISSN 0306-4530

AGUILERA, G. et al. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 319-29, Mar 2004. ISSN 0196-9781

AKMAN, C.; UGUZ, F.; KAYA, N. Postpartum-onset major depression is associated with personality disorders. **Compr Psychiatry**, v. 48, n. 4, p. 343-7, Jul-Aug 2007. ISSN 0010-440X

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A., Ed. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-V: **American Psychiatric Pubed**. 2013.

ANDELA, C. D. et al. Smaller grey matter volumes in the anterior cingulate cortex and greater cerebellar volumes in patients with long-term remission of Cushing's disease: a case-control study. **Eur J Endocrinol**, v. 169, n. 6, p. 811-9, Dec 2013. ISSN 0804-4643.

ARANA, G. W.; BALDESSARINI, R. J.; ORNSTEEN, M. The dexamethasone suppression test for diagnosis and prognosis in psychiatry. Commentary and review. **Arch Gen Psychiatry**, v. 42, n. 12, p. 1193-204, Dec 1985. ISSN 0003-990X

ARAYA, R. et al. Effects of stressful life events, maternal depression and 5-HTTLPR genotype on emotional symptoms in pre-adolescent children. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 150b, n. 5, p. 670-82, Jul 5 2009. ISSN 1552-4841.

ARIYANNUR, P. S. et al. Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. **Brain Res**, v. 1335, p. 1-13, Jun 4 2010. ISSN 0006-8993.

AUER, D. P. et al. Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 305-13, Feb 15 2000. ISSN 0006-3223

AULD, D. S.; ROBITAILLE, R. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. **Neuron**, v. 40, n. 2, p. 389-400, Oct 9 2003. ISSN 0896-6273

- BATES, T. E. et al. Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for 1H MRS studies in vivo. **Neuroreport**, v. 7, n. 8, p. 1397-400, May 31 1996. ISSN 0959-4965
- BECK, A. T. et al. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. **J Consult Clin Psychol**, v. 56, n. 6, p. 893-7, Dec 1988. ISSN 0022-006X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3204199> >.
- BELVEDERI MURRI, M. et al. The HPA axis in bipolar disorder: Systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 63, p. 327-42, Jan 2016. ISSN 0306-4530.
- BENNETT, M. R.; BALCAR, V. J. Forty years of amino acid transmission in the brain. **Neurochem Int**, v. 35, n. 4, p. 269-80, Oct 1999. ISSN 0197-0186
- BERRIDGE, M. J. The Albert Lasker Medical Awards. Inositol trisphosphate, calcium, lithium, and cell signaling. **Jama**, v. 262, n. 13, p. 1834-41, Oct 6 1989. ISSN 0098-7484
- BERTOLAZI, A. N. et al. Portuguese-language version of the Epworth sleepiness scale: validation for use in Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 9, p. 877-83, Sep 2009. ISSN 1806-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820814> >
- BHAKOO, K. K.; PEARCE, D. In vitro expression of N-acetyl aspartate by oligodendrocytes: implications for proton magnetic resonance spectroscopy signal in vivo. **J Neurochem**, v. 74, n. 1, p. 254-62, Jan 2000. ISSN 0022-3042
- BHAKOO, K. K. et al. Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. **Cancer Res**, v. 56, n. 20, p. 4630-5, Oct 15 1996. ISSN 0008-5472
- BINDER, E. B.; NEMEROFF, C. B. The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. **Mol Psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 574-88, Jun 2010. ISSN 1359-4184.
- BLOCH, M.; DALY, R. C.; RUBINOW, D. R. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. **Compr Psychiatry**, v. 44, n. 3, p. 234-46, 2003 May-Jun 2003. ISSN 0010-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764712> >.
- BLOCH, M. et al. Cortisol response to ovine corticotropin-releasing hormone in a model of pregnancy and parturition in euthymic women with and without a history of postpartum depression. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 2, p. 695-9, Feb 2005. ISSN 0021-972X
- BLOCH, M. et al. Effects of gonadal steroids in women with a history of postpartum depression. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 6, p. 924-30, Jun 2000. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831472> >.
- BLOM, E. A. et al. Perinatal complications increase the risk of postpartum depression. The Generation R Study. **Bjog**, v. 117, n. 11, p. 1390-8, Oct 2010. ISSN 1470-0328.
- BOEHRINGER, A. et al. Neural Correlates of the Cortisol Awakening Response in Humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 9, p. 2278-85, Aug 2015. ISSN 0893-133x.

BONNIN, F. Cortisol levels in saliva and mood changes in early puerperium. **J Affect Disord**, v. 26, n. 4, p. 231-9, Dec 1992. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1479135> >.

BRADLEY, R. G. et al. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. **Arch Gen Psychiatry**, v. 65, n. 2, p. 190-200, Feb 2008. ISSN 0003-990x.

BRAISSANT, O. et al. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 86, n. 1-2, p. 193-201, Jan 31 2001. ISSN 0169-328X

BRAND, A.; RICHTER-LANDSBERG, C.; LEIBFRITZ, D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. **Dev Neurosci**, v. 15, n. 3-5, p. 289-98, 1993. ISSN 0378-5866. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7805581> >.

BRAND, S. R.; BRENNAN, P. A. Impact of antenatal and postpartum maternal mental illness: how are the children? **Clin Obstet Gynecol**, v. 52, n. 3, p. 441-55, Sep 2009. ISSN 1532-5520. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661760> >.

BRINSMEAD, M. et al. Peripartum concentrations of beta endorphin and cortisol and maternal mood states. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 25, n. 3, p. 194-7, Aug 1985. ISSN 0004-8666

BROOKS, J. C. et al. A proton magnetic resonance spectroscopy study of age-related changes in frontal lobe metabolite concentrations. **Cereb Cortex**, v. 11, n. 7, p. 598-605, Jul 2001. ISSN 1047-3211

BROWN, E. S. et al. Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 5, p. 538-45, Mar 2004. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023583> >.

BRUMMELTE, S.; GALEA, L. A. Depression during pregnancy and postpartum: contribution of stress and ovarian hormones. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 766-76, Jun 2010. ISSN 1878-4216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751794> >.

BURKE, H. M. et al. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 9, p. 846-56, Oct 2005. ISSN 0306-4530

BUSH, G.; LUU, P.; POSNER, M. I. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. **Trends Cogn Sci**, v. 4, n. 6, p. 215-222, Jun 2000. ISSN 1364-6613.

BUSTILLO, J. R. Use of proton magnetic resonance spectroscopy in the treatment of psychiatric disorders: a critical update. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 329-37, Sep 2013. ISSN 1294-8322.

CANTILINO, A. et al. Postpartum depression in Recife - Brazil: prevalence and association with bio-socio-demographic factors. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 1, 2010.

CARROLL, B. J.; MARTIN, F. I.; DAVIES, B. Pituitary-adrenal function in depression. **Lancet**, v. 1, n. 7556, p. 1373-4, Jun 22 1968. ISSN 0140-6736

CARTER, F. A.; FRAMPTON, C. M.; MULDER, R. T. Cesarean section and postpartum depression: a review of the evidence examining the link. **Psychosom Med**, v. 68, n. 2, p. 321-30, Mar-Apr 2006. ISSN 0033-3174.

CASTRAL, T. C. et al. Maternal mood and concordant maternal and infant salivary cortisol during heel lance while in kangaroo care. **Eur J Pain**, v. 19, n. 3, p. 429-38, Mar 2015. ISSN 1090-3801.

CASTRO, M. et al. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 3, p. 878-82, Mar 1999. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10084565>

CASTRO, M.; MOREIRA, A. C. **Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal**. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. . 47: 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 p. 2003.

CATANI, M.; DELL'ACQUA, F.; THIEBAUT DE SCHOTTEN, M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 8, p. 1724-37, Sep 2013. ISSN 0149-7634.

CECIL, K. M.; JONES, B. V. Magnetic resonance spectroscopy of the pediatric brain. **Top Magn Reson Imaging**, v. 12, n. 6, p. 435-52, Dec 2001. ISSN 0899-3459

CERMAKIAN, N. et al. Circadian clock gene expression in brain regions of Alzheimer 's disease patients and control subjects. **J Biol Rhythms**, v. 26, n. 2, p. 160-70, Apr 2011. ISSN 0748-7304.

CHAKRABORTY, G. et al. Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase. **J Neurochem**, v. 78, n. 4, p. 736-45, Aug 2001. ISSN 0022-3042

CHEN, Y. F. et al. Neuropsychiatric disorders and cognitive dysfunction in patients with Cushing's disease. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 16, p. 3156-60, Aug 2013. ISSN 0366-6999

CHENG, C.-Y.; PICKLER, R. H. Maternal Psychological Well-Being and Salivary Cortisol in Late Pregnancy and Early Post-Partum. **Stress and Health**, v. 26, n. 3, p. 215-224, Aug 2010. ISSN 1532-3005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281274600007 >.

CHETELAT, G.; BARON, J. C. Early diagnosis of Alzheimer's disease: contribution of structural neuroimaging. **Neuroimage**, v. 18, n. 2, p. 525-41, Feb 2003. ISSN 1053-8119

CHIDA, Y.; STEPTOE, A. Cortisol awakening response and psychosocial factors: a systematic review and meta-analysis. **Biol Psychol**, v. 80, n. 3, p. 265-78, Mar 2009. ISSN 1873-6246. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022335> >.

CHING-LOPEZ, A. et al. Epidemiological support for genetic variability at hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonergic system as risk factors for major depression. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 11, p. 2743-54, 2015. ISSN 1176-6328

CHOI, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 369-79, Feb 1987. ISSN 0270-6474

CICCHETTI, D.; ROGOSCH, F. A.; OSHRI, A. Interactive effects of corticotropin releasing hormone receptor 1, serotonin transporter linked polymorphic region, and child maltreatment on diurnal cortisol regulation and internalizing symptomatology. **Dev Psychopathol**, v. 23, n. 4, p. 1125-38, Nov 2011. ISSN 0954-5794.

CLOW, A. et al. The awakening cortisol response: methodological issues and significance. **Stress**, v. 7, n. 1, p. 29-37, Mar 2004. ISSN 1025-3890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15204030> >.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences** Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

COHEN, S.; KAMARCK, T.; MERMELSTEIN, R. A global measure of perceived stress. **J Health Soc Behav**, v. 24, n. 4, p. 385-96, Dec 1983. ISSN 0022-1465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6668417> >.

COLLA, M. et al. Glutamate as a spectroscopic marker of hippocampal structural plasticity is elevated in long-term euthymic bipolar patients on chronic lithium therapy and correlates inversely with diurnal cortisol. **Mol Psychiatry**, v. 14, n. 7, p. 696-704, 647, Jul 2009. ISSN 1359-4184.

COPLAN, J. D. et al. Metabolic syndrome and neurometabolic asymmetry of hippocampus in adult bonnet monkeys. **Physiol Behav**, v. 103, n. 5, p. 535-9, Jul 6 2011. ISSN 0031-9384.

CORWIN, E. J. et al. The impact of fatigue on the development of postpartum depression. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs**, v. 34, n. 5, p. 577-86, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0884-2175. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16227513> >.

COUPLAND, N. J. et al. Decreased prefrontal Myo-inositol in major depressive disorder. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 12, p. 1526-34, Jun 15 2005. ISSN 0006-3223

COX, J. L.; HOLDEN, J. M.; SAGOVSKY, R. Detection of postnatal depression. Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. **Br J Psychiatry**, v. 150, p. 782-6, Jun 1987. ISSN 0007-1250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3651732> >.

CRAIG, M. C. et al. Effects of acute ovarian hormone suppression on the human brain: an in vivo 1H MRS study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 8-10, p. 1128-32, Sep-Nov 2007. ISSN 0306-4530

CRESPO, I. et al. Impaired decision-making and selective cortical frontal thinning in Cushing's syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 81, n. 6, p. 826-33, Dec 2014. ISSN 0300-0664.

CUNHA, J. A. **Manual da versão em português das Escalas de Beck**. São Paulo. Brasil.: Casa do Psicólogo.: 11-13 p. 2001.

DA SILVA, A. A. et al. A protocol to identify non-classical risk factors for preterm births: the Brazilian Ribeirão Preto and São Luís prenatal cohort (BRISA). **Reprod Health**, v. 11, n. 1, p. 79, 2014. ISSN 1742-4755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410690> >.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001. ISSN 0301-0082

DAUTZENBERG, F. M. et al. Molecular biology of the CRH receptors-- in the mood. **Peptides**, v. 22, n. 5, p. 753-60, May 2001. ISSN 0196-9781

DAVIS, E. P. et al. Prenatal exposure to maternal depression and cortisol influences infant temperament. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 46, n. 6, p. 737-46, Jun 2007. ISSN 0890-8567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513986> >.

DAVIS, M. C. et al. Dexamethasone-induced inositol 1,4,5-trisphosphate receptor elevation in murine lymphoma cells is not required for dexamethasone-mediated calcium elevation and apoptosis. **J Biol Chem**, v. 283, n. 16, p. 10357-65, Apr 18 2008. ISSN 0021-9258

DE FIGUEIREDO, F. P. et al. Postpartum depression screening by telephone: a good alternative for public health and research. **Arch Womens Ment Health**, Nov 2014. ISSN 1435-1102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380783> >

DE KLOET, E. R. et al. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr Rev**, v. 19, n. 3, p. 269-301, Jun 1998. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626555> >.

DE REZENDE, M. G. et al. Altered functioning of the HPA axis in depressed postpartum women. **J Affect Disord**, v. 193, p. 249-256, Dec 2015. ISSN 1573-2517. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773916> >.

DEDOVIC, K. et al. The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. **Neuroimage**, v. 47, n. 3, p. 864-71, Sep 2009. ISSN 1053-8119.

DEDOVIC, K.; NGIAM, J. The cortisol awakening response and major depression: examining the evidence. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 11, p. 1181-9, 2015. ISSN 1176-6328

- DEICKEN, R. F.; PEGUES, M.; AMEND, D. Reduced hippocampal N-acetylaspartate without volume loss in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 37, n. 3, p. 217-23, Jun 22 1999. ISSN 0920-9964 .
- DEL-BEN, C. M. et al. Test-retest reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV – Clinical Version (SCID-CV) translated into portuguese. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 23, p. 156-159, 2001.
- DEVINSKY, O.; MORRELL, M. J.; VOGT, B. A. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. **Brain**, v. 118 (Pt 1), p. 279-306, Feb 1995. ISSN 0006-8950
- DEYOUNG, C. G.; CICCHETTI, D.; ROGOSCH, F. A. Moderation of the association between childhood maltreatment and neuroticism by the corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 52, n. 8, p. 898-906, Aug 2011. ISSN 0021-9630.
- DIETZ, L. J. et al. Cortisol response to social stress in parentally bereaved youth. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 4, p. 379-87, Feb 2013. ISSN 1873-2402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021533> >.
- DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 3839-47, Sep 1993. ISSN 0270-6474
- DORN, L. D.; SUSMAN, E. J.; PETERSEN, A. C. Cortisol reactivity and anxiety and depression in pregnant adolescents: a longitudinal perspective. **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 219-39, 1993. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8516425> >.
- DOUGHERTY, D.; RAUCH, S. L. Neuroimaging and neurobiological models of depression. **Harv Rev Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. 138-59, Sep-Oct 1997. ISSN 1067-3229
- DREVETS, W. C. Neuroplasticity in mood disorders. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 199-216, Jun 2004. ISSN 1294-8322
- DUAN, H. et al. Chronic stress exposure decreases the cortisol awakening response in healthy young men. **Stress**, v. 16, n. 6, p. 630-7, Nov 2013. ISSN 1025-3890.
- EARLS, M. F. Incorporating recognition and management of perinatal and postpartum depression into pediatric practice. **Pediatrics**, v. 126, n. 5, p. 1032-9, Nov 2010. ISSN 0031-4005.
- EDWARDS, S. et al. Components of the diurnal cortisol cycle in relation to upper respiratory symptoms and perceived stress. **Psychosom Med**, v. 65, n. 2, p. 320-7, Mar-Apr 2003. ISSN 0033-3174.
- EHLERT, U. et al. Postpartum blues: salivary cortisol and psychological factors. **J Psychosom Res**, v. 34, n. 3, p. 319-25, 1990. ISSN 0022-3999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2342000> >.

ENGINEER, N. et al. Association of glucocorticoid and type 1 corticotropin-releasing hormone receptors gene variants and risk for depression during pregnancy and postpartum. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 9, p. 1166-73, Sep 2013. ISSN 0022-3956.

EPPELSON, C. N. et al. Preliminary evidence of reduced occipital GABA concentrations in puerperal women: a 1H-MRS study. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 186, n. 3, p. 425-33, Jun 2006. ISSN 0033-3158

EVAGOROU, O.; ARVANITI, A.; SAMAKOURI, M. Cross-Cultural Approach of Postpartum Depression: Manifestation, Practices Applied, Risk Factors and Therapeutic Interventions. **Psychiatr Q**, May 19 2015. ISSN 0033-2720.

FALAH-HASSANI, K. et al. Prevalence of postpartum depression among immigrant women: A systematic review and meta-analysis. **J Psychiatr Res**, v. 70, p. 67-82, Nov 2015. ISSN 0022-3956.

FAN, F. L. et al. Hormonal changes and somatopsychologic manifestations in the first trimester of pregnancy and post partum. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 105, n. 1, p. 46-49, Apr 2009. ISSN 0020-7292. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265308100014 >.

FEKSI, A. et al. 'Maternity blues' and hormone levels in saliva. **J Affect Disord**, v. 6, n. 3-4, p. 351-5, Jun 1984. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6235265> >.

FIELD, T. Postpartum depression effects on early interactions, parenting, and safety practices: a review. **Infant Behav Dev**, v. 33, n. 1, p. 1-6, Feb 2010. ISSN 1934-8800. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962196> >.

FIGUEIREDO, B.; COSTA, R. Mother's stress, mood and emotional involvement with the infant: 3 months before and 3 months after childbirth. **Arch Womens Ment Health**, v. 12, n. 3, p. 143-53, Jun 2009. ISSN 1435-1102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259772> >.

FIGUEIREDO, F. P. et al. The Influence of genetic factors on peripartum depression: A systematic review. **J Affect Disord**, v. 172C, p. 265-273, Oct 2014. ISSN 1573-2517. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25451426> >.

FIGUEIREDO, H. F. et al. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 2357-64, Oct 2003. ISSN 0953-816X

FIRST, M. B. et al. Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Clinical Version (SCID-CV). New York: **Biometrics Research**, New York State Psychiatric Institute, 1997

FOLAND-ROSS, L. C.; HARDIN, M. G.; GOTLIB, I. H. Neurobiological markers of familial risk for depression. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 14, p. 181-206, 2013. ISSN 1866-3370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573472> >.

FRIM, D. M. et al. Characterization and gestational regulation of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in human placenta. **J Clin Invest**, v. 82, n. 1, p. 287-92, Jul 1988. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3260606> >.

FRYE, C. A.; WALF, A. A. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. **Horm Behav**, v. 41, n. 3, p. 306-15, May 2002. ISSN 0018-506X

FUNDER, J. W. Non-genomic actions of aldosterone: role in hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 10, n. 2, p. 227-30, Mar 2001. ISSN 1062-4821

GAGLIARDI, L.; PETROZZI, A.; RUSCONI, F. Symptoms of maternal depression immediately after delivery predict unsuccessful breast feeding. **Arch Dis Child**, v. 97, n. 4, p. 355-7, Apr 2012. ISSN 0003-9888.

GARD, P. R. et al. A multivariate investigation of postpartum mood disturbance. **Br J Psychiatry**, v. 148, p. 567-75, May 1986. ISSN 0007-1250

GAVIN, N. I. et al. Perinatal depression: a systematic review of prevalence and incidence. **Obstet Gynecol**, v. 106, n. 5 Pt 1, p. 1071-83, Nov 2005. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16260528> >.

GAYNES, B. N. et al. Perinatal depression: prevalence, screening accuracy, and screening outcomes. **Evid Rep Technol Assess (Summ)**, n. 119, p. 1-8, Feb 2005. ISSN 1530-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760246> >.

GERRA, G. et al. Neuroendocrine responses to experimentally-induced psychological stress in healthy humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 91-107, Jan 2001. ISSN 0306-4530

GLYNN, L. M.; DAVIS, E. P.; SANDMAN, C. A. New insights into the role of perinatal HPA-axis dysregulation in postpartum depression. **Neuropeptides**, v. 47, n. 6, p. 363-70, Dec 2013. ISSN 1532-2785. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210135> >.

GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. **Mol Psychiatry**, v. 7, n. 3, p. 254-75, 2002. ISSN 1359-4184. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920153> >.

GOLDSTEIN, B. L.; KLEIN, D. N. A review of selected candidate endophenotypes for depression. **Clin Psychol Rev**, v. 34, n. 5, p. 417-27, Jul 2014. ISSN 0272-7358.

GOODMAN, S. H. et al. Maternal depression and child psychopathology: a meta-analytic review. **Clin Child Fam Psychol Rev**, v. 14, n. 1, p. 1-27, Mar 2011. ISSN 1096-4037.

GOTTESMAN, II; GOULD, T. D. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 4, p. 636-45, Apr 2003. ISSN 0002-953X

GRABE, H. J. et al. Childhood maltreatment, the corticotropin-releasing hormone receptor gene and adult depression in the general population. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 153B, n. 8, p. 1483-93, Dec 2010. ISSN 1552-485X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20957648> >.

GRACE, S. L.; EVINDAR, A.; STEWART, D. E. The effect of postpartum depression on child cognitive development and behavior: a review and critical analysis of the literature. **Arch Womens Ment Health**, v. 6, n. 4, p. 263-74, Nov 2003. ISSN 1434-1816. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14628179> >.

GREENWOOD, J.; PARKER, G. The dexamethasone suppression test in the puerperium. **Aust N Z J Psychiatry**, v. 18, n. 3, p. 282-4, Sep 1984. ISSN 0004-8674

GRIMM, S. et al. Region-specific glutamate changes in patients with unipolar depression. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 8, p. 1059-65, Aug 2012. ISSN 0022-3956.

GROER, M. W.; MORGAN, K. Immune, health and endocrine characteristics of depressed postpartum mothers. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 2, p. 133-9, Feb 2007. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207585> >.

GU, H. et al. [Changes and significance of orphanin and serotonin in patients with postpartum depression]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 38, n. 12, p. 727-8, Dec 2003. ISSN 0529-567X

HALBREICH, U.; KAHN, L. S. Atypical depression, somatic depression and anxious depression in women: are they gender-preferred phenotypes? **J Affect Disord**, v. 102, n. 1-3, p. 245-58, Sep 2007. ISSN 0165-0327

HAMILTON, J. P.; SIEMER, M.; GOTLIB, I. H. Amygdala volume in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. **Mol Psychiatry**, v. 13, n. 11, p. 993-1000, Nov 2008. ISSN 1476-5578. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18504424> >.

HAMILTON, M. A rating scale for depression. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 23, p. 56-62, Feb 1960. ISSN 0022-3050. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14399272> >.

HANDLEY, S. L. et al. Mood changes in puerperium, and plasma tryptophan and cortisol concentrations. **Br Med J**, v. 2, n. 6078, p. 18-20, Jul 1977. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/559524> >.

HANDLEY, S. L. et al. Tryptophan, cortisol and puerperal mood. **Br J Psychiatry**, v. 136, p. 498-508, May 1980. ISSN 0007-1250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7388254> >.

HANKIN, B. L. et al. Cortisol reactivity to stress among youth: stability over time and genetic variants for stress sensitivity. **J Abnorm Psychol**, v. 124, n. 1, p. 54-67, Feb 2015. ISSN 0021-843x.

HARRIS, B. et al. The hormonal environment of post-natal depression. **Br J Psychiatry**, v. 154, p. 660-7, May 1989. ISSN 0007-1250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2597859> >.

HARRIS, B. et al. Maternity blues and major endocrine changes: Cardiff puerperal mood and hormone study II. **BMJ**, v. 308, n. 6934, p. 949-53, Apr 1994. ISSN 0959-8138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8173402> >.

HARRIS, B. et al. Cardiff puerperal mood and hormone study. III. Postnatal depression at 5 to 6 weeks postpartum, and its hormonal correlates across the peripartum period. **Br J Psychiatry**, v. 168, n. 6, p. 739-44, Jun 1996. ISSN 0007-1250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8773817> >.

HASHIMOTO, T. et al. Reduced N-acetylaspartate in the brain observed on in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with mental retardation. **Pediatr Neurol**, v. 13, n. 3, p. 205-8, Oct 1995. ISSN 0887-8994

HASLER, G. et al. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. **Arch Gen Psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 193-200, Feb 2007. ISSN 0003-990X

HASSELMANN, M. H.; WERNECK, G. L.; SILVA, C. V. Symptoms of postpartum depression and early interruption of exclusive breastfeeding in the first two months of life. **Cad Saude Publica**, v. 24 Suppl 2, p. S341-52, 2008. ISSN 0102-311x.

HEIM, C. et al. Effect of Childhood Trauma on Adult Depression and Neuroendocrine Function: Sex-Specific Moderation by CRH Receptor 1 Gene. **Front Behav Neurosci**, v. 3, p. 41, 2009. ISSN 1662-5153.

HENDRICK, V. Treatment of postnatal depression. **BMJ**, v. 327, n. 7422, p. 1003-4, Nov 2003. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593008> >.

HENSHAW, C. Mood disturbance in the early puerperium: a review. **Arch Womens Ment Health**, v. 6 Suppl 2, p. S33-42, Aug 2003. ISSN 1434-1816.

HERMAN, J. P. et al. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201-13, Dec 2005. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271821> >.

HERRERA, E.; REISSLAND, N.; SHEPHERD, J. Maternal touch and maternal child-directed speech: effects of depressed mood in the postnatal period. **J Affect Disord**, v. 81, n. 1, p. 29-39, Jul 2004. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183597> >.

HEUSER, I.; YASSOURIDIS, A.; HOLSBOER, F. The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. **J Psychiatr Res**, v. 28, n. 4, p. 341-56, 1994 Jul-Aug 1994. ISSN 0022-3956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7877114> >.

- HOBFOLL, S. E. et al. Depression prevalence and incidence among inner-city pregnant and postpartum women. **J Consult Clin Psychol**, v. 63, n. 3, p. 445-53, Jun 1995. ISSN 0022-006X
- HOHLAGSCHWANDTNER, M. et al. Correlation between serum testosterone levels and peripartal mood states. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 80, n. 4, p. 326-30, Apr 2001. ISSN 0001-6349
- HOLSBOER, F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477-501, Nov 2000. ISSN 0893-133X
- HOLUB, B. J. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. **Annu Rev Nutr**, v. 6, p. 563-97, 1986. ISSN 0199-9885
- HOWE, F. A. et al. Proton spectroscopy in vivo. **Magn Reson Q**, v. 9, n. 1, p. 31-59, Mar 1993. ISSN 0899-9422
- HUANG, W. et al. Brain metabolite concentration and dementia severity in Alzheimer's disease: a (1)H MRS study. **Neurology**, v. 57, n. 4, p. 626-32, Aug 28 2001. ISSN 0028-3878
- HUCKLEBRIDGE, F. H. et al. Dysphoria and immune status in postpartum women. **Biol Psychol**, v. 37, n. 3, p. 199-206, Jul 1994. ISSN 0301-0511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7948465> >.
- IJUN, T. et al. The relationship between maternity blues and thyroid dysfunction. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 24, n. 1, p. 49-55, Feb 1998. ISSN 1341-8076. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564106> >.
- JABBI, M. et al. Convergent genetic modulation of the endocrine stress response involves polymorphic variations of 5-HTT, COMT and MAOA. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 5, p. 483-90, May 2007. ISSN 1359-4184
- JACOBS, G. E. et al. Hypothalamic glutamate levels following serotonergic stimulation: a pilot study using 7-Tesla magnetic resonance spectroscopy in healthy volunteers. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 3, p. 486-91, Apr 16 2010. ISSN 0278-5846.
- JEZOVA, D. Control of ACTH secretion by excitatory amino acids: functional significance and clinical implications. **Endocrine**, v. 28, n. 3, p. 287-94, Dec 2005. ISSN 1355-008X
- JOHNS, M. W. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. **Sleep**, v. 14, n. 6, p. 540-5, Dec 1991. ISSN 0161-8105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1798888> >.
- JOLLEY, S. N. et al. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in postpartum depression. **Biol Res Nurs**, v. 8, n. 3, p. 210-22, Jan 2007. ISSN 1099-8004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172320> >.

JONES, R. S.; WALDMAN, A. D. 1H-MRS evaluation of metabolism in Alzheimer's disease and vascular dementia. **Neurol Res**, v. 26, n. 5, p. 488-95, Jul 2004. ISSN 0161-6412

JOSEFSSON, A.; SYDSJO, G. A follow-up study of postpartum depressed women: recurrent maternal depressive symptoms and child behavior after four years. **Arch Womens Ment Health**, v. 10, n. 4, p. 141-5, 2007. ISSN 1434-1816 .

JOËLS, M. et al. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan 2008. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063498> >.

JUNG, R. E. et al. Biochemical markers of intelligence: a proton MR spectroscopy study of normal human brain. **Proc Biol Sci**, v. 266, n. 1426, p. 1375-9, Jul 7 1999. ISSN 0962-8452

JURUENA, M. F. et al. Early life stress in depressive patients: role of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. **Curr Pharm Des**, v. 21, n. 11, p. 1369-78, 2015. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25564387> >.

KALANTARIDOU, S. N. et al. Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. **Ann N Y Acad Sci**, v. 997, p. 129-35, Nov 2003. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644819> >.

KAMMERER, M.; TAYLOR, A.; GLOVER, V. The HPA axis and perinatal depression: a hypothesis. **Arch Womens Ment Health**, v. 9, n. 4, p. 187-96, Jul 2006. ISSN 1434-1816. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16708167> >

KARLAMANGLA, A. S. et al. Daytime trajectories of cortisol: demographic and socioeconomic differences--findings from the National Study of Daily Experiences. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 11, p. 2585-97, Nov 2013. ISSN 0306-4530.

KATHOL, R. G. et al. Consistent reduction of ACTH responses to stimulation with CRH, vasopressin and hypoglycaemia in patients with major depression. **Br J Psychiatry**, v. 155, p. 468-78, Oct 1989. ISSN 0007-1250

KEMPTON, M. J. et al. Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 68, n. 7, p. 675-90, Jul 2011. ISSN 0003-990x.

KENNARD, M. A. Effect of bilateral ablation of cingulate area on behaviour of cats. **J Neurophysiol**, v. 18, n. 2, p. 159-69, Mar 1955. ISSN 0022-3077

KHIAT, A. et al. Brain metabolic alterations in Cushing's syndrome as monitored by proton magnetic resonance spectroscopy. **NMR Biomed**, v. 12, n. 6, p. 357-63, Oct 1999. ISSN 0952-3480

KINLEIN, S. A.; WILSON, C. D.; KARATSOREOS, I. N. Dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function contributes to altered endocrine and neurobehavioral responses to acute stress. **Front Psychiatry**, v. 6, p. 31, 2015. ISSN 1664-0640.

KIRSCHBAUM, C.; PIRKE, K. M.; HELLHAMMER, D. H. The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. **Neuropsychobiology**, v. 28, n. 1-2, p. 76-81, 1993. ISSN 0302-282X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8255414>>.

KLOK, M. D. et al. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA and its splice variants in postmortem brain regions of patients with major depressive disorder. **J Psychiatr Res**, v. 45, n. 7, p. 871-8, Jul 2011. ISSN 0022-3956.

KNAPMAN, A. et al. Increased stress reactivity is associated with reduced hippocampal activity and neuronal integrity along with changes in energy metabolism. **Eur J Neurosci**, v. 35, n. 3, p. 412-22, Feb 2012. ISSN 0953-816x.

KNIGHT-SCOTT, J. et al. Molality as a unit of measure for expressing 1H MRS brain metabolite concentrations in vivo. **Magn Reson Imaging**, v. 21, n. 7, p. 787-97, Sep 2003. ISSN 0730-725X

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Res**, v. 320, n. 1, p. 65-98, Nov 1984. ISSN 0006-8993

KOOLSCHIJN, P. C. et al. Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. **Hum Brain Mapp**, v. 30, n. 11, p. 3719-35, Nov 2009. ISSN 1065-9471.

KRANZLER, H. R. et al. A CRHR1 haplotype moderates the effect of adverse childhood experiences on lifetime risk of major depressive episode in African-American women. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 156b, n. 8, p. 960-8, Dec 2011. ISSN 1552-4841.

KREIS, R. Issues of spectral quality in clinical 1H-magnetic resonance spectroscopy and a gallery of artifacts. **NMR Biomed**, v. 17, n. 6, p. 361-81, Oct 2004. ISSN 0952-3480

KREIS, R.; ERNST, T.; ROSS, B. D. Development of the human brain: in vivo quantification of metabolite and water content with proton magnetic resonance spectroscopy. **Magn Reson Med**, v. 30, n. 4, p. 424-37, Oct 1993. ISSN 0740-3194

KRPAN, K. M. et al. Experiential and hormonal correlates of maternal behavior in teen and adult mothers. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 1, p. 112-122, Jan 2005. ISSN 0018-506X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226172400014>.

KUEVI, V. et al. Plasma amine and hormone changes in 'post-partum blues'. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 19, n. 1, p. 39-46, Jul 1983. ISSN 0300-0664. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6413099>>.

KUMAR, A. et al. Frontal white matter biochemical abnormalities in late-life major depression detected with proton magnetic resonance spectroscopy. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 4, p. 630-6, Apr 2002. ISSN 0002-953X

KUMARI, M. et al. Measures of social position and cortisol secretion in an aging population: findings from the Whitehall II study. **Psychosom Med**, v. 72, n. 1, p. 27-34, Jan 2010. ISSN 0033-3174.

KUNZ-EBRECHT, S. R. et al. Differences in cortisol awakening response on work days and weekends in women and men from the Whitehall II cohort. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 4, p. 516-28, May 2004. ISSN 0306-4530

LAMERS, F. et al. Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 692-9, Jun 2013. ISSN 1476-5578. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23089630>>.

LAUCHT, M. et al. Interactive effects of corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene and childhood adversity on depressive symptoms in young adults: findings from a longitudinal study. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 5, p. 358-67, May 2013. ISSN 0924-977x.

LAULE, C. et al. Magnetic resonance imaging of myelin. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 3, p. 460-84, Jul 2007. ISSN 1933-7213

LEVINE, J. et al. Inositol treatment has no effect on the dexamethasone suppression test. **World J Biol Psychiatry**, v. 2, n. 4, p. 190-2, Oct 2001. ISSN 1562-2975

LICINIO, J. et al. Association of a corticotropin-releasing hormone receptor 1 haplotype and antidepressant treatment response in Mexican-Americans. **Mol Psychiatry**, v. 9, n. 12, p. 1075-82, Dec 2004. ISSN 1359-4184

LIGHTMAN, S. L. et al. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Prog Brain Res**, v. 133, p. 111-29, 2001. ISSN 0079-6123. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11589125>>.

LIU, Z. et al. Association study of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene polymorphisms and antidepressant response in major depressive disorders. **Neurosci Lett**, v. 414, n. 2, p. 155-8, Mar 6 2007. ISSN 0304-3940

LIU, Z. et al. Association of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene SNP and haplotype with major depression. **Neurosci Lett**, v. 404, n. 3, p. 358-62, Sep 1 2006. ISSN 0304-3940

LOBEL, M. et al. Polymorphism in COMT is associated with IgG3 subclass level and susceptibility to infection in patients with chronic fatigue syndrome. **J Transl Med**, v. 13, p. 264, 2015. ISSN 1479-5876.

LOMMATZSCH, M. et al. Maternal serum concentrations of BDNF and depression in the perinatal period. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 388-94, Apr 2006. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289360> >

LUFT, C. D. et al. [Brazilian version of the Perceived Stress Scale: translation and validation for the elderly]. **Rev Saude Publica**, v. 41, n. 4, p. 606-15, Aug 2007. ISSN 0034-8910

LUYKX, J. J. et al. Region and state specific glutamate downregulation in major depressive disorder: a meta-analysis of (1)H-MRS findings. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 1, p. 198-205, Jan 2012. ISSN 0149-7634.

MACLULLICH, A. M. et al. Smaller left anterior cingulate cortex volumes are associated with impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation in healthy elderly men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 4, p. 1591-4, Apr 2006. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464941> >.

MAES, M. et al. Disturbances in dexamethasone suppression test and lower availability of L-tryptophan and tyrosine in early puerperium and in women under contraceptive therapy. **J Psychosom Res**, v. 36, n. 2, p. 191-7, Feb 1992. ISSN 0022-3999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1560430> >.

MAGIAKOU, M. A. et al. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone suppression during the postpartum period: implications for the increase in psychiatric manifestations at this time. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 5, p. 1912-7, May 1996. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626857> >.

MAGIAKOU, M. A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Ann N Y Acad Sci**, v. 816, p. 42-56, Jun 1997. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9238254> >.

MAHON, P. B. et al. Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 227, n. 2, p. 231-41, May 2013. ISSN 0033-3158.

MALHI, G. S. et al. Magnetic resonance spectroscopy and its applications in psychiatry. **Aust N Z J Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 31-43, Feb 2002. ISSN 0004-8674

MALTEZOS, S. et al. Glutamate/glutamine and neuronal integrity in adults with ADHD: a proton MRS study. **Transl Psychiatry**, v. 4, p. e373, 2014. ISSN 2158-3188.

MARI, J. J.; WILLIAMS, P. A comparison of the validity of two psychiatric screening questionnaires (GHQ-12 and SRQ-20) in Brazil, using Relative Operating Characteristic (ROC) analysis. **Psychol Med**, v. 15, n. 3, p. 651-9, Aug 1985. ISSN 0033-2917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4048323> >.

MASTORAKOS, G.; ILIAS, I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. **Ann N Y Acad Sci**, v. 997, p. 136-49, Nov 2003. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644820> >.

- MAYBERG, H. S. Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 9, n. 3, p. 471-81, Summer 1997. ISSN 0895-0172
- MCEWEN, A. M. et al. Increased glutamate levels in the medial prefrontal cortex in patients with postpartum depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 11, p. 2428-35, Oct 2012. ISSN 0893-133x.
- MCEWEN, B. S.; DE KLOET, E. R.; ROSTENE, W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. **Physiol Rev**, v. 66, n. 4, p. 1121-88, Oct 1986. ISSN 0031-9333
- MENKE, A. et al. Polymorphisms within the metabotropic glutamate receptor 1 gene are associated with depression phenotypes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 4, p. 565-75, Apr 2012. ISSN 0306-4530.
- MERKL, A. et al. Abnormal cingulate and prefrontal cortical neurochemistry in major depression after electroconvulsive therapy. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 772-9, Apr 15 2011. ISSN 0006-3223.
- MICHAEL, N. et al. Metabolic changes within the left dorsolateral prefrontal cortex occurring with electroconvulsive therapy in patients with treatment resistant unipolar depression. **Psychol Med**, v. 33, n. 7, p. 1277-84, Oct 2003. ISSN 0033-2917
- MILLER, B. L. et al. In vivo ¹H MRS choline: correlation with in vitro chemistry/histology. **Life Sci**, v. 58, n. 22, p. 1929-35, 1996. ISSN 0024-3205
- MILLER, B. L. Alzheimer disease: depiction of increased cerebral myo-inositol with proton MR spectroscopy. **Radiology**, v. 187, n. 2, p. 433-7, May 1993. ISSN 0033-8419
- MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. **Metabolism**, v. 51, n. 6 Suppl 1, p. 5-10, Jun 2002. ISSN 0026-0495. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040534>>.
- MISDRAHI, D. et al. Prepartum chronic ultramild stress increases corticosterone and estradiol levels in gestating mice: implications for postpartum depressive disorders. **Psychiatry Res**, v. 137, n. 1-2, p. 123-30, Nov 15 2005. ISSN 0165-1781
- MITCHELL, C. et al. Role of mother's genes and environment in postpartum depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 20, p. 8189-93, May 17 2011. ISSN 0027-8424.
- MIURA, H. et al. A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. **Stress**, v. 11, n. 3, p. 198-209, May 2008. ISSN 1025-3890.
- MOFFITT, T. E.; CASPI, A.; RUTTER, M. Strategy for investigating interactions between measured genes and measured environments. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 473-81, May 2005. ISSN 0003-990X

MOLINA-HERNANDEZ, M.; TELLEZ-ALCANTARA, N. P. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 5, p. 479-91, Jul 2001. ISSN 0306-4530

MOSSNER, R. et al. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. **World J Biol Psychiatry**, v. 8, n. 3, p. 141-74, 2007. ISSN 1562-2975

MU, J. et al. 1H magnetic resonance spectroscopy study of thalamus in treatment resistant depressive patients. **Neurosci Lett**, v. 425, n. 1, p. 49-52, Sep 20 2007. ISSN 0304-3940

MURRAY, L. et al. The impact of postnatal depression and associated adversity on early mother-infant interactions and later infant outcome. **Child Dev**, v. 67, n. 5, p. 2512-26, Oct 1996. ISSN 0009-3920

NAPPI, R. E. et al. Serum allopregnanolone in women with postpartum "blues". **Obstet Gynecol**, v. 97, n. 1, p. 77-80, Jan 2001. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152912> >.

NASCA, C. et al. Mind the gap: glucocorticoids modulate hippocampal glutamate tone underlying individual differences in stress susceptibility. **Mol Psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 755-63, Jun 2015. ISSN 1359-4184.

NELSON, J. C.; DAVIS, J. M. DST studies in psychotic depression: a meta-analysis. **Am J Psychiatry**, v. 154, n. 11, p. 1497-503, Nov 1997. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356556> >.

NEYLAN, T. C. et al. Cortisol levels are positively correlated with hippocampal N-acetylaspartate. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 10, p. 1118-21, Nov 15 2003. ISSN 0006-3223

NIDDAM, D. M. et al. Reduced hippocampal glutamate-glutamine levels in irritable bowel syndrome: preliminary findings using magnetic resonance spectroscopy. **Am J Gastroenterol**, v. 106, n. 8, p. 1503-11, Aug 2011. ISSN 0002-9270.

NOVAK, J. E. et al. Differentiated human NT2-N neurons possess a high intracellular content of myo-inositol. **J Neurochem**, v. 72, n. 4, p. 1431-40, Apr 1999. ISSN 0022-3042

O'HARA, M. W. et al. Prospective study of postpartum blues. Biologic and psychosocial factors. **Arch Gen Psychiatry**, v. 48, n. 9, p. 801-6, Sep 1991. ISSN 0003-990X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1929770> >.

O'KEANE, V. et al. Changes in the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during the early puerperium may be related to the postpartum 'blues'. **J Neuroendocrinol**, v. 23, n. 11, p. 1149-55, Nov 2011. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004568> >.

OKANO, T.; NOMURA, J. Endocrine study of the maternity blues. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 16, n. 6, p. 921-32, 1992. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1513931> >.

OLDFIELD, R. C. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. **Neuropsychologia**, v. 9, n. 1, p. 97-113, Mar 1971. ISSN 0028-3932

OTTOWITZ, W. E. et al. Neural and endocrine correlates of sadness in women: implications for neural network regulation of HPA activity. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 446-55, 2004. ISSN 0895-0172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616171> >.

PAGLIACCIO, D. et al. Stress-system genes and life stress predict cortisol levels and amygdala and hippocampal volumes in children. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1245-53, Apr 2014. ISSN 0893-133x.

PAGLIACCIO, D. et al. HPA axis genetic variation, pubertal status, and sex interact to predict amygdala and hippocampus responses to negative emotional faces in school-age children. **Neuroimage**, v. 109, p. 1-11, Apr 1 2015. ISSN 1053-8119.

PARIANTE, C. M. Glucocorticoid receptor function in vitro in patients with major depression. **Stress**, v. 7, n. 4, p. 209-19, Dec 2004. ISSN 1025-3890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16019586> >.

PARKER, K. J.; SCHATZBERG, A. F.; LYONS, D. M. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. **Horm Behav**, v. 43, n. 1, p. 60-6, Jan 2003. ISSN 0018-506X

PEDERSEN, C. A. et al. Thyroid and adrenal measures during late pregnancy and the puerperium in women who have been major depressed or who become dysphoric postpartum. **J Affect Disord**, v. 29, n. 2-3, p. 201-11, 1993 Oct-Nov 1993. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300979> >.

PETROSYAN, D.; ARMENIAN, H. K.; ARZOUMANIAN, K. Interaction of maternal age and mode of delivery in the development of postpartum depression in Yerevan, Armenia. **J Affect Disord**, v. 135, n. 1-3, p. 77-81, Dec 2011. ISSN 0165-0327.

PETROWSKI, K. et al. Blunted salivary and plasma cortisol response in patients with panic disorder under psychosocial stress. **Int J Psychophysiol**, v. 88, n. 1, p. 35-9, Apr 2013. ISSN 1872-7697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313605> >.

PFLEIDERER, B. et al. Effective electroconvulsive therapy reverses glutamate/glutamine deficit in the left anterior cingulum of unipolar depressed patients. **Psychiatry Res**, v. 122, n. 3, p. 185-92, Apr 1 2003. ISSN 0165-1781

PINHEIRO, R. T. et al. Association of a serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and stressful life events with postpartum depressive symptoms: a population-based study. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, v. 34, n. 1, p. 29-33, Mar 2013. ISSN 0167-482x.

POLANCZYK, G. et al. Protective effect of CRHR1 gene variants on the development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 9, p. 978-85, Sep 2009. ISSN 0003-990x.

PORTER, R. J. et al. Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 173, n. 1-2, p. 1-17, Apr 2004. ISSN 0033-3158

POUWELS, P. J.; FRAHM, J. Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. **Magn Reson Med**, v. 39, n. 1, p. 53-60, Jan 1998. ISSN 0740-3194

PRESCOT, A. P. et al. Phase-adjusted echo time (PATE)-averaging ^1H MRS: application for improved glutamine quantification at 2.89 T. **NMR Biomed**, v. 25, n. 11, p. 1245-52, Nov 2012. ISSN 0952-3480.

PROVENCHER, S. W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. **Magn Reson Med**, v. 30, n. 6, p. 672-9, Dec 1993. ISSN 0740-3194

PRUESSNER, J. C. et al. Deactivation of the limbic system during acute psychosocial stress: evidence from positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging studies. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 2, p. 234-40, Jan 15 2008. ISSN 0006-3223.

PRUESSNER, J. C. et al. Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. **Life Sci**, v. 61, n. 26, p. 2539-49, 1997. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9416776> >.

PRUESSNER, M. et al. Attenuated cortisol response to acute psychosocial stress in individuals at ultra-high risk for psychosis. **Schizophr Res**, v. 146, n. 1-3, p. 79-86, May 2013. ISSN 1573-2509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510595> >.

QI, X. R. et al. Aberrant stress hormone receptor balance in the human prefrontal cortex and hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 6, p. 863-70, Jun 2013. ISSN 0306-4530.

RADEMAKER, K. J. et al. Neonatal hydrocortisone treatment related to ^1H -MRS of the hippocampus and short-term memory at school age in preterm born children. **Pediatr Res**, v. 59, n. 2, p. 309-13, Feb 2006. ISSN 0031-3998

RAE, C. D. A guide to the metabolic pathways and function of metabolites observed in human brain ^1H magnetic resonance spectra. **Neurochem Res**, v. 39, n. 1, p. 1-36, Jan 2014. ISSN 0364-3190.

RAO, N. P.; VENKATASUBRAMANIAN, G.; GANGADHAR, B. N. Proton magnetic resonance spectroscopy in depression. **Indian J Psychiatry**, v. 53, n. 4, p. 307-11, Oct 2011. ISSN 0019-5545.

RECK, C. et al. Maternity blues as a predictor of DSM-IV depression and anxiety disorders in the first three months postpartum. **J Affect Disord**, v. 113, n. 1-2, p. 77-87, Feb 2009. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573539> >.

RHODES, A. M.; SEGRE, L. S. Perinatal depression: a review of US legislation and law. **Arch Womens Ment Health**, v. 16, n. 4, p. 259-70, Aug 2013.

RITTER, C. et al. Stress, psychosocial resources, and depressive symptomatology during pregnancy in low-income, inner-city women. **Health Psychol**, v. 19, n. 6, p. 576-85, Nov 2000. ISSN 0278-6133

ROBERTSON, E. et al. Antenatal risk factors for postpartum depression: a synthesis of recent literature. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 26, n. 4, p. 289-95, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 0163-8343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234824> >

ROWLAND, L. M. et al. Effects of ketamine on anterior cingulate glutamate metabolism in healthy humans: a 4-T proton MRS study. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 2, p. 394-6, Feb 2005. ISSN 0002-953X

ROYES, L. F. et al. Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: role of NMDA receptors. **Neurochem Int**, v. 53, n. 1-2, p. 33-7, Jul 2008. ISSN 0197-0186

RUDKIN, T. M.; ARNOLD, D. L. Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. **Arch Neurol**, v. 56, n. 8, p. 919-26, Aug 1999. ISSN 0003-9942

RULAND, T. et al. Neuropeptide S receptor gene variation modulates anterior cingulate cortex Glx levels during CCK-4 induced panic. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 10, p. 1677-82, Oct 2015. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26235955> >.

SALEH EL, S. et al. Predictors of postpartum depression in a sample of Egyptian women. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 9, p. 15-24, 2013. ISSN 1176-6328

SALMELA-ARO, K. et al. Goal reconstruction and depressive symptoms during the transition to motherhood: evidence from two cross-lagged longitudinal studies. **J Pers Soc Psychol**, v. 81, n. 6, p. 1144-59, Dec 2001. ISSN 0022-3514

SANACORA, G. et al. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 705-13, Jul 2004. ISSN 0003-990X

SANTOS, I. S. et al. Validation of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) in a sample of mothers from the 2004 Pelotas Birth Cohort Study. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 11, p. 2577-88, Nov 2007. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952250> >.

SCHATZBERG, A. F. et al. HPA axis genetic variation, cortisol and psychosis in major depression. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 220-7, Feb 2014. ISSN 1359-4184.

SCHEEL, M.; STRÖHLE, A.; BRUHN, H. Effects of short-term stress-like cortisol on cerebral metabolism: a proton magnetic resonance spectroscopy study at 3.0 T. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 8, p. 521-6, Jun 2010. ISSN 1879-1379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20022344> >.

SCHNEIDER, M. et al. Genetic variants in the genes of the stress hormone signalling pathway and depressive symptoms during and after pregnancy. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 469278, 2014.

SCHUBERT, M. I. et al. Effects of altered corticosteroid milieu on rat hippocampal neurochemistry and structure--an in vivo magnetic resonance spectroscopy and imaging study. **J Psychiatr Res**, v. 42, n. 11, p. 902-12, Sep 2008. ISSN 0022-3956

SHACKMAN, A. J. et al. The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 154-67, Mar 2011. ISSN 1471-003x.

SHEIKH, H. I. et al. Corticotropin-releasing hormone system polymorphisms are associated with children's cortisol reactivity. **Neuroscience**, v. 229, p. 1-11, Jan 15 2013. ISSN 0306-4522.

SHELLOCK, F. G.; CRUES, J. V. MR procedures: biologic effects, safety, and patient care. **Radiology**, v. 232, n. 3, p. 635-52, Sep 2004. ISSN 0033-8419

SHIMIZU, A. et al. Depressive symptoms and changes in physiological and social factors 1 week to 4 months postpartum in Japan. **J Affect Disord**, v. 179, p. 175-82, Jul 1 2015. ISSN 0165-0327.

SIL, A.; BARR, G. Assessment of predictive ability of Epworth scoring in screening of patients with sleep apnoea. **J Laryngol Otol**, v. 126, n. 4, p. 372-9, Apr 2012. ISSN 1748-5460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152589> >.

SILVEIRA, D. X.; JORGE, M. R. Propriedades psicométricas da escala de Rastreamento Populacional para Depressão (CES-D) em populações clínicas e não-clínicas de adolescentes e adultos jovens. **Revista de Psiquiatria Clínica.**, v. 25, p. 251-261, 1998.

SKALKIDOU, A. et al. Biological aspects of postpartum depression. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 8, n. 6, p. 659-72, Nov 2012. ISSN 1745-5065. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181531> >.

SKUPIO, U. et al. Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. **Neuroscience**, v. 286, p. 141-50, Feb 12 2015. ISSN 0306-4522.

SMITH, R. et al. Mood changes, obstetric experience and alterations in plasma cortisol, beta-endorphin and corticotrophin releasing hormone during pregnancy and the puerperium. **J Psychosom Res**, v. 34, n. 1, p. 53-69, 1990. ISSN 0022-3999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138227> >.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 8, n. 4, p. 383-95, 2006. ISSN 1294-8322

SPARKS,2013:<https://www.medicine.uiowa.edu/uploadedFiles/Education/MD/Content/Oportunities_for_Growth/Writing_Program/2013%20Rysavy%20essay.pdf>

SPIGA, F. et al. HPA axis-rhythms. **Compr Physiol**, v. 4, n. 3, p. 1273-98, Jul 2014. ISSN 2040-4603.

SPIJKER, A. T.; VAN ROSSUM, E. F. Glucocorticoid sensitivity in mood disorders. **Neuroendocrinology**, v. 95, n. 3, p. 179-86, 2012. ISSN 0028-3835.

STALDER, T. et al. Assessment of the cortisol awakening response: Expert consensus guidelines. **Psychoneuroendocrinology**, v. 63, p. 414-32, Jan 2016. ISSN 0306-4530.

STECKLER, T.; HOLLSBOER, F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 11, p. 1480-508, Dec 1 1999. ISSN 0006-3223

STEIN, A. et al. Interpretation of infant facial expression in the context of maternal postnatal depression. **Infant Behav Dev**, v. 33, n. 3, p. 273-8, Jun 2010. ISSN 0163-6383.

STEIN, G.; MARSH, A.; MORTON, J. Mental symptoms, weight changes, and electrolyte excretion in the first post partum week. **J Psychosom Res**, v. 25, n. 5, p. 395-408, 1981. ISSN 0022-3999

STEIN-BEHRENS, B. A.; LIN, W. J.; SAPOLSKY, R. M. Physiological elevations of glucocorticoids potentiate glutamate accumulation in the hippocampus. **J Neurochem**, v. 63, n. 2, p. 596-602, Aug 1994. ISSN 0022-3042

STEKETEE, J. D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 41, n. 2-3, p. 203-28, Mar 2003.

STETLER, C.; MILLER, G. E. Blunted cortisol response to awakening in mild to moderate depression: regulatory influences of sleep patterns and social contacts. **J Abnorm Psychol**, v. 114, n. 4, p. 697-705, Nov 2005. ISSN 0021-843X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16351390> >.

STETLER, C.; MILLER, G. E. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. **Psychosom Med**, v. 73, n. 2, p. 114-26, 2011 Feb-Mar 2011. ISSN 1534-7796. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257974> >.

STOWE, Z. N.; HOSTETTER, A. L.; NEWPORT, D. J. The onset of postpartum depression: Implications for clinical screening in obstetrical and primary care. **Am J Obstet Gynecol**, v. 192, n. 2, p. 522-6, Feb 2005. ISSN 0002-9378

SUDA, S. et al. A postpartum model in rat: behavioral and gene expression changes induced by ovarian steroid deprivation. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 311-9, Aug 15 2008. ISSN 0006-3223.

SUMNER, J. A. et al. CRHR1 genotype and history of maltreatment predict cortisol reactivity to stress in adolescents. **Psychoneuroendocrinology**, v. 43, p. 71-80, May 2014. ISSN 0306-4530.

TAN, E. C. et al. Case-control study of glucocorticoid receptor and corticotrophin-releasing hormone receptor gene variants and risk of perinatal depression. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 15, n. 1, p. 283, 2015. ISSN 1471-2393.

TAYLOR, A.; DORE, C.; GLOVER, V. Urinary phenylethylamine and cortisol levels in the early puerperium. **J Affect Disord**, v. 37, n. 2-3, p. 137-42, Apr 12 1996. ISSN 0165-0327

TAYLOR, A. et al. Diurnal pattern of cortisol output in postnatal depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1184-8, Sep 2009. ISSN 1873-3360. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406580> >.

TAYLOR, A. et al. Serum cortisol-levels are related to moods of elation and dysphoria in new mothers. **Psychiatry Research**, v. 54, n. 3, p. 241-247, Dec 1994. ISSN 0165-1781. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994QK58700002 >.

TETI, D. M.; GELFAND, D. M. Behavioral competence among mothers of infants in the first year: the mediational role of maternal self-efficacy. **Child Dev**, v. 62, n. 5, p. 918-29, Oct 1991. ISSN 0009-3920

THOMSON, F.; CRAIGHEAD, M. Innovative approaches for the treatment of depression: targeting the HPA axis. **Neurochem Res**, v. 33, n. 4, p. 691-707, Apr 2008. ISSN 0364-3190

TOW, P. M.; WHITTY, C. W. Personality changes after operations on the cingulate gyrus in man. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 16, n. 3, p. 186-93, Aug 1953. ISSN 0022-3050

TREADWAY, M. T. et al. Early adverse events, HPA activity and rostral anterior cingulate volume in MDD. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4887, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325704> >.

TYRKA, A. R. et al. Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. **Biol Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 681-5, Oct 1 2009. ISSN 0006-3223.

VALE, W. et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v. 213, n. 4514, p. 1394-7, Sep 18 1981. ISSN 0036-8075

VALENTINE, G. W.; SANACORA, G. Targeting glial physiology and glutamate cycling in the treatment of depression. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 5, p. 431-9, Sep 1 2009. ISSN 0006-2952.

VIDEBECH, P.; RAVNKILDE, B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 11, p. 1957-66, Nov 2004. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514393> >.

VIK, T. et al. Infantile colic, prolonged crying and maternal postnatal depression. **Acta Paediatr**, v. 98, n. 8, p. 1344-8, Aug 2009. ISSN 0803-5253.

VREEBURG, S. A. et al. Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 6, p. 617-26, Jun 2009. ISSN 1538-3636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487626> >.

VREEBURG, S. A. et al. Associations between sociodemographic, sampling and health factors and various salivary cortisol indicators in a large sample without psychopathology. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1109-20, Sep 2009. ISSN 0306-4530.

VYTHILINGAM, M. et al. Focal and lateralized subcortical abnormalities in unipolar major depressive disorder: an automated multivoxel proton magnetic resonance spectroscopy study. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 744-50, Oct 1 2003. ISSN 0006-3223

WALLIMANN, T. et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochem J**, v. 281 (Pt 1), p. 21-40, Jan 1 1992. ISSN 0264-6021

WANG, Y. et al. Hippocampal N-acetylaspartate and morning cortisol levels in drug-naive, first-episode patients with major depressive disorder: effects of treatment. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 11, p. 1463-70, Nov 2012. ISSN 1461-7285. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22706518> >.

WASSERMAN, D. et al. The CRHR1 gene: a marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. **Genes Brain Behav**, v. 7, n. 1, p. 14-9, Feb 2008. ISSN 1601-183x.

WASSERMAN, D. et al. Depression in suicidal males: genetic risk variants in the CRHR1 gene. **Genes Brain Behav**, v. 8, n. 1, p. 72-9, Feb 2009. ISSN 1601-183x.

WATANABE, A.; KATO, N.; KATO, T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. **Neurosci Res**, v. 42, n. 4, p. 279-85, Apr 2002. ISSN 0168-0102

WEISSMAN, M. M. et al. Assessing depressive symptoms in five psychiatric populations: a validation study. **Am J Epidemiol**, v. 106, n. 3, p. 203-14, Sep 1977. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/900119> >.

WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Prog Neurobiol**, v. 40, n. 5, p. 573-629, May 1993. ISSN 0301-0082

WILHELM, I. et al. Is the cortisol awakening rise a response to awakening? **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 4, p. 358-66, May 2007. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408865> >.

WISNER, K. L.; PARRY, B. L.; PIONTEK, C. M. Clinical practice. Postpartum depression. **N Engl J Med**, v. 347, n. 3, p. 194-9, Jul 18 2002. ISSN 0028-4793.

WORLD HEALTH, O. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10. **Porto Alegre: Artmed**, 1993.

WRIGHT, C. E.; STEPTOE, A. Subjective socioeconomic position, gender and cortisol responses to waking in an elderly population. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 6, p. 582-90, Jul 2005. ISSN 0306-4530

WUST, S. et al. The cortisol awakening response - normal values and confounds. **Noise Health**, v. 2, n. 7, p. 79-88, 2000. ISSN 1463-1741

YILDIZ-YESILOGLU, A.; ANKERST, D. P. Review of 1H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder: a meta-analysis. **Psychiatry Res**, v. 147, n. 1, p. 1-25, Jun 30 2006. ISSN 0165-1781

YOUNG, E. A.; CARLSON, N. E.; BROWN, M. B. Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 267-76, Aug 2001. ISSN 0893-133X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425510>>.

YOUNG, E. A. et al. Beta-lipotropin-beta-endorphin response to low-dose ovine corticotropin releasing factor in endogenous depression. Preliminary studies. **Arch Gen Psychiatry**, v. 47, n. 5, p. 449-57, May 1990. ISSN 0003-990X

YUKSEL, C.; ONGUR, D. Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 68, n. 9, p. 785-94, Nov 1 2010. ISSN 0006-3223.

ZHENG, H. et al. Abnormal Anterior Cingulate N-Acetylaspartate and Executive Functioning in Treatment-Resistant Depression After rTMS Therapy. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 11, p. pyv059, Oct 2015. ISSN 1461-1457.

ZILLES; WREE. Cortex: Areal and laminar structure. In: Paxinos, G. (ed.) The rat nervous system – forebrain and midbrain. **Academic Press**, p. 374-415, 1985.

ZWANZGER, P. et al. Acute shift in glutamate concentrations following experimentally induced panic with cholecystokinin tetrapeptide--a 3T-MRS study in healthy subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 9, p. 1648-54, Aug 2013. ISSN 0893-133x.

7-ANEXOS

7 Anexos

ANEXO A — EPDS

ESCALA DE DEPRESSÃO PÓS-PARTO DE EDIMBURGO (EPDS)

A EPDS é de fácil e rápida aplicação sendo a escala mais usada para rastreamento de sintomas depressivos no puerpério, apresentando boa sensibilidade e especificidade. A EPDS é composta de 10 itens que podem ser divididos nos fatores depressão (9, 10, 8, 7, 5 e 1) e ansiedade cognitiva (itens 6, 3, 4 e 2). Cada item é pontuado de 0 a 3, de acordo com a presença ou a intensidade do sintoma. A somatória dos pontos pode chegar a 30, sendo que valores entre 9 e 13 são indicativos de depressão.

Orientações para preenchimento: essa parte da entrevista consta de 10 perguntas, sendo que cada pergunta tem 4 respostas possíveis. Por favor, escolha a resposta que melhor reflete como você tem se sentido nos últimos sete dias. **Nos últimos 7 dias, a senhora...**

1 - Tem sido capaz de rir e achar graça das coisas?					
0	Como eu sempre fiz	1	Não tanto quanto antes	2	Sem dúvida, menos que antes
2 - Tem pensado no futuro com alegria?					
0	Sim, como de costume	1	Um pouco menos que de costume	2	Muito menos que de costume
3 - Tem se culpado sem razão quando as coisas dão errado?					
3	Sim, muito frequentemente	2	Sim, às vezes	1	Raramente
4 - Tem ficado ansiosa ou preocupada sem uma boa razão?					
0	Não, de jeito nenhum	1	De vez em quando	2	Sim, as vezes
5 - Tem se sentido assustada ou em pânico sem um bom motivo?					
3	Sim, muito seguido	2	Sim, às vezes	1	Raramente
6 - Tem sentido sobrecarregada pelas tarefas e acontecimentos do seu dia-a-dia?					
3	Sim, na maioria das vezes não consigo lidar bem com eles	2	Sim, algumas vezes não tenho conseguido lidar bem como antes	1	Não. Na maioria das vezes consigo lidar bem com eles
7 - Tem se sentido tão infeliz que tem tido dificuldade de dormir?					
3	Sim, na maioria das vezes	2	Sim, algumas vezes	1	Raramente
8 - Tem se sentido triste ou muito mal?					
3	Sim, na maioria das vezes	2	Sim, muitas vezes	1	Raramente
9 - Tem se sentido tão triste que tem chorado?					
3	Sim, a maior parte do tempo	2	Sim, muitas vezes	1	Só de vez em quando
10 - Tem pensado em fazer alguma coisa contra si mesma?					
3	Sim, muitas vezes	2	Às vezes	1	Raramente

ANEXO — B

ESCALA DE RASTREAMENTO POPULACIONAL PARA DEPRESSÃO DO CENTRO DE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS (CES-D)

A CES-D é um instrumento de rastreamento desenvolvido para identificar humor depressivo em estudos populacionais. É uma escala autoaplicável com 20 itens divididos em 4 fatores: humor, psicomotor, “bem-estar” e relações interpessoais. Os indivíduos respondem por quantos dias na última semana sentiram alguns sintomas de depressão e o escore total que varia entre 0 e 60 reflete a gravidade dos sintomas depressivos.

Orientações para preenchimento: segue abaixo uma lista de tipos de sentimentos e comportamentos. Solicitamos que você assinale a frequência com que tenha se sentido desta maneira durante a semana passada.

Durante a última semana:

	Raramente (menos que 1 dia)	Durante pouco tempo (1 ou 2 dias)	Durante um tempo moderado (3 a 4 dias)	Durante a maior parte do tempo (5 a 7 dias)
1P. Senti-me incomodada com coisas que habitualmente não me incomodam	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
2P. Não tive vontade de comer; tive pouco apetite	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
3P. Senti não conseguir mudar meu estado de ânimo mesmo com a ajuda de familiares e amigos	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
4P. Senti-me, comparando-me às outras pessoas, tendo tanto valor quanto a maiores delas	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
5P. Senti dificuldade de me concentrar no que estava fazendo	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
6P. Senti-me deprimida	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
7P. Senti que tive que fazer esforço para dar conta das minhas tarefas habituais	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
8P. Senti-me otimista com relação ao futuro	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
9P. Considerei que minha vida tinha sido um fracasso	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
10P. Senti-me amedrontada	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
11P. Meu sono não foi repousante	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
12P. Estive feliz	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
13P. Falei menos que o habitual	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
14P. Senti-me sozinha	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
15P. As pessoas não foram amistosas comigo	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
16P. Aproveitei minha vida	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
17P. Tive crises de choro	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
18P. Senti-me triste	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
19P. Senti que as pessoas não gostavam de mim	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
20P. Não consegui levar adiante minhas coisas	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐

ANEXO — C

ESCALA DE ANSIEDADE DE BECK (BAI)

A BAI consiste de 21 itens que medem a intensidade dos sintomas mais comuns de ansiedade. Cada item possui quatro graus de respostas que vão de ausente a grave. A somatória dos escores varia de 0 a 63 e os seguintes pontos de corte podem ser encontrados: 0 a 10 (ansiedade mínima); 11 a 19 (ansiedade leve); 20 a 30 (ansiedade moderada); >30 (ansiedade grave).

Orientações para preenchimento: abaixo temos uma lista de sintomas comuns à ansiedade. Por favor, preencha cada item da lista de maneira cuidadosa. Indique agora os sintomas que você apresentou na ÚLTIMA SEMANA, INCLUINDO HOJE. Os sintomas podem estar ausentes, suaves (não lhe incomodam muito), moderados (são desagradáveis, mas você consegue suportar) ou severos (quase você não consegue suportar). Marque com um X os espaços correspondentes a cada sintoma.

	Ausente	Suave	Moderado	Grave
1 Dormência ou formigamento	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
2 Sensações de calor	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
3 Tremor nas pernas	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
4 Incapaz de relaxar	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
5 Medo de acontecimentos ruins	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
6 Confusa ou delirante	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
7 Coração batendo rápido e forte	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
8 Insegura	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
9 Apavorada	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
10 Nervosa	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
11 Sensação de sufocamento	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
12 Tremor nas mãos	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
13 Trêmula	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
14 Medo de perder o controle	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
15 Dificuldade de respirar	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
16 Medo de morrer	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
17 Assustada	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
18 Indigestão ou desconforto abdominal	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
19 Desmaios	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
20 Rubor facial	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐
21 Sudorese (não devido ao calor)	0. ☐	1. ☐	2. ☐	3. ☐

ANEXO — D

ESCALA DE ESTRESSE PERCEBIDO (PSS)

A PSS mede o grau em que os indivíduos consideram suas vidas imprevisíveis, incontroláveis e sobrecarregadas, componentes centrais na experiência de estresse. A PSS é composta por 14 questões, cujas pontuações variam de zero a quatro. As questões positivas (4, 5, 6, 7, 9, 10 e 13) têm sua pontuação somada invertida: 0=4, 1=3, 2=2, 3=1 e 4=0. As demais são questões negativas e devem ser somadas diretamente. O total da escala pode variar de 0 a 56.

Orientações para preenchimento: as questões nesta escala perguntam sobre seus sentimentos e pensamentos durante o último mês. Embora algumas das perguntas sejam parecidas, há diferenças entre elas e você deve analisar cada uma como uma pergunta separada. A melhor abordagem é responder a cada pergunta razoavelmente rápido. Isto é, não tente contar o número de vezes que você se sentiu de uma maneira particular, mas indique a alternativa que lhe pareça como uma estimativa razoável. Para cada pergunta, escolha as seguintes alternativas.

Neste último mês, com que frequência:

1M. Você tem ficado triste por causa de algo que aconteceu inesperadamente? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
2M. Você tem se sentido incapaz de controlar as coisas importantes em sua vida? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
3M. Você tem se sentido nervosa e "estressada"? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
4M. Você tem tratado com sucesso dos problemas difíceis da vida? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
5M. Você tem sentido que está lidando bem com as mudanças importantes que estão ocorrendo em sua vida? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
6M. Você tem se sentido confiante na sua habilidade de resolver problemas pessoais? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
7M. Você tem sentido que as coisas estão acontecendo de acordo com a sua vontade? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
8M. Você tem achado que não conseguiria lidar com todas as coisas que você tem que fazer? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
9M. Você tem conseguido controlar as irritações em sua vida? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
10M. Você tem sentido que as coisas estão sob o seu controle? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
11M. Você tem ficado irritada porque as coisas que acontecem estão fora do seu controle? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
12M. Você tem se encontrado pensando sobre as coisas que deve fazer? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
13M. Você tem conseguido controlar a maneira como gasta seu tempo? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre
14M. Você tem sentido que as dificuldades se acumulam a ponto de você acreditar que não pode superá-las? 0. ☐ Nunca 1. ☐ Quase nunca 2. ☐ Às vezes 3. ☐ Quase sempre 4. ☐ Sempre

ANEXO — E**ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DEPRESSÃO DE HAMILTON (HAM-D)***1. Humor depressivo (tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade)*

0- ausente

1- sentimentos relatados somente se perguntados

2- sentimentos relatados espontaneamente, com palavras

3- comunica os sentimentos não com palavras, mas com expressão facial, postura, voz e tendência ao choro

4- o paciente comunica quase que exclusivamente esses sentimentos, tanto em seu relato verbal como na comunicação não- verbal.

2. Sentimentos de culpa:

0- ausente

1- auto recriminação, acha que decepcionou outras pessoas

2- ideias de culpa ou ruminações de erros ou ações pecaminosas (más) no passado

3- paciente acha que a doença atual é uma punição (castigo). Delírio de culpa

4- ouve vozes que o acusam ou denunciam e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras

3. Suicídio:

0- ausente

1- acha que não vale a pena viver

2- deseja estar morto ou pensa em uma possível morte para si

3- ideias ou atitudes suicidas

4- tentativas de suicídio

4. Insônia inicial:

0- sem dificuldades para iniciar o sono

1- queixa de dificuldade ocasional para iniciar o sono, ou seja, mais que meia hora

2- queixa de dificuldade para iniciar o sono todas as noites

5. Insônia intermediária:

0- sem dificuldade

1- queixa de agitação e perturbação durante a noite

2- acorda durante a noite – qualquer saída da cama (exceto por motivos de necessidade fisiológica)

6. Insônia tardia:

0- sem dificuldade

1- acorda durante a madrugada, mas volta a dormir

2- não consegue voltar a dormir se levantar da cama durante a noite

7. Trabalho e atividades:

0- sem dificuldades

1- pensamentos e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza, relacionados a atividades, trabalho ou passatempos

2- perda de interesse em atividades, passatempos ou trabalho, quer relatado diretamente pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão ou vacilação (sente que precisa se esforçar para o trabalho ou outras atividades)

3- diminuição no tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, o paciente ocupa-se por menos de três horas por dia em atividades (trabalho hospitalar ou passatempos) com exceção das tarefas rotineiras da enfermaria

4- parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, sem atividades, com exceção das tarefas rotineiras da enfermaria, ou se não consegue realizá-las sem ajuda

8. Retardo (lentificação do pensamento e da fala, dificuldade de concentração, diminuição da atividade motora):

0 pensamentos e fala normais

1 lentificação discreta à entrevista

2 lentificação óbvia durante a entrevista

3 entrevista difícil

4 estupor completo

9. Agitação: Avaliação baseada na observação durante a entrevista

0 nenhuma

1 inquietação

2 mexe as mãos, cabelos etc.

3 movimenta-se bastante, não consegue permanecer sentado durante a entrevista

4 retorce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios

10. Ansiedade psíquica:

0 sem dificuldade

1 tensão e irritabilidade subjetivas

2 preocupa-se com trivialidades

3 atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala

4 paciente expressa medo sem ser perguntado

11. Ansiedade - somática: Na última semana, você sofreu de alguns dos seguintes sintomas físicos?

Nota: não considerar se claramente relacionados à medicação (por exemplo, boca seca e imipramina) (boca seca, flatulência, indigestão, diarreias, cólicas, eructações, palpitação, cefaléias, hiperventilação, suspiros, de urinar freqüentemente, sudorese)

0 ausente

1 duvidoso ou trivial: sintomas menores, relatados quando questionados

2 leve: paciente descreve espontaneamente os sintomas, que não são acentuados ou incapacitantes

3 moderado: mais do que 2 sintomas e com maior freqüência. São acompanhados de estresse subjetivo e prejudicam o funcionamento normal

4 grave: numerosos sintomas, persistentes e incapacitantes na maior parte do tempo, ou ataques de pânico quase diariamente

12. Como tem estado seu apetite nesta última semana?

0 nenhuma alteração

1 perda de apetite, mas come sem necessidade de insistência

2 dificuldade para comer se não insistirem

13. Como tem estado sua "energia" nesta última semana?

0 nenhuma alteração

1 peso em membros, costas ou cabeça; dor nas costas, na cabeça ou nos músculos. Perda de energia e fadigabilidade

2 qualquer sintoma bem caracterizado e nítido

14. Sintomas Genitais – (como perda de libido, distúrbios menstruais):

0 ausentes

1 leves ou infrequentes: perda de libido, desempenho sexual prejudicado

2 óbvio e graves: perda completa do interesse sexual

15. Hipocondria:

0 ausente

1 auto-observação aumentada (com relação ao corpo)

2 preocupação com a saúde

3 queixas frequentes, pedidos de ajuda etc.

4 delírios hipocondríacos

16. Perda de Peso (desde o início da doença ou da última avaliação)

0 sem perda de peso ou perda de peso NÃO causada pela doença atual

1 perda de peso provavelmente causada pela doença atual. Perda de menos de meio quilo

2 perda de peso definitivamente causada pela doença atual. Perda de meio quilo ou mais

17. Crítica (Consequência da doença):

0 reconhece estar deprimido e doente OU não estar deprimido no momento

1 reconhece estar, mas atribui a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a um vírus, à necessidade de descanso etc.

2 nega estar doente

18. Nesta última semana você se sentiu melhor ou pior em algum período específico do dia – manhã ou noite? SE VARIAÇÃO: Quanto pior você se sente (de MANHÃ OU de NOITE)?

Variação Diurna:

A. Anote se os sintomas são piores de manhã ou à noite.

SE NÃO HOUVER variação diurna, marque nenhuma:

- sem variação ou não deprimido no momento

- pior pela manhã

- pior a tarde/à noite

B. Quando presente, anote a gravidade da variação:

0 nenhuma

1 leve

2 grave

19. *Despersonalização e Desrealização* (como sensação de irreabilidade a ideias niilistas)

- 0- ausentes
- 1 leves
- 2 moderadas
- 3 graves
- 4 incapacitantes

20. *Sintomas Paranoides*:

- 0 nenhum
- 1 desconfiado
- 2 ideias de referência
- 3 delírios de referência e perseguição

21. *Sintomas Obsessivos e Compulsivos*:

- 0 nenhum
- 1 leves
- 2 graves

22. *Hipersônia – Adormecer Precoce*:

- 0 não
- 1 leve, infrequente – menos do que uma hora
- 2 óbvia, definida – mais que 60 minutos mais cedo, todas as noites

23. *Hipersônia – dormir mais que o habitual*:

- 0 não
- 1 leve, infrequente – menos do que uma hora
- 2 óbvia/ definida – dorme em excesso por mais do que uma hora, na maioria dos dias

24. *Hipersônia – Cochilos*:

- 0 ausentes
- 1 leve, infrequente – cochilos duram menos do que 30 minutos, ou relata sonolência diurna excessiva
- 2 óbvia/ definida – sonecas duram mais do que 30 minutos na maioria dos dias

25. *Aumento de Appetite (Mudança no apetite caracterizada por aumento na quantidade de comida ingerida, ou fissura excessiva)*:

- 0 ausente
- 1 mínimo – aumento leve de apetite; fissura por comida
- 2 definido – aumento acentuado de ingestão de comida, ou fissura

26. *Ganho de peso*:

- 0 ausente
- 1 duvidoso/mínimo – menos do que 0,5 kg
- 2 óbvio – ganho de peso de 0,5 kg ou mais

27. *Retardo Psíquico:* (Lentificação na fala e no processo de pensamento: descreve inibição da vontade ou sensação de que os processos de pensamento estão paralisados. Avalie com base na observação e na autodescrição, mas diferencie de um real retardo motor.)

0- ausente

1- leve - discreto retardo na fala e no processo de pensamento

2 moderado – demora para responder às questões, descreve inibição de volição

3 grave – retardo na fala e no processo de pensamento suficiente para prolongar significativamente a entrevista

4 extremo/ excessivo; quase em mutismo, minimamente responsivo

28. *Retardo Motor:*

0 ausente

1 leve – discreto achatamento do afeto, expressão fixa

2 moderado – voz monótona e diminuição de movimentos espontâneos

3 grave – óbvio retardo de movimento, marcha; afeto embotado

4 extremo – em estupor; retardo motor acentuado observado na marcha e na postura

29. *Desamparo:*

0 ausente

1 sentimentos subjetivos extraídos apenas pela entrevista

2 paciente relata espontaneamente sentimentos de desamparo

3 necessita de insistência, orientação e reassuramento para completar tarefas

4 requer assistência para se vestir, comer, ou realizar higiene pessoal

30. *Desesperança:*

0 ausente

1 dúvida intermitentemente de que "as coisas irão melhorar", mas pode ser reassurado

2 consistentemente se sente desesperado, mas aceita reassuramentos

3 expressa sentimentos de desencorajamento, desespero, pessimismo quanto ao futuro, que não podem ser desfeitos

4 espontânea e inapropriadamente persevera "nunca vou melhorar" ou equivalente

31. *Baixa autoestima:*

0 ausente

1 indica sentimentos de inutilidade (perda da autoestima) apenas quando perguntado

2 paciente indica espontaneamente sentimentos de inutilidade

3 diferente de (2) acima por grau: paciente relata espontaneamente que é "ruim", "inferior"

4 delírios de inutilidade

ANEXO — F

ESCALA DE SONOLÊNCIA DE EPWORTH (ESS)

A ESS avalia a sonolência diurna em adultos. Ela é composta por 8 itens que descrevem situações cotidianas nas quais uma pessoa pode cochilar. Para cada situação são atribuídos 4 níveis de resposta de acordo com a chance de cochilar que variam de nenhuma a intensa. Pessoas cuja soma dos escores variam de 0-9 apresentam baixa sonolência, de 10-24 indicam sonolência média, e acima de 24 a sonolência é alta, havendo implicações médicas.

Orientações para preenchimento: qual a probabilidade de você “cochilar” ou dormir, e não apenas se sentir cansado, nas seguintes situações? Considere o modo de vida que você tem levado recentemente. Mesmo que você não tenha feito algumas destas coisas nos últimos dias, tente imaginar como elas o afetariam. Escolha o número mais apropriado para responder cada questão:

0 = Nunca cochilaria

1 = Pequena probabilidade de cochilar

2 = Probabilidade média de cochilar

3 = Grande probabilidade de cochilar

Situação	Probabilidade de cochilar			
Sentado e lendo.	0	1	2	3
Assistindo TV.	0	1	2	3
Sentado, quieto, em um lugar público em lugar público (por exemplo, em um teatro, reunião, palestra)	0	1	2	3
Andando de carro por uma hora sem parar, como passageiro	0	1	2	3
Ao deitar-se à tarde para descansar, quando possível	0	1	2	3
Sentado e conversando com alguém.	0	1	2	3
Sentado quieto após o almoço sem bebida de álcool.	0	1	2	3
Em um carro parado no trânsito por alguns minutos	0	1	2	3

ANEXO — G

SELF-REPORTING QUESTIONNAIRE (SRQ-20)

O SRQ é um questionário usado em nível de atenção primária para o rastreamento psiquiátrico de transtornos não-psicóticos. Ele é composto por 20 questões elaboradas para detecção de transtornos não-psicóticos, chamados atualmente de transtornos mentais comuns (TMC). A questão respondida como sim vale 1 ponto, assim os escores obtidos variam de 0 a 20. Pessoas que pontuam acima de 7 são consideradas possíveis casos.

Orientações para a realização do teste: o SRQ-20 é composto por 20 questões que avaliam elementos relativos à saúde mental. Cada questão possui duas alternativas: Sim ou Não. Por favor, leia atentamente cada questão e escolha uma das alternativas fazendo um círculo ao redor. Procure não deixar questões em branco.

RESPONDA ÀS SEGUINTE PERGUNTAS A RESPEITO DA SUA SAÚDE.		
1. Tem dores de cabeça freqüentes?	() Sim	() Não
2. Tem falta de apetite?	() Sim	() Não
3. Dorme mal?	() Sim	() Não
4. Assusta-se com facilidade?	() Sim	() Não
5. Tem tremores de mão?	() Sim	() Não
6. Sente-se nervoso(a), tenso(a) ou preocupado(a)?	() Sim	() Não
7. Tem má digestão?	() Sim	() Não
8. Tem dificuldade para pensar com clareza?	() Sim	() Não
9. Tem se sentido triste ultimamente?	() Sim	() Não
10. Tem chorado mais do que de costume?	() Sim	() Não
11. Encontra dificuldades para realizar com satisfação suas atividades diárias?	() Sim	() Não
12. Tem dificuldades para tomar decisões?	() Sim	() Não
13. Tem dificuldades no serviço (seu trabalho é penoso, causa sofrimento)?	() Sim	() Não
14. É incapaz de desempenhar um papel útil em sua vida?	() Sim	() Não
15. Tem perdido o interesse pelas coisas?	() Sim	() Não
16. Sente-se uma pessoa inútil, sem préstimo?	() Sim	() Não
17. Tem tido idéias de acabar com a vida?	() Sim	() Não
18. Sente-se cansado(a) o tempo todo?	() Sim	() Não
19. Tem sensações desagradáveis no estômago?	() Sim	() Não
20. Cansa-se com facilidade?	() Sim	() Não
TOTAL:		
NOME RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TESTE		

ANEXO — H

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

<small>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</small>
www.hcrp.usp.br		

Ribeirão Preto, 31 de agosto de 2011

Ofício nº 3169/2011
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“ALTERAÇÕES DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL E DE NEUROIMAGEM NOS ESTADOS DEPRESSIVOS PÓS-PARTO”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 331ª Reunião Ordinária realizada em 29/08/2011, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5560/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
CYBELE GARCIA LEAL
PROFª. DRª. CRISTINA MARTA DEL BEN
Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP- Campus Universitário
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO — I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

NOME DA PESQUISA: Alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e de neuroimagem nos estados depressivos pós-parto

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Cybele Garcia-Leal e Prof.^a Dra. Cristina Marta Del Ben.

TELEFONES PARA CONTATO: (16) 3602-3316, 3602-2607.

PATROCINADOR FINANCEIRO DA PESQUISA: FAPESP

OBJETIVOS DA PESQUISA:

Estamos realizando uma pesquisa para entender o que faz algumas mães apresentarem sintomas depressivos no período pós-parto. Para isso, vamos estudar alguns hormônios, fazer exames de imagem do cérebro e verificar a ocorrência de sintomas de depressão no período pós-parto. Precisaremos, portanto, coletar amostras de sangue e de saliva e fazer exame de Ressonância Magnética de crânio, tanto de mães que apresentem sintomas depressivos após o parto, como de mães que não apresentem sintomas depressivos, por motivo de comparação. Convidamos você a participar desta pesquisa.

Este é um formulário de consentimento, que fornece informações sobre a pesquisa. Você e a equipe de pesquisadores analisarão as informações. Faça perguntas quando quiser. Se concordar em participar da pesquisa, você deverá assinar este formulário. Forneceremos uma cópia para você guardar.

Antes de conhecer a pesquisa, é importante saber o seguinte:

- Você está participando voluntariamente. Não é obrigatório participar desta parte da pesquisa.
- Você pode decidir não participar ou desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem perder o seu acesso ou o acesso de seu bebê ao atendimento médico de rotina, no serviço de saúde que escolher ou que tiver direito ou quaisquer outros benefícios a que você tenha direito.
- Você não é obrigada a participar de todos os procedimentos da pesquisa. Por exemplo, você pode aceitar participar do exame de sangue e se recusar a participar do exame de Ressonância Magnética e vice-versa.

Alguns dados deste projeto serão retirados das pesquisas para a qual você pode ter sido convidada a participar, e assinou o termo de consentimento, denominadas “Fatores etiológicos do nascimento pré-termo e consequências dos fatores perinatais na saúde da criança: coortes de nascimentos em duas cidades brasileiras” e “Interação genético-ambiental nos estados depressivos pós-parto”. Gostaríamos que você participasse, como voluntária, nos ajudando também neste outro estudo.

- Dos exames laboratoriais:

Você fará exame de sangue. O sangue será colhido utilizando material descartável e por pessoas experientes [médico(a) ou enfermeiro(a)]. Esse exame medirá a quantidade de hormônios femininos e os liberado no seu sangue em momentos de estresse.

Como a quantidade de indivíduos que serão examinados neste estudo é muito grande, não será possível realizar todos os exames laboratoriais ao mesmo tempo. Para isso o material terá que ser estocado por algum tempo até a realização dos exames. Pedimos a você permissão para que o sangue e a saliva sejam guardados por tempo indeterminado, visto que o próprio estudo e outros que têm sido feitos podem trazer novos conhecimentos sobre o assunto e pode haver necessidade de realização de novos testes com o material guardado. No entanto, novos testes somente serão realizados após aprovação do novo projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP que decidirá se você deverá ser convocada ou não para autorizar os novos testes. Você será informada dos resultados dos novos testes que porventura sejam feitos, caso eles apresentem alguma alteração.

Além disso, durante sua estada no hospital após o parto, o seu sangue será coletado na rotina de internação, logo ao internar, imediatamente e 12 horas após o parto para dosagem de seus hormônios sexuais e outros relacionados ao estresse. Como serão realizadas várias coletas de sangue, será mantido acesso venoso durante sua internação. Assim apenas uma picada será necessária para estas coletas, o que já é feito na rotina de seu parto. Além disso, coletaremos sua saliva para a dosagem de hormônio. Para essa coleta você precisará colocar um algodão em sua boca, mastigá-lo e então devolvê-lo ao tubo plástico ao acordar, antes de levantar-se, 30 minutos, 3 e 12 horas após você acordar. Você deverá fazer essa coleta de saliva duas vezes: na primeira semana depois do parto e entre a quarta e a oitava semana depois do parto. Alguém da nossa equipe entrará em contato com você, por telefone, para lembrá-la da data prevista para a coleta de material e orientá-la de como armazenar os salivettes. Quando você receber alta, levará 8 tubos com algodão, denominados “salivettes” para sua casa e receberá as instruções de como fazer a coleta em sua casa e de como armazenar o material até nossa equipe entrar em contato para buscar o material.

Pode ser que você não participe da primeira etapa desta pesquisa logo após seu parto, então durante a entrevista diagnóstica no hospital você pode ser convidadas a participar dessa pesquisa e receberá 4 salivettes para levar para casa, recebendo as instruções de como fazer a coleta em sua casa e de como armazenar o material até nossa equipe entrar em contato para buscar o material, se você permitir. Além disso, também lhe convidaremos para realizar uma ressonância magnética.

Do exame de Ressonância Magnética:

Algumas das mulheres participantes deste estudo serão convidadas também para fazer um exame de neuroimagem do cérebro. Esse exame será usado para investigarmos se existem diferenças no tamanho e nos níveis de algumas substâncias de algumas áreas do sistema nervoso central (cérebro) entre mulheres com depressão pós-parto e mulheres no pós-parto sem depressão. Será realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Este exame é bastante seguro. O único cuidado a ser tomado diz respeito à presença de objetos metálicos e magnetizados, estejam eles presos em seu corpo (como implantes e próteses) ou eles sendo carregados por você (como joias e relógios). Não podem fazer o exame pessoas com marca-passos cardíacos, implante auditivo (coclear) ou fragmentos de metal

nos olhos. Você deverá informar ao pesquisador sobre essas condições antes do exame. Será solicitado que você deixe os objetos metálicos e os magnetizados (como cartões de crédito, moedas, chaves, relógios e outros) fora da sala de exame. Estes últimos podem ser danificados pelo campo magnético da máquina de Ressonância. Seus objetos ficarão sob os cuidados do pesquisador responsável que estiver lhe acompanhando. O seu exame de Ressonância Magnética será avaliado pelos radiologistas do Hospital das Clínicas e você será informada do resultado pelos pesquisadores do projeto.

QUANTO TEMPO DURARÁ NOSSA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA?

Você será avaliada durante sua internação no pós-parto e quando você estiver com um a dois meses do parto. Esta avaliação será feita através de coleta de saliva durante um ou dois dias (logo ao acordar, 30 minutos, 3 e 12 horas após acordar), uma coleta de sangue, uma entrevista telefônica de aproximadamente 15 minutos, de um exame de Ressonância Magnética de crânio de duração de cerca de 40 minutos e, se necessário, de uma consulta psiquiátrica de aproximadamente 50 minutos.

QUAIS SÃO OS RISCOS DA PESQUISA?

A coleta de saliva é um procedimento não invasivo e não traz nenhum risco. A coleta de sangue venoso periférico será realizada após o seu consentimento, por profissional qualificado para o procedimento e será utilizado material estéril. O exame de Ressonância Magnética de crânio é um exame seguro, não doloroso, não invasivo, sem emissão de radiação ionizante, e não será administrada anestesia ou contraste, portanto, não há risco de reações alérgicas. Você ficará deitada acordada enquanto o aparelho faz imagens do seu cérebro. Algumas pessoas podem se sentir desconfortáveis por ficarem deitadas em local estreito ou incomodadas com o barulho forte que a máquina de ressonância faz quando está funcionando. O exame será interrompido imediatamente, e você poderá sair do aparelho, se desejar, podendo fazer o exame em outro momento. Você usará protetores de ouvido durante o exame para diminuir o desconforto do barulho. Terá também à mão uma campainha, que poderá acionar se precisar falar com o técnico que estará operando o aparelho. O exame de Ressonância Magnética não interfere na amamentação. Um dos pesquisadores deste projeto estará presente durante todo o exame de Ressonância Magnética.

HÁ VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTA PESQUISA?

Você poderá ser beneficiada diretamente. A avaliação de episódios depressivos pós-parto poderá detectar algum problema que favoreça a interações de menor qualidade entre você e seu filho, mais perdas de consultas de rotina com o pediatra e maiores níveis de distúrbios psiquiátricos entre as crianças. No caso de ser detectado um possível episódio depressivo pós-parto, você será convocada para uma avaliação e tratamento por um médico psiquiatra no Hospital das Clínicas, mas não há garantias absolutas que isto seja suficiente para evitar as possíveis consequências de um episódio depressivo pós-parto. Também é possível que você não receba qualquer benefício direto ao participar desta pesquisa, porém as informações coletadas nesta pesquisa podem ajudar outras pessoas que possam vir a ter risco de depressão pós-parto.

Lembramos que o sigilo de todas as informações será garantido, nenhum dado que permita sua identificação será fornecido. Quando este estudo acabar, os resultados serão discutidos com outros pesquisadores e divulgados para que muitas pessoas se beneficiem desse conhecimento, mas sem identificar as mães e os bebês participantes do estudo.

QUE OUTRAS OPÇÕES EU E MEU BEBÊ TEMOS, ALÉM DESTA PESQUISA?

Você deverá realizar o acompanhamento do puerpério com seu médico normalmente, e, caso detectado algum problema psiquiátrico, ser encaminhada ou tratada conforme o protocolo do seu serviço de saúde, como recomendado para todas as puérperas.

E A CONFIDENCIALIDADE?

Os registros referentes a você e ao bebê permanecerão confidenciais. Você e o bebê serão identificados por um código, e suas informações pessoais contidas nos registros não serão divulgadas sem sua expressa autorização. Além disso, no caso de publicação deste estudo, não serão utilizados seus nomes ou qualquer dado que os identifique.

As pessoas que podem examinar seus registros são: o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, a equipe de pesquisadores e os monitores da pesquisa.

QUAL É O CUSTO PARA MIM/MEU BEBÊ?

Os procedimentos realizados durante a pesquisa não terão nenhum custo para você. Você receberá auxílio para transporte no caso de ser convocada para a entrevista psiquiátrica, e se vier realizar o exame de Ressonância Magnética no Hospital das Clínicas, para que você não tenha nenhuma despesa, quando precisar ir da sua casa para o local da pesquisa.

EU RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Por ser uma participação voluntária, não haverá nenhum tipo de pagamento por sua participação nesse estudo. Mas nós a ressarciremos de gastos com transporte e alimentação, nos dias em que você precisar vir ao hospital.

O QUE ACONTECE SE EU OU MEU BEBÊ FICARMOS DOENTES?

Se você ou o seu bebê ficarem doentes **como resultado de sua participação nesta pesquisa**, vocês serão encaminhados diretamente para tratamento da doença, mas esse risco praticamente não existe. A assistência será fornecida pelo sistema de saúde brasileiro no hospital da pesquisa. Não existe programa de indenização por esta instituição. Você não renunciará a nenhum de seus direitos legais ao assinar este formulário de consentimento.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS E OS DO MEU BEBÊ COMO OBJETO DE PESQUISA?

Participar desta pesquisa é totalmente voluntário. Você pode escolher não participar ou retirar-se da pesquisa em qualquer momento. Você e o bebê serão tratados da mesma forma, o que quer que você decida.

Nós forneceremos novas informações sobre esta e outras pesquisas que podem afetar a saúde e bem-estar do bebê e sua vontade de permanecer na pesquisa. Se quiser receber os resultados da pesquisa, informe isto à equipe de pesquisadores.

O QUE FAÇO EM CASO DE DÚVIDAS OU PROBLEMAS?

Para solucionar dúvidas relativas a este estudo ou a uma lesão relacionada à pesquisa, entre em contato com a médica Cybele Garcia Leal nos telefones 3602-2607 e 3602-3316.

Para obter informações sobre seus direitos e os direitos de seu bebê como objeto de pesquisa, entre em contato com o **Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** pelo telefone 3602-2228.

Este termo de consentimento livre e esclarecido explica o projeto de pesquisa. Por favor, faça perguntas sobre aquilo que você não entendeu. Se você não tiver perguntas agora, poderá fazê-las quando tiver através dos telefones mencionados acima. A participação é voluntária e você pode deixar a pesquisa em qualquer momento, sem ter que dar qualquer justificativa para tal. O tratamento e todos os cuidados do sistema de saúde estarão garantidos a qualquer tempo, mesmo que você não concorde em participar. Se você entendeu a explicação e concorda voluntariamente em participar deste estudo, por favor, assine abaixo.

Agradecemos muito a sua colaboração.

ASSINATURAS

Nome do voluntário: _____

Assinatura do Voluntário: _____

Data: ____/____/____

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Data: ____/____/____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Data: ____/____/____

ANEXO — J

LISTA DE CHECAGEM E PROTOCOLO DE COLETA DO CORTISOL SALIVAR

Você precisará colher sua saliva no dia ____/____/____ nos seguintes momentos:

T1 - Logo ao acordar, **ANTES DE LEVANTAR-SE DA CAMA.**

T2 - **30** minutos após acordar

T3 - **3** horas após acordar

T4 - **12** horas após acordar

Então, se você, por exemplo, acordou às 8 horas, você deverá colher a saliva na cama, antes de se levantar e depois às 8:30 h, às 11:00 h e às 20:00 h.

Para colher a saliva, você deve abrir o tubo contendo algodão (salivette), pegar o algodão que está dentro dele e mastigá-lo até umedecê-lo bem. Os tubos estarão identificados como **T1**, **T2**, **T3** e **T4**.

- ✓ Na coleta **T1** (ao acordar), é muito importante que você a realize na cama, antes de levantar-se. Assim, no dia anterior à coleta, não se esqueça de deixar o salivette ao seu alcance para que você possa pegá-lo ainda na cama.

Para as coletas **T2**, **T3** e **T4** você deverá seguir as seguintes orientações antes da coleta:

- ✓ Fazer higiene bucal através de bochecho com água por três vezes, não escovar os dentes uma hora antes da coleta.
- ✓ Entre a primeira e segunda saliva não escovar os dentes, comer ou beber, sendo possível apenas a ingestão de água.
- ✓ Para coleta das amostras posteriores: não fumar, comer ou beber, ingerir álcool ou café uma hora antes da coleta da saliva. É possível a ingestão de água.
- ✓ Não realizar tarefas estressantes uma hora antes da coleta, por exemplo: exercício físico, avaliações, limpeza forçada da casa, lavar ou passar roupa.
- ✓ Após a coleta preencha a folha em anexo com data, horário de coleta e número do salivette.
- ✓ Após a coleta mantenha o material em congelador, até o contato com nossa equipe para recolher os Salivettes. **Qualquer dúvida ligue para 36022837 (Dra Cybele) ou 36022607 (Marcos)**

Protocolo de Coleta do Cortisol Salivar

Nome (seu nome): _____

Medicações em uso: _____

Você está amamentando? () sim () não

Data da Coleta: ____/____/____

Horários:

T1. Ao acordar: _____

T2. 30 minutos após acordar: _____

T3. 3 horas após acordar: _____

T4. 12 horas após acordar: _____

Fez a primeira coleta antes de levantar-se da cama: () sim () não

Anotações:

- ✓ Fez higienização bucal? () sim () não
- ✓ Escovou os dentes 1 hora antes da coleta? () sim () não
- ✓ Comeu ou bebeu (exceto água) 1 hora antes das coletas? () sim () não
- ✓ Fumou 1 hora antes das coletas? () sim () não
- ✓ Realizou atividades estressantes 1 hora antes da coleta? () sim () não

Anotações:

ANEXO — L

QUESTIONÁRIO DE LATERALIDADE DE EDIMBURG

O questionário de lateralidade de Edimburg é usado para definir o nível de lateralidade.

Orientações para a realização do teste: Este é um questionário para determinar qual lado você usa para realizar as atividades manuais. Nas questões seguintes, marque a letra (D) se você realiza certa atividade com a mão direita; (E) se você realiza com a mão esquerda; e (A) se você realiza facilmente com ambas as mãos. Em todas essas atividades, considere suas mãos vazias quando começar a realizá-las.

	D	E	A
1. Com que mão você gira a maçaneta da porta para abri-la?			
2. Com que mão você arremessa uma bola?			
3. Com que mão você usualmente pega um copo ou caneca, quando vai beber algo?			
4. Com que mão você segura um martelo quando está martelando?			
5. Com que mão você segura a tampa quando esta abrindo uma compota?			
6. Com que mão você segura a tesoura quando está cortando algo?			
7. Com que mão você aperta o interruptor da luz na parede?			
8. Com que mão você distribui cartas quando está embaralhando-as?			
9. Com que mão você segura o lenço quando esta assoando o nariz?			
10. Com que mão você dá tchau?			
11. Com que mão você joga a moeda para cima para fazer cara ou coroa?			
12. Com que mão você risca um fósforo?			
13. Com que mão você coloca o relógio?			
14. Com que mão você segura a escova de dente?			
15. Com que mão você tira o dinheiro da carteira?			
16. Com que mão você segura a faca para cortar um baguete?			
17. Com que mão você segura a linha para colocá-la na agulha?			
18. Com que mão você segura uma colher quando está mexendo algo em uma panela?			
19. Com que mão você segura o pente para pentear o cabelo?			
20. Com que mão você vira as páginas de um livro?			
21. Com que mão você segura a faca quando está descascando uma batata?			
22. Com que mão você escreve?			
23. Com que mão você usa a borracha no papel?			
24. Com que mão você corta com a faca quando está comendo de garfo e faca?			
25. Com que mão você usa o saleiro?			
26. Com que mão você quica uma bola de basquete no chão?			
27. Qual mão está acima quando você aplaude?			
28. Com que mão você desenha uma figura?			
29. Com que mão você abre uma torneira quando está com as duas mãos livres?			
30. Com que mão você pega uma moeda que está no chão?			
31. Com que mão você usa o apagador em um quadro negro?			
32. Qual a mão que fica em cima quando você usa uma pá?			
33. Com que mão você segura uma raquete de tênis (frescobol/squash/tênis de mesa)?			
34. Com que mão você coloca a chave na fechadura?			

ANEXO — M

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

<p>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</p> <p>www.hcrp.usp.br</p>
---	--	---

Ribeirão Preto, 04 de agosto de 2010

Ofício nº 2608/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“INTERAÇÃO GENÉTICO-AMBIENTAL NOS ESTADOS DEPRESSIVOS PÓS-PARTO”** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5169/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a MÁRCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
FELIPE PINHEIRO DE FIGUEIREDO
PROF^a DR^a CRISTINA MARTA DEL-BEN (Orientadora)
Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ARTIGO PUBLICADO

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Affective Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jad

Research paper

Altered functioning of the HPA axis in depressed postpartum women

Marcos Gonçalves de Rezende^{a,*}, Cybele Garcia-Leal^a, Felipe Pinheiro de Figueiredo^a,
Ricardo de Carvalho Cavalli^b, Maristela Schaufelberger Spanghero^a,
Marco Antonio Barbieri^c, Heloisa Bettiol^c, Margaret de Castro^d, Cristina Marta Del-Ben^a

^a Departments of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^b Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^c Puericulture and Pediatrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^d Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2015

Received in revised form

18 December 2015

Accepted 26 December 2015

Available online 31 December 2015

Keywords:

Hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis

Depression

Cortisol awakening response

Cortisol diurnal variation

Postpartum

Puerperium

ABSTRACT

Background: The present study aimed to evaluate the relationship between the functioning of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and major depressive episodes in the remote postpartum period.

Methods: The sample (mean age, 28.0 ± 5.3 years) consisted of 37 depressed postpartum women (DPP), 42 euthymic postpartum women (EPP) and 25 non-postpartum healthy women (HC). Salivary cortisol samples were collected immediately after awakening and 30 min, 3 and 12 h later, at approximately the sixth month postpartum (mean, 169.6 ± 60.3 days).

Results: Differences in cortisol levels were observed at awakening ($DPP < EPP = HC$), at 30 min ($DPP < EPP < HC$), at 3 h ($DPP = EPP < HC$) and at 12 h ($DPP > EPP = HC$). The relative increment in the cortisol awakening response (CAR $\%$) was significantly higher in HC (113.5 ± 94.3) than in EPP (63.1 ± 69.8) and DPP (32.2 ± 49.6). The relative reduction in diurnal variation (DV $\%$) was lower in DPP (56.5 ± 41.8) than in EPP (75.6 ± 22.4) and HC (75.1 ± 13.0).

Limitations: The main limitation was cortisol collection on a single day and without measurement at midnight.

Conclusions: Our findings suggest that the remote postpartum period involves attenuation of HPA axis reactivity; this dysregulation is more pronounced in the presence of DPP, which is associated with a reduction in cortisol diurnal variation. Abnormalities in the neuroendocrine system related to stress processing, present even several months after delivery, can represent vulnerability to mental disorders. Thus, improvements in the mental health care of postpartum women are needed.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Postpartum depression (PPD) is a prevalent condition (Gavin et al., 2005) with serious consequences not only for the women but also for the entire family and especially for the child. In the latter, mother's depressive state can trigger future cognitive, behavioral and emotional problems (Brand and Brennan, 2009).

Several environmental factors, such as stressful life events and low social support, represent a risk for the development of PPD (Robertson et al., 2004). Moreover, biologic factors, such as the dramatic changes in the hormonal environment during pregnancy and in the postpartum period, appear to play a role in the etiology of postpartum depression (Skalkidou et al., 2012). In particular, the

function of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis does change during pregnancy and puerperium. Corticotrophin-releasing hormone (CRH), which is normally released by the hypothalamus and is undetectable in plasma, is produced by the placenta (Kalantaridou et al., 2003). In response to the increased CRH levels, cortisol levels progressively increase during pregnancy, achieving levels similar to those observed in Cushing's syndrome (Magiakou et al., 1997). After birth, CRH and cortisol levels decrease at approximately 4 days postpartum (Mastorakos and Ilias, 2003).

There is evidence suggesting that HPA axis dysregulation can be correlated with depressive disorders (Stetler and Miller, 2011); however, the association between HPA axis dysregulation and PPD is still controversial. In the immediate postpartum period (up to 10 days after delivery), blood cortisol levels have been reported to be increased in depressed women (Okano and Nomura, 1992), as well as high salivary cortisol levels in the morning but not in the afternoon or in the evening (Ehlert et al., 1990). However, non-

* Corresponding author.

E-mail address: rezendemarcos@yahoo.com.br (M.G. de Rezende).

significant results have also been found in the immediate postpartum period (Fan et al., 2009). In the late puerperium (from the 10th day to the 42nd day after delivery), lower cortisol levels were reported in depressed women compared to healthy controls (Groer and Morgan, 2007); other studies have reported no significant differences in cortisol levels in blood (Okano and Nomura, 1992) or in saliva specimens (Corwin et al., 2005). Studies in women in the remote puerperium (from the 43rd day after delivery) have shown normal salivary (Davis et al., 2007) or urinary (Figueiredo and Costa, 2009; Pedersen et al., 1993) cortisol levels, although one study demonstrated increased blood cortisol levels in depressed postpartum women (Pedersen et al., 1993).

The discrepancies in the results described above can be attributed to the methodological features of the studies that did not consider the specificities of the HPA axis function. The HPA axis has a circadian rhythm whereby the nadir of cortisol concentrations occurs at midnight (Young et al., 2001) and the decline during the course of the day is punctuated by cortisol peaks. The cortisol awakening response (CAR) is a significant increase in cortisol levels that occurs approximately 30 min after awakening and serves as a synchronizer for the circadian rhythm of the HPA axis (Wilhelm et al., 2007). To consider the presence of CAR, an increase of at least 50% in cortisol levels is expected at 30 or 60 min after awakening and is considered to be a measure of the reactivity of the HPA axis in healthy individuals (Pruessner et al., 1997). Although there is a large individual variation in the morning cortisol levels, there is an intra-individual stability of the CAR, which supports its use as a biomarker (Pruessner et al., 1997).

Studies using the CAR have demonstrated an increase in the reactivity of the HPA axis in depressive disorders (Lamers et al., 2013; Vreeburg et al., 2009). However, contradictory results have also been reported (Stetler and Miller, 2005). Specifically regarding postpartum depression, it has been shown that depressed women evaluated between the 6th and 8th week postpartum showed the absence of the CAR compared with postpartum euthymic women and healthy female controls (Taylor et al., 2009). However, in another study, there was no correlation between the CAR and depressive symptoms in a group of women evaluated during pregnancy (36 weeks) and between the 4th and 6th weeks postpartum (Cheng and Pickler, 2010).

In the present study, we aimed to investigate the relationship of HPA axis function and major depressive disorder during the puerperium. More specifically, we aimed to assess whether the putative HPA axis dysregulation observed between the 6th and 8th weeks of the postpartum period in depressed women (Taylor et al., 2009) would last for a longer time. We hypothesized that the association of hormonal changes and the psychosocial demands inherent to the pregnancy/postpartum period would cause the dysregulation of the HPA axis to persist for a longer period. In this case, depressed postpartum women evaluated several months after delivery would have attenuated HPA axis reactivity and a reduced cortisol diurnal variation compared to euthymic postpartum and non-postpartum healthy women.

2. Materials and methods

2.1. Study design and protocol

This was a cross-sectional study conducted on a sample from a larger project, the *Birth Cohorts in Two Brazilian Cities – BRISA* (Brazilian, Ribeirão Preto and São Luís Birth Cohort Studies), in order to assess the consequences of perinatal factors for child health. Women with a singleton pregnancy, users of prenatal outpatient clinics of public and private health services, who had performed the first gestational ultrasound exam at less than 20

weeks of gestational age, were invited to participate in the BRISA study. The women were interviewed between the 22nd and the 25th weeks of gestational age and socioeconomic variables, support network, and gynecologic, obstetric, and mental health problems were assessed during pregnancy as part of the original protocol. The participants were reevaluated at the time of delivery, when details regarding parity, gestational age, type of delivery, and gender and clinical conditions of the newborn were collected (da Silva et al., 2014).

Women who participated in the BRISA cohort were enrolled in the present study in order to verify the association of environmental and biologic factors with depressive symptoms during the first year postpartum. The diagnostic process of depressive episodes has been described in detail elsewhere (de Figueiredo et al., 2014). Briefly, during the postpartum period, the women were initially evaluated by a telephone interview for the screening of depressive symptoms using the Edinburgh Postpartum Depressive Scale (EPDS) (Cox et al., 1987; Santos et al., 2007). The EPDS administered by a telephone interview showed good predictive validity (de Figueiredo et al., 2014). Women with a positive screening (EPDS ≥ 10 , $n=257$) were matched with controls for age and time of delivery (EPDS < 10 , $n=239$), and women of both groups (positive and negative screening) were invited to engage in a face-to-face clinical diagnostic interview (described in detail below). A significant portion of women refused to take part in the face-to-face interview, which was held for 199 participants (de Figueiredo et al., 2014). Women with a confirmed diagnosis of a current major depressive episode and matched controls were invited to participate in the present study.

2.2. Indicators of mental health during pregnancy and postpartum

As part of the BRISA protocol, the occurrence of depressive symptoms during pregnancy was assessed using the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D) (Silveira and Jorge, 1998; Weissman et al., 1977). We adopted a cut-off ≥ 24 in the CES-D to define patients likely to show depressive disorders during pregnancy. Anxiety and perception of stress were assessed using the Beck Anxiety Inventory (BAI) (Beck et al., 1988; Cunha, 2001) and the Perceived Stress Scale (PSS-14) (Cohen et al., 1983), respectively.

The diagnosis of major depressive episodes during the postpartum period was made using the Structured Clinical Interview for the DSM-IV, clinical version (SCID-CV) (First et al., 1997) translated into Portuguese (Del-Ben et al., 2001). The severity of the depressive symptoms was evaluated using the Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D) (Hamilton, 1960); scores ≥ 22 were defined as severe depression. Trained psychiatrists or clinical psychologists applied both instruments to the subjects.

During the diagnostic interview, the mothers were invited to complete two self-report instruments: the EPDS (Cox et al., 1987; Santos et al., 2007), which assesses the severity of the depressive symptoms, and the Epworth Sleepiness Scale (ESS), which evaluates daytime sleepiness in adults (Bertolazi et al., 2009; Johns, 1991). On the same occasion, the participants were also asked to provide their height and weight, to report the use of contraceptives or psychotropic agents, and to state whether they were breastfeeding.

2.3. Participants

A total of 199 postpartum women were assessed in face-to-face interviews using the SCID-CV. Ninety women had a diagnosis of a current major depressive episode and 109 were considered euthymic (de Figueiredo et al., 2014). Exclusion criteria were medical conditions or treatments that alter cortisol concentration, except

psychotropic agents, and other mental disorders, except anxiety disorders, a common co-morbid condition among the depressed postpartum women. Nine of the 199 participants were initially excluded: 1 due to a medical condition and 8 due to severe mental disorders (2 with bipolar disorder, 1 with psychotic depression, 2 with personality disorders, and 3 with substance-related mental disorders). Of those invited to take part in the study, 86 refused. Thus, 51 depressed women and 53 euthymic women agreed to participate. There was no difference between the missing sample and the final sample regarding demographic characteristics: age ($p=0.365$), years of study ($p=0.305$), co-habiting with a partner ($p=0.394$), monthly household income ($p=0.170$); postnatal characteristics: primiparous subjects ($p=0.767$), weeks of gestational age at birth ($p=0.310$), breastfeeding ($p=0.842$), body mass index ($p=0.278$); newborn characteristics: male sex ($p=0.720$), 1st minute APGAR score ($p=0.806$), 5th minute APGAR score ($p=0.964$); and mental health during pregnancy or postpartum: CES-D ($p=0.331$), BAI ($p=0.742$), EPDS ($p=0.592$), ESS ($p=0.907$), PSS ($p=0.313$). There was a higher proportion of vaginal delivery among the women who completed the study than among those who refused to participate ($p=0.022$).

Forty-five non-puerperal healthy women aged 20 to 40 years, who were not taking medicines, except for hormonal contraceptives, were recruited from the local population and were eligible to participate in the study. Among these, 40 women matched with the postpartum women according to the use of hormonal contraceptive agreed to participate. The mental health of the controls was assessed using the Brazilian version of the Self-Reporting Questionnaire (SRQ-20) (Mari and Williams, 1985), which excluded common mental disorders (cut-off ≤ 7). The controls also complete the ESS for the characterization of eventual sleep disturbances, and the EPDS to verify the presence of subclinical depressive symptoms.

The study was approved by the local Ethics Committee, all the invited participants were informed of the study's objectives and methodology, and they signed in duplicate a term of free and informed consent.

2.4. Salivary cortisol collection

The participants were asked to collect saliva samples at home for the determination of cortisol levels. A copy of the informed consent form and written guidelines about the procedures for salivary sample collection were given to the volunteers, together with a checklist for recording the date, time, and care taken before each sample collection, as well as to record their general medical condition, use of medication, or, in the case of postpartum women, if they were breastfeeding.

The participants received four salivettes, plastic tubes containing a cotton swab, identified with their name and the times of collection. Salivary cortisol samples were collected immediately after awakening and at 30 min, 3 h and 12 h post-awakening as previously proposed (Taylor et al., 2009). The volunteers were instructed to perform the first collection at the time of awakening, before getting up and while still in bed. Before the three other collections, they were asked to perform a mouthwash with water, not to brush their teeth, not to smoke or drink beverages (except water), not to eat one hour before the collection, and not to perform stressful tasks one day before the collection. The participants were also instructed to keep the saliva samples in the freezer until they were delivered to the laboratory.

To control the levels of progesterone, the non-postpartum participants who were not using contraceptives were asked to perform the saliva collection between 5 and 8 days after their menstrual period.

2.5. Salivary cortisol measurements

The saliva samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and stored at -30°C . Salivary cortisol was determined in the Laboratory of Endocrinology, Ribeirão Preto Medical School. Saliva aliquots (25 μL) were subjected to radioimmunoassay according to a previously described method (Castro and Moreira, 2003). The test sensitivity was 60 ng/dL. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.1% and 9.3%, respectively. The values are expressed as nanomoles per liter (nmol/L). All samples were analyzed in duplicate in the same assay.

2.6. Statistical analysis

The data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0. The demographic and clinical variables were analyzed by one-way analysis of variance – ANOVA (continuous variables) or the chi-square or Fisher exact test (categorical variables).

For the statistical analyses, cortisol values were log-transformed; the figures displayed raw values. The variation of free salivary cortisol levels during the day was subjected to two-factor repeated-measures ANOVA [between factor: diagnostic group (depressed postpartum women, euthymic postpartum women and non-postpartum healthy controls); within factor: time (awakening and 30 min, 3 h and 12 h post-awakening)]. The degrees of freedom of the repeated factors were corrected using the Huynh-Feldt epsilon. *Post-hoc* comparisons were conducted by one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. The effect size was determined by the Cohen "d" test, defined as "small" for values of "d" equal to or lower than 0.20; "medium" for values equal to or higher than 0.50, and "large" for values higher than 0.80 (Cohen, 1988). As a secondary analysis, we conducted a multivariate analysis of covariance (MANCOVA) including as covariates some demographic and clinical variables: age, years of schooling, marital status, ESS scores, body mass index, and contraceptive use.

The changes in the cortisol levels were determined using two auxiliary indexes: the percentage of increment in free salivary cortisol levels obtained at 30 min after awakening compared to the cortisol levels obtained immediately after awakening, i.e., the relative cortisol awakening response (CARi%) (Clow et al., 2004), and the relative reduction of cortisol levels obtained 12 h after awakening compared to the cortisol levels determined at the time of awakening, i.e., the relative diurnal variation reduction (DVR%) (Edwards et al., 2003). In the CARi%, an increment from baseline (awakening) of at least 50% has been established to represent the presence of reactivity of the HPA axis (Pruessner et al., 1997). One-way ANOVA followed by the Bonferroni test was used to compare the mean CARi% and DVR% of the three groups. Additional analyses using one-way ANOVA and the Pearson correlation coefficient were performed considering only depressed postpartum women in order to determine possible associations between perceived stress during pregnancy, the features and severity of the depressive episode and CARi% and DVR%.

The normality of the sample was confirmed and outliers were identified by the Shapiro-Wilk test.

Values of $p \leq 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Sociodemographic and clinical variables

The final sample consisted of 104 volunteers who were divided into three groups: euthymic postpartum women ($n=42$),

Fig. 1. Flowchart showing the eligible volunteer recruitment and the composition of the final sample.

depressed postpartum women ($n=37$), and non-postpartum healthy control women ($n=25$). Fig. 1 shows the flowchart of recruitment and the composition of the final sample.

Table 1 shows the characteristics of the sample. The three groups did not differ significantly regarding age ($p=0.702$), use of contraceptives ($p=0.304$), daytime sleepiness (ESS total scores; $p=0.689$), and time of awakening ($p=0.430$). However, the non-postpartum women had more years of education ($p=0.014$) than depressed and non-depressed postpartum women, with a lower proportion of participants co-habiting with partners ($p<0.001$), and a lower body mass index (BMI) ($p<0.001$).

As expected, the EPDS scores were higher for the depressed postpartum participants ($p<0.001$). The EPDS scores did not differ between the non-postpartum controls and the euthymic postpartum women ($p=0.720$).

The depressed postpartum women scored higher in the mental health measures (CES-D, BAI, PSS) obtained during pregnancy and in the occurrence of lifetime depressive episodes compared to the euthymic postpartum women. However, there were no differences between the postpartum groups in the demographic or delivery variables, or in postnatal and newborn characteristics.

Most of the depressed postpartum women (68.0%) were depressed during pregnancy (CES-D ≥ 24). Regarding the current episode, 67.6% of depressed postpartum women exhibited the melancholic subtype. Anxiety disorders were detected in 32.4% of the depressed postpartum women and 45.7% of them had a severe depressive episode. Only 2 women were taking an antidepressant (sertraline).

3.2. Evaluation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis

The postpartum women collected saliva samples at the 6th month postpartum (mean = 169.6 ± 60.5 days) and, on average, 5 weeks (mean = 37.5 ± 45.3 days) after the diagnostic interview.

As observed in Fig. 2, there was a significant difference in the cortisol levels of the three groups during the 12-h period [diagnostic group $\times$ time interaction $F(5.11, 258.50)=6.34$; $p<0.001$].

Post-hoc analyses showed significant differences at awakening, when healthy controls had significantly higher cortisol levels than depressed postpartum women ($p=0.050$; $d=0.670$), but without differences compared to euthymic postpartum women ($p=0.952$; $d=0.250$). There was no significant difference between euthymic and depressed postpartum women in cortisol levels at awakening ($p=0.307$; $d=0.366$). At 30 min after awakening, the depressed postpartum women had significantly lower cortisol levels than the euthymic postpartum women ($p=0.002$; $d=0.775$) and controls ($p<0.001$; $d=1.594$); the euthymic postpartum women had significantly lower cortisol levels compared to healthy women ($p<0.001$; $d=0.846$). At 3 h after awakening, the controls had significantly higher cortisol levels than the euthymic women ($p<0.001$; $d=0.912$) and the depressed postpartum women ($p<0.001$; $d=1.265$), with no difference between the depressed and euthymic postpartum women ($p=0.351$; $d=0.350$). Finally, 12 h after awakening, the depressed postpartum participants had higher cortisol levels compared to the euthymic postpartum participants ($p=0.060$; $d=0.500$), but without difference regarding the healthy controls ($p=1.000$; $d=0.144$). The euthymic postpartum women had levels similar to those of controls 12 h after awakening ($p=1.000$; $d=0.506$).

The significant differences observed by repeated-measures ANOVA remained the same when repeated measurements were covariates by age, years of schooling, daily sleepiness (ESS scores), body mass index, contraceptive use and marital status [group $\times$ time interaction $F(5.42, 254.90)=6.22$; $p<0.001$]. Notably, the exclusion from statistical analysis of the participants who had comorbid anxiety disorders and those who received treatment did not alter the results of statistical analysis.

Fig. 3 illustrates the mean and standard error of the mean values of CARi% and DVr% in the three groups. A 50% increase in CARi% occurred in 72.0% of the healthy controls, in 47.6% of the euthymic postpartum women, and in 32.4% of the depressed postpartum women. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc comparisons tests revealed that the CARi% values were significantly higher in the control group ($113.5\% \pm 94.3$) than in

Table 1
Demographic and clinical features of the participants in the study.

	Euthymic postpartum women (n=42)	Depressed postpartum women (n=37)	Non-postpartum healthy control women (n=25)	p
Demographic characteristics				
Age: mean (SD)	27.7 (5.3)	27.7 (5.3)	28.7 (5.2)	0.702
Years of study: ≥ 9 years (%)	71.4	81.1	100.0	0.014*
Co-habiting with a partner (%)	85.7	81.1	36.0	< 0.001 [†]
Monthly household income in U.S. dollars: mean (SD)	964.9 (538.5)	898.9 (1182.8)	NA	0.761
Delivery and postnatal characteristics				
Primiparous subjects (%)	33.3	24.3	NA	0.379
Weeks of gestational age at birth: mean (SD)	39.6 (1.4)	38.8 (2.1)	NA	0.058
Vaginal delivery (%)	61.9	59.5	NA	0.357
Breastfeeding (%)	88.1	91.9	NA	0.717
Contraceptive use (%)	59.5	75.0	72.0	0.304
Body mass index, kg/m ² : mean (SD)	27.5 (4.6)	27.3 (4.3)	22.7 (3.3)	< 0.001 [†]
Newborn characteristics				
Male (%)	50.0	43.2	NA	0.548
APGAR 1st minute: mean (SD)	8.2 (1.4)	8.0 (1.7)	NA	0.601
APGAR 5th minute: mean (SD)	9.5 (0.6)	9.4 (0.8)	NA	0.610
Mental health in pregnancy				
CES-D: mean (SD)	16.6 (10.4)	26.1 (12.8)	NA	< 0.001*
BAI: mean (SD)	15.0 (11.0)	21.0 (12.0)	NA	0.029*
Perceived Stress Scale: mean (SD)	23.9 (9.0)	29.5 (8.8)	NA	0.009*
Mental health in postpartum				
ESS: mean (SD)	8.3 (5.2)	8.8 (5.8)	7.7 (3.3)	0.689
EPDS: mean (SD)	5.3 (4.4)	16.5 (5.3)	4.0 (2.7)	< 0.001 [†]
Lifetime depressive episode (%)	43.0	65.7	NA	0.045*
Depression during pregnancy (%)	NA	68.0	NA	
Current use of psychotropic drugs (%)	NA	5.2	NA	
Severe depression (%)	NA	45.7	NA	
Melancholic subtype (%)	NA	67.6	NA	
Co-morbid anxiety (%)	NA	32.4	NA	
Sampling				
Days after birth: mean (SD)	170.7 (56.8)	169.4 (64.8)	NA	0.927
Awakening time, A.M.: mean hours: mins (SD)	7:07 (1:24)	7:33 (1:36)	7:24 (1:11)	0.430

NA, not applicable; ESS, Epworth Sleepiness Scale; CES-D, Center for Epidemiologic Studies Depression; BAI, Beck Anxiety Inventory; EPDS, Edinburgh Postnatal Depression Scale.

* Significant *p* value.

Fig. 2. Mean and standard error of the levels of salivary cortisol in the euthymic (n=42) and depressed (n=37) postpartum women and in the non-postpartum healthy control women (n=25) immediately upon awakening (0) and 30 min, 3 h and 12 h after waking. Cortisol awakening response (CAR: awakening (0)–30 min); **p* < 0.05 in the non-postpartum healthy control women compared to the depressed postpartum women; †*p* < 0.001 in the non-postpartum healthy control women compared to the euthymic women and the depressed postpartum women; ***p* < 0.05 in the depressed postpartum women compared to the euthymic postpartum women.

euthymic women ($63.1\% \pm 69.8$; *p* = 0.017; *d* = 0.606) and depressed postpartum women ($32.2\% \pm 49.6$; *p* < 0.001; *d* = 1.078). The euthymic postpartum women showed higher CARi% than the depressed postpartum women, although the values were not

statistically significant (*p* = 0.165; *d* = 0.509).

The relative reduction in cortisol concentrations over 12 h (DVi%) was significantly lower in the depressed postpartum women ($56.5\% \pm 41.8$) compared to both the euthymic postpartum women ($75.6\% \pm 22.4$; *p* = 0.015; *d* = 0.567) and the healthy controls ($75.1\% \pm 13.0$; *p* = 0.05; *d* = 0.599). No significant difference was found between euthymic postpartum women and controls (*p* = 1.000; *d* = 0.026).

In the depressed women, we assessed HPA axis reactivity according to the features and the subtype of the current major depressive episode. As observed in Table 2, no significant differences in cortisol indexes were found regarding severity, presence of sleep disturbances or co-morbid anxiety disorders, and occurrence of depression during pregnancy. Women diagnosed with the melancholic type of depression showed a lower CARi% compared to women with depressive episodes with atypical features (*p* = 0.042, *d* = 0.697).

In the depressed postpartum women, the EPDS scores correlated negatively with the CARi% (*r* = −0.365, *p* = 0.001) but not with the DVi% (*r* = −0.179, *p* = 0.115). No significant correlation between PSS scores and CARi% (*r* = −0.303; *p* = 0.072) or DVi% (*r* = 0.206; *p* = 0.288) were found.

4. Discussion

In the present study, we evaluated the HPA axis function of women diagnosed with a current major depressive disorder in a

254

M.G. de Rezende et al. / Journal of Affective Disorders 193 (2016) 249–256

Fig. 3. Mean and standard error of the mean of the relative increase of cortisol concentrations after awakening (CARi%) and relative reduction of cortisol in the assessment of diurnal variation (DVR%). * $p < 0.05$ compared to the euthymic postpartum women, and $p < 0.001$ compared to the depressed postpartum women; ** $p < 0.05$ compared to the euthymic postpartum women, and $p = 0.05$ compared to the non-postpartum healthy control women.

Table 2

Mean and standard error of the mean of the relative increase of cortisol concentrations after awakening (CARi%) and relative reduction of cortisol in the assessment of diurnal variation (DVR%) according to the features of the current major depressive episode.

	n	CARi%		p	DVR%		p	d
		Mean	(SD)		Mean	(SD)		
Severity								
Severe	16	37.0	(53.1)	0.559	0.199	53.5	(35.2)	0.491
Mild/moderate	19	26.7	(49.9)			63.1	(44.7)	0.238
Subtype								
Melancholic	25	20.8	(42.0)	0.042*	0.697	60.1	(35.0)	0.465
Atypical	12	55.9	(57.4)			49.1	(54.5)	0.240
Sleepiness disturbances								
Yes (ESS ≥ 12)	15	36.9	(54.0)	0.642	0.155	47.4	(53.0)	0.277
No (ESS < 12)	22	29.0	(47.4)			62.8	(32.0)	0.351
Co-morbid anxiety								
Yes	12	42.1	(49.7)	0.408	0.293	54.0	(57.8)	0.802
No	25	27.5	(49.8)			57.7	(33.0)	0.078
Depression during pregnancy								
Yes	25	25.0	(43.5)	0.203	0.427	61.1	(34.9)	0.342
No	12	47.3	(59.5)			47.0	(54.0)	0.310

ESS: Epworth Sleepiness Scale.

* Significant p value.

remote postpartum period (6 months, on average) compared to non-depressed postpartum women and non-postpartum healthy women. We found an attenuation of the reactivity of the HPA axis in the remote postpartum period, independent of the diagnosis of a mental disorder; however, this attenuation was more pronounced in depressed postpartum women. On the other hand, the diurnal variation of salivary cortisol levels was reduced only in women with the diagnosis of a current major depressive episode.

Our results showed that postpartum women, independent of the diagnosis of current depressive episodes, presented an

attenuation of the cortisol awakening response compared to non-postpartum healthy women. The lower cortisol levels in postpartum women were also observed 3 h after awakening. These data suggest that the postpartum period by itself causes changes in HPA axis function, even a long time after delivery. A likely explanation for the mechanisms underlying the dysregulation of HPA axis function in the puerperium includes continuous exposure to sustained elevations of CRH levels during pregnancy, which may desensitize the receptors in the anterior pituitary to CRH (Glynn et al., 2013). Moreover, the decreased receptor sensitivity at the level of the hypothalamus and its higher regulatory inputs can be associated with decreased CRH secretion, which, in turn, might lead to a mild adrenal suppression after delivery (Glynn et al., 2013). A blunted ACTH response to the administration of ovine CRH was observed at 3 and 6 weeks postpartum, independently of the diagnosis of blues or PPD, but when the depressed postpartum women were analyzed separately, they presented a more pronounced and long lasting (12 weeks postpartum) blunting of the ACTH response (Magiakou et al., 1996).

The hyporesponsiveness of the HPA axis during the postpartum period can have an adaptive function, such as energy conservation for lactation, protection against the stress-related inhibition of lactation, improvement of immune function and enhancement of maternal defense and, consequently, of the offspring protection (Lightman et al., 2001). It has been suggested that, in genetically and epigenetically vulnerable women, the delay in the return of the HPA axis to its normal function during the postpartum period can contribute to the onset or worsening of postpartum depression (Glynn et al., 2013; Kammerer et al., 2006).

Only 32% of depressed postpartum women exhibited an increment equal to or higher than 50% in the CAR, which is below the range found in normal subjects (Clow et al., 2004). Our results are consistent with reported data of the abolition of the cortisol awakening response in the 6th to 8th week postpartum depressed women (Taylor et al., 2009). Since our patients were studied 6 months after delivery, in the present study we demonstrated that dysregulation of the reactivity of the HPA axis persists for

longer periods of time during the puerperium. The impairment of the HPA axis in depressed postpartum women was also confirmed by the lower diurnal variation in cortisol levels compared to both euthymic postpartum depressed women and non-postpartum healthy women.

The increment of 50% or more in the CAR was observed in 46.7% of the euthymic postpartum women and in 72% of healthy control women. Interestingly, although without statistical significance, but with a medium effect size, the euthymic postpartum women showed, on average, a relative CARi% that was intermediate between those of the non-postpartum controls and the depressed postpartum women. On the other hand, the DVr% of the cortisol levels was reduced in the depressed postpartum women but not in the euthymic postpartum or non-postpartum women. It is noteworthy that the HPA axis is under the control of glucocorticoid receptors (GRs) and mineralocorticoid receptors (MRs) (De Kloet et al., 1998). While GRs have a low affinity for endogenous cortisol and regulate the cortisol peaks, which occur, for example, during the CAR and in response to stress, MRs have a high affinity for endogenous corticosteroids and regulate the circadian variation (Joëls et al., 2008; Pariante, 2004). Thus, taken together, our data regarding reactivity and diurnal variation suggest a broader impairment of HPA axis function in the presence of depression occurring during the remote postpartum, which can involve both corticosteroid receptors.

We cannot rule out the impact of psychological stress that is inherent to the postpartum period and of parental care on the dysregulation of the HPA axis. There is evidence that psychosocial factors can differently affect the magnitude of the CAR. A meta-analysis showed that job-related and general life stressful events are associated with enhancement of the CAR, whereas other types of psychosocial factors, such as fatigue, burnout, and exhaustion, are associated with a decrease in CAR (Chida and Steptoe, 2009). A likely explanation for the attenuated CAR observed in our study on postpartum women, particularly in clinically depressed women, could be a response to the exhaustion caused by the demands related to parenting care during the postpartum period. The attenuation of the CAR is also observed for other causes of hypocortisolism and seems to be associated with chronic stress and sleep disturbances (Chida and Steptoe, 2009).

We found a negative correlation between the cortisol awakening response, measured using the CARi%, and the severity of the depressive symptoms, measured using the EPDS scores in the depressed postpartum women, which was not reported in a previous study (Cheng and Pickler, 2010). This discrepancy can be related to differences between the samples studied, since the former study assessed the presence/severity of depressive complaints in 21 healthy postpartum women without a formal diagnosis of major depressive disorder.

DVr% showed no correlation with the depressive symptoms. This lack of correlation may be attributed to the sampling time of 12 h after awakening because this interval did not include the nadir of the circadian rhythm that is typically measured at midnight (Castro et al., 1999).

No significant differences were observed between CARi% and DVr% and the clinical features in depressed postpartum women, except for a more pronounced attenuation of the CAR in the melancholic depression subtype compared to the atypical depression subtype. These data are consistent with previous findings reporting an association between the melancholic depression subtype and HPA axis dysregulation (Lamers et al., 2013). Other negative results can be attributed to the small sample size or, in the case of sleep disturbances, to the scale adopted in this study because the Epworth Sleepiness Scale may not be the most appropriate tool for assessing the quality of nocturnal sleep (Sil and Barr, 2012).

This study has some limitations, such as the small sample size and the presence of co-morbidities in depressed postpartum women, particularly anxiety disorders, although the analysis excluding anxiety did not change the significance of the results. We also did not collect data regarding the women's family history of depression. As previously discussed, a salivary cortisol measurement at midnight would provide a better parameter for assessing the circadian rhythm and subsequent assessments of the CAR on different days would allow us to confirm the observed changes in HPA axis function. Additionally, cortisol sampling was undertaken 5 weeks after the psychiatric assessment and, although unlikely, some change in the diagnosis may have occurred.

Another limitation of the study is the difference in years of schooling of the participants, with higher educational levels in the group of healthy control women compared to postpartum women. Although it has been shown that, in community samples, middle class highly functioning healthy women have a steeper diurnal variation in cortisol compared to lower functioning women (Adam and Gunnar, 2001), we did not find significant differences in the diurnal variation of cortisol levels between the non-postpartum healthy women and the euthymic postpartum women. Data regarding associations between socioeconomic features and CAR are controversial, with studies pointing to a negative association between CAR and socioeconomic status (Kunz-Ebrecht et al., 2004; Wright and Steptoe, 2005), a positive association between CAR and socioeconomic characteristics (Karlman et al., 2013), or the absence of association with educational level and other parameters of social position (Kumari et al., 2010). It is noteworthy that in our analyses including years of schooling as a covariate did not change the statistical significance of the main result of our study.

On the other hand, this study has several strengths: it was conducted on medication-free patients (only 2 were taking antidepressants at the time of saliva collection); the diagnosis of major depressive episode was based on structured clinical interviews conducted by trained mental health professionals; and it included an assessment of the eventual associations between HPA axis functioning and clinical features of the depressive episode.

In conclusion, we have shown that the remote postpartum period is associated with a dysregulation of the HPA axis, indicated by an attenuation of the HPA axis reactivity. The HPA axis dysregulation is more pronounced in the presence of the diagnosis of a major depressive episode, which, in turn, is associated with an attenuation of the cortisol awakening response and a reduction of the cortisol diurnal variation. Postpartum depression is highly prevalent; in our sample, a positive screening (EPDS ≥ 10) was observed in 23.7% of the 1083 postpartum women (de Figueiredo et al., 2014). However, it is estimated that fewer than 50% of women with postpartum depression are identified and treated (Hendrick, 2003). Our findings emphasize the need for improvement in the health care of women during the postpartum period. Even 6 months after delivery, women present alterations in the neuroendocrine system related to stress processing, which can represent vulnerability to depressive and other mental disorders.

Acknowledgments

The authors are indebted to Mr. José Roberto Silva for technical assistance with cortisol determination and to Dr. Rosana Shuhama for collaborating with the recruitment of non-postpartum women.

References

- Adam, E.K., Gunnar, M.R., 2001. Relationship functioning and home and work demands predict individual differences in diurnal cortisol patterns in women. *Psychoneuroendocrinology* 26, 189–206.
- Beck, A.T., Epstein, N., Brown, G., Steer, R.A., 1988. An inventory for measuring

- clinical anxiety: psychometric properties. *J. Consult. Clin. Psychol.* 56, 893–897.
- Bertolazi, A.N., Fagnoules, S.C., Hoff, L.S., Pedro, V.D., Menna Barreto, S.S., Johns, M. W., 2009. Portuguese-language version of the Epworth sleepiness scale: validation for use in Brazil. *J. Bras. Pneumol.* 35, 877–883.
- Brand, S.R., Brennan, P.A., 2009. Impact of antenatal and postpartum maternal mental illness: how are the children? *Clin. Obstet. Gynecol.* 52, 441–455.
- Castro, M., Elias, P.C., Quidute, A.R., Halah, F.P., Moreira, A.C., 1999. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 878–882.
- Castro, M., Moreira, A.C., 2003. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367.
- Cheng, C.-Y., Pickler, R.H., 2010. Maternal psychological well-being and salivary cortisol in late pregnancy and early post-partum. *Stress Health* 26, 215–224.
- Chida, Y., Steptoe, A., 2009. Cortisol awakening response and psychosocial factors: a systematic review and meta-analysis. *Biol. Psychol.* 80, 265–278.
- Clow, A., Thorn, L., Evans, P., Hucklebridge, F., 2004. The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress* 7, 29–37.
- Cohen, J., 1988. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, New Jersey.
- Cohen, S., Kamarck, T., Mermelstein, R., 1983. A global measure of perceived stress. *J. Health Soc. Behav.* 24, 385–396.
- Corwin, E.J., Brownstead, J., Barlow, N., Heckard, S., Morin, K., 2005. The impact of fatigue on the development of postpartum depression. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* 34, 577–586.
- Cox, J.L., Holden, J.M., Sagovsky, R., 1987. Detection of postnatal depression. Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. *Br. J. Psychiatry* 150, 782–786.
- Cunha, J.A., 2001. *Manual da versão em português das Escalas de Beck*. São Paulo, Brazil, Casa do Psicólogo, pp. 11–13.
- da Silva, A.A., Simões, V.M., Barbieri, M.A., Cardoso, V.C., Alves, C.M., Thomaz, E.B., de Sousa Queiroz, R.C., Cavalli, R.C., Batista, R.F., Bettiol, H., 2014. A protocol to identify non-classical risk factors for preterm births: the Brazilian Ribeirão Preto and São Luís prenatal cohort (BRISA). *Reprod. Health* 11, 79.
- Davis, E.P., Glynn, L.M., Schetter, C.D., Hobel, C., Chicz-Demet, A., Sandman, C.A., 2007. Prenatal exposure to maternal depression and cortisol influences infant temperament. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 46, 737–746.
- de Figueiredo, E.P., Parada, A.P., Cardoso, V.C., Batista, R.F., da Silva, A.A., Barbieri, M. A., Cavalli, R.C., Bettiol, H., Del-Ben, C.M., 2014. Postpartum depression screening by telephone: a good alternative for public health and research. *Arch. Womens Ment. Health*.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Diod, M.S., Joels, M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 19, 269–301.
- Del-Ben, C.M., Vilela, J.A.A., Cipriani, J.A.S., Hallak, J.E.C., Lohate, C.M., Zuairi, A.W., 2001. Test-retest reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV – Clinical Version (SCID-CV) translated into Portuguese. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 23, 156–159.
- Edwards, S., Hucklebridge, F., Clow, A., Evans, P., 2003. Components of the diurnal cortisol cycle in relation to upper respiratory symptoms and perceived stress. *Psychosom. Med.* 65, 320–327.
- Ehlert, U., Patalla, H., Kirschbaum, C., Piedmont, E., Hellhammer, D.H., 1990. Postpartum blues: salivary cortisol and psychological factors. *J. Psychosom. Res.* 34, 319–325.
- Fan, F.L., Zou, Y.L., Ma, A.Q., Yue, Y.F., Mao, W.J., Ma, X.C., 2009. Hormonal changes and somatopsychologic manifestations in the first trimester of pregnancy and post partum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 105, 46–49.
- Figueiredo, E., Costa, R., 2009. Mother's stress, mood and emotional involvement with the infant: 3 months before and 3 months after childbirth. *Arch. Womens Ment. Health* 12, 143–153.
- First, M.B., Spitzer, R.L., Gibbon, M., Williams, J.B.W., 1997. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders – Clinician Version (SCID-CV)*. American Psychiatric Press Inc., Washington DC and London England.
- Gavin, N.I., Gaynes, B.N., Loh, K.N., Meltzer-Brody, S., Gartlehner, G., Swanson, T., 2005. Perinatal depression: a systematic review of prevalence and incidence. *Obstet. Gynecol.* 106, 1071–1083.
- Glynn, L.M., Davis, E.P., Sandman, C.A., 2013. New insights into the role of perinatal HPA-axis dysregulation in postpartum depression. *Neuropeptides* 47, 363–370.
- Groer, M.W., Morgan, K., 2007. Immune, health and endocrine characteristics of depressed postpartum mothers. *Psychoneuroendocrinology* 32, 133–139.
- Hamilton, M., 1960. A rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 23, 56–62.
- Hendrick, V., 2003. Treatment of postnatal depression. *BMJ* 327, 1003–1004.
- Johns, M.W., 1991. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14, 540–545.
- Joels, M., Karst, H., DeRijck, R., de Kloet, E.R., 2008. The coming out of the brain mineralocorticoid receptors. *Trends Neurosci.* 31, 1–7.
- Kalantiridou, S.N., Makrispanakis, A., Mastorakos, G., Chrousos, G.P., 2003. Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann. NY. Acad. Sci.* 997, 129–135.
- Kammerer, M., Taylor, A., Glover, V., 2006. The HPA axis and perinatal depression: a hypothesis. *Arch. Womens Ment. Health* 9, 187–196.
- Karlman, A.S., Friedman, E.M., Seeman, T.E., Stavitski, R.S., Almeida, D.M., 2013. Daytime trajectories of cortisol: demographic and socioeconomic differences – findings from the National Study of Daily Experiences. *Psychoneuroendocrinology* 38, 2585–2597.
- Kumari, M., Badrick, E., Chandola, T., Adler, N.E., Epe, F., Seeman, T., Kirschbaum, C., Marmot, M.G., 2010. Measures of social position and cortisol secretion in an aging population: findings from the Whitehall II study. *Psychosom. Med.* 72, 27–34.
- Kunz-Eckelt, S.R., Kirschbaum, C., Marmot, M., Steptoe, A., 2004. Differences in cortisol awakening response on work days and weekends in women and men from the Whitehall II cohort. *Psychoneuroendocrinology* 29, 510–528.
- Lamers, F., Vogelzangs, N., Merikangas, K.R., de Jonge, P., Beekman, A.T., Penninx, B. W., 2013. Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. *Mol. Psychiatry* 18, 692–698.
- Lighnan, S.L., Windle, R.J., Wood, S.A., Kershaw, Y.M., Slanks, N., Ingram, C.D., 2001. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog. Brain Res.* 133, 111–129.
- Magiakou, M.A., Mastorakos, G., Rabin, D., Dubbert, R., Gold, P.W., Chrousos, G.P., 1996. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone suppression during the postpartum period: implications for the increase in psychiatric manifestations at this time. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1912–1917.
- Magiakou, M.A., Mastorakos, G., Webster, E., Chrousos, G.P., 1997. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann. NY. Acad. Sci.* 816, 42–56.
- Mari, J.J., Williams, P., 1985. A comparison of the validity of two psychiatric screening questionnaires (GHQ-12 and SRQ-20) in Brazil, using Relative Operating Characteristic (ROC) analysis. *Psychol. Med.* 15, 651–659.
- Mastorakos, G., Ilias, L., 2003. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann. NY. Acad. Sci.* 997, 136–149.
- Okano, T., Nomura, J., 1992. Endocrine study of the maternity blues. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 16, 921–932.
- Pasante, C.M., 2004. Glucocorticoid receptor function in vitro in patients with major depression. *Stress* 7, 209–219.
- Pedersen, C.A., Stern, R.A., Pate, J., Senger, M.A., Bowes, W.A., Mason, G.A., 1993. Thyroid and adrenal measures during late pregnancy and the puerperium in women who have been major depressed or who become dysphoric postpartum. *J. Affect. Disord.* 29, 201–211.
- Pruessner, J.C., Wolf, O.T., Hellhammer, D.H., Buske-Kirschbaum, A., von Auer, K., Jobst, S., Kaspers, F., Kirschbaum, C., 1997. Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci.* 61, 2539–2549.
- Robertson, E., Grace, S., Wallington, T., Stewart, D.E., 2004. Antenatal risk factors for postpartum depression: a synthesis of recent literature. *Gen. Hosp. Psychiatry* 26, 289–295.
- Santos, I.S., Mattiasevich, A., Tavares, B.F., Barros, A.J., Botelho, L.P., Lapoli, C., Magalhães, P.V., Barbosa, A.P., Barros, F.C., 2007. Validation of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) in a sample of mothers from the 2004 Pelotas Birth Cohort Study. *Cad. Saude Publ.* 23, 2577–2588.
- Sil, A., Barr, C., 2012. Assessment of predictive ability of Epworth scoring in screening of patients with sleep apnoea. *J. Laryngol. Otol.* 126, 372–379.
- Silveira, D.X., Jorge, M.R., 1998. Propriedades psicométricas da escala de Rastreamento Populacional para Depressão (CES-D) em populações clínicas e não-clínicas de adolescentes e adultos jovens. *Rev. de Psiquiatr. Clin.* 25, 251–261.
- Skalkidou, A., Hellgren, C., Comasco, E., Sylven, S., Sundström Poromaa, I., 2012. Biological aspects of postpartum depression. *Womens Health* 8, 650–672.
- Stetler, C., Miller, G.E., 2005. Blunted cortisol response to awakening in mild to moderate depression: regulatory influences of sleep patterns and social contacts. *J. Abnorm. Psychol.* 114, 697–705.
- Stetler, C., Miller, G.E., 2011. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom. Med.* 73, 114–126.
- Taylor, A., Glover, V., Marks, M., Kammerer, M., 2009. Diurnal pattern of cortisol output in postnatal depression. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1184–1188.
- Vreeburg, S.A., Hoogendijk, W.J., van Elk, J., Derijk, R.H., Verhagen, J.C., van Dyck, R., Smit, J.H., Zitman, F.G., Penninx, B.W., 2009. Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 617–626.
- Weissman, M.M., Sholomskas, D., Pottenger, M., Prusoff, B.A., Locke, R.Z., 1977. Assessing depressive symptoms in five psychiatric populations: a validation study. *Am. J. Epidemiol.* 106, 203–214.
- Wilhelm, I., Born, J., Kudielka, B.M., Schlotz, W., Wust, S., 2007. Is the cortisol awakening rise a response to awakening? *Psychoneuroendocrinology* 32, 358–366.
- Wright, C.E., Steptoe, A., 2005. Subjective socioeconomic position, gender and cortisol responses to waking in an elderly population. *Psychoneuroendocrinology* 30, 582–590.
- Young, E.A., Carlson, N.E., Brown, M.B., 2001. Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. *Neuropsychopharmacology* 25, 267–276.