Laura Caroline Bastos

**Estudo da associação entre estresse materno
durante a gestação e o padrão de metilação em
sangue de cordão umbilical**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Psiquiatria
Orientadora: Prof^a Dra. Helena Paula Brentani

**São Paulo
2017**

Laura Caroline Bastos

**Estudo da associação entre estresse materno
durante a gestação e o padrão de metilação em
sangue de cordão umbilical**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Psiquiatria
Orientadora: Prof^a Dra. Helena Paula Brentani

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bastos, Laura Caroline

Estudo da associação entre estresse materno durante a gestação e o padrão de metilação em sangue de cordão umbilical / Laura Caroline Bastos. -- São Paulo, 2017.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Psiquiatria.

Orientadora: Helena Paula Brentani.

Descritores: 1.Estresse materno 2.Estresse intrauterino 3.Metilação de DNA 4.Cordão umbilical/irrigação sanguínea 5.Diferença entre sexo 6.Neurodesenvolvimento

USP/FM/DBD-391/17

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Kátia Braga, ao meu irmão Raphael Bastos e a minha irmãzinha Tetê pelo apoio e compreensão.

Agradeço a minha avó Laura Braga, pelo exemplo de fé, dedicação, carinho e ensinamentos até em seus últimos minutos de vida.

Agradeço às minhas tias, tio, primos e primas, mesmo morando a quilômetros de distância permanecem em meus pensamentos.

Agradeço a minha orientadora Dra. Helena Brentani, pelo aprendizado e exemplo de paciência.

Agradeço a professora Dra. Alexandra Brentani pela colaboração com o projeto e ensinamentos.

Agradeço à amiga Verônica Euclides, sempre atenciosa e gentil, soube esclarecer minhas dúvidas e me ajudar em diversas situações.

Agradeço a Mariana Maschietto e Ana Tahira pela colaboração na análise dos dados.

Agradeço aos médicos e enfermeiras do Centro Obstétrico do Hospital Universitário pela colaboração.

Agradeço ao Dr. Alísio Felipe-Silva, Dra Angélica Braz Simões, a querida Zuleide e todos os médicos e colaboradores da Anatomia Patológica do Hospital Universitário por compartilhar conhecimento durante o período de convívio.

Agradeço as minhas amigas do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto de Psiquiatria -

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aos meus amigos do Laboratório de Biologia de sistemas em psiquiatria (PsySiBio) pela ajuda, conhecimento e amizade.

Agradeço a Eliza e Isabel da pós-graduação do Instituto de Psiquiatria e ao professor Beny Lafer por serem sempre solícitos e atenciosos.

Agradeço a todos os professores que me acompanharam durante a vida, pois contribuíram muito para a minha formação.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Estresse.....	16
1.2. Exposição ao estresse intrauterino e suas consequências.....	17
1.3. Mecanismo biológico e a influência de fatores ambientais.....	19
1.4. Efeito do estresse intrauterino e relação entre os sexos.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Desenho do Estudo.....	25
4.2. Casuística.....	25
4.3. Questionário e levantamento dos dados.....	26
4.4. Avaliação da idade gestacional.....	26
4.5. Avaliação do recém-nascido.....	27
4.6. Medidas antropométricas dos recém-nascidos	28
4.7. Coleta de sangue de cordão umbilical.....	28
4.8. Extração de DNA.....	29

4.9. Metilação de DNA.....	30
4.10. Análise de dados.....	31
4.10.1. Dados.....	31
4.10.2. Controle de qualidade.....	32
4.10.3. Normalização.....	32
4.10.4. Correção de celularidade.....	32
4.10.5. Identificação de covariáveis.....	32
4.10.6. Análise de metilação diferencial.....	34
4.10.7. Análise referente aos grupos de acordo com a exposição ao estresse gestacional.....	34
4.10.7.1. Identificação de grupos de mães.....	34
4.10.7.2. Associação entre os resultados dos recém-nascidos e a metilação dos sítios CpGs.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Características da população estudada.....	36
5.2. <i>Clusters</i> A e B, e diferenças nos níveis de sítios CpGs do sangue de cordão umbilical dos recém-nascidos.....	42
5.3. Avaliação sexo específica.....	42
5.4. Associação entre metilação dos sítios CpGs e medidas antropométricas dos recém-nascidos..	44
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 - Classificação dos recém-nascidos de acordo com a Idade Gestacional.....	27
Figura 2 - Classificação dos recém-nascidos de acordo com o peso ao nascimento e a idade gestacional.....	28
Figura 3 - <i>Heatmap</i> refletindo <i>p-values</i> como calculado pelo SVD.....	33
Figura 4 - <i>Heatmap</i> demonstrando a matriz correlação de todas as variáveis maternas.....	38
Figura 5 - Gráfico de autovalor para o critério do teste de <i>scree</i>	40
Figura 6 - <i>Biplot</i> do CP1 e CP2 e perfis para o <i>Cluster A</i> e <i>Cluster B</i>	42

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1 - Características da coorte do estudo (n=96).....	37
Tabela 2 - Componentes principais e cargas dos componentes para cada variável materna.....	39
Tabela 3 - Variáveis maternas durante a gestação, os componentes principais e suas respectivas cargas.....	40
Tabela 4 - Características dos recém-nascidos de acordo com o cluster A e B (n=89).....	42
Tabela 5 - Relação da localização dos genes do <i>Cluster A</i> e <i>Cluster B</i>	43
Tabela 6 - Relação das CpGs, índice de perímetro cefálico para a idade e circunferência abdominal referente aos recém-nascidos dos do <i>Cluster A</i> e do <i>Cluster B</i>	45

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

%	Porcentagem
AIG	Adequado para a idade gestacional
APGAR	<i>Appearance, pulse, grimace, activity and respiration</i>
B	Beta
<i>BMIQ</i>	<i>Beta Mixture Quantile</i>
BNDF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
C	Citosina
CEP HU-USP	Comitê de Ética em Pesquisa - Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
CEP-FMUSP	Comitê de Ética em Pesquisa - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<i>ChAMP</i>	<i>Chip Analysis Methylation Pipeline</i>
CIUR	Crescimento intrauterino restrito
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COHU-USP	Centro Obstétrico do Hospital Universitário - Universidade de São Paulo
CpG	Dinucleótido Citosina-fosfato-Guanina
DMR	Região Diferencialmente Metiladas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>DOHaD</i>	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
DPP	Data prevista para o parto
DUM	Data da última menstruação
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
G	Grama
G	Guanina
GIG	Grande para a idade gestacional
HD	<i>High definition</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IG	Idade gestacional

<i>InfI</i>	<i>Infinium I</i>
<i>InfII</i>	<i>Infinium II</i>
INPD	Instituto Nacional de Psiquiatria do Desenvolvimento da Infância e da Adolescência
IPq-HCFMUSP	Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM 23	Laboratório de Psicopatologia e Terapêutica Psiquiátrica do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<i>MDS</i>	<i>Multidimensional scaling</i>
ml	Mililitro
<i>MVP</i>	<i>Methylation variable positions</i>
°C	Grau Celsius
pb	Pares de base
PIG	Pequeno para a idade gestacional
<i>RefSeq</i>	<i>Reference sequence</i>
RN	Recém-nascido
SCU	Sangue de cordão umbilical
<i>SNP</i>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>SVD</i>	<i>Singular value decomposition</i>
T	Metilado
<i>SWAN</i>	<i>Subset-quantile Within Array Normalization</i>
TCD4	Linfócitos TCD4
TCD8	Linfócitos TCD8
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
TDAH	Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
μl	Micro litro
USP	Universidade de São Paulo
<i>UTR</i>	<i>Untranslated region</i>

Nota: Algumas siglas foram mantidas na forma original, em inglês, por serem assim conhecidas internacionalmente.

Resumo

Bastos LC. *Estudo da associação entre estresse materno durante a gestação e o padrão de metilação em sangue de cordão umbilical* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Exposição a fatores ambientais e estresse durante o período intrauterino estão associados com alterações da trajetória do neurodesenvolvimento de forma sexo-dependente. Mecanismos epigenéticos estão envolvidos a esta associação. **OBJETIVOS:** Analisar de acordo com a exposição ao estresse na gestação o impacto do sexo e de alterações de metilação do DNA no sangue de cordão umbilical nas medidas antropométricas do neonato. **MÉTODOS:** Foram recrutadas 94 gestantes e aplicados questionários de medidas exposição ao estresse e fatores de risco durante a gravidez. A coleta de sangue do cordão umbilical seguiu protocolo padronizado. Para analisar o estresse foi utilizada análise de componentes principais (ACP) dos fatores de exposição avaliados: status socioeconômico, educação, ganho de peso, índice de massa corporal pré-gravídico, presença de doença psiquiátrica, estresse psicossocial durante a gravidez. Após o ACP fizemos análise de agrupamento por *K-means*. As análises de metilação foram realizadas utilizando *Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip*. Os dados foram analisados pelos pacotes *Minfi* e *ChAMP (Chip Analysis Methylation Pipeline)*. A partir das posições diferencialmente metiladas (PDMs) foi feita análise de enriquecimento de processos biológicos com a ferramenta *WebGestalt*. Para avaliar impacto do sexo e alterações de metilação no desfecho antropométrico do neonato usamos modelos de análise linear de regressão múltipla. **RESULTADOS:** A coorte final para a avaliação do estresse foi composta por 89 pares mãe/recém-nascidos, sendo 50 meninas e 39 meninos. A ACP mostrou que os primeiros 3 componentes explicaram 60% da variabilidade da amostra. Sendo o primeiro componente (CP1) estresse psíquico, o segundo CP estresse social e o CP3 exposição a tóxicos. O *biplot* dos primeiros

dois componentes sugeriu a separação das mães em dois grupos, confirmados pela análise de agrupamentos. Usando o ponto de corte de p -valor $<0,01$ e $\Delta\beta$ -valor $>5\%$, encontramos 110 posições PDMs entre os grupos e restringindo este valor para p -valor $<0,01$ e $\Delta\beta$ -valor $>10\%$ encontramos 13 PDMs. Usando apenas as crianças adequadas para idade gestacional fizemos análise de metilação diferencial entre os sexos. Foram encontradas 426 PDMs. Nenhuma das 13 PDMs encontradas entre os dois grupos pertenciam ao conjunto das PDMs entre sexos. No modelo de regressão linear multivariada controlando para sexo da criança e idade da mãe não encontramos nenhuma PDM associada aos desfechos antropométricos do neonato. Na análise estratificada por grupos os sítios cg24702040 (*MAP3K21*), cg21550016 (*PAX8*) foram estatisticamente significantes para perímetro abdominal e cg18706028 (*CCKBR*) e cg21550016 (*PAX8*) foram estatisticamente significantes para índice do perímetro cefálico para a idade. Este estudo sugere que o estresse materno independente do sexo pode afetar o crescimento fetal, mediado por respostas epigenéticas em genes relacionados à resposta ao estresse, regulação negativa da via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico, biogênese da sinapse e processo apoptótico.

Descritores: estresse materno; estresse intrauterino; metilação de DNA; cordão umbilical/irrigação sanguínea; diferença entre sexo; neurodesenvolvimento.

Abstract

Bastos LC. *Study of the association between maternal stress during pregnancy and the methylation pattern in umbilical cord blood* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

BACKGROUND: Exposure to environmental factors and stress during the intrauterine period are associated with changes in the neurodevelopmental trajectory in a sex-dependent manner. Epigenetic mechanisms are involved in this association. **OBJECTIVES:** Analyze according to exposure to stress during pregnancy the impact of sex and DNA methylation alterations on umbilical cord blood in the anthropometric measurements of the neonate **METHODS:** A total of 94 pregnant women were recruited and questionnaires were used to measure stress exposure and risk factors during pregnancy. Umbilical cord blood collection followed a standardized protocol. In order to analyze the stress, the principal components analysis (PCA) of the exposure factors evaluated were: socioeconomic status, education, weight gain, pre-gravid body mass index, presence of psychiatric illness, and psychosocial stress during pregnancy. After the PCA we did group analysis by k-means. Methylation analyzes were performed using Illumina Infinium Human Methylation 450 (450K) BeadChip. The data were analyzed by the Minfi and ChAMP (Chip Analysis Methylation Pipeline) packages. From the differentially methylated positions (DMPs) was made analysis of enrichment of biological processes with the tool WebGestalt. To evaluate gender impact and methylation alterations in the neonatal anthropometric outcome we used multiple regression linear analysis models. **RESULTS:** The final cohort for the evaluation of stress was composed of 89 mother/newborn pairs, being 50 girls and 39 boys. The PCA showed that the first 3 components accounted for 60% of the variability of the sample. Being the first component (PC1) psychic stress, the second PC social stress and PC3 exposure to toxic. The biplot of the first two

components suggested the separation of the mothers into two groups, confirmed by cluster analysis. Using the cutoff point of p -value <0.01 and $\Delta\beta$ -value $> 5\%$, we found 110 DMPs between the groups and restricting this value to p -value <0.01 and $\Delta\beta$ -value $>10\%$ we found 13 DMPs. Using only children suitable for gestational age we did differential methylation analysis between genders. There were 426 DMPs found. None of the 13 DMPs found between the two groups belonged to the pool of DMPs between the sexes. In the multivariate linear regression model controlling for child sex and age of the mother we did not find any DMP associated with the anthropometric outcomes of the neonate. In group-stratified analysis the cg24702040 (*MAP3K21*), cg21550016 (*PAX8*) sites were statistically significant for abdominal perimeter and cg18706028 (*CCKBR*) and cg21550016 (*PAX8*) were statistically significant for head cephalic circumference for age. This study suggests that maternal stress independent of sex can affect fetal growth, mediated by epigenetic responses in genes related to stress response, negative regulation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway, biogenesis of the synapse and apoptotic process

Descriptors: maternal stress; intrauterine stress; ADN methylation; umbilical cord/blood irrigation; difference between sex; neurodevelopment.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

As primeiras referências ao conceito de homeostase provêm dos filósofos gregos e dos médicos, em particular, Hipócrates (Chrousos, 1992), após os trabalhos do fisiologista Cannon, formulou-se o conceito de homeostase, a reação de estresse passou a ser compreendida enquanto um fenômeno relacionado à interação corpo-cérebro (Oliveira, 2006). O termo estresse advém da Física e, nesse campo de conhecimento, tem como sentido o grau de deformidade que uma estrutura sofre quando é submetida a um esforço (Monk et al., 2012), é uma manifestação normal do funcionamento do corpo e uma consequência do ato de viver (Seyle, 1973). O estresse foi definido como qualquer evento que demanda do ambiente externo ou interno e que estipule ou exceda a capacidade de adaptação de um indivíduo ou sistema social (Eysenck, 1985). De acordo com Chamon, 2006, é o conjunto de percepções de impotência e mal-estar que invadem o indivíduo diante de eventos difíceis de controlar, uma reação complexa do organismo, envolvendo componentes físicos e/ou psicológicos, mentais e hormonais, causados por alterações psicofisiológicas que ocorrem no momento em que o indivíduo se confronta com uma situação que cause temor, irritação, confusão, excitação, seja desconhecida ou, até mesmo, provoque felicidade (Lipp and Tanganelli, 2002).

Embora cada pessoa reaja de maneira singular, o estresse constitui um processo que envolve a totalidade do organismo. Um evento estressor estimula o hipotálamo e desencadeia um mecanismo de resposta hormonal. Seja físico ou neurogênico, o estresse é capaz de provocar um aumento acentuado na secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adeno-hipófise, ao qual se segue um significativo aumento na secreção adrenal de cortisol, a liberação de ACTH, adrenalina, noradrenalina e cortisol formando um sistema de retroalimentação, responsável pelas alterações psicofisiológicas que acontecem no animal ou no homem submetido a um estressor, em última instância, a rápida liberação de cortisol e os efeitos metabólicos decorrentes visam a amenizar os

efeitos nocivos do estado de estresse (Guyton A. C., 2011). O estresse excessivo assim como o estresse crônico, tem sido considerado um dos principais problemas do mundo moderno e tema de interesse da Organização Mundial da Saúde (OMS), pode interferir na qualidade de vida do ser humano, levando-o a uma série de prejuízos (Lipp and Tanganelli, 2002), e podendo provocar mudanças deletérias específicas no organismo humano, como por exemplo, transtornos de humor, síndrome de Burnout, alterações permanentes na memória, supressão do sistema imunológico, distúrbios cardiovasculares e metabólicos.

Uma das dificuldades em se trabalhar com o conceito de estresse é que somos confrontados com um conceito composto e multidimensional, ou seja, depende do indivíduo acometido e sua reatividade, dependente de diferentes variáveis de estresse (Levine and Ursin, 1991), como social, psicológico, físico, além do momento como duração em que o mesmo ocorre .

1.2. Exposição ao estresse intrauterino e suas consequências

O estresse psicossocial na gravidez foi definido como o desequilíbrio que uma mulher grávida sente quando não consegue lidar com demandas que dão origem à experiência do estresse, que é expressa de forma comportamental e fisiológica (Ruiz and Fullerton, 1999). A influência da exposição ambiental durante o desenvolvimento intrauterino na saúde ao longo da vida constitui a “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença” (*DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease*), a mesma propõe que adaptações fetais às condições intrauterinas e maternas durante o desenvolvimento modelam a estrutura e função dos diferentes tecidos do organismo, influenciando a sobrevivência fetal, crescimento, tamanho, composição do corpo, e função de vários sistemas (Swanson et al., 2009). Exposição fetal aos sinais maternos de estresse exerce uma influência significativa sobre a trajetória do desenvolvimento fetal (Sandman et al., 2012), efeitos

negativos do estresse materno sobre o feto têm sido documentados em animais e seres humanos, e envolvem desde problemas no parto a impactos negativos sobre o neurodesenvolvimento, bem como, em longo prazo, distúrbios psiquiátricos, alterações hormonais e metabólicas no indivíduo adulto (Emack et al., 2008; Kanaka-Gantenbein, 2010; Lazinski et al., 2008). O sofrimento materno na gravidez aumenta o risco de asma para a criança (Guxens et al., 2014) e os eventos adversos da vida na gravidez aumentam o risco de doenças atópicas (Hartwig et al., 2014). Baixo peso ao nascer ($\leq 2.500\text{g}$), parto prematuro, baixo peso materno, desnutrição materna e retardo de crescimento intrauterino (RCIU) têm sido relacionados a um risco aumentado de transtornos neuropsiquiátricos ao longo da vida (Johnson and Schoeni, 2011; Lund et al., 2012; Mu et al., 2012) (Dunkel Schetter, 2011; Gluckman et al., 2007, 2008; Tegethoff et al., 2010). Peso elevado ao nascimento ($\geq 4.500\text{g}$), obesidade materna, ganho de peso excessivo durante a gravidez e diabetes gestacional estão associados a risco aumentado para obesidade e para os tipos de câncer mais prevalentes na vida adulta (Michels and Xue, 2006; Stuebe et al., 2009).

. Além dos fatores biológicos estabelecidos, depressão, ansiedade e estresse percebido podem contribuir para nascimentos prematuros, ativando vias diferentes no processo de neurodesenvolvimento (Sloan and Barres, 2014). Diversos estudos de coorte e epidemiológicos revelaram associações entre estresse psicossocial materno e risco de esquizofrenia (Khashan et al., 2008; MacDonald and Schulz, 2009; Mittal et al., 2008; Tandon et al., 2008), depressão, transtorno bipolar e comportamento suicida (D'Addario et al., 2012; Fuchikami et al., 2011; Keller et al., 2010; Kim et al., 2013; Perroud et al., 2008).

1.3. Mecanismo biológico e a influência de fatores ambientais

O marcador epigenético mais bem estudado em mamíferos é a metilação das citosinas do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Bird, 2002; Illingworth and Bird, 2009; Wilson et al., 2007). Modificações epigenéticas, em particular na metilação do DNA, e subsequentes efeitos nos genes alvo, alterando a expressão, são potenciais mecanismos ligando o ambiente pré-natal adverso a um comportamento resultante (Bale, 2009; Burdge and Lillycrop, 2010; Gluckman et al., 2008; Waterland and Jirtle, 2003). Após a fertilização ocorre desmetilação de cerca de 80% do genoma (Goldberg et al., 2007), o epigenótipo, e consequentemente o fenótipo, é induzido de novo em cada geração através de interações com o fenótipo materno e o ambiente durante a gravidez (Burdge et al., 2011). Padrões epigenéticos somáticos precisam ser “reprogramados” em células germinativas e em embriões (Hochberg et al., 2011), e os mecanismos epigenéticos seriam um meio pelo qual o ambiente influenciaria ou “programaria” a expressão gênica durante o desenvolvimento (Borrelli et al., 2008; Franklin and Mansuy, 2010; Sweatt, 2009). A metilação do DNA é a adição covalente de um grupo metil na posição 5 de uma citosina (C), quando este precede uma guanina (G), formando um sítio CpG (Citosina-fosfato de ligação Guanina). Há cerca de 28 milhões de sítios CpG no genoma humano. A região promotora de aproximadamente 60% dos genes humanos possui trechos com alto conteúdo CpG, denominados “ilhas CpG” (Ching et al., 2005; Illingworth and Bird, 2009; Shen et al., 2007). Dependendo da região cromossômica, tipo de célula, estágio de desenvolvimento, alelos de origem, um sítio CpG pode ser metilado, não-metilado ou hemimetilado. A metilação do DNA está envolvida na regulação da repressão da transcrição e silenciamento de genes na maioria das vezes. Juntamente com outros mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA seria como um "interruptor" que liga ou desliga o funcionamento de genes relevantes em resposta a alterações do ambiente interno e ou externo, um mecanismo que é crucial para o desenvolvimento, diferenciação e homeostase (Deaton and Bird, 2011).

O padrão de metilação do DNA é altamente dinâmico em neurônios durante o desenvolvimento e na idade adulta. Evidências mostram que alterações epigenéticas durante o neurodesenvolvimento estão relacionadas à sensibilidade ao estresse (Feder et al., 2009; Meaney and Szyf, 2005) e desempenham um papel crítico no condicionamento da memória e do medo condicionado (Levenson et al., 2006; Miller and Sweatt, 2007; Tsankova et al., 2007). Processos epigenéticos são potencialmente reversíveis, diferente de alterações genéticas, e são consequentemente passíveis de tratamento (Yang et al., 2010). Tem sido bem caracterizado em seres humanos que a exposição a agentes prejudiciais externos, como tabagismo, mercúrio e arsênico durante a gestação induziu alterações epigenéticas em recém-nascidos (Bouwland-Both et al., 2015; Cardenas et al., 2015; Ivorra et al., 2015). Diferentes estudos propõem que mecanismos epigenéticos, principalmente de metilação do DNA fazem a mediação entre exposição a fatores de risco ambientais e desfechos psiquiátricos ao longo da vida (James et al., 2010; Steegers-Theunissen et al., 2009; Zeisel, 2008). Como mencionado anteriormente a exposição ao estresse durante a vida intrauterina pode influenciar a "fisiologia e comportamento do indivíduo devido à alta vulnerabilidade aos insultos. As evidências epidemiológicas mostraram que a exposição a fatores ambientais durante a vida fetal tem impacto no eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HPA) (Weinstock, 2015) e capacidade de resposta do sistema imunológico, com a exposição ao estresse aumentando o risco de desenvolver doenças crônicas (Barker and Osmond, 1986; Monk et al., 2012). Em vários casos estudos de epigenética fazem a mediação desta associação. Isso inclui abuso de drogas/álcool (A. Chakraborty et al., 2015; Ouellet-Morin et al., 2011), tabagismo (Lee and Pausova, 2013), atividade física (McCullough et al., 2015), contaminação tóxica (Guerrero-Preston et al., 2010), depressão materna, ansiedade e estresse emocional (Palma-Gudiel et al., 2015). Por exemplo, o estresse psicossocial pré-natal está associado à prematuridade, baixo peso ao nascer, aumento do risco de aumento da adiposidade e comprometimento do desenvolvimento

neurológico, predisposição ao desenvolvimento do autismo, depressão e esquizofrenia (Fineberg et al., 2016; O'Donnell and Meaney, 2016).

1.4. Efeito do estresse intrauterino e relação entre os sexos

A maioria das doenças *DOHaD* tem uma susceptibilidade sexo dependente (Intapad et al., 2013). A vulnerabilidade a exposição ao estresse durante o desenvolvimento do cérebro é diferente entre os sexos. Há evidências de que os meninos manifestam alterações de comportamento em idade precoce decorrentes da exposição ao estresse mais no início da gestação (Gerardin et al., 2011), enquanto as meninas exibem efeitos em períodos posteriores da vida e mais associados com exposição gestacional ao estresse mais tardio (Sandman et al., 2012). Tais diferenças comportamentais induzidas pelo estresse específicas do sexo são acompanhadas por diferenças nas estruturas cerebrais específicas, como a amígdala, onde as meninas mostram um aumento de volume em comparação com meninos (Sandman et al., 2012). Desta forma a exposição ao estresse pode contribuir para diferença de prevalência quanto aos transtornos psiquiátricos entre sexos: mulheres têm taxas mais elevadas de depressão, ansiedade e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) em comparação aos homens (Beck et al., 1988; Macmillan et al., 2001; Pitzer and Fingerman, 2010). Em contraste, os homens parecem mais vulneráveis ao desenvolvimento de esquizofrenia, autismo e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Van Os and Selten, 1998).

Ainda hoje não há um consenso claro da relação entre dimorfismo sexual, exposição a variáveis de estresse na gestação e alterações de desfechos antropométricos neonatais e ao longo da vida (Radulescu et al., 2013). Na tentativa de melhor entender esta relação fizemos um primeiro trabalho (Maschietto et al., 2017) buscando diferença de metilação no sangue de cordão entre meninos e meninas, e controlamos as variáveis de exposição ao estresse gestacional.

Foram analisados 39 meninas e 32 meninos nascidos a termo e com peso adequado a idade gestacional e variáveis de exposição ao estresse foram corrigidas se necessário. O DNA convertido com bissulfito foi hibridizado com *Illumina HumanMethylation450 BeadChips*, excluindo sondas dos cromossomos X e Y, havia 2.332 sítios CpG diferencialmente metilados (DMSs) entre sexos, que foram enriquecidos em módulos cerebrais de CpGs co-metilados durante o desenvolvimento cerebral e também diferencialmente metilados no cérebro de meninos e meninas. A comparação entre os sexos identificou 2.332 sítios CpG diferencialmente metilados (DMSs) com 1.499 sítios CpG associados para 1.113 genes. As meninas tiveram o dobro do número de sítios CpGs metilados do que os meninos, $\text{adj} < 0,05$, 1.546 e 786 CpG, respectivamente, com uma distribuição não aleatória no genoma. Os sítios de CpG com mais frequência metilados nas meninas foram mais frequentemente localizados perto dos sítios de início da transcrição (TSS1500) e dentro das ilhas CpG, *S_shores* e *S_shelves*. Por outro lado, os sítios de CpG mais frequentemente metilados em meninos foram enriquecidos em corpos de genes e 3'UTR, e foram associados a áreas do *open sea*. Os genes associados aos DMSs foram enriquecidos para distúrbios do desenvolvimento neurológico, particularmente para os sítios de CpG encontrados diferencialmente metilados no tecido cerebral entre pacientes com esquizofrenia e controles. No intuito de separarmos sítios relacionados ao dimorfismo sexual e a exposição a estresse comparamos os sítios diferencialmente metilados do nosso trabalho com a coorte de CHAMACOS submetida a estresse tóxico (exposição a pesticidas) (Yousefi et al., 2015). Comparando ambos os dados, encontramos 890 sítios CpG sobrepostos, com nossas diferenças de metilação (delta-beta) menores do que as por eles encontradas, sugerindo que a exposição ao estresse poderia aumentar essas diferenças. Este estudo sugere que existem diferenças de metilação no sangue de cordão umbilical com possível associação a genes específicos relacionados ao dimorfismo sexual, somente relacionadas à exposição ao estresse e genes que parecem ter um efeito aditivo destes fatores.

2. JUSTIFICATIVA

Alterações induzidas pelo ambiente mediadas por mecanismos epigenéticos que afetam a programação durante o desenvolvimento da gestação podem ter efeito na programação do crescimento e desenvolvimento fetal, desfechos do parto assim como ao longo da vida. Alterações epigenéticas causadas por fatores ambientais se refletem em padrões diferenciais de expressão gênica e metilação do DNA em sangue do cordão umbilical (SCU) (Schlinzig et al., 2009; Wilhelm-Benartzi et al., 2012). A coleta de sangue de cordão acarreta riscos mínimos para a mãe e o recém-nascido (RN) e vários estudos têm sido realizados com sangue de cordão umbilical para avaliar associação do perfil de metilação de genes e fatores de risco de exposição ao estresse (Yousefi et al., 2015). Porém a maioria destes estudos realiza avaliação de um tipo específico de estresse, por exemplo, exposição à nicotina, ou dieta rica em gordura e não apresenta uma visão multidimensional da exposição ao estresse. Além disso, não encontramos outro estudo que propõe avaliar interferência de diferença de sítios de metilação em desfechos do neonato excluindo sítios diferencialmente metilados associados ao dimorfismo sexual.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Buscar diferenças de sítios de metilação do DNA em sangue de cordão umbilical em neonatos de acordo com a exposição materna a fatores de estresse gestacional e verificar a interferência dos sítios diferencialmente metilados em medidas antropométricas do neonato.

3.2. Objetivos Específicos

- Buscar componentes principais de exposição ao estresse gestacional a partir de medidas de fatores de risco gestacional ao crescimento fetal;
- Identificar e validar possíveis grupos de RN de acordo com os componentes principais de exposição ao estresse gestacional;
- Buscar sítios diferencialmente metilados em SCU de recém-nascidos adequados para a idade gestacional e de termo entre meninos e meninas;
- Buscar sítios diferencialmente metilados em SCU de recém-nascidos entre os grupos de RN formados de acordo com exposição ao estresse intraútero excluindo a metilação diferencial associada ao dimorfismo sexual e
- Avaliar impacto dos sítios diferencialmente metilados em medidas de crescimento fetal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

O estudo utiliza o desenho de corte transversal. As gestantes foram recrutadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). O material biológico coletado no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (COHU-USP) foi processado no LIM23 (Laboratório de Psicopatologia e Terapêutica Psiquiátrica do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e o experimento de metilação de DNA foi realizado em serviço terceirizado, Deoxi Biotecnologia Ltda. A análise dos dados foi realizada no Laboratório de Biologia de sistemas em psiquiatria (PsySiBio) da professora Dr.^a Helena Brentani, localizado no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-HCFMUSP). O presente estudo segue as Boas Práticas Clínicas e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP: 512/15 CAAE: 51521715.3.0000.0065).

4.2. Casuística

Convidamos para este projeto parturientes internadas no pré-parto do COHU-USP, localizado na região oeste da cidade de São Paulo/SP, período de março a dezembro de 2012, as entrevistas e coletas aconteceram habitualmente das 8 horas às 18 horas, durante três dias semanais. Critérios de inclusão: todas as parturientes concordantes em participar do projeto e com a devida assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou responsável legal quando menor de idade. Critérios de exclusão: RN com síndrome genética detectada durante a gestação ou estabelecida ao nascimento, e por segurança dos envolvidos no projeto, casos de detecção prévia de

Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e hepatite C.

4.3. Questionário e levantamento dos dados

O questionário utilizado para o estudo foi uma composição dos questionários utilizados no projeto do Instituto Nacional de Psiquiatria do Desenvolvimento da Infância e da Adolescência (INPD) e do projeto “*Avaliação do impacto do Programa de saúde da família no desenvolvimento da criança*”. Utilizamos perguntas relacionadas a fatores adversos e protetores durante a gestação: (a) ganho de peso materno durante a gestação, (b) medidas de peso e altura pré-gravídico, (c) consumo de cigarros, (d) abuso drogas/álcool durante a gravidez (e) presença de transtornos psiquiátricos (conferido através de uso de medicamentos controlada, diagnóstico de transtornos psiquiátricos, relato de sentimentos negativos e de conflito), (f) estresse psicossocial (verificado através da violência verbal, física, sexual, acidente moto/carro, perda de emprego, morte na família), (g) nível educacional e (h) renda familiar durante a gestação.

A aplicação do questionário foi realizada por duas pesquisadoras treinadas, sendo uma delas a executante deste projeto. Os questionários foram respondidos pelas puérperas durante o período de internação, no COHU-USP ou no Alojamento Conjunto (AC HU-USP) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) de acordo com a disponibilidade das mães e ausência de outros indivíduos, mantendo a privacidade das participantes do projeto. Dados complementares como registro das informações sobre o parto e das condições de nascimento dos RNs foram obtidos através de banco de dados do HU-USP.

4.4. Avaliação da idade gestacional

Para caracterizar a idade gestacional do RN foram consideradas a Data da Última

Menstruação (DUM) e a Data Provável do Parto (DPP). A idade gestacional (IG) é o tempo transcorrido desde a concepção até o momento do nascimento, corresponde à duração da gestação, o tempo em semanas e dias completos. Por métodos clínicos é impossível determinar o momento da concepção, podendo ser inferido de forma indireta a partir da DUM ou DPP. Através de um cálculo utilizando como base a DUM é obtida a DPP. A gestação humana dura em média 40 semanas, a DPP é 40 semanas após a DUM. Considera-se período provável do parto de duas semanas antes (-14 dias) a duas semanas depois (+14 dias) da DPP, ou seja, da 38ª a 42ª semana como saudável.

Na chegada da parturiente ao HU-USP foi realizada pelo obstetra uma anamnese, onde foram obtidas informações utilizadas para o cálculo aproximado da IG, estimada pela média das idades calculadas a partir da DUM, DPP e quando a paciente apresentava exames de ultrassonografia, estes foram utilizados pelos médicos para aumentar a precisão da IG. O método utilizado para obter a IG permite classificar os RNs conforme Figura 1.

Nomenclatura	Semanas de gestação
Pré-termo	Idade gestacional inferior à 37 semanas
Termo	Idade gestacional entre 37 e 41 semanas e 6 dias
Pós-termo	Idade gestacional igual ou maior 42 semanas

FONTE: Ministério da Saúde, 2002

Figura 1. Classificação dos recém-nascidos de acordo com a Idade Gestacional

4.5. Avaliação do recém-nascido

Em todos os casos, como procedimento do HU-USP, logo após o nascimento ainda na sala de parto, realizou-se pelo pediatra o primeiro exame físico no RN, foi aplicado o método de Capurro e Escala de APGAR.

O método de Capurro é uma maneira de se avaliar a idade gestacional de um neonato, este método funciona avaliando cinco parâmetros somáticos e dois neurológicos, o resultado é obtido através da soma dos parâmetros e expresso em dias. A Escala de APGAR consiste na avaliação de cinco sinais objetivos do RN realizada no primeiro, no quinto e no décimo minuto após o nascimento, atribuindo-se a cada um dos sinais uma pontuação de 0 a 10, sendo utilizado para avaliar as condições dos recém-nascidos. Podemos classificar o recém-nascido segundo o seu crescimento intrauterino Figura 2.

Classificação	Percentil na curva de referência
PIG - RN pequeno para IG	< percentil 10
AIG - RN adequado para IG	percentil 10 a 90
GIG -RN grande para IG	> percentil 90

FONTE: SBP, 2009

Figura 2. Classificação dos recém-nascidos de acordo com o peso ao nascimento e a idade gestacional

4.6. Medidas antropométricas dos recém-nascidos

Os valores (*z-score*) dos parâmetros de crescimento do recém-nascido basearam-se nos padrões de crescimento da Organização Mundial da Saúde (OMS) (De Onis, 2006; WHO, 1995; World Health Organisation (WHO), 1995).

4.7. Coleta de sangue de cordão umbilical

O material biológico coletado no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CO HU-USP) foi obtido através de punção venosa do cordão umbilical,

de maneira não ordenhada, da parte proximal ao RN e o mais distante da placenta, evitando a contaminação com o sangue materno. Dois tubos *Vacutainer* de 5mL contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), devidamente identificados foram armazenados em geladeira localizada no próprio COHU-USP. As amostras foram mantidas em geladeira pelo prazo máximo de cinco dias após a data da coleta, aguardando o transporte para o LIM 23, localizado no IPq-HCFMUSP, onde realizou-se o procedimento de extração de DNA. Para garantir a qualidade do material, a segurança dos pesquisadores e da sociedade, o transporte do material biológico aconteceu de acordo com as normas nacionais vigentes.

4.8. Extração de DNA

Para obter DNA a partir do SCU utilizou-se o kit de extração *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN), conforme o protocolo do fabricante. Através da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro *NanoDrop® ND1000* (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*), utilizando 2µl de cada amostra para a quantificação, obtivemos a quantificação e análise de pureza do DNA. Verificou-se a integridade através de eletroforese, em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio. As amostras diluídas a 100ng/µl e um marcador de 100pb foram aplicados juntamente com o *Loading Buffer* no gel de agarose por aproximadamente 40 minutos (Waltrick-Zambuzzi et al., 2012).

O DNA manteve-se armazenado em freezer a -80°C no LIM 23 até ser enviado para Empresa Deoxi Biotecnologia Ltda, localizada na cidade de Araçatuba/SP. O material biológico foi transportado pela empresa especializada, OCASA Soluções Logísticas, obedecendo às normas do fabricante e as leis vigentes. As amostras permaneceram congeladas até o seu destino final.

4.9. Metilação de DNA

No laboratório Deoxi Biotecnologia Ltda, ocorreu o procedimento de avaliação da metilação global, foram utilizados 500ng de DNA, as amostras de DNA de SCU passaram pelo tratamento com Bissulfito de Sódio utilizando o *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo), este realiza a conversão de bases citosina não-metiladas em uracila enquanto as bases citosina metiladas permanecem inalteradas. O DNA bissulfito convertido foi desnaturado, neutralizado e amplificado em uma PCR (Reação em cadeia de polimerase) isotérmica, por aproximadamente 16 horas, com perfil de incubação de 16 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 60 minutos e um passo final de realização de 4°C durante 10 minutos. O produto amplificado foi fragmentado por um processo de hidrólise enzimática para evitar o excesso de fragmentação da amostra. Após uma precipitação com isopropanol, o DNA fragmentado foi recolhido por centrifugação à 4°C e resuspenso em tampão para hibridização.

As amostras de DNA fragmentadas e em resuspensão foram dispensadas nas lâminas do ensaio utilizando o *Illumina Infinium HumanMethylation450 (450K)*. Para o ensaio *Infinium I (InfI)* (135.501 sondas), dois tipos de sondas correspondem a cada locus CpG, um corresponde ao metilado (C) e outro ao não-metilado (T). Para o ensaio *Infinium II (InfII)* (350.076 sondas), utiliza um único tipo de sonda que complementa a base anterior do sítio em questão e a adição de uma base é marcada com um fluoróforo (Dedeurwaerder et al., 2014).

O ensaio de metilação foi realizado em 4µl de DNA convertido em cada lâmina são inseridas doze amostras, por distribuição aleatória com objetivo de evitar efeitos de lote e localização, totalizando 4 (quatro) lâminas. Estas foram incubadas *overnight* durante 20 horas à 37°C, no *Illumina Hybridization Oven (Illumina Inc.)*. As lâminas foram inseridas no *Scanner iScan Microarray (Illumina Inc.)* usando um *laser* para excitar o fluoróforo do produto de extensão de uma base única nas sondas digitalizou o *BeadChip*. Essa extensão de base única incorpora

marcadores detectáveis utilizando o DNA capturado como modelo e determina o nível de metilação dos CpGs. O *scanner* registrou imagens de alta resolução da luz emitida a partir dos fluoróforos. Foram gerados arquivos *IDAT* que contém os dados brutos, verde e vermelho em separado, e que foram usados para as análises posteriores. A intensidade desses fluoróforos, com a cor verde para metilado e vermelho para não-metilado, que permite calcular a quantidade de sondas metiladas e não-metiladas (Bibikova et al., 2011; Dedeurwaerder et al., 2014; Touleimat and Tost, 2012). Os níveis de metilação para cada sonda CpG foram fornecidos em valores beta (0 indicando CpGs não metilados e 1, CpG totalmente metilados). Todas as análises foram realizadas em ambiente R usando pacotes Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

4.10. Análise de dados

As sondas foram anotadas de acordo com os genes mais próximos usando o pacote *FDdb.InfiniumMethylation.hg19* com uma anotação adicional para as sondas localizadas em mais de um gene, as coordenadas Hg19 da UCSC foram selecionadas. Isso resultou em 20.461 genes únicos. Os dados foram analisados utilizando o pacote *RnBeads* que integra etapas de controle de qualidade, normalização, identificação de covariáveis e análises de diferença de metilação (Assenov et al., 2014).

4.10.1. Dados

Os dados brutos foram extraídos pelo *scanner iScan SQ (Illumina)* usando o *software GenomeStudio* (v.2011.1), com o módulo de metilação v.1.9.0 (*Illumina*), nos arquivos *IDAT*, que foram utilizados para análises adicionais.

4.10.2. Controle de qualidade

Medições não confiáveis foram identificadas usando *GreedyCut* ($p > 0,05$) que removeu 1.478 sondas. Também foram excluídas as sondas localizadas em SNPs ($n=4.776$), bem como as localizadas em contextos específicos ($n=5.926$ - sítios não CpG, bem como SNPs adicionais). As amostras foram retidas apenas se $> 99\%$ dos sítios testados tiveram detecção $p > 0,05$.

4.10.3. Normalização

Os arquivos de dados brutos foram normalizados usando *FunNorm* (Oros Klein et al., 2015).

4.10.4. Correção de celularidade

Para quantificar as diferenças de metilação resultantes da composição celular foi utilizado o conjunto de dados de sangue de cordão (Bakulski et al., 2016), conforme implementado em *Minfi* (Aryee et al., 2014).

4.10.5. Identificação de covariáveis

As covariáveis podem ser técnicas ou biológicas, e podem ser corrigidas em relação ao grupo de estudo.. Para as covariáveis técnicas e biológicas utilizamos pacote *SVA* (Leek et al., 2012) que usa a função *ComBat* com base num *framework* empírico *Bayesiano* para deconvoluir uma nova matriz de valores. As amostras foram corrigidas para diferenças de celularidade e diferentes lotes de *laminas* ($p=2.01e^{-3}$, teste de *Kruskal-Wallis*) em relação às variáveis técnicas.

Figura 3. Heatmap refletindo *p-values* como calculado pelo SVD

O bloco mais escuro significa uma correlação mais forte entre componentes e variáveis deconvoluídos. A: antes e B: após a correção dos efeitos do lote (*slide*)

4.10.6. Análise de metilação diferencial

Para identificar sítios CpG diferencialmente metilados (DMSs), os valores M (*logit*: $M = \log_2(B/(1-B))$) foram utilizados modelos lineares ajustados por método bayesianos empíricos do *limma* (Ritchie et al., 2015). Para considerar os sítios CpG como diferencialmente metilados foram usados dois critérios: (1) valor p ajustado FDR ($\text{adjP} < 0,05$) e quando este não pode ser satisfeito (2) os DMSs significativos apresentaram $p < 0,01$ e $\Delta\beta > 10\%$. Regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em ilhas CpG pré-definidas, promotores, genes e regiões de todo o genoma foram buscadas pelo pacote *RnBeads* ($\text{FDR adjP} < 0,05$).

4.10.7. Análise referente aos grupos de acordo com exposição ao estresse gestacional

4.10.7.1. Identificação de grupos de mães

Para redução da dimensionalidade dos dados usamos a técnica de Análise de Componentes Principais (ACP). A ACP é uma técnica que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais, estes apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados. Das 96 mães recrutadas para o estudo, sete foram excluídas por falta de informação no questionário, com 89 mães restantes. A ACP foi aplicada às seguintes variáveis normalizadas: ganho de peso durante a gestação, IMC pré-gravídico, fumo durante a gestação, abuso drogas/álcool durante a gravidez, transtornos psiquiátricos, estresse psicossocial, nível educacional e renda familiar. O índice de peso corporal (IMC) foi calculado usando peso pré-

gravidez e altura. Para a extração de componentes, o método de máxima verossimilhança foi aplicado. Apenas os componentes que representaram variações superiores a 1 (*eigenvalue*>1) foram incluídos. Também usamos o gráfico de *enigenvalue* para o critério do teste de *scree* para tomar uma decisão final sobre a retenção de componentes. Consideramos um valor de 0,5 como um corte para selecionar variáveis pertencentes a cada componente principal. O agrupamento hierárquico com *K-means* foi aplicado usando a correlação de *Person* como distância com ligação completa.. Para testar semelhanças de variáveis entre os grupos, o qui-quadrado e o teste-t foram aplicados considerando as variáveis significativas que apresentaram $p<0,05$. Todas as análises foram realizadas usando *Multiple Experiment Viewer* (MeV) (Saeed et al., 2003).

4.10.7.2 Associação entre os resultados dos recém-nascidos e a metilação dos sítios CpG

Para identificar associações, modelos de regressão linear multivariada foram aplicados em sítios diferencialmente metilados e resultados de desenvolvimento neonatal normalizados, usando modelos ajustados (para idade da mãe e sexo do neonato) nas amostras agrupadas (independentemente dos grupos aos quais pertencem) e aos grupos estratificados como identificados por componentes de exposição ao estresse. Todas as análises estatísticas foram realizadas com *RStudio* e *Stata* versão 11.0.

5. RESULTADOS

5.1. Características da população estudada

Foram abordadas aleatoriamente 125 parturientes, 05 não manifestaram interesse no estudo, 24 participantes foram entrevistadas mas a coleta do SCU não ocorreu pois os partos aconteceram fora do horário estabelecido e 02 parturientes foram excluídas devido aos critérios de exclusão. A nossa coorte possui 94 mulheres e coletamos amostras de sangue do cordão umbilical de 96 indivíduos a diferença entre pessoas entrevistadas e coletas de SCU dá-se devido ao fato de duas gestações gemelares.

Devido a falta de alguns dados como exposição ao estresse materno e medidas antropométricas das parturientes e dos RNs, sete indivíduos foram retirados, portanto a coorte final é composta por 50 meninas e 39 meninos totalizando 89 recém-nascidos, dos 96 indivíduos mencionados inicialmente. A coorte composta por 89 mães (Tabela 1), apresenta mulheres com idade entre 14 e 46 anos. Seis das mães com ensino primário incompleto, 43 cursaram até o ensino primário, 14 com ensino secundário e 18 com faculdade. Durante a gravidez, 7 mães apresentaram transtorno psiquiátrico e 58 relataram estresse psicossocial, respectivamente. Dezesseis também relataram fumar e 26 usando drogas ou álcool. Seis meses antes de engravidar, quatro mães usaram medicação controlada.

Tabela 1: Características da coorte do estudo (n=96)

Características maternas durante a gestação	n (94)	%	Média (± DP)
- Idade (anos)			25.46(1.06)
- Renda familiar			4.57 (0.9)
> R\$ 622,00	5	9,43	
> R\$ 1.244,02	7	13,20	
> R\$ 2.448,00	30	56,60	
> R\$ 6.220,00	8	15,09	
> R\$12.440,00	3	05,66	
- Nível educacional			
Ensino primário incompleto	6	1,33	
Ensino primário	43	53,08	
Ensino médio	14	17,28	
Ensino superior	18	22,22	
- Altura (metros)			159.5 (5.7)
- IMC pré-gravídico (kg/m²)			23.74 (0.72)
Abaixo do peso (< 18.5)	1	3,13	
Eutrófico (18.5 – 24.9)	21	65,72	
Excesso de peso (25.0 – 29.9)	8	25,04	
Obeso (≥ 30.0)	2	6,26	
- Peso ganho			12.04 (4.76)
- Estresse psicossocial	58	66,66	3.34 (1.68)
- Transtorno psiquiátrico	7	7,86	
- Uso remédio controlado	44	49,43	
- Abuso drogas/álcool	26	29,21	
- Fumo durante a gestação	16	18,39	
- Tipo de parto			
Normal	50	56,17	
Cesáreo	39	43,82

Figura 4. *Heatmap* demonstrando a matriz correlação de todas as variáveis maternas

A escala de cores (preta e vermelha) no *heatmap* indicam baixas ou altas medidas de correlação entre as variáveis, assim podemos ver que a maioria das correlações é maior que 0,3 sugerindo possíveis componentes.

A Análise de Componentes Principais mostrou que os primeiros quatro CPs (*eigenvalue*>1) explicaram a maior parte da variância, em torno de 73% (Tabela 2).

Tabela 2: Componentes principais e cargas dos componentes para cada variável materna

Componente Principal (PC)	<i>Eigenvalue</i>	Explicação da variância (%)
CP1	1,79	0,24
CP2	1,47	0,20
CP3	1,09	0,15
CP4	1,05	0,14
CP5	0,71	0,10
CP6	0,53	0,07
CP7	0,44	0,06
CP8	0,36	0,05

No entanto, a variância introduzida pela CP4 (Figura 5) foi muito pequena e, portanto, de acordo com o gráfico de *eigenvalue* para o critério do teste de *scree* o CP4 apesar de ter o *Eigenvalue* maior que 1 foi descartado.

Figura 5. Gráfico de *eigenvalue* para o critério do teste de *scree*

Tabela 3: Variáveis maternas durante a gestação, os componentes principais e suas respectivas cargas

Variáveis maternas durante a gestação	Carga dos componentes							
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Peso ganho	-0,17	0,58	-0,16	0,24	-0,17	-0,09	-0,48	-0,50
IMC pré-gravídico	0,14	-0,54	0,20	-0,17	-0,20	-0,03	0,01	-0,75
Fumo	0,41	0,02	0,49	0,47	-0,13	0,53	-0,21	0,09
Drogas/álcool	0,43	0,16	-0,56	-0,04	-0,48	0,25	0,39	-0,06
Transtornos psiquiátricos	0,52	-0,11	-0,33	-0,31	0,41	0,06	-0,57	0,03
Estresse psicossocial	0,54	0,18	0,17	0,27	0,14	-0,69	0,23	-0,04
Nível educacional	0,06	0,49	0,28	-0,41	0,42	0,32	0,34	-0,29
Renda familiar	0,10	0,20	0,36	-0,58	-0,54	-0,20	-0,23	0,25

Cargas significantes foram consideradas acima de 0,5. O CP1, composto por estresse psicossocial e transtorno psiquiátrico durante a gravidez, com cargas fatoriais de 0,55 e 0,52, respectivamente, explica 24% da variância; o CP2 incluiu ganho de peso gestacional, IMC antes da gravidez e nível educacional, com cargas de 0,59, -0,55 e 0,49, respectivamente, e explica 20% da variância; O CP3 foi composto por abuso drogas/álcool durante a gravidez, mostrando carga de -0,56 e explica 15% da variância. Interpretamos CP1, CP2 e CP3 como componente de estresse psicológico, componente de estresse social e componente de estresse tóxico, respectivamente.

O *biplot* de CP1 e CP2 sugeriu a existência de dois grupos de mães (Figura 6). Para validar a existência de dois grupos de mães, aplicamos a análise de agrupamento *K-means* (K=2) às mesmas variáveis, que identificaram *Cluster A* contendo 42 mães e *Cluster B* com 47 mães (Fig. 6b), replicando os grupos identificados por PCA (Fig. 6a). A caracterização dos recém-nascidos dos *Clusters A* e *B* mostrou que quase todas as medidas antropométricas neonatais eram diferentes entre os dois grupos ($p < 0,05$). RNs do *Cluster A* foram menores em relação aos do *Cluster B* (Tabela 4).

Figura 6. Biplot do CP1 e CP2 e perfis para o *Cluster A* e *Cluster B*. Figura 6a. Representação gráfica da análise ACP. Todas as 89 amostras são apresentadas sendo 42 amostras do *Cluster A* (rosa) e 47 amostras do *Cluster B* (azul). O CP1 compreende o estresse psicológico (transtornos psicossociais e psiquiátricos) representado no eixo X e o CP2 compreende o estresse social (IMC pré-gravidez, ganho de peso durante a gravidez e nível de escolaridade) representado no eixo Y. Figura 6b. Centróide do gráfico da análise *K-means* que representam ambos os grupos do *Cluster A* e B e distribuição de cada medida variável entre amostras em cada *Cluster*.

Tabela 4: Características dos recém-nascidos de acordo com o cluster A e B (n=89)

Variáveis dos recém-nascidos	Cluster A (n=42)			Cluster B (n=47)			p-value
	n	%	Média (± DP)	n	%	Média (± DP)	
- Sexo (masculino)	15	35,71		24	55,06		0,055
- Idade gestacional (semanas)			38,68 (1,6)			39,9(1,19)	0,001
- Peso ao nascimento (gramas)			3077,8 (337,2)			3626 (469,0)	0
- Comprimento (centímetros)			47,51 (1,9)			49,85 (1,5)	0
- IMC/idade (z-score)			0,12 (1,0)			0,82 (1,2)	0,004
- Peso/idade (z-score)			-0,05 (0,73)			0,64 (0,94)	0
- Comprimento/idade (z-score)			-1,00 (1,0)			0,16 (0,8)	0
- Peso/comprimento (z-score)			0,57 (1,14)			0,88 (1,26)	0,253
- Índice de perímetro cefálico (z-score)			0,09 (0,85)			0,65 (0,93)	0

5.2. *Clusters* A e B, e diferenças nos níveis de metilação dos sítios CpGs do sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos

Considerando que os mecanismos epigenéticos fazem a mediação da resposta ao meio ambiente, comparamos os perfis de metilação do DNA do sangue do cordão umbilical entre os recém-nascidos dos *Clusters* A e B e identificamos 13 sítios diferencialmente metilados (DMSs) ($p < 0,01$ e $\Delta\beta > 10\%$). Houve um sítio hipometilado e 12 sítios de CpG hipermetilados no *Cluster* A em comparação com o *Cluster* B. Cinco sítios de CpG (um hipo e quatro hipermetilados estavam no PAX8 e os quatro CpGs hipermetilados também estavam no PAX8 antisense-1 LOC654433 (PAX8-AS1). Houve também um sítio de CpG hipermetilado localizado no MAP3K21, um sítio de CpG localizado na ilha CpG de CCKBR e outros seis sítios de CpG que não estavam associados a um gene conhecido (Tabela 5).

Tabela 5: Relação da localização dos genes dos *Cluster A* e *B*

Nome	Chr	pos	Nome das Ilhas	Gene	RefGene Group1st	UCSC RefGene Group	Relação com a Ilha	DMR	Log FC	Ave Expr	t	P.Valor	adj.P.Val	B	Cluster A	Cluster B	DeltaB
cg09704166	chr2	114031854	chr2:114033359-114033617	PAX8	Body	Body	N_Shore		-0,53	-0,47	-2,69	8,42E-03	1,00	-	0,35	0,47	-0,12
cg18706028	chr11	6292490	chr11:6292256-6292693	CCKBR	Body	Body	Island		0,59	0,34	3,31	1,32E-03	1,00	-	0,60	0,50	0,10
cg19083407	chr2	113993142	chr2:113993204-113994075	PAX8, PAX8-AS1	Body	Body;TSS1500	N_Shore		0,65	1,85	2,91	4,49E-03	1,00	-	0,82	0,72	0,10
cg12889195	chr2	113992843	chr2:113993204-113994075	PAX8, PAX8-AS1	Body	Body;TSS1500	N_Shore	DMR	0,79	1,83	3,23	1,73E-03	1,00	-	0,82	0,71	0,11
cg24702040	chr1	233501790	chr1:233497707-233497917	MAP3K21	Body	Body	S_Shelf		0,54	0,44	2,72	7,76E-03	1,00	-	0,64	0,52	0,11
cg21550804	chr8	74282865					OpenSea		0,61	-1,40	3,28	1,46E-03	1,00	-	0,35	0,24	0,11
cg11763394	chr2	113992921	chr2:113993204-113994075	PAX8, PAX8-AS1	Body	Body;TSS1500	N_Shore	DMR	0,98	1,69	3,34	1,21E-03	1,00	-	0,79	0,68	0,11
cg21550016	chr2	113992930	chr2:113993204-113994075	PAX8, PAX8-AS1	Body	Body;TSS1500	N_Shore	DMR	0,96	1,65	3,32	1,31E-03	1,00	-	0,79	0,67	0,12
cg21724239	chr8	58056113	chr8:58055960-58056244				Island		0,83	-0,50	3,80	2,60E-04	1,00	-	0,49	0,35	0,14
cg10486069	chr11	133658113					OpenSea	RD MR	0,69	0,48	2,66	9,30E-03	1,00	-	0,66	0,51	0,14
cg22968622	chr17	43663579	chr17:43662141-43663807				Island		1,44	-3,73	3,16	2,14E-03	1,00	-	0,22	0,08	0,14
cg08219700	chr8	58056026	chr8:58055960-58056244				Island		0,81	-0,39	3,87	2,02E-04	1,00	-	0,51	0,37	0,14
cg11062466	chr8	58055876	chr8:58055960-58056244				N_Shore		1,16	-1,09	4,06	1,04E-04	1,00	-	0,46	0,26	0,20

5.3. Avaliação sexo específica

Como mostramos a existência de diferenças de metilação entre sexos em cordão umbilical em crianças AIG e nascidas de termo potencialmente sem exposição significativa a variável de estresse (Maschietto et al., 2017), neste trabalho consideramos que para avaliar a diferença de sítios de metilação entre os grupos encontrados quanto à exposição ao estresse e não previamente associadas ao dimorfismo sexual e devido à Decomposição de Valor Singular (*singular-value decomposition-SVD*) evidenciar que sexo foi significativo para o CP6 da análise atual (Figura 3), refizemos a análise em busca de sítios diferencialmente metilados para meninos e meninas com a intenção de excluir qualquer sítio em comum nas análises. Identificamos 426 DMSs, não relatando sobreposição com os 13 DMSs.

5.4. Associação entre a metilação dos sítios CpGs e medidas antropométricas dos recém-nascidos

A análise de regressão multivariada pela idade da mãe e o sexo do recém-nascido não encontrou associação entre os níveis de metilação dos 13 DMS e as medidas antropométricas dos recém-nascidos na amostra agrupada. No entanto, encontramos uma associação positiva entre PAX8 (cg21550016) com índice do perímetro cefálico normalizada (z-score) e circunferência abdominal com *Cluster A*. Para o *Cluster B* encontramos uma associação positiva entre CCKBR (cg18706028) e índice do perímetro cefálico para a idade normalizado (z-score) e associação negativa com MAP3K21 (cg24702040) e circunferência abdominal (Tabela 6).

Tabela 6: Relação das CpGs, índice de perímetro cefálico para a idade e circunferência abdominal referente aos recém-nascido dos do *Cluster A* e do *Cluster B*

	Cluster A (n=42)						Cluster B (n=47)					
	Circunferência abdominal (centímetros)			Índice do perímetro cefálico (z-score)			Circunferência abdominal (centímetros)			Índice do perímetro cefálico (z-score)		
	Coef.	95% CI		Coef.	95% CI		Coef.	95% CI		Coef.	95% CI	
cg08219700	7,82	-7,35	22,98	5,87	-1,96	13,70	7,85	-20,71	36,42	-8,06	-19,91	3,79
cg09704166	-7,97	-19,46	3,51	-2,83	-8,76	3,10	-0,93	-12,40	10,54	2,18	-2,58	6,93
cg10486069	-0,93	-4,53	2,67	0,68	-1,18	2,54	0,79	-3,53	5,11	-1,14	-2,93	0,66
cg11062466	4,88	-4,20	13,95	-0,52	-5,21	4,16	-5,07	-26,76	16,62	0,96	-8,04	9,96
cg11763394	-11,97	-45,90	21,95	-7,38	-24,91	10,15	36,51	-25,52	98,55	19,08	-6,66	44,81
cg12889195	-32,28	-69,30	4,74	-16,38	-35,51	2,74	9,62	-29,75	49,00	0,97	-15,37	17,30
cg18706028	0,97	-4,58	6,52	2,22	-0,65	5,09	2,40	-3,81	8,61	2,68*	0,11	5,26
cg19083407	-1,28	-17,36	14,81	1,63	-6,68	9,94	-8,16	-31,01	14,69	1,10	-8,38	10,58
cg21550016	40,74*	1,60	79,89	21,19*	0,97	41,41	-42,62	-106,35	21,12	-21,53	-47,97	4,91
cg21550804	3,63	-1,40	8,67	1,17	-1,43	3,77	-0,38	-6,59	5,84	1,56	-1,02	4,14
cg21724239	-14,35	-28,68	-0,01	-6,09	-13,50	1,32	-2,57	-24,94	19,79	6,81	-2,47	16,09
cg22968622	-0,98	-3,93	1,97	-0,32	-1,84	1,20	-0,66	-6,54	5,22	-2,43	-4,87	0,01
cg24702040	-0,04	-3,36	3,29	-0,44	-2,16	1,28	-5,75*	-11,10	-0,41	-1,65	-3,87	0,57
mother_age	-0,01	-0,09	0,06	0,03	0,15	-0,01	0,16*	0,02	0,30	0,04	-0,01	0,10
Sex	0,05	-1,28	1,37	0,04	-0,65	0,72	0,29	-1,55	2,13	0,33	-0,43	1,09
_cons	39,95	26,27	53,62	0,10	-6,97	7,16	33,80	18,17	49,44	-1,19	-7,67	5,30

6. DISCUSSÃO

Estudos relacionados com a Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (*DOHaD*) sugeriram que insultos durante a vida intra-uterina podem ter impacto sobre a saúde da prole mais tarde na vida. Considera-se que o mecanismo epigenético é um mediador biológico de uma série de fatores de exposição tóxica materna pré-natal e resultados antropométricos do recém-nascido (Babenko et al., 2015). Uma grande preocupação nesta área de pesquisa é a mensuração do impacto da exposição tóxica pré-natal. Existem escalas que quantificam o impacto de eventos estressores específicos na vida, ou em período específico desta, de um indivíduo. Os questionários geralmente validados são usados para medir estressores específicos, como o questionário de violência da OMS (Garcia-Moreno et al., 2005), escala de esforço perceptível (Cohen, S., Kamarck, T. and Mermelstein, 1983); a escala de depressão, ansiedade e estresse de 21 itens [DASS-21] (Henry and Crawford, 2005); suporte social percebido (Zimet et al., 1988); escala de ansiedade relacionada à gravidez (Huizink et al., 2004); e questionários sobre violência doméstica (Mirrlees-Black, 1999).

Porém, esses instrumentos apresentam limitações, uma vez que os eventos relacionados ao estresse podem variar muito entre indivíduos e quando falamos de diferentes tipos de exposição é difícil avaliar o real impacto do estresse conjunto, pois estresse é um constructo multidimensional. Existem três formas de medir o estresse que devem ser integradas (Cohen and Williamson, 1988), a primeira é direcionada à presença de agentes estressores específicos; a segunda, aos sintomas físicos e psicológicos do estresse e a terceira, pretende mensurar a percepção de estresse individual de forma global, independente dos agentes estressores. O questionário proposto para o presente projeto abrange fatores protetores e adversos descritos na literatura com perguntas tentando cobrir as três formas, no entanto é importante notar que somente através dos valores obtidos das diferentes perguntas do questionário de forma isolada, indivíduos que apresentam todas as medidas muito

ruins ou muito boas são raros dificultando a busca de subgrupos relacionados à exposição ao estresse, assim não obtivemos uma medida que possa categorizar pela presença ou ausência de estresse na vida da população do estudo, puérperas usuárias do SUS e em vulnerabilidade socioeconômica. Acreditamos que o número da amostra compromete o resultado, podendo ser alterado com aumento no número amostral.

Embora os métodos para combinar diferentes medidas de exposição ao estresse tóxico não estejam bem estabelecidos, é claro que uma visão integrada é necessária (Dolatian et al., 2016; Premji, 2014), como demonstrado por análises que consideram a interação entre essas variáveis (Clayborne et al., 2017). Além disso, a reatividade individual à exposição não é frequentemente considerada nas análises atuais.

O uso da análise de componentes principais pode lidar com várias dessas dificuldades porque identifica os principais eixos de variância dentro de um conjunto de dados e pode ser usado para encontrar componentes importantes. No nosso caso, a ACP nos permitiu utilizar diferentes medidas de estresse sem uma decisão a priori de quanto peso é dado a cada uma das variáveis e, além disso, foi capaz de considerar as variâncias específicas e compartilhadas. O uso da ACP além de reduzir a dimensão das variáveis de exposição ao estresse, independentemente da quantidade ou tipo de estresse durante a gravidez, foi capaz de sugerir grupos de mães. Como a ACP não é uma técnica projetada para encontrar grupos, nós validamos nossos grupos usando uma técnica de agrupamentos.

Exposição à depressão e ansiedade durante a gestação são reconhecidos como fatores de risco para o crescimento e desenvolvimento fetal assim como alterações comportamentais e metabólicas ao longo da vida (Gelaye et al., 2016; McDonald et al., 2014). O estresse psicossocial pode alterar a fisiologia da gravidez, e cada vez mais a preocupação com seus efeitos nos

resultados da saúde infantil ocorre (Fatima et al., 2017), o estresse de guerra em mulheres grávidas afetou o crescimento fetal e foi responsável por 35% da variância no peso ao nascer (Mulligan et al., 2012). É interessante notar que o componente principal, com altas cargas fatoriais para estas variáveis explique a maior variância neste estudo, este componente foi interpretado como um componente de vulnerabilidade psicológica. Fome e pobreza (Braveman, 2014) são fatores de risco bem estudados que afetam negativamente a saúde da prole, diabetes ou obesidade afetam negativamente a saúde da prole e estão significativamente relacionados ao aumento nos partos prematuros e baixo peso ao nascer (Goldstein et al., 2017). Neste estudo, as cargas da escolaridade materna e o estado nutricional (IMC pré-gravídico e ganho de peso durante a gestação) são as mais importantes para o segundo componente principal. Sendo que no Brasil, mães com menor escolaridade e menor ganho financeiro tendem a apresentar uma alimentação mais calórica e menos balanceada, explicando um maior IMC pré-gravídico, no entanto menor ganho de peso gestacional. O PC2 foi interpretado como um componente de status social. O *biplot* de CP1 e CP2 sugeriu dois grupos de mães. O *Cluster A* tem indivíduos com um componente de vulnerabilidade psicológica mais positiva e um componente de status social mais negativo em relação ao *Cluster B*. Quase todas as medidas de recém-nascidos foram menores no *Cluster A*, sustentando hipóteses de que o estresse psicológico e o *status* social mais baixo tem impacto negativo no neonato e podem estar mais associados a recém-nascidos menores. Importante ressaltar que não existe diferença de número de meninas e meninos nos dois grupos, uma vez que meninas tendem a serem menores que meninos.

Observou-se diferenças na metilação do DNA entre os grupos, com o *Cluster A* apresentando um padrão hipermetilado em comparação com os do *Cluster B*. Nossa análise anterior de metilação do DNA do genoma de sangue de cordão apenas composta de bebês nascidos a termo, com peso adequado para idade gestacional e corrigindo para fatores de exposição ao estresse que poderiam interferir com a metilação do DNA, de crianças desta mesma coorte, mostrou diferenças

de metilação do DNA entre os sexos, com meninos apresentando um padrão hipometilado em comparação com meninas (Maschietto et al., 2017). Embora tenhamos proporções semelhantes de meninos e meninas em ambos os grupos, refizemos a análise de sítios diferencialmente metilados entre meninos e meninas desta coorte e comparamos os 13 DMSs entre o *Cluster A* e B com os DMSs entre os sexos e não encontramos sobreposição. Esses dados indicaram que os 13 DMSs estão relacionados à resposta ao estresse independentemente do sexo do recém-nascido. O sexo foi uma covariável nos modelos de regressão múltipla, sugerindo que os 13 DMSs podem afetar os resultados antropométricos independentemente do sexo. Medidas antropométricas do neonato são amplamente utilizadas como indicador do desenvolvimento fetal e do risco para a saúde mais tarde na vida. Por exemplo, o peso ao nascer tem sido associado a inúmeros resultados de desenvolvimento, incluindo saúde física e mental, habilidades linguísticas e cognitivas (Hasanzadeh and Faramarzi, 2017).

Os sítios de CpG diferencialmente metilados foram associados a quatro genes, todos com padrão hipermetilado no *Cluster A* em comparação com o *Cluster B*: PAX8, seu LCO654433 anti-sentido (PAX8-AS1), MAP3K21 e CCKBR. Uma análise direta da metilação do DNA realizada em uma coorte histórica de jovens adultos expostos à fome no início da vida em uma área rural de Bangladesh mostrou um padrão ligeiramente hipermetilado de PAX8 nos indivíduos expostos à fome durante a sua gestação (Finer et al., 2016). Não medimos diretamente a fome, mas usamos IMC pré-gravídico e ganho de peso gestacional para mensurar o estado nutricional. Como usamos uma combinação de variáveis de exposição ao estresse, não é possível analisar metilação diferencial para variáveis específicas. Recentemente, em um estudo de associação genoma completo (GWAS) da duração normal do sono, o locus com a associação mais forte foi uma região intergênica de 35 a 80kb a montante do PAX8. Os alelos associados com maior duração do sono foram descritos por GWAS prévio como relacionados a perfis metabólicos mais favoráveis e menor risco de transtorno

de déficit de atenção e hiperatividade (Gottlieb et al., 2015). Neste estudo, PAX8 foi hipermetilado no *Cluster A* em comparação com o *Cluster B*, mostrando associação positiva com circunferência abdominal e índice do perímetro cefálico para a idade normalizado com z-score apenas para *Cluster A*. PAX8-AS1 foi identificado como parte de um grupo de dez genes a partir de 108 genes imprintados em amostras de placenta humana de 615 recém-nascidos. A expressão combinada dos 10 genes distinguiu dois grupos de recém-nascidos com base em diferenças na qualidade do movimento, sinais de assimetria, reflexos, estresse fisiológico e abstinência (Green et al., 2015). Embora a coorte tenha sido composta de bebês nascidos pequenos, grandes e com peso adequado para a idade gestacional, a análise foi corrigida para o tamanho do neonato, tornando impossível avaliar se o PAX8-AS1 foi associado às medidas antropométricas nesta coorte, como demonstrado pelos nossos resultados. Sugerimos que o PAX8 deve ser melhor explorado em mães que apresentam mais exposição ao estresse psicológico e menor status social como marcador de medidas antropométricas neonatais e para possíveis associações com resultados psiquiátricos mais tarde na vida.

Um CpG no gene CCKBR teve uma associação positiva com o índice do perímetro cefálico para a idade normalizado (z-score) para o *Cluster B*. Uma associação fraca entre a expressão de CCKBR e o transtorno de estresse pós-traumático já foi relatada (N. Chakraborty et al., 2015). Ele codifica um receptor acoplado à proteína G para gastrina e colecistoquinina (CCK), principalmente encontrado no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal. Recentemente, foi envolvido com desenvolvimento cortical anormal. Evidenciou-se sinergia funcional entre os receptores de colecistoquinina CCKAR e CCKBR no desenvolvimento do cérebro de mamíferos e transtornos psiquiátricos relacionado ao medo (Bowers and Ressler, 2015).

Também encontramos uma associação negativa entre a metilação MAP3K21 e a circunferência abdominal para o *Cluster B*. Embora não possamos encontrar nenhuma associação

entre esse gene e a exposição ao estresse, é interessante notar que o nome de MAP3K21 também é linhagem mista 4 (MLK). Este atua como um regulador negativo da sinalização dos receptores Toll-like 4 (TLR4). Esta via foi associada à citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e com manutenção de uma resposta imune adequada (Seit-Nebi et al., 2012). Sendo que várias citocinas pró-inflamatórias já foram associadas à exposição ao estresse (Farooq et al., 2016; Slavich and Irwin, 2014).

Estamos conscientes de que este estudo tem limitações. Não medimos a contaminação de células maternas no sangue de cordão umbilical e, portanto, isso não foi corrigido. Falta-nos poder estatístico para buscar regiões diferencialmente metiladas em vez de posições diferencialmente metiladas. Mesmo que uma revisão recente tenha discutido os tamanhos de efeito epigenético de pequena magnitude em estudos epigenéticos ambientais, mostrando que geralmente estudos longitudinais explicam melhor os resultados, nossos DMPs não apresentaram grandes diferenças de metilação (delta-beta).

7. CONCLUSÃO

Ao aplicar ACP a uma coorte bem caracterizada de mulheres grávidas, identificamos dois grupos de mães, com diferentes componentes de exposição ao estresse validados por análise de agrupamentos e desfechos antropométricos do recém-nascido. A análise diferencial de metilação entre os grupos apontou para sítios CpG que podem estar relacionadas a diferentes respostas ao estresse, independentemente do sexo e apresentaram diferentes impactos no desfecho do recém-nascido em cada grupo. Nosso estudo contribui para a complexidade da associação de variáveis de estresse, diferença de metilação e desfechos neonatais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., et al. (2014) 'Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays', *Bioinformatics* 30: 1363–9.
- Assenov, Y., Müller, F., Lutsik, P., et al. (2014) 'Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads', *Nature Methods* 11: 1138–40. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.3115>.
- Babenko, O., Kovalchuk, I. and Metz, G. A. S. (2015) 'Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, pp. 70–91.
- Bakulski, K. M., Feinberg, J. I., Andrews, S. V., et al. (2016) 'DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies', *Epigenetics* 11: 354–62.
- Bale, T. L. (2009) 'Neuroendocrine and Immune Influences on the CNS: It's a Matter of Sex', *Neuron*, pp. 13–6.
- Barker, D. and Osmond, C. (1986) 'Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales', *The Lancet* 327: 1077–81.
- Beck, A. T., Epstein, N., Brown, G. and Steer, R. A. (1988) 'An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties.', *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 56: 893–7. Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0022-006X.56.6.893>.
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., et al. (2011) 'High density DNA methylation array with single CpG site resolution', *Genomics* 98: 288–95.
- Bird, A. (2002) 'DNA methylation patterns and epigenetic memory', *Genes and Development*, pp. 6–21.
- Borrelli, E., Nestler, E. J., Allis, C. D. and Sassone-Corsi, P. (2008) 'Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity', *Neuron*, pp. 961–74.
- Bouwland-Both, M. I., van Mil, N. H., Tolhoek, C. P., et al. (2015) 'Prenatal parental tobacco smoking, gene specific DNA methylation, and newborns size: the Generation R study', *Clinical Epigenetics* 7: 83. Available at: <http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/7/1/83>.
- Bowers, M. E. and Ressler, K. J. (2015) 'Interaction between the Cholecystokinin and Endogenous Cannabinoid Systems in Cued Fear Expression and Extinction Retention', *Neuropsychopharmacology* 40: 688–700. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/npp.2014.225>.
- Braithwaite, E. C., Kundakovic, M., Ramchandani, P. G., Murphy, S. E. and Champagne, F. A. (2015) 'Maternal prenatal depressive symptoms predict infant NR3C1 1F and BDNF IV DNA methylation', *Epigenetics* 10: 408–17.
- Braveman, P. (2014) 'What are Health Disparities and Health Equity? We Need to Be Clear',

Public Health Reports 129: 5–8. Available at:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/00333549141291S203>.

- Burdge, G. C., Hoile, S. P., Uller, T., et al. (2011) ‘Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition’, *PLoS ONE* 6.
- Burdge, G. C. and Lillycrop, K. A. (2010) ‘Nutrition, Epigenetics, and Developmental Plasticity: Implications for Understanding Human Disease’, *Annual Review of Nutrition* 30: 315–39. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.012809.104751>.
- Cardenas, A., Koestler, D. C., Houseman, E. A., et al. (2015) ‘Differential DNA methylation in umbilical cord blood of infants exposed to mercury and arsenic in utero’, *Epigenetics* 10: 508–15.
- Chakraborty, A., Anstice, N. S., Jacobs, R. J., et al. (2015) ‘Prenatal exposure to recreational drugs affects global motion perception in preschool children’, *Scientific Reports* 5: 16921. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep16921>.
- Chakraborty, N., Meyerhoff, J., Gautam, A., et al. (2015) ‘Gene and stress history interplay in emergence of PTSD-like features’, *Behavioural Brain Research* 292: 266–77.
- Chamon, E. M. Q. de O. (2006) ‘Estresse e estratégias de enfrentamento: o uso da escala toulousaine no Brasil TT - Stress and coping strategies: toulousaine scale in Brazil’, *Rev. psicol. org. trab* 6: 43–64. Available at: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1984-66572006000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.
- Chen, C. and Van Horn, J. D. (2017) ‘Developmental neurogenetics and multimodal neuroimaging of sex differences in autism’, *Brain Imaging and Behavior* 11: 38–61.
- Ching, T.-T., Maunakea, A. K., Jun, P., et al. (2005) ‘Epigenome analyses using BAC microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3’, *Nature Genetics* 37: 645–51. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng1563>.
- Chrousos, G. P. (1992) ‘The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis’, *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 267: 1244–52. Available at: <http://jama.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/jama.267.9.1244>.
- Clayborne, Z. M., Giesbrecht, G. F., Bell, R. C. and Tomfohr-Madsen, L. M. (2017) ‘Relations between neighbourhood socioeconomic status and birth outcomes are mediated by maternal weight’, *Social Science and Medicine* 175: 143–51.
- Cohen, S., Kamarck, T. and Mermelstein, R. (1983) ‘A Global Measure of Perceived Stress.’, *Journal of Health and Social Behavior* 24: 386–96. Available at: <http://www.ljemail.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1518465>.
- Cohen, S. and Williamson, G. (1988) ‘Perceived stress in a probability sample of the United States.’, *The Social Psychology of Health*.
- D’Addario, C., Dell’Osso, B., Palazzo, M. C., et al. (2012) ‘Selective DNA Methylation of BDNF Promoter in Bipolar Disorder: Differences Among Patients with BDI and BDII’, *Neuropsychopharmacology* 37: 1647–55. Available at:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/npp.2012.10>.

- De Onis, M. (2006) 'Breastfeeding in the WHO Multicentre Growth Reference Study', *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* 95: 16–26.
- Deaton, A. M. and Bird, A. (2011) 'CpG islands and the regulation of transcription', *Genes and Development* 25: 1010–22.
- Dedeurwaerder, A., Olyslaegers, D. A. J., Desmarests, L. M. B., et al. (2014) 'ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN- γ -induced antiviral response', *Journal of General Virology* 95: 393–402.
- Dolatian, M., Mahmoodi, Z., Alavi-Majd, H., et al. (2016) 'Psychosocial factors in pregnancy and birthweight: Path analysis', *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 42: 822–30.
- Dunkel Schetter, C. (2011) 'Psychological Science on Pregnancy: Stress Processes, Biopsychosocial Models, and Emerging Research Issues', *Annual Review of Psychology* 62: 531–58. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.psych.031809.130727>.
- Emack, J., Kostaki, A., Walker, C. D. and Matthews, S. G. (2008) 'Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal function in juvenile offspring', *Hormones and Behavior* 54: 514–20.
- Eysenck, H. J. (1985) 'Stress, appraisal, and coping', *Behaviour Research and Therapy*, pp. 714–5.
- Farooq, R., Asghar, K., Kanwal, S. and Zulqernain, A. (2016) 'Role of inflammatory cytokines in depression: Focus on interleukin-1 β (Review)', *Biomedical Reports*. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2016.807>.
- Fatima, M., Srivastav, S. and Mondal, A. C. (2017) 'Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates', *International Journal of Developmental Neuroscience*, pp. 1–7.
- Feder, G., Ramsay, J., Dunne, D., et al. (2009) 'How far does screening women for domestic (partner) violence in different health-care settings meet criteria for a screening programme? Systematic reviews of nine UK, National Screening Committee criteria', *Health Technology Assessment*.
- Fineberg, A. M., Ellman, L. M., Schaefer, C. A., et al. (2016) 'Fetal exposure to maternal stress and risk for schizophrenia spectrum disorders among offspring: Differential influences of fetal sex', *Psychiatry Research* 236: 91–7.
- Finer, S., Iqbal, M. S., Lowe, R., et al. (2016) 'Is famine exposure during developmental life in rural Bangladesh associated with a metabolic and epigenetic signature in young adulthood? A historical cohort study', *BMJ Open* 6: e011768. Available at: <http://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2016-011768>.
- Franklin, T. B. and Mansuy, I. M. (2010) 'Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects', *Neurobiology of Disease*, pp. 61–5.
- Fuchikami, M., Morinobu, S., Segawa, M., et al. (2011) 'DNA methylation profiles of the brain-

derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression', *PLoS One* 6: e23881. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912609>.

- Garcia-Moreno, C., Jansen, H. a F. M., Ellsberg, M., Heise, L. and Watts, C. H. (2005) 'WHO Multi-Country Study on Women's Health and Domestic Violence Against Women: Initial Results on Prevalence, Health Outcomes and Women's Responses', *Genetics* 151: 277–83. Available at: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20063002089.html>.
- Gelaye, B., Rondon, M. B., Araya, R. and Williams, M. A. (2016) 'Epidemiology of maternal depression, risk factors, and child outcomes in low-income and middle-income countries', *The Lancet Psychiatry*, pp. 973–82.
- Gerardin, P., Wendland, J., Bodeau, N., et al. (2011) 'Depression during pregnancy: Is the developmental impact earlier in boys? A prospective case-control study', *Journal of Clinical Psychiatry* 72: 378–87.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S. (2007) 'Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective', *American Journal of Human Biology* 19: 1–19.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Cooper, C. and Thornburg, K. L. (2008) 'Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease', *New England Journal of Medicine* 359: 61–73. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0708473>.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D. and Bernstein, E. (2007) 'Epigenetics: A Landscape Takes Shape', *Cell*, pp. 635–8.
- Goldstein, J. A., Norris, S. A. and Aronoff, D. M. (2017) 'DOHaD at the intersection of maternal immune activation and maternal metabolic stress: a scoping review', *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 8: 273–83.
- Gottlieb, D. J., Hek, K., Chen, T., et al. (2015) 'Novel loci associated with usual sleep duration: the CHARGE Consortium Genome-Wide Association Study', *Molecular Psychiatry* 20: 1232–9. Available at: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/mp.2014.133>.
- Green, B. B., Kappil, M., Lambertini, L., et al. (2015) 'Expression of imprinted genes in placenta is associated with infant neurobehavioral development', *Epigenetics* 10: 834–41.
- Guerrero-Preston, R., Goldman, L. R., Brebi-Mieville, P., et al. (2010) 'Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds', *Epigenetics* 5: 539–46.
- Guxens, M., Sonnenschein-Van Der Voort, A. M. M., Tiemeier, H., et al. (2014) 'Parental psychological distress during pregnancy and wheezing in preschool children: The Generation R Study', *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133.
- Guyton A. C. (2011) *Tratado de Fisiología Médica, Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Available at: <http://eprints.utas.edu.au/4774/>.
- Hartwig, I. R. V., Sly, P. D., Schmidt, L. A., et al. (2014) 'Prenatal adverse life events increase the risk for atopic diseases in children, which is enhanced in the absence of a maternal atopic

- predisposition', *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134.
- Hasanjanzadeh, P. and Faramarzi, M. (2017) 'Relationship between maternal general and specific-pregnancy stress, anxiety, and depression symptoms and pregnancy outcome', *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 11: VC04-VC07.
- Henry, J. D. and Crawford, J. R. (2005) 'The short-form version of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS-21): Construct validity and normative data in a large non-clinical sample', *British Journal of Clinical Psychology* 44: 227–39. Available at: <http://doi.crossref.org/10.1348/014466505X29657>.
- Hochberg, Z., Feil, R., Constancia, M., et al. (2011) 'Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming', *Endocrine Reviews*, pp. 159–224.
- Huizink, A. C., Mulder, E. J. H., Robles De Medina, P. G., Visser, G. H. A. and Buitelaar, J. K. (2004) 'Is pregnancy anxiety a distinctive syndrome?', *Early Human Development* 79: 81–91.
- Illingworth, R. S. and Bird, A. P. (2009) 'CpG islands - "A rough guide"', *FEBS Letters*, pp. 1713–20.
- Intapad, S., Tull, F. L., Brown, A. D., et al. (2013) 'Renal denervation abolishes the age-dependent increase in blood pressure in female intrauterine growth-restricted rats at 12 months of age', *Hypertension* 61: 828–34.
- Ivorra, C., Fraga, M. F., Bayón, G. F., et al. (2015) 'DNA methylation patterns in newborns exposed to tobacco in utero.', *Journal of translational medicine* 13: 25. Available at: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/25>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25623364>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4312439>.
- Johnson, R. C. and Schoeni, R. F. (2011) 'Early-life origins of adult disease: National longitudinal population-based study of the United States', *American Journal of Public Health* 101: 2317–24.
- Kanaka-Gantenbein, C. (2010) 'Fetal origins of adult diabetes', *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 99–105.
- Keller, S., Sarchiapone, M., Zarrilli, F., et al. (2010) 'Increased BDNF Promoter Methylation in the Wernicke Area of Suicide Subjects', *Archives of General Psychiatry* 67: 258. Available at: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archgenpsychiatry.2010.9>.
- Khashan, A. S., Abel, K. M., McNamee, R., et al. (2008) 'Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events.', *Archives of general psychiatry* 65: 146–52. Available at: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archgenpsychiatry.2007.20>.
- Kim, J. M., Stewart, R., Kang, H. J., et al. (2013) 'A longitudinal study of BDNF promoter methylation and genotype with poststroke depression', *Journal of Affective Disorders* 149: 93–9.
- Kundakovic, M., Lim, S., Gudsnuk, K. and Champagne, F. A. (2013) 'Sex-specific and strain-dependent effects of early life adversity on behavioral and epigenetic outcomes', *Frontiers in*

Psychiatry 4.

- Lazinski, M. J., Shea, A. K. and Steiner, M. (2008) 'Effects of maternal prenatal stress on offspring development: A commentary', *Archives of Women's Mental Health* 11: 363–75.
- Lee, K. W. K. and Pausova, Z. (2013) 'Cigarette smoking and DNA methylation', *Frontiers in Genetics*.
- Leek, J. T., Johnson, W. E., Parker, H. S., Jaffe, A. E. and Storey, J. D. (2012) 'The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments', *Bioinformatics* 28: 882–3.
- Le-Niculescu, H., Balaraman, Y., Patel, S., et al. (2007) 'Towards understanding the schizophrenia code: An expanded convergent functional genomics approach', *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics* 144: 129–58.
- Levenson, J. M., Roth, T. L., Lubin, F. D., et al. (2006) 'Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus', *The Journal of biological chemistry* 281: 15763–73. Available at: [papers3://publication/doi/10.1074/jbc.M511767200](https://doi.org/10.1074/jbc.M511767200).
- Levine, S. and Ursin, H. (1991) 'What is stress?', *Stress - Neurobiology and Neuroendocrinology*, pp. 3–21.
- Lipp, M. E. N. and Tanganelli, M. S. (2002) 'Stress e qualidade de vida em Magistrados da Justiça do Trabalho: diferenças entre homens e mulheres', *Psicologia: Reflexão e Crítica* 15: 537–48.
- Lund, L. K., Vik, T., Skranes, J., et al. (2012) 'Low birth weight and psychiatric morbidity; stability and change between adolescence and young adulthood', *Early Human Development* 88: 623–9.
- MacDonald, A. W. and Schulz, S. C. (2009) 'What we know: Findings that every theory of Schizophrenia should explain', *Schizophrenia Bulletin*, pp. 493–508.
- Macmillan, H. L., Fleming, J. E., Streiner, D. L., et al. (2001) 'Childhood abuse and lifetime psychopathology in a community sample', *American Journal of Psychiatry* 158: 1878–83.
- Maschietto, M., Bastos, L. C., Tahira, A. C., et al. (2017) 'Sex differences in DNA methylation of the cord blood are related to sex-bias psychiatric diseases', *Scientific Reports* 7: 44547. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep44547>.
- McCullough, L. E., Mendez, M. A., Miller, E. E., et al. (2015) 'Associations between prenatal physical activity, birth weight, and DNA methylation at genomically imprinted domains in a multiethnic newborn cohort', *Epigenetics* 10: 597–606.
- McDonald, S. W., Kingston, D., Bayrampour, H., Dolan, S. M. and Tough, S. C. (2014) 'Cumulative psychosocial stress, coping resources, and preterm birth', *Archives of Women's Mental Health* 17: 559–68.
- Meaney, M. J. and Szyf, M. (2005) 'Environmental programming of stress responses through DNA methylation: Life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome', *Dialogues in Clinical Neuroscience* 7: 103–23.

- Michels, K. B. and Xue, F. (2006) 'Role of birthweight in the etiology of breast cancer', *International Journal of Cancer*, pp. 2007–25.
- Miller, C. A. and Sweatt, J. D. (2007) 'Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation', *Neuron* 53: 857–69.
- Mirrlees-Black, C. (1999) *Domestic Violence: Findings from a new British Crime Survey self-completion questionnaire, Home Office Research Study*.
- Mittal, V. A., Ellman, L. M. and Cannon, T. D. (2008) 'Gene-environment interaction and covariation in schizophrenia: The role of obstetric complications', *Schizophrenia Bulletin*, pp. 1083–94.
- Monk, C., Spicer, J. and Champagne, F. A. (2012) 'Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants: The role of epigenetic pathways', *Development and Psychopathology* 24: 1361–76. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954579412000764.
- Mu, M., Wang, S. F., Sheng, J., et al. (2012) 'Birth weight and subsequent blood pressure: A meta-analysis', *Archives of Cardiovascular Diseases*, pp. 99–113.
- Mulligan, C. J., D'Errico, N. C., Stees, J. and Hughes, D. A. (2012) 'Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight', *Epigenetics* 7: 853–7.
- O'Donnell, K. J. and Meaney, M. J. (2016) 'Fetal Origins of Mental Health: The Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis', *American Journal of Psychiatry* appi.ajp.2016.1. Available at: <http://ajp.psychiatryonline.org/doi/10.1176/appi.ajp.2016.16020138>.
- Oliveira, E. de (2006) 'Delimitando o conceito de stress', *Ensaio e Ciência* 11–8. Available at: <http://sare.anhanguera.com/index.php/rencs/article/viewArticle/327>.
- Oros Klein, K., Grinek, S., Bernatsky, S., et al. (2015) 'FuntooNorm: An R package for normalization of DNA methylation data when there are multiple cell or tissue types', *Bioinformatics* 32: 593–5.
- Ouellet-Morin, I., Dionne, G., Lupien, S. J., et al. (2011) 'Prenatal alcohol exposure and cortisol activity in 19-month-old toddlers: An investigation of the moderating effects of sex and testosterone', *Psychopharmacology* 214: 297–307.
- Palma-Gudiel, H., Córdova-Palomera, A., Eixarch, E., Deuschle, M. and Fañanás, L. (2015) 'Maternal psychosocial stress during pregnancy alters the epigenetic signature of the glucocorticoid receptor gene promoter in their offspring: A meta-analysis', *Epigenetics*, pp. 893–902.
- Perroud, N., Courtet, P., Vincze, I., et al. (2008) 'Interaction between BDNF Val66Met and childhood trauma on adult's violent suicide attempt', *Genes, Brain and Behavior* 7: 314–22.
- Pitzer, L. M. and Fingerman, K. L. (2010) 'Psychosocial resources and associations between childhood physical abuse and adult well-being', *Journals of Gerontology - Series B Psychological Sciences and Social Sciences* 65 B: 425–33.

- Premji, S. (2014) 'Perinatal Distress in Women in Low- and Middle-Income Countries: Allostatic Load as a Framework to Examine the Effect of Perinatal Distress on Preterm Birth and Infant Health', *Maternal and Child Health Journal*, pp. 2393–407.
- Radulescu, L., Ferechide, D. and Popa, F. (2013) 'The importance of fetal gender in intrauterine growth restriction.', *Journal of Medicine and Life* 6: 38–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3624643&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., et al. (2015) 'limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies', *Nucleic acids research* 43: e47.
- Ruiz, R. J. and Fullerton, J. T. (1999) 'The measurement of stress in pregnancy.', *Nursing & health sciences* 1: 19–25.
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., et al. (2003) 'TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis', *BioTechniques* 34: 374–8.
- Sandman, C. A., Davis, E. P., Buss, C. and Glynn, L. M. (2012) 'Exposure to prenatal psychobiological stress exerts programming influences on the mother and her fetus', *Neuroendocrinology*, pp. 8–21.
- Saviouk, V., Moreau, M. P., Tereshchenko, I. V. and Brzustowicz, L. M. (2007) 'Association of synapsin 2 with schizophrenia in families of Northern European ancestry', *Schizophrenia Research* 96: 100–11.
- Schlinzig, T., Johansson, S., Gunnar, A., Ekström, T. and Norman, M. (2009) 'Epigenetic modulation at birth - Altered DNA-methylation in white blood cells after Caesarean section', *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* 98: 1096–9.
- Seit-Nebi, A., Cheng, W., Xu, H. and Han, J. (2012) 'MLK4 has negative effect on TLR4 signaling', *Cellular and Molecular Immunology* 9: 27–33. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cmi.2011.15>.
- Seyle, H. (1973) 'The Evolution Concept of the Stress', *American Scientist* 61: 692–9.
- Shen, L., Kondo, Y., Guo, Y., et al. (2007) 'Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters', *PLoS Genetics* 3: 2023–6.
- Slavich, G. M. and Irwin, M. R. (2014) 'From stress to inflammation and major depressive disorder: A social signal transduction theory of depression.', *Psychological Bulletin* 140: 774–815. Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/a0035302>.
- Sloan, S. A. and Barres, B. A. (2014) 'Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders', *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 75–81.
- Steeb, H., Ramsey, J. M., Guest, P. C., et al. (2014) 'Serum proteomic analysis identifies sex-specific differences in lipid metabolism and inflammation profiles in adults diagnosed with Asperger syndrome', *Molecular Autism* 5: 4. Available at: <http://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-2392-5-4>.
- Stuebe, A. M., Forman, M. R. and Michels, K. B. (2009) 'Maternal-recalled gestational weight

- gain, pre-pregnancy body mass index, and obesity in the daughter.’, *International journal of obesity* (2005) 33: 743–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.101>.
- Swanson, J. M., Entringer, S., Buss, C. and Wadhwa, P. D. (2009) ‘Developmental origins of health and disease: Environmental exposures’, *Seminars in Reproductive Medicine*, pp. 391–402.
- Sweatt, J. D. (2009) ‘Experience-Dependent Epigenetic Modifications in the Central Nervous System’, *Biological Psychiatry*, pp. 191–7.
- Tandon, R., Keshavan, M. S. and Nasrallah, H. A. (2008) ‘Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology.’, *Schizophrenia research* 102: 1–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514488>.
- Tegethoff, M., Greene, N., Olsen, J., Meyer, A. H. and Meinlschmidt, G. (2010) ‘Maternal Psychosocial Adversity During Pregnancy Is Associated With Length of Gestation and Offspring Size at Birth: Evidence From a Population-Based Cohort Study’, *Psychosomatic Medicine* 72: 419–26. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006842-201005000-00014>.
- Touleimat, N. and Tost, J. (2012) ‘Complete pipeline for Infinium[®] Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation’, *Epigenomics* 4: 325–41. Available at: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/epi.12.21>.
- Tsankova, N., Renthal, W., a, K. and E, N. (2007) ‘Epigenetic Regulation in Psychiatric Disorders.’, *Nature reviews. Neuroscience* 8: 355–67. Available at: papers2://publication/uuid/380254A8-5AD7-4700-A357-AB6DD245755A.
- Van Os, J. and Selten, J. P. (1998) ‘Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands’, *British Journal of Psychiatry* 172: 324–6.
- Waterland, R. A. and Jirtle, R. L. (2003) ‘Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation.’, *Molecular and cellular biology* 23: 5293–300. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=165709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weinstock, M. (2015) ‘Changes induced by prenatal stress in behavior and brain morphology: Can they be prevented or reversed?’, *Advances in Neurobiology*, pp. 3–25.
- WHO (1995) ‘Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee.’, *World Health Organization technical report series*, pp. 1–452.
- Wilhelm-Benartzi, C. S., Houseman, E. A., Maccani, M. A., et al. (2012) ‘In utero exposures, infant growth, and DNA methylation of repetitive elements and developmentally related genes in human placenta.’, *Environmental health perspectives* 120: 296–302. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3279448&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Wilson, A. S., Power, B. E. and Molloy, P. L. (2007) ‘DNA hypomethylation and human diseases.’, *Biochimica et biophysica acta* 1775: 138–62.

- World Health Organisation (WHO) (1995) 'Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee.', *World Health Organization technical report series*, pp. 1–452. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8594834>.
- Yang, X., Lay, F., Han, H. and Jones, P. A. (2010) 'Targeting DNA methylation for epigenetic therapy', *Trends in Pharmacological Sciences*, pp. 536–46.
- Yousefi, P., Huen, K., Davé, V., et al. (2015) 'Sex differences in DNA methylation assessed by 450 K BeadChip in newborns.', *BMC genomics* 16: 911. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553366> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4640166>.
- Zimet, G. D., Dahlem, N. W., Zimet, S. G. and Farley, G. K. (1988) 'The Multidimensional Scale of Perceived Social Support', *Journal of Personality Assessment* 52: 30–41. Available at: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1207/s15327752jpa5201_2.