

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

CAINÁ CORRÊA DO AMARAL

**Associação entre o SNP rs6505162 e a expressão de hsa-miR423-5p e
has-miR221-3p no soro de gestantes e por bioinformática**

Pelotas

2019

CAINÁ CORRÊA DO AMARAL

**Associação entre o SNP rs6505162 e a expressão de hsa-miR423-5p e
has-miR221-3p no soro de gestantes e por bioinformática**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde e
Comportamento da Universidade
Católica de Pelotas.

Orientadora: Fernanda Nedel

Pelotas

2019

A485a Amaral, Cainá Corrêa do

Associação entre o SNP rs6505162 e a expressão de hsa-miR423-5p e has-miR221-3p no soro de gestantes e por bioinformática / Cainá Corrêa do Amaral. - 2019.

84 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Comportamento) - Universidade Católica de Pelotas, 2019.

Orientadora: Fernanda Nedel.

1. Gestação. 2. Polimorfismos. 3. rs6505162. 4. MicroRNA-423-5p. 5. MicroRNA-221-3p. I. Nedel, Fernanda. II. Título.

CDD 618.3

Catálogo na fonte: Bibliotecária Jetlin da Silva Maglioni CRB-10/2462

CAINÁ CORRÊA DO AMARAL

**Associação entre o SNP rs6505162 e a expressão de hsa-miR423-5p e
has-miR221-3p no soro de gestantes e por bioinformática**

Banca examinadora:

Prof^o Dr^o Adriano Martinbianco de Assis

Prof^a Dr^a Tatiana Bilhalva

Dr^a Jéssica Puchalski Trettim

Orientadora - Prof^a Dr^a Fernanda Nedel

RESUMO

Com o início da gravidez, profundas alterações anatômicas e fisiológicas afetam praticamente todos os órgãos do corpo da mãe. Essas mudanças são induzidas principalmente para atender às complexas demandas de desenvolvimento e proteção fetal e para preparar o organismo materno para o parto. Os microRNAs são pequenas moléculas endógenas não codificantes capazes de regular a expressão gênica no período pós-transcricional e foram recentemente estudados para melhor compreender as condições fisiológicas e patológicas da gestação. Nesse sentido, também é enfatizada a identificação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs6505162. O SNP rs6505162 está localizado no pré-microRNA-423 e mapeia para 17q11.2, com uma mudança nucleotídica de C para A. Esse polimorfismo foi considerado funcional, regulando os níveis de expressão do microRNA-423. Dessa forma, esta dissertação teve como objetivo avaliar a associação entre o SNP rs6505162 e a expressão de microRNAs (microRNA-423-5p e microRNA-221-3p) em gestantes. Nossa amostra incluiu 173 gestantes. Questionários com questões sociodemográficas foram aplicados para caracterizar a amostra. A genotipagem do SNP rs6505162 foi avaliada por PCR em tempo real. A expressão de microRNA-423-5p, microRNA-221-3p foi avaliada por PCR quantitativa. A análise de bioinformática foi realizada através do software DIANA Tools, mirPath v.3. Os resultados mostram uma associação entre o genótipo CC e o microRNA-221-3p ($p = 0,015$), bem como com o alelo C e o microRNA-423-5p ($p = 0,037$) e o microRNA-221-3p ($p = 0,025$). A associação foi mantida após a análise de regressão linear ajustada. As portadoras do alelo C apresentaram níveis de expressão de microRNA-423-5p e microRNA-221-3p mais altos no soro sanguíneo. A análise de correlação mostrou uma correlação positiva entre os microRNAs ($p = 0,001$). A análise de bioinformática revelou

a via de sinalização do estrogênio ($p = 0,002$) e o gene do proto-oncogene Raf-1, serina / treonina-quinase (RAF1). Em conclusão, nossos resultados mostram que o SNP rs6505162 influencia a expressão do microRNA-423-5p e do microRNA-221-3p no sangue periférico e que a expressão de ambos os microRNAs está positivamente correlacionada na gestaç. Assim, a interação entre SNP e microRNAs pode representar um importante alvo de estudo na busca de biomarcadores para condições fisiológicas e patológicas.

Palavras-chave: Gestação, polimorfismos, rs6505162, microRNA-423-5p, microRNA-221-3p.

ABSTRACT

With the onset of pregnancy, profound anatomical and physiological changes affect virtually all organs in the mother's body. These changes are mainly induced to meet the complex demands of fetal development and protection and to prepare the maternal organism for parturition. MicroRNAs are small non-coding endogenous molecules capable of regulating gene expression in the post-transcriptional period and have been recently studied in order to better comprehend the physiological and pathological conditions of pregnancy. In this sense, the identification of the rs6505162 single nucleotide polymorphism (SNP) is also emphasized. The rs6505162 SNP is located in pre-microRNA-423 and maps to 17q11.2, with a nucleotide change from C to A. This polymorphism has been considered functional, regulating levels microRNA-423 expression. Thus, this study aimed to evaluate the association between rs6505162 SNP and microRNAs (microRNA-423-5p and microRNA-221-3p) expression in pregnancy. Our sample included 173 pregnant. Questionnaires with socio demographic questions were applied to characterize the sample. And rs6505162 SNP genotyping were evaluated by real time PCR. MicroRNA-423-5p, microRNA-221-3p expression were evaluated by quantitative PCR. Bioinformatics analysis was performing using the DIANA Tools software, mirPath v.3. The results shows an association between the CC genotype and microRNA-221-3p ($p = 0.015$), as well as with allele C and microRNA-423-5p ($p = 0.037$) and microRNA-221-3p ($p = 0.025$). The association was maintained after the adjusted linear regression analysis. The C allele carriers have higher levels of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression in the blood serum. The correlation analysis showed a positive correlation between the microRNAs ($p = 0.001$). The bioinformatics analysis revealed the estrogen signaling pathway ($p = 0.002$), and the *Raf-1 proto-*

oncogene, serine/threonine kinase (RAF1) gene. In conclusion, our results show that the rs6505162 SNP influences the peripheral blood expression of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p, and that both microRNAs expression are positively correlated in pregnancy. Thus, this SNP and microRNAs interaction could represent an important study target to seek biomarker for physiological and pathological conditions.

Keywords: Pregnancy, polymorphisms, rs6505162, microRNA-423-5p, microRNA-221-3p.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (Revisão de literatura) – Representação das isoformas da família do VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF) de acordo com seus receptores específicos (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-2, NRP1 e NRP2)	30
Figura 1 (Artigo) - The target genes of mir-221-3p and miR-423-5p in the estrogen signaling pathway.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Revisão de literatura) – Descrição dos estudos realizados sobre polimorfismos do VEGF relacionados a depressão	36
Tabela 2 (Revisão de literatura) – Cronograma de atividades a serem realizadas ..	44
Tabela 3 (Revisão de literatura) – Orçamento de material para extração do DNA e genotipagem dos polimorfismos	45
Tabela 1 (Artigo) – Sample distribution according to socio-demographic characteristics and genetics variables in pregnant in the city of Pelotas.....	61
Tabela 2 (Artigo) – Association between microRNA microRNA423-5p and microRNA221-3p expression and rs6505162 SNP genotypes and alleles.....	61
Tabela 3 (Artigo) – Correlation analysis between microRNAs miR221-3p and miR423-5p.....	62
Tabela 4 (Artigo) – Crude and adjusted analysis of the microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression in a sample of pregnant.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABEP	Associação Brasileira de Empresas e Pesquisa
ANOVA	Análise de Variância
BDI	Inventário de Depressão de Beck
C	Citosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID-10	Código Internacional de Doenças – 10
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Depressão Pós-parto
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – IV
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
G	Guanina
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GWAS	Genome-wide Association Study
HAM-D	Escala de Depressão de Hamilton
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Estatística
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
LANEC	Laboratório de Neurociências Clínicas
MDD	Major Disorder Depressive
MINI	International Neuropsychiatric Interview
NRP	Neurofilina
NSPC	Células Tronco Progenitoras Neuronais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PIGF	Fator de Crescimento Placentário
RNA	Ácido Ribonucleico

RNA _m	RNA mensageiro
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCC	Terapia Cognitivo-comportamental
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCN	Terapia Cognitiva Narrativa
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TEC	Terapia Eletroconvulsiva
UCPEL	Universidade Católica de Pelotas
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

IDENTIFICAÇÃO

Título: Associação entre SNP e a expressão de microRNAs na gestação

Designação da titulação pretendida pela autora: Mestre

Orientadora: Fernanda Nedel

Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

Curso: Mestrado em Saúde e Comportamento

Linha de pesquisa: Saúde Materno-Infantil

Data: 29 de novembro de 2019

SUMÁRIO

CARTA JUSTIFICATIVA	14
1 PROJETO.....	15
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS	18
1.3 HIPÓTESES	19
1.4 REVISÃO DE LITERATURA	20
1.5 MÉTODO	38
1.5.1 Delineamento	38
1.5.2 Participantes	38
1.5.3 Procedimentos e instrumentos.....	40
1.5.4 Análise dos dados.....	42
1.5.5 Aspectos éticos	43
1.6 CRONOGRAMA	44
1.7 ORÇAMENTO	45
1.8 REFERÊNCIAS	46
2 ARTIGO	52
ANEXOS	76
Anexo A: Carta de aprovação no comitê de ética	78
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido para gestantes maiores de idade	81
Anexo C: Termo de consentimento livre e esclarecido para gestantes menores de idade ...	82
Anexo D: Sistema de pontos para averiguação da classe social, segundo o Critério da ABEP	83

CARTA JUSTIFICATIVA

O projeto inicial foi qualificado intitulado “Investigação de polimorfismos da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na depressão pré-natal e pós-parto” tinha como objetivo investigar polimorfismos da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no transtorno depressivo maior em gestantes da cidade de Pelotas, a fim de ampliar as bases do conhecimento acerca da influência destes polimorfismos na prevenção, no diagnóstico e no tratamento da depressão no período pré-natal e pós-parto, evitando, dessa maneira, as suas prováveis consequências sobre as díades. Porém, diante da oportunidade de aninhar a dissertação ao estudo intitulado: “Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na tríade familiar” foi realizada a alteração da dissertação com o novo título “Associação entre o SNP rs6505162 SNP e a expressão de microRNAs em gestantes” com o objetivo de avaliar a associação entre o SNP rs6505162 e a expressão de microRNAs (microRNA-423-5p e microRNA-221-3p) em gestantes. A escolha do novo projeto se deu pela relevância clínica do tema, visto que o período gestacional é um momento de grande vulnerabilidade da mulher e quaisquer alteração pode acarretar efeitos adversos a díade mãe-feto/bebê. E ainda, os polimorfismos de microRNAs têm apresentado papel importante fisiologicamente e/ou patologicamente junto a expressão dos microRNAs quando avaliados durante a gestação.

1 PROJETO

1.1 INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior, é conhecido popularmente como depressão e caracterizado como um transtorno mental complexo comum e uma das principais causas de incapacidade no mundo (Buttenshon, Demontis et al. 2015). No entanto, apesar da complexidade, estima-se que mais de 300 milhões de pessoas, de todas as idades, sofram com o transtorno, no mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

A depressão pode ser caracterizada por tristeza persistente ou pela perda de interesse em atividades que normalmente são prazerosas, acompanhadas da incapacidade de realizar atividades diárias. Contudo, sintomas como, perda de energia, mudanças no apetite, alterações no padrão do sono, ansiedade, falta de concentração, indecisão, inquietude, sensação de não ter valor, sensação de culpa ou desesperança, e pensamentos suicidas ou de causar danos a si mesmos, também podem ser comuns durante os episódios depressivos . E especialmente quando os distúrbios se tornam de longa duração e com intensidade dos sintomas, em moderado ou grave, a depressão é vista como uma condição crítica para a saúde pública, onde, nos piores casos pode levar ao suicídio .

O TDM pode surgir em qualquer momento da vida. Contudo, o período pré-natal e pós-parto, é considerado um momento de grande vulnerabilidade da mulher (Yim, Tanner Stapleton et al. 2015), visto que as mulheres enfrentam uma série de mudanças e desafios que podem aumentar seu estresse, e que, por vez, influenciar no humor e bem-estar. Assim, estudos têm relatado que entre 13 e 19% das mulheres experimentarão ao menos um episódio depressivo durante o período, que compreende desde o início da gestação, até 12 meses após o parto. Em consoante, mulheres com histórico de TDM

prévio, possuem maior risco para depressão pós-parto (O'Hara and Wisner 2014, Pope, Sharma et al. 2018).

Em adição aos sintomas depressivos, a doença também age biologicamente. Assim, evidências recentes têm demonstrado que alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) desempenham papéis importantes na etiologia do TDM durante a gravidez. Visto que alterações hormonais (entre estrogênio e progesterona) interagem com o eixo HPA com a capacidade de desencadear anormalidades do eixo em mulheres suscetíveis. Dessa forma, em condições normais durante a gestação, o aumento da estimulação hormonal ocasiona uma hiperatividade do eixo HPA acarretando em níveis elevados de cortisol plasmático. Além disso, o sistema de adaptações hormonais estabelecido ao longo da gravidez é repentinamente interrompido no momento do parto, e assim desafia o organismo materno a restaurar um novo equilíbrio endócrino (Yim, Tanner Stapleton et al. 2015). Logo, o desequilíbrio endócrino no período pós-parto imediato, pode ser visto como um indicativo para uma DPP subsequentemente.

Diante do contexto, denota-se a necessidade de um acompanhamento cuidadoso com as mães, em especial as que estão em vulnerabilidade social, ou seja, predispostas aos fatores de risco consistentes para a depressão (Silva, Jansen et al. 2012).

O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é bastante conhecido por suas propriedades endoteliais em regular a diferenciação celular na angiogênese fisiológica e patológica, inclusive mantendo um papel chave no processo de placentação (Andraweera, Dekker et al. 2012), essencial para o desenvolvimento da rede vascular feto placentária (Gao, Zhou et al. 2014, Sharma, da Costa e Silva et al. 2016). Além de suas atividades pró angiogênica, estudos dos últimos anos revelam um potencial neurotrófico e neuroprotetor do VEGF tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Exercendo

influências diretas, induzindo a proliferação, migração e sobrevivência de células nervosas de diferentes tipos. Tais descobertas lançam possíveis caminhos sobre o papel do VEGF na regulação fisiológica cerebral, permitindo vislumbrar um possível envolvimento do VEGF na patofisiologia da depressão. De fato, estudos têm mostrado uma desregulação da expressão do VEGF em pacientes deprimidos quando comparado com seus controles (Iga, Ueno et al. 2007, Nowacka and Obuchowicz 2012). O papel do VEGF como potencial neurotrófico e neuroprotetor, vem sendo consolidado nos últimos anos, e portanto a sua possível relevância na depressão vem sendo sugerida (Pelletier, Roudier et al. 2015). No entanto, o seu envolvimento na depressão pré-natal e pós-parto ainda permanece obscura. Assim, apoiando-se nos dados obtidos a partir do TDM e da função do VEGF no cérebro, hipotetizamos uma possível relação entre SNPs do gene do VEGF e a depressão no período pré- e pós-natal, bem como na resposta ao tratamento as psicoterapias breves.

Nesse contexto, a identificação de Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) que possam prever a suscetibilidade à depressão e/ou um auxílio na resposta ao tratamento, pode influenciar diretamente na implicação da prática clínica. Assim, pesquisas acerca dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da depressão e na resposta ao tratamento com psicoterapias breves, permitem a implementação de seus achados na predição de risco personalizada e num tratamento mais direcionado a depressão (Xie, Stathopoulou et al. 2017).

Assim, este projeto está sendo elaborado com a finalidade de ampliar as bases do conhecimento acerca da influência dos polimorfismos do VEGF na prevenção, no diagnóstico e no tratamento da depressão pré-natal e pós-parto, no intuito de evitar, as prováveis consequências sobre as díades. Como produto direto deste projeto almeja-se a

publicação de um artigo A1, bem como a divulgação dos seus resultados em congressos da área medicina I.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Investigar polimorfismos da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no transtorno depressivo maior em gestantes da cidade de Pelotas, a fim de ampliar as bases do conhecimento acerca da influência destes polimorfismos na prevenção, no diagnóstico e no tratamento da depressão no período pré-natal e pós-parto, evitando, dessa maneira, as suas prováveis consequências sobre as díades.

1.2.2 Específicos

- Analisar e correlacionar a frequência genotípica dos polimorfismos rs4416670, rs2010963 e rs10434 do VEGF nas gestantes com depressão pré-natal com o grupo controle;
- Analisar e correlacionar a frequência genotípica dos polimorfismos rs4416670, rs2010963 e rs10434 do VEGF nas mães com depressão pós-parto com o grupo controle;
- Analisar e correlacionar a frequência genotípica dos polimorfismos rs4416670, rs2010963 e rs10434 do VEGF com a remissão dos sintomas depressivos das gestantes, no período pré-natal e pós-natal, frente ao tratamento com psicoterapia breve (Terapia cognitiva-comportamental/Terapia cognitiva-comportamental associada a Terapia cognitiva narrativa).

1.3 HIPÓTESES

- A frequência genotípica dos polimorfismos, TC (rs4416670), GC/CC (rs2010963) e GA (rs10434) será maior em gestantes com transtorno depressivo pré-natal quando comparadas ao grupo controle;

- A frequência genotípica dos polimorfismos TC (rs4416670), GC/CC (rs2010963) e GA (rs10434) será maior nas mães com depressão pós-parto em comparação com o grupo controle;

- Haverá uma correlação negativa entre a frequência genotípica dos polimorfismos TC (rs4416670), GC/CC (rs2010963) e GA (rs10434) e a remissão dos sintomas depressivos nas gestantes, no período pré-natal e pós-natal, em resposta ao tratamento com psicoterapia breve.

1.4. REVISÃO DE LITERATURA

1.4.1 Transtorno Depressivo Maior (TDM) no período pré-natal

O Transtorno Depressivo Maior, popularmente conhecido como depressão é um transtorno mental complexo comum e uma das principais causas de incapacidade no mundo (Buttenschon, Demontis et al. 2015). Apesar da complexidade da depressão, sua ocorrência a nível mundial tem sido relatada com frequência, pois estima-se que mais de 300 milhões de pessoas, de todas as idades, sofram com esse transtorno, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

A depressão pode ser caracterizada por tristeza persistente ou pela perda de interesse em atividades que normalmente são prazerosas, acompanhadas da incapacidade de realizar atividades diárias. Contudo, sintomas como, perda de energia, mudanças no apetite, alterações no padrão do sono, ansiedade, falta de concentração, indecisão, inquietude, sensação de não ter valor, sensação de culpa ou desesperança, e pensamentos suicidas ou de causar danos a si mesmos, também podem ser comuns durante os episódios depressivos (Brown, McIntyre et al. 2018). Para consolidar o diagnóstico, requer-se um período de duas semanas durante as quais pelo menos cinco dos sintomas acima devem estar presentes. Especialmente quando os distúrbios se tornam de longa duração e com intensidade dos sintomas, em moderado ou grave, a depressão é vista como uma condição crítica para a saúde pública, onde, nos piores casos pode levar ao suicídio (Brown, McIntyre et al. 2018).

Definida também como uma síndrome multidimensional composta de distúrbios psicológicos entre as dimensões humorais, cognitivas e vegetativas. Sua psicopatologia é subvencionada por mudanças neurobiológicas que podem ser descritas como circuitos neurais e redes assíncronas em sua reciprocidade (Brown, McIntyre et al. 2018).

Evidenciando que sua etiologia ainda não é totalmente elucidada (Buttenschon, Demontis et al. 2015).

Nesse sentido, vale salientar que as mulheres são a população mais afetada (Parker, Fletcher et al. 2014). Distúrbios afetivos, como ansiedade e depressão, são desproporcionalmente prevalente em mulheres, atingindo cerca de 10-20% após a puberdade, entre 15 e 19 anos (Faravelli, Alessandra Scarpato et al. 2013). Essa tendência persiste até os 54 anos e declina durante a idade avançada, quando é chegada a menopausa (Faravelli, Alessandra Scarpato et al. 2013).

Em consoante, o estudo de Silva e colaboradores, realizado com gestantes na cidade de Pelotas, apresentou uma prevalência de sintomas depressivos de 20,5% no ano de 2011 (Silva, Jansen et al. 2012). O qual continua compatível na atualidade, de acordo com os dados do acompanhamento pré-natal de um grande estudo de coorte de base populacional no sul do Brasil realizado por Coll e colaboradores, no ano de 2017, onde a proporção de mulheres grávidas com triagem positiva para depressão pré-natal foi de 16% em Pelotas (Coll, da Silveira et al. 2017).

Sendo assim, é necessário chamar a atenção para o período pré-natal, pois caracteriza-se como um momento de vulnerabilidade da mulher, abrindo espaço para o desenvolvimento da depressão pré-natal, principalmente durante o primeiro trimestre de gestação (Shakeel, Eberhard-Gran et al. 2015). Nesse sentido, evidências recentes têm demonstrado que alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) desempenham papéis importantes na etiologia do TDM durante a gravidez. Visto que alterações hormonais (entre estrogênio e progesterona) interagem com o eixo HPA com a capacidade de desencadear anormalidades do eixo em mulheres suscetíveis. Dessa forma, em condições normais durante a gestação, o aumento da estimulação hormonal ocasiona

uma hiperatividade do eixo HPA acarretando em níveis elevados de cortisol plasmático (Gelman, Flores-Ramos et al. 2015).

Por conseguinte, sabe-se que a placenta representa uma interface essencial entre as circulações materna e fetal, com propriedades importantes como, transporte de sangue e nutrientes ricos em oxigênio. Contudo, também é dotada de função endócrina, através da produção de hormônios peptídicos (CRH, gonadotrofina coriônica humana, hormônio do crescimento e lactogênio placentário humano), citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento (EGF de ligação à heparina, IGF1, VEGF), cortisol, prostaglandinas, estrogênios e progesterona (Thomson 2013). Sendo assim, denota-se a complexidade das alterações ocorridas durante a gestação, e os inúmeros marcadores envolvidos no processo para que funções metabólicas, energéticas e associadas ao crescimento, ocorram simultaneamente e em homeostasia. No entanto, quaisquer interferências ou desequilíbrios entre os fatores acima, têm sido implicados em transtornos de humor e/ou comportamentos depressivos. Evidenciando assim, que a atividade endócrina da placenta interage com o cérebro e com o eixo HPA no intuito de manter um equilíbrio homeostático, a fim de levar a gravidez a termo e com sucesso no desfecho neonatal (Gelman, Flores-Ramos et al. 2015).

No entanto, o diagnóstico de TDM nesse período pode ser complicado devido à grande variedade de sintomas normais da gestação como, alterações do sono, alterações do apetite e fadiga, sendo sobrepostos a alguns dos sintomas diagnósticos da doença (Sidebottom, Harrison et al. 2012). Nesse sentido, se faz necessário, concomitantemente, uma avaliação dos fatores de risco psicossociais nas gestantes incluindo questões sobre instabilidade de moradia, recursos financeiros, apoio social, violência doméstica, transtornos psiquiátricos ativos e abuso de substâncias (Pearlstein 2015).

Nesse contexto, a triagem e a identificação de transtornos psiquiátricos e das necessidades psicossociais no pré-natal devem ocorrer o mais breve possível. Assim, dentre os métodos diagnósticos utilizados para identificação da depressão, o mais conhecido é o *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais* (DSM), um manual que lista critérios e categorias diagnósticas, a fim de auxiliar os profissionais de saúde mental a diagnosticar pacientes com transtornos mentais, como o TDM (Uher, Payne et al. 2014). Um outro método também bastante conhecido é a *MINI - International Neuropsychiatric Interview* (MINI-Plus), uma entrevista diagnóstica estruturada, desenvolvida para avaliar os diagnósticos de pacientes psiquiátricos de acordo com os critérios do DSM-IV, citado anteriormente, e do *Código Internacional de Doenças* (CID-10) (van Vliet and de Beurs 2007). Em conjunto aos métodos citados anteriormente, ainda podem ser utilizados instrumentos que realizam uma avaliação quanto a severidade dos sintomas depressivos, como por exemplo, o *Inventário de Depressão de Beck* (BDI), composto por 21 itens, e que tem a finalidade de auxiliar os profissionais de saúde na avaliação acerca da psicoterapia que será utilizada para a depressão. Sua fácil aplicabilidade e solidez psicométrica popularizaram seu uso em uma variedade de amostras e ambientes de saúde no mundo todo (Vieira Da Silva Magalhaes, Tavares Pinheiro et al. 2008, Wang and Gorenstein 2013).

De acordo com a OMS, é fundamental salientar que o TDM é um transtorno tratável, seja por meio de psicoterapias, medicamentos antidepressivos ou a combinação de ambos, variando de acordo com a responsividade do indivíduo. Portanto, o tratamento terapêutico da depressão pré- e pós-natal é um julgamento clínico que deve ser individualizado e que pondera o benefício materno da terapia em relação ao risco de efeitos adversos para o feto (Pearlstein 2015).

Assim, estratégias não farmacológicas como as psicoterapias breves, são preferidas pelas gestantes para a prevenção da recorrência da depressão, bem como para o tratamento da doença, no intuito de minimizar a exposição fetal a medicamentos psicotrópicos. A partir disso, a terapia cognitivo-comportamental (TCC) é uma forma de psicoterapia breve com uma eficácia já consolidada para o tratamento e prevenção da depressão (Beijers, Buitelaar et al. 2014). A TCC baseia-se na premissa de que o sofrimento emocional e os comportamentos desadaptativos são causados por padrões disfuncionais de cognição (Beck and Haigh 2014, da Silva, Wiener et al. 2018). Nesse sentido, o objetivo da TCC é ajudar os pacientes a identificar, avaliar, desafiar e modificar suas crenças disfuncionais, no intuito de alterar os comportamentos desadaptativos (Sockol 2015, da Silva, Wiener et al. 2018).

Em um ensaio clínico randomizado realizado na cidade de Pelotas por Moreira e colaboradores, foi avaliado o impacto de dois modelos de terapia cognitiva breve para depressão, TCC e Terapia Cognitiva Narrativa (TCN), um outro modelo de psicoterapia breve que visa reformular narrativas pessoais, elaborando uma nova biografia baseada em histórias de vida que perderam sentido e se tornam incoerentes. Dentre os resultados do estudo, observou-se que os sintomas depressivos da população avaliada foram significativamente reduzidos após a intervenção em ambos os modelos de psicoterapia. No entanto a TCC foi mostrada-se mais eficaz em relação à remissão dos sintomas (Moreira, Cardoso Tde et al. 2015).

Entretanto, nos casos mais graves da doença, a intervenção medicamentosa se faz necessária, no entanto, o feto fica exposto a potenciais efeitos adversos a curto e longo prazo. Pois o uso de medicação antidepressiva durante a gravidez leva a um aumento do risco de aborto espontâneo, risco de malformações cardíacas congênitas, e sintomas

neonatais transitórios em até um terço dos neonatos (Pearlstein 2015). Dentre as medicações mais conhecidas estão os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), entretanto, é difícil identificar seus efeitos específicos, o que pode influenciar no desenvolvimento do sistema serotoninérgico do feto (Brown, McIntyre et al. 2018).

Uma vez que o estresse pré-natal não tratado, a ansiedade e a depressão podem levar a resultados semelhantes, salienta-se que as decisões quanto ao tratamento, além de individualizadas precisam envolver a gestante, seu parceiro e clínicos de múltiplas especialidades (Pearlstein 2015). Contudo, a triagem e a identificação de transtornos psiquiátricos e necessidades psicossociais no pré-natal precisam de melhorias. Visto que, mesmo quando as gestantes reconhecem a necessidade de tratamento, ainda existem muitas barreiras para o acesso ao tratamento efetivo (Brown, McIntyre et al. 2018).

Logo, a depressão pré-natal vem sendo reconhecida como preditora para depressão pós-parto. Ressaltando sua associação a uma série de resultados negativos para o decorrer da gestação, ou até mesmo aos filhos, como, aumento do risco de parto prematuro, baixo peso ao nascer, restrição de crescimento intrauterino, problemas emocionais e comportamentais da mãe e da criança, dificuldades cognitivas e, transtornos de humor (Coll, da Silveira et al. 2017).

1.4.2 Depressão pós-parto

O período pós-parto, é considerado o tempo transcorrido desde o nascimento do bebê e saída da placenta, e pode ser estendido até 12 meses pós-parto (Yim, Tanner Stapleton et al. 2015). Logo, estudos têm relatado que entre 13 e 19% das mulheres experimentarão ao menos um episódio depressivo durante o período pré-natal, ou seja, desde o início da gestação, até o final do pós-parto. Entretanto, mulheres com histórico

de TDM prévio, possuem maior risco para depressão pós-parto (O'Hara and Wisner 2014, Pope, Sharma et al. 2018).

Após o nascimento do bebê, as mulheres enfrentam uma série de mudanças e desafios que podem aumentar seu estresse, e que, por vez, pode influenciar no humor e bem-estar. Pode-se assim dizer que a DPP é um distúrbio um tanto distinto de outras depressões, sendo o único apresentado de duas maneiras. Primeiramente, é precedido e acompanhado por adaptações biológicas importantes capazes de afetar o humor. E num segundo momento, a DPP não afeta apenas a mãe, mas também o desenvolvimento cognitivo, comportamental e emocional do recém-nascido, com efeitos potencialmente duradouros na adolescência (Yim, Tanner Stapleton et al. 2015).

De acordo com Viguera e colaboradores, 4,6% das mulheres com TDM tiveram, ao menos, um episódio da doença durante a gestação, enquanto que 30% delas tiveram um episódio durante o período pós-parto, denotando uma frequência maior de episódios depressivos no período pós-parto (Viguera, Tondo et al. 2011). De fato, O'Hara e colaboradores também estimaram que até 84% das mulheres experimentem sintomas de humor em graus variados no período inicial do pós-parto. Além disso, mulheres com história de transtorno depressivo maior têm um risco aumentado de recorrência durante esse período (O'Hara and Wisner 2014).

Em um estudo realizado nas maternidades da cidade de Pelotas por Moraes e colaboradores, foi encontrada uma prevalência de DPP de 19,1% no ano de 2000. O estudo utilizou a Escala de depressão de Hamilton (HAM-D) para avaliar as puérperas, e encontrou uma média de pontos na escala de 10,60. Foi possível denotar também que precárias condições socioeconômicas e a não aceitação da gravidez são os fatores mais influentes no aparecimento da doença (Moraes, Pinheiro et al. 2006).

Num outro estudo, realizado por Silva e colaboradores, também na cidade de Pelotas, a prevalência de sintomas depressivos encontrada no período pós-parto foi de 16,5%. Contudo, os fatores de risco se mantêm próximos aos citados anteriormente, como, menor nível socioeconômico ($p = 0,002$), não viver com parceiro ($p = 0,026$), transtornos psicológicos e / ou psiquiátricos prévios ($p < 0,001$), transtorno psiquiátrico familiar ($p = 0,046$) e uso de tabaco durante a gravidez ($p = 0,007$). Este estudo ainda salienta que a presença de sintomas depressivos no período neonatal aumentou o risco para o desenvolvimento de sintomas depressivos relevantes no pós-parto ($p < 0,001$) (Silva, Jansen et al. 2012).

Em consoante aos sintomas depressivos, a doença também age biologicamente, como por exemplo, através dos hormônios relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), implicados na depressão não puerperal. No entanto, os hormônios seguem um padrão semelhante aos hormônios reprodutivos, de modo que aumentam ao longo da gravidez e caem após o parto. Assim, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) do neuropeptídeo aumenta exponencialmente ao longo da gestação, visto que durante a gestação o CRH, que normalmente é liberado pelo hipotálamo, também é produzido pela placenta, estimulado pelo cortisol. Nesse sentido, afirma-se que o cortisol aumenta precocemente na gravidez e pode resultar em aumentos acelerados de CRH ao longo da gestação (Yim, Tanner Stapleton et al. 2015).

O funcionamento descrito acima, implica num sistema de adaptações hormonais estabelecido ao longo da gravidez que é repentinamente interrompido no momento do parto, e assim desafia o organismo materno a restaurar um novo equilíbrio endócrino (Yim, Tanner Stapleton et al. 2015). Através disso, o desequilíbrio endócrino no período

pós-parto imediato, pode ser um indicativo para o desenvolvimento da DPP subsequentemente.

Dentro do contexto demonstrado até aqui, denota-se a necessidade de um acompanhamento cuidadoso com as mães, em especial as que estão em vulnerabilidade social, ou seja, com fatores de risco consistentes para a depressão (Silva, Jansen et al. 2012), como: multiparidade, idade avançada, baixa escolaridade, não morar com cônjuge ou companheiro, gravidez planejada, pensar em aborto, histórico de sofrimento psíquico e / ou psiquiátrico, uso de tabaco ou álcool, e experiência de eventos estressantes no passado (Silva, Jansen et al. 2010). Sendo assim, fundamentais, ações integradas de saúde que levem em conta os fatores associados ao TDM, com a finalidade de prevenir graves problemas pessoais e familiares decorrentes da DPP (Moraes, Pinheiro et al. 2006).

Ainda assim, é necessário chamar atenção para a recorrência dos sintomas, visto que Silva e colaboradores, demonstraram que ao mesmo tempo em que o tratamento anterior pode sugerir assistência adequada em termos de cuidados de saúde mental durante a gestação, também pode indicar que episódios depressivos recorrentes podem ser desencadeados (Silva, Jansen et al. 2010).

Nesse sentido, enfatiza-se a necessidade de disponibilidade de instrumentos adequados às equipes de saúde, para que haja uma avaliação efetiva das gestantes quanto aos transtornos mentais, visto que estes estão associados ao aumento do risco de DPP, no intuito de oferecer às mães um cuidado especial e individualizado (Silva, Jansen et al. 2012). Assim, a literatura sugere que a aplicação de instrumentos breves para triagem de sintomas depressivos, como o BDI, e a HAM-D para mulheres durante a assistência pré-natal podem ser altamente benéficos (Silva, Jansen et al. 2010).

1.4.3 Fator de crescimento endotelial vascular: na depressão pré-natal e pós-parto

Pesquisas têm sido realizadas buscando relacionar e compreender a importância do VEGF nos processos que concernem a patofisiologia da depressão na população em geral. No entanto, pouca ou nenhuma literatura se faz notar no tocante do entendimento da relação dessa molécula na depressão pré-natal e pós-parto. No intuito de moldar essas relações, é necessário compreender o papel do VEGF no cérebro durante o processo fisiológico ou até mesmo no decorrer do TDM.

O VEGF caracteriza-se como um mitógeno celular bem conhecido e um fator de crescimento vascular regulador de permeabilidade (Nowacka and Obuchowicz 2012), localizado no cromossomo 6p21.3. Sua região codificante abrange oito éxons separados por sete íntrons. Composto por uma família de moléculas semelhantes, chamadas de isoformas, geradas a partir de um splicing alternativo de um único RNA mensageiro (Robinson and Stringer 2001), identificadas por letras: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, além do Fator de crescimento placentário (PlGF). Outra via de atuação do VEGF é através de seus receptores, divididos em duas classes: os receptores de tirosina-quinase incluindo o receptor VEGF-1 (VEGFR1, Flt-1), receptor VEGF-2 (VEGFR2, KDR, Flk-1) e o receptor VEGF-3 (VEGFR3, Flt-4); e os receptores não-tirosina quinase, incluindo a neuropilina-1 (NRP-1) e neuropilina-2 (NRP-2), que também são receptores de semaforinas e funcionam como co-receptores para os VEGFRs (Gao, Zhou et al. 2014), (Figura 1).

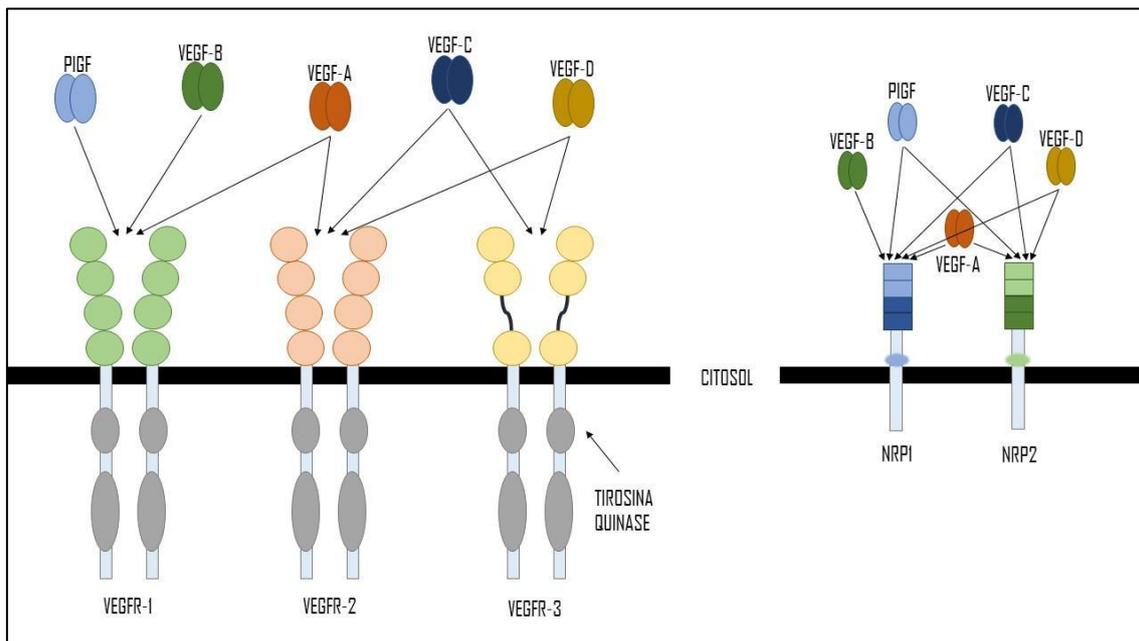


Figura 1: Representação das isoformas da família do VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PIGF) de acordo com seus receptores específicos (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-2, NRP1 e NRP2).

Além de suas atividades pró angiogênica, estudos dos últimos anos revelam um potencial neurotrófico e neuroprotetor do VEGF tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Exercendo influências diretas, induzindo a proliferação, migração e sobrevivência de células nervosas de diferentes tipos, como as células de Schwann, as células progenitoras neuronais, os astrócitos e a microglia (Nowacka and Obuchowicz 2012). Pois, este fator desempenha um papel importante nos processos de desenvolvimento do tecido nervoso, implicado na neurogênese e na regulação do desenvolvimento neuronal, além da diferenciação e formação de novos vasos no cérebro, os quais são conhecidos por estarem envolvidos na fisiopatologia do TDM (Iga, Ueno et al. 2007, Nowacka and Obuchowicz 2012). Nesse sentido, o VEGF como fator trófico, com influência sobre as células endoteliais vasculares e cerebrais, vem sendo foco de

estudos acerca das desordens neuropsiquiátricas, assim como o mecanismo de ação de drogas psicotrópicas (Iga, Ueno et al. 2007, Nowacka and Obuchowicz 2012).

Nesse contexto, Kirby e colaboradores, consideram o VEGF como uma molécula essencial para a plasticidade cerebral. Pois, no cérebro de camundongos adultos, sua superexpressão endógena estimula a neovascularização, melhora a cognição e a neurogênese do hipocampo através da proteção das células progenitoras neuronais. Em contrapartida, um bloqueio endógeno, prejudica as respostas cognitivas e neurogênicas a estímulos como antidepressivos. Nesse sentido, o estudo demonstra também que as células-tronco e progenitoras neurais (NSPC) adultas são uma fonte endógena de VEGF no hipocampo adulto. E logo, podem ser um contribuinte potente para fatores de crescimento secretados no nicho neurogênico adulto (Kirby, Kuwahara et al. 2015).

Tais descobertas lançam possíveis caminhos sobre o papel do VEGF na regulação fisiológica cerebral, permitindo vislumbrar um possível envolvimento do VEGF na patofisiologia da depressão. Assim, através de estudos como o de Sharma e colaboradores, que realizaram uma revisão sistemática de literatura com a finalidade de compilar as evidências acerca das alterações nos fatores, GDNF, IGF-1 e VEGF em pacientes deprimidos e como tais fatores neurotróficos podem ser afetados por medicações antidepressivas. Foi possível observar um panorama geral do que a literatura traz sobre os níveis de VEGF em indivíduos com TDM. Demonstrando que tais níveis têm sua expressão aumentada no soro e plasma de indivíduos deprimidos em comparação aos controles (Sharma, da Costa e Silva et al. 2016). Ainda, a literatura tem demonstrado uma correlação entre depressão e polimorfismos do VEGF (Galecki, Galecka et al. 2013, Elfving, Buttenschon et al. 2014, Han, Qiao et al. 2017, Xie, Stathopoulou et al. 2017).

Diante destes dados, o papel do VEGF como potencial neurotrófico e neuroprotetor, vem sendo consolidado nos últimos anos, e, portanto, a sua possível relevância na depressão vem sendo sugerida. No entanto, o seu envolvimento na depressão pré-natal e pós-parto ainda permanece obscura. Assim, apoiando-se nos dados obtidos a partir do TDM e da função do VEGF no cérebro, hipotetizamos uma possível relação entre o VEGF e o TDM no período pré- e pós-natal. E assim o aparecimento de polimorfismos de VEGF podem representar uma vertente chave para a fisiopatologia da depressão pré-natal e pós-parto.

1.4.4 Polimorfismos derivados do VEGF associados a Depressão

Polimorfismos genéticos são caracterizados como pequenas mutações genéticas, com uma ocorrência regular e simultânea em determinadas populações, superior a 1%. Os polimorfismos incluem diferenças em genótipos que variam em tamanho de um único local de nucleotídeo, chamado polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), até grandes sequências alélicas visíveis a nível cromossômico (Blazej, Paegel et al. 2003).

Em consoante, as variações genéticas são vistas como subjacentes à diferenças de suscetibilidade a doenças, como por exemplo, a idade de início da doença, a variabilidade e gravidade clínica e a maneira como o organismo responde aos tratamentos (Shaw 2013). Através disso, os polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, visto que são transmitidos associados a outros genes localizados em regiões cromossômicas próximas. Assim, os SNPs chamados “funcionais”, possuem a capacidade de afetar o processamento de genes, a ligação do fator de transcrição, a degradação do RNA mensageiro e demais fatores que influenciam a transcrição do gene e a tradução do mRNA em proteínas (Shaw 2013).

Nesse contexto, a identificação de SNPs que possam prever a suscetibilidade à depressão e/ou um auxílio na resposta ao tratamento com psicoterapias breves, podem influenciar diretamente na implicação da prática clínica. Assim, pesquisas acerca dos mecanismos envolvidos na depressão e na resposta ao tratamento, permitem a implementação de seus achados na predição de risco personalizada e num tratamento mais direcionado a doença (Xie, Stathopoulou et al. 2017).

Dentre os estudos que têm se dedicado a analisar polimorfismos do VEGF na depressão, destacam-se os abaixo citados denotando uma diferença significativa. De acordo com o conhecimento de Han e colaboradores, há uma interação entre o polimorfismo VEGF +405 G/C e eventos adversos da vida com a patologia do TDM. Na qual, indivíduos portadores dos alelos C (CC, CG) tiveram maior suscetibilidade ao TDM quando expostos a eventos de vida altamente negativos. Os resultados indicaram que as interações entre o polimorfismo do gene VEGF e fatores ambientais aumentam o risco de desenvolver TDM (Han, Qiao et al. 2017). Nesse sentido, a interação dos polimorfismos do VEGF com o meio ambiente pode ser explicada pelo modelo de diátese-estresse, que postula que indivíduos com 'genes de vulnerabilidade' são mais suscetíveis a depressão quando experimentam eventos negativos de vida. Entretanto, é reforçada uma vulnerabilidade genética, visto que eventos negativos de vida são comuns, e nem todos que vivenciam tais eventos, desenvolvem o TDM (Han, Qiao et al. 2017).

No estudo de Xie e colaboradores, foram analisados diversos polimorfismos do VEGF com a finalidade de relacioná-los a depressão, todos previamente identificados por meio do GWAS (*genome-wide association study*). No entanto, apenas um SNP (rs4416670) foi relacionado aos níveis de VEGF com o aumento do risco para depressão. O alelo C deste polimorfismo tem sido previamente associado a níveis reduzidos de

VEGF plasmático. Assim, vale salientar que este polimorfismo possui uma alta frequência, podendo chegar a 50%. Dessa forma, o efeito do seu alelo C pode afetar uma grande porcentagem da população, acarretando um grande impacto a saúde pública (Xie, Stathopoulou et al. 2017).

Dentre as observações obtidas por Elfving e colaboradores, está um aumento dos níveis séricos de VEGF nos indivíduos depressivos em comparação com indivíduos controle. Assim como, uma associação significativa entre o SNP rs10434 e a depressão, sugerindo o alelo A como um fator de risco para doença. Bem como uma associação positiva entre os episódios depressivos prévios e o aumento nos níveis séricos de VEGF. Denotando que o VEGF sérico pode ser um biomarcador útil para identificação da gravidade de depressão e episódios depressivos anteriores (Elfving, Buttenschon et al. 2014).

Para Galecki e colaboradores, a frequência da variante VEGFA + 405G/C, diferiu significativamente entre pacientes com TDM e controles saudáveis, pois o alelo C e o genótipo CC foram demonstrados como fatores de risco para o desenvolvimento do transtorno depressivo. Para salientar a significância do estudo, observou-se uma associação do alelo C do polimorfismo com os níveis plasmáticos de VEGF. Além disso, a eficácia de tratamentos antidepressivos também pode ser mediada pelo polimorfismo, no entanto influenciada pelo receptor do fator de crescimento (VEGFR) (Galecki, Galecka et al. 2013).

No estudo de Viikki e colaboradores, o alelo -2578 C do VEGF foi associado à resistência ao tratamento em pacientes deprimidos. O genótipo CC foi mais comum nos pacientes com terapia eletroconvulsiva (TEC) do que nos controles ($p = 0,015$). Por ser um grupo heterogêneo de doenças, os pacientes com o transtorno depressivo maior

respondem prontamente e facilmente ao tratamento básico com ISRS, enquanto outros são resistentes ao tratamento medicamentoso e requerem TEC, que é o método de tratamento mais eficaz para depressão atualmente. Nesse sentido, pacientes depressivos são clinicamente diferentes, e assim podem diferir biologicamente entre si (Viikki, Anttila et al. 2010). Visto que, os vasomediadores derivados do endotélio, como a endotelina-1 (ET-1), induzem uma vasoconstrição e uma vasodilatação do óxido nítrico. Assim, ambos são capazes de regular positivamente a expressão VEGF, supondo uma associação com polimorfismo VEGF 2578 C/A, modificando a imagem da depressão e desempenhando um papel na resistência a TEC (Viikki, Anttila et al. 2010).

Sendo assim, para dar maior ênfase aos resultados citados pelos estudos acima, foi realizada uma metanálise, considerada o topo na pirâmide de evidências, por Carvalho e colaboradores no ano de 2015. O estudo obteve a finalidade de compilar a literatura acerca do tema, atribuindo confiabilidade dos dados acerca dos níveis periféricos de VEGF em indivíduos com TDM em comparação a controles saudáveis. E os dados encontrados demonstram que os participantes com TDM apresentaram maiores concentrações periféricas de VEGF (no soro ou no plasma) quando comparados aos controles saudáveis ($p < 0,01$) (Carvalho, Kohler et al. 2015).

Em suma, a literatura científica demonstra-se vasta e abrangente em relação às causas da depressão maior na população em geral. No entanto, as evidências sobre preditores específicos de depressão em mulheres durante os períodos pré e pós-natal são escassas. Entretanto, a similaridade fisiopatológica de TDM em ambos os momentos sugere uma possível associação do VEGF com a depressão pré-natal e pós-parto. Acarretando vertentes para que os polimorfismos sejam considerados como fatores de

risco para a doença em gestantes portadoras de alelos mutados, ou até mesmo em resposta a tratamentos com psicoterapia breve.

Autor, ano	N amostral	Método Diagnóstico	Resultado(s) significativo(s)	Polimorfismo(s) analisado(s)
Xie, 2017	Casos (132 homens + 305 mulheres) Controles (187 homens + 290 mulheres)	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (critérios do DSM-IV)	O rs4416670 foi associado a um aumento do risco para depressão, enquanto o alelo menor C foi mais frequente nos pacientes deprimidos em comparação aos controles. O alelo menor tem sido previamente associado a níveis diminuídos de VEGF.	VEGF: rs6921438, rs4416670 , rs6993770 e rs10738760.
Han, 2017	Casos (274 / 82 homens + 192 mulheres) Controles (273 / 79 homens + 194 mulheres)	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (critérios do DSM-IV) e a severidade dos sintomas através da Escala de Depressão de Hamilton (HRSD-24)	Houve uma diferença significativa na distribuição dos genótipos entre os pacientes com MDD e controles (P = 0,003). Os indivíduos portadores de alelos C e que tiveram eventos de vida altamente negativos deram um OR de 3.873. Interações entre o polimorfismo no gene VEGF e fatores ambientais aumentam o risco de desenvolvimento da depressão.	VEGF: rs2010963 (+405 G/C)

Elfving, 2014	Casos (155 / 25 homens + 130 mulheres) Controles (290 / 57 homens + 223 mulheres)	CID-10 (World Health Organization, 1993)	O rs10434 apresentou associação significativa com depressão.	VEGF: RS3025042, RS3024994, RS2146323, RS3025000, RS3025047, rs10434 , RS3025030, RS998584, RS6899540, RS6900017, RS6905288.
Galecki, 2013	Casos (268 / 152 mulheres + 116 homens) Controles (200 / 121 mulheres + 79 homens)	CID-10 (World Health Organization, 1992) Classificação de Depressão de Hamilton Scale (HDRS) para avaliar o nível sintomas depressivos.	Observou-se que ambos os níveis de mRNA de VEGFA e proteína foram significativamente maiores em pacientes que sofrem de Depressão em comparação os controles. Uma correlação significativa entre mRNA, níveis proteicos e a distribuição dos polimorfismos foi observada. A análise dos haplótipos encontrou diferença significativa na distribuição entre pacientes e controles para haplótipos TG e CC.	VEGFA: + 405G / C - rs2010963 e + 936C / T - rs3025039
Viikki, 2010	119 Pacientes em eletroconvulsoterapia (ECT) - 98 Pacientes com inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) - 394 Controles	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, Quarta Edição (DSM- IV)	O polimorfismo VEGF 2578 C / A foi associado à depressão resistente ao tratamento. O genótipo CC foi mais comum nos pacientes com ECT do que nos controles (p=0,015).	VEGF 2578 C / A

Tabela 1: Descrição dos estudos realizados sobre polimorfismos do VEGF relacionados a depressão.

1.5. METODOLOGIA

1.5.1 Delineamento

Este é um estudo transversal aninhado a um projeto de coorte, intitulado “Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na tríade familiar”, sob coordenação do professor doutor Ricardo Tavares Pinheiro, financiado pela Fundação Bill e Melinda Gates.

Atualmente, o presente projeto encontra-se em desenvolvimento, no qual a primeira etapa do estudo foi encerrada com um N total de 1002 gestantes, captadas antes das 24 semanas de gestação. A segunda etapa, realizada 2 meses após a primeira, completou um N atual de 694 gestantes, no entanto ainda são esperadas mais 180 gestantes para a avaliação. Logo, a terceira etapa do estudo, já avaliou cerca de 500 mães, 3 meses após o parto, contudo, ainda são previstas mais 280 avaliações.

1.5.2 Participantes

1.5.2.1 Captação da amostra

O processo de amostragem está sendo realizado em múltiplos estágios, tendo setores censitários delimitados pelo Instituto Brasileiro de Estatística (IBGE) como unidades amostrais primárias. Assim, foram listados 488 setores censitários da zona urbana da cidade de Pelotas de acordo com a malha do Censo de 2010 para o sorteio sistemático de 244 setores (50% do total). Após os moradores de todas as casas dos setores sorteados, recebem uma visita (“bateção”) realizada por bolsistas treinados, para

a identificação dos domicílios com gestantes nas primeiras 24 semanas de gestação. E estas serão convidadas a participar da pesquisa.

1.5.2.2 Cálculo amostral

O número estimado de mulheres, entre os três trimestres gestacionais, por setor censitário é de 7,8, o que acarretaria uma amostra de 1.903 gestantes, porém a amostra é composta apenas por mulheres no primeiro e segundo trimestre, assim a expectativa de amostra final é em torno de 1.256 mulheres.

Dessas 1.256 gestantes, estima-se que 20% tenham diagnóstico positivo para transtorno depressivo maior (n=252), e que 25% apresentem riscos para depressão maior (n= 314), restando 691 gestantes para o grupo controle.

1.5.2.3 Critérios de inclusão

- Estar grávida e no máximo na 24^o semana de gestação;
- Possuir entre 15 e 49 anos;
- Residir nos setores censitários pré-estabelecidos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil;
- Aceitar a aplicação dos instrumentos de classificação econômica, diagnóstico e severidade de sinais e sintomas de depressão maior;
- Aceitar a coleta de material biológico;
- Gestantes do grupo caso - pré-natal deverão ser consideradas deprimidas segundo o módulo A do MINI, versão plus (MINI - Plus) (Anexo X) apresentar valor de pontuação para BDI-II (Anexo X) igual ou maior que 15;
- Gestantes do grupo controle deverão apresentar valor de pontuação para BDI-II igual ou menor que 9;

1.5.2.4 Critérios de exclusão

- Não ser gestante;
- Estar com mais de 24 semanas de gestação;
- Ter idade fora da faixa entre 15 e 49 anos;
- Não residir nos setores censitários pré-estabelecidos;
- Estar em tratamento psicoterapêutico ou farmacológico;
- Apresentar risco de suicídio;
- Fazer uso abusivo de alguma substância psicoativa;
- Não aceitar a aplicação dos instrumentos de classificação econômica, diagnóstico e severidade de sinais e sintomas de depressão maior;
- Não aceitar a coleta de material biológico.

1.5.3 Procedimentos e Instrumentos

1.5.3.1 Coleta de dados

A coleta de dados, para avaliação das mães, é prevista em três momentos: o primeiro, chamada 1a etapa, ou entrada, momento em que a gestante é identificada, antes das 24 semanas gestacionais. O segundo, 2a etapa ou pós terapia, ocorre 2 meses após a primeira abordagem, de modo que as gestantes com risco para depressão maior e com depressão maior, já tenham concluído o tratamento com psicoterapia, caso necessário. E num terceiro momento, 3 meses após o parto, chamada 3a etapa ou pós-natal. Ambas as etapa são compostas de aplicação de questionários, utilizando-se métodos e escalas

previamente validados. As equipes de coleta de dados e de material biológico são previamente treinadas.

Vale ressaltar que para todas as gestantes identificadas com depressão, ou seja, com os escores do BDI II maiores ou iguais a 20, serão ofertados dois modelos de terapia, de modo randomizado – TCC e TCC em associação com terapia motivacional. A TCC consistirá em 6 sessões semanais, com duração de 50 minutos cada e a TCC em associação com a terapia motivacional consistirá em 8 sessões semanais, também com duração de 50 minutos

1.5.3.2 Instrumentos para coleta de dados

São aplicados os seguintes instrumentos: MINI-Plus (Anexo A), BDI-II (Anexo B) e uma adaptação do Critério de Classificação Econômica Brasil do ano de 2015 (Anexo C). A MINI-Plus é aplicada para identificação diagnóstica de transtorno depressivo. Concomitantemente, o BDI-II é aplicado para detecção de risco para depressão ou depressão. Pois, o instrumento prevê que serão consideradas gestantes com risco para depressão maior ou depressão maior aquelas gestantes que pontuarem escores igual ou maiores que 15. O Critério de Classificação Econômica Brasil do ano de 2015 é aplicado para determinar a classe social das gestantes participantes, seguindo os procedimentos recomendados pela ABEP.

1.5.3.3 Coleta de material biológico

A coleta de material biológico das gestantes para a extração de DNA total acontece na etapa 1, concomitantemente a coleta de dados. As amostras de sangue total são coletadas por punção venosa periférica no turno da manhã entre 8:00 e 12:00 horas,

e encaminhadas para o Laboratório de Neurociências Clínicas (LANEC), da UCPel. O sangue é centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos, em temperatura ambiente (18°C). Uma vez encerrado o ciclo de centrifugação, o plasma fica suspenso, seguido de uma fina camada de leucócitos, e ao fundo do tubo ficam depositadas as hemácias. Subsequentemente, os leucócitos são armazenados em falcons de 15ml, e armazenadas em geladeira para posterior extração de DNA.

1.5.3.4 *Análise dos polimorfismos*

Após a coleta do material biológico, o DNA total será extraído a partir de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o método descrito por Lahiri e Nurnberger (1987). Posteriormente o DNA total será quantificado por espectrofotometria e armazenado a -20°C até se proceder a análise molecular. Os polimorfismos de VEGF rs4416670, rs2010963 e rs10434 serão genotipados utilizando ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Anexo D)(Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Primers e sondas do tipo TaqMan MGB serão designados utilizando-se o software Primer Express v3.0 e a sequência consenso do gene obtida a partir do GeneBank (www.ncbi.nlm.nih). As reações de PCR serão realizadas utilizando-se o tampão TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), 900 nmol/l de cada primer, 200 nmol/l de cada sonda (VIC e FAM) e 2 ng de DNA, conforme determinação do fabricante. Os resultados serão analisados no software System Sequence Detection v.1.4 (Applied Biosystems).

1.5.4 *Análise de dados*

O processamento dos dados será realizado através de dupla entrada no programa Epi-Info 6.04d com checagem automática no momento da digitação. Além disso, será testado no mesmo software inconsistências de digitação comparando as duas entradas de dados. Para o tratamento estatístico dos dados será utilizado o programa SPSS13. Para a comparação de variáveis contínuas com distribuição normal entre os grupos de pacientes serão utilizados o teste t de Student ou análise da variância (ANOVA), e o teste do qui-quadrado para a comparação entre variáveis normais. Para a análise da interação entre os fatores será realizado o teste do modelo linear geral. Valores de $p \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

1.5.5 Aspectos éticos

O desenvolvimento desta dissertação está aninhado a um projeto maior, intitulado “Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na tríade familiar”, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UCPel, sob o número de protocolo 1.729.653. Assim, seguem em anexo a Carta de Aceite da Instituição (Anexo E), bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para gestantes maiores (Anexo F) e menores de idade (Anexo G).

1.6. Cronograma

Atividades	Semestres/Ano							
	1/ 2016	2/ 2016	1/ 2017	2/ 2017	1/ 2018	2/ 2018	1/ 2019	2/ 2019
Estudo piloto do campo	X							
Captação de participantes	X	X	X	X	X	X		
Revisão de literatura					X	X	X	X
Qualificação do projeto						X		
Estudo piloto da genotipagem dos polimorfismos						X		
Análise dos genótipos							X	X
Redação do artigo 1							X	X
Submissão do artigo 1								X
Apresentação dos resultados finais em eventos científicos							X	X
Defesa								X

Tabela 2: Cronograma de atividades a serem realizadas.

1.7. Orçamento

 Materiais	Valor unitário (R\$)	Quantidade	Valor total (R\$)
Reagentes e materiais de consumo para extração do DNA.	2.491,00	-	2.491,00
Master Mix	3.492,00	1	3.492,00
Primers	1.245,00	4	4.980,00
Material de consumo para PCR em tempo real	1.500,00	-	1.500,00
Total	R\$12.463,00		

Tabela 3: Orçamento de material para extração do DNA e genotipagem dos polimorfismos.

1.8. REFERÊNCIAS

Andraweera, P. H., G. A. Dekker, S. D. Thompson, R. A. North, L. M. McCowan, C. T. Roberts and S. Consortium (2012). "The interaction between the maternal BMI and angiogenic gene polymorphisms associates with the risk of spontaneous preterm birth." Mol Hum Reprod **18**(9): 459-465.

Beck, A. T. and E. A. Haigh (2014). "Advances in cognitive theory and therapy: the generic cognitive model." Annu Rev Clin Psychol **10**: 1-24.

Beijers, R., J. K. Buitelaar and C. de Weerth (2014). "Mechanisms underlying the effects of prenatal psychosocial stress on child outcomes: beyond the HPA axis." Eur Child Adolesc Psychiatry **23**(10): 943-956.

Blazej, R. G., B. M. Paegel and R. A. Mathies (2003). "Polymorphism ratio sequencing: a new approach for single nucleotide polymorphism discovery and genotyping." Genome Res **13**(2): 287-293.

Brown, G. M., R. S. McIntyre, J. Rosenblat and R. Hardeland (2018). "Depressive disorders: Processes leading to neurogeneration and potential novel treatments." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **80**(Pt C): 189-204.

Buttenschon, H. N., D. Demontis, M. Kaas, B. Elfving, S. Molgaard, C. Gustafsen, L. Kaerlev, C. M. Petersen, A. D. Borglum, O. Mors and S. Glerup (2015). "Increased serum levels of sortilin are associated with depression and correlated with BDNF and VEGF." Transl Psychiatry **5**: e677.

Carvalho, A. F., C. A. Kohler, R. S. McIntyre, C. Knochel, A. R. Brunoni, M. E. Thase, J. Quevedo, B. S. Fernandes and M. Berk (2015). "Peripheral vascular endothelial growth factor as a novel depression biomarker: A meta-analysis." Psychoneuroendocrinology **62**: 18-26.

- Coll, C. V. N., M. F. da Silveira, D. G. Bassani, E. Netsi, F. C. Wehrmeister, F. C. Barros and A. Stein (2017). "Antenatal depressive symptoms among pregnant women: Evidence from a Southern Brazilian population-based cohort study." J Affect Disord **209**: 140-146.
- da Silva, S. K., C. Wiener, G. Ghisleni, J. P. Oses, K. Jansen, M. L. Molina, R. Silva and L. D. Souza (2018). "Effects of cognitive-behavioral therapy on neurotrophic factors in patients with major depressive disorder." Rev Bras Psiquiatr **40**(4): 361-366.
- Elfving, B., H. N. Buttenschon, L. Foldager, P. H. Poulsen, M. B. Grynderup, A. M. Hansen, H. A. Kolstad, L. Kaerlev, S. Mikkelsen, A. D. Borglum, G. Wegener and O. Mors (2014). "Depression and BMI influences the serum vascular endothelial growth factor level." Int J Neuropsychopharmacol **17**(9): 1409-1417.
- Faravelli, C., M. Alessandra Scarpato, G. Castellini and C. Lo Sauro (2013). "Gender differences in depression and anxiety: the role of age." Psychiatry Res **210**(3): 1301-1303.
- Galecki, P., E. Galecka, M. Maes, A. Orzechowska, D. Berent, M. Talarowska, K. Bobinska, A. Lewinski, M. Bienkiewicz and J. Szemraj (2013). "Vascular endothelial growth factor gene (VEGFA) polymorphisms may serve as prognostic factors for recurrent depressive disorder development." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **45**: 117-124.
- Gao, L., S. Zhou, H. Cai, Z. Gong and D. Zang (2014). "VEGF levels in CSF and serum in mild ALS patients." J Neurol Sci **346**(1-2): 216-220.
- Gelman, P. L., M. Flores-Ramos, M. Lopez-Martinez, C. C. Fuentes and J. P. Grajeda (2015). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function during perinatal depression." Neurosci Bull **31**(3): 338-350.
- Han, D., Z. Qiao, L. Chen, X. Qiu, D. Fang, X. Yang, J. Ma, M. Chen, J. Yang, L. Wang, X. Zhu, C. Zhang, Y. Yang and H. Pan (2017). "Interactions between the vascular

endothelial growth factor gene polymorphism and life events in susceptibility to major depressive disorder in a Chinese population." J Affect Disord **217**: 295-298.

Iga, J., S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Tayoshi-Shibuya, S. Kinouchi, M. Nakataki, H. Song, K. Hokoishi, H. Tanabe, A. Sano and T. Ohmori (2007). "Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **31**(3): 658-663.

Kirby, E. D., A. A. Kuwahara, R. L. Messer and T. Wyss-Coray (2015). "Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(13): 4128-4133.

Moraes, I. G., R. T. Pinheiro, R. A. Silva, B. L. Horta, P. L. Sousa and A. D. Faria (2006). "[Prevalence of postpartum depression and associated factors]." Rev Saude Publica **40**(1): 65-70.

Moreira, F. P., A. Cardoso Tde, T. C. Mondin, L. D. Souza, R. Silva, K. Jansen, J. P. Oses and C. D. Wiener (2015). "The effect of proinflammatory cytokines in Cognitive Behavioral Therapy." J Neuroimmunol **285**: 143-146.

Nowacka, M. M. and E. Obuchowicz (2012). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action." Neuropeptides **46**(1): 1-10.

O'Hara, M. W. and K. L. Wisner (2014). "Perinatal mental illness: definition, description and aetiology." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **28**(1): 3-12.

Parker, G., K. Fletcher, A. Paterson, J. Anderson and M. Hong (2014). "Gender differences in depression severity and symptoms across depressive sub-types." J Affect Disord **167**: 351-357.

- Pearlstein, T. (2015). "Depression during Pregnancy." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **29**(5): 754-764.
- Pelletier, J., E. Roudier, P. Abraham, B. Fromy, J. L. Saumet, O. Birot and D. Sigaudou-Roussel (2015). "VEGF-A promotes both pro-angiogenic and neurotrophic capacities for nerve recovery after compressive neuropathy in rats." Mol Neurobiol **51**(1): 240-251.
- Pope, C. J., V. Sharma, C. Sommerdyk and D. Mazmanian (2018). "Antidepressants and recurrence of depression in the postpartum period." Arch Womens Ment Health.
- Robinson, C. J. and S. E. Stringer (2001). "The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors." J Cell Sci **114**(Pt 5): 853-865.
- Shakeel, N., M. Eberhard-Gran, L. Sletner, K. Slinning, E. W. Martinsen, I. Holme and A. K. Jenum (2015). "A prospective cohort study of depression in pregnancy, prevalence and risk factors in a multi-ethnic population." BMC Pregnancy Childbirth **15**: 5.
- Sharma, A. N., B. F. da Costa e Silva, J. C. Soares, A. F. Carvalho and J. Quevedo (2016). "Role of trophic factors GDNF, IGF-1 and VEGF in major depressive disorder: A comprehensive review of human studies." J Affect Disord **197**: 9-20.
- Shaw, G. (2013). "Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNPs)." BJU Int **112**(5): 664-665.
- Sidebottom, A. C., P. A. Harrison, A. Godecker and H. Kim (2012). "Validation of the Patient Health Questionnaire (PHQ)-9 for prenatal depression screening." Arch Womens Ment Health **15**(5): 367-374.
- Silva, R., K. Jansen, L. Souza, L. Quevedo, L. Barbosa, I. Moraes, B. Horta and R. Pinheiro (2012). "Sociodemographic risk factors of perinatal depression: a cohort study in the public health care system." Rev Bras Psiquiatr **34**(2): 143-148.

- Silva, R. A., K. Jansen, L. D. Souza, I. G. Moraes, E. Tomasi, G. Silva Gdel, S. Dias Mde and R. T. Pinheiro (2010). "Depression during pregnancy in the Brazilian public health care system." Rev Bras Psiquiatr **32**(2): 139-144.
- Sockol, L. E. (2015). "A systematic review of the efficacy of cognitive behavioral therapy for treating and preventing perinatal depression." J Affect Disord **177**: 7-21.
- Thomson, M. (2013). "The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth." J Physiol Biochem **69**(3): 559-573.
- Uher, R., J. L. Payne, B. Pavlova and R. H. Perlis (2014). "Major depressive disorder in DSM-5: implications for clinical practice and research of changes from DSM-IV." Depress Anxiety **31**(6): 459-471.
- van Vliet, I. M. and E. de Beurs (2007). "[The MINI-International Neuropsychiatric Interview. A brief structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV en ICD-10 psychiatric disorders]." Tijdschr Psychiatr **49**(6): 393-397.
- Vieira Da Silva Magalhaes, P., R. Tavares Pinheiro, B. Lessa Horta, K. Amaral Tavares Pinheiro and R. Azevedo Da Silva (2008). "Validity of the Beck Depression Inventory in the postpartum period." Int J Psychiatry Clin Pract **12**(1): 81-84.
- Viguera, A. C., L. Tondo, A. E. Koukopoulos, D. Reginaldi, B. Lepri and R. J. Baldessarini (2011). "Episodes of mood disorders in 2,252 pregnancies and postpartum periods." Am J Psychiatry **168**(11): 1179-1185.
- Viikki, M., S. Anttila, O. Kampman, A. Illi, M. Huuhka, E. Setälä-Soikkeli, N. Mononen, T. Lehtimäki and E. Leinonen (2010). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism is associated with treatment resistant depression." Neurosci Lett **477**(3): 105-108.

Wang, Y. P. and C. Gorenstein (2013). "Assessment of depression in medical patients: a systematic review of the utility of the Beck Depression Inventory-II." Clinics (Sao Paulo) **68**(9): 1274-1287.

Xie, T., M. G. Stathopoulou, F. de Andres, G. Siest, H. Murray, M. Martin, J. Cobaleda, A. Delgado, J. Lamont, L. E. Penas, L. L. A and S. Visvikis-Siest (2017). "VEGF-related polymorphisms identified by GWAS and risk for major depression." Transl Psychiatry **7**(3): e1055.

Yim, I. S., L. R. Tanner Stapleton, C. M. Guardino, J. Hahn-Holbrook and C. Dunkel Schetter (2015). "Biological and psychosocial predictors of postpartum depression: systematic review and call for integration." Annu Rev Clin Psychol **11**: 99-137.

2. ARTIGO

Title page

Title: Associação entre o SNP rs6505162 e a expressão de hsa-miR423-5p e hsa-miR221-3p no soro de gestantes e por bioinformática

Authors and their affiliations: Cainá Corrêa do Amaral^a; Ricardo Tavares Pinheiro^{a*}; Camila Perelló Ferrúa^a; Clarissa Ribeiro Bastos^a; Gabriela da Cunha^a; Tiago Fernandez Garcia^a; Adriano Martimbianco de Assis^a; Luciana de Ávila Quevedo^a; Gabriele Cordenonzi Ghisleni^a; Mariana Bonati de Matos^a; Karen Amaral Tavares Pinheiro^a; Tatiana Bilhalva Fogaça^a; Jéssica Puchalski Trettim^a; Fernanda Nedel^a.

a. Post-Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-901, Brazil.

ORCID: 0000-0002-5603-5734 (Cainá Corrêa do Amaral)

ORCID: 0000-0002-5603-5734 (Ricardo Tavares Pinheiro)*

ORCID: 0000-0002-5603-5734 (Camila Perelló Ferrúa)

ORCID: 0000-0002-5603-5734 (Clarissa Ribeiro Bastos)

- (Gabriela Kurz da Cunha)

ORCID: 0000-0002-5603-5734 (Tiago Fernandez Garcia)

ORCID: 0000-0002-5603-5734 (Adriano Martimbianco de Assis)

ORCID: 0000-0001-6883-4333 (Luciana de Ávila Quevedo)

ORCID: 0000-0002-1764-6882 (Gabriele Cordenonzi Ghisleni)

ORCID: 0000-0003-1196-7228 (Mariana Bonati de Matos)

- (Karen Amaral Tavares Pinheiro)

- (Tatiana Bilhalva Fogaça)

ORCID: 0000-0001-5795-2318 (Jéssica Puchalski Trettim)

ORCID: 0000-0002-9055-8328 (Fernanda Nedel)

***Corresponding author:** Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento,
Universidade Católica de Pelotas, Rua Félix da Cunha, 412, postal code: 96010-901,
Pelotas, RS, Brazil. Tel.: +55 53 2128 8408; fax: +55 53 2128 8229.
E-mail address: ricardop@terra.com.br (Ricardo Tavares Pinheiro)*

Abstract

Background: With the onset of pregnancy, profound anatomical and physiological changes affect virtually all organs in the mother's body. These changes are mainly induced to meet the complex demands of fetal development and protection and to prepare the maternal organism for parturition. MicroRNAs are small non-coding endogenous molecules capable of regulating gene expression in the post-transcriptional period and have been recently studied in order to better comprehend the physiological and pathological conditions of pregnancy. In this sense, the identification of the rs6505162 single nucleotide polymorphism (SNP) is also emphasized. The rs6505162 SNP is located in pre-microRNA-423 and maps to 17q11.2, with a nucleotide change from C to A. This polymorphism has been considered functional, regulating levels microRNA-423 expression. Thus, this study aimed to evaluate the association between rs6505162 SNP and microRNAs (microRNA-423-5p and microRNA-221-3p) expression in pregnancy.

Methods: Our sample included 173 pregnant. Questionnaires with socio demographic questions were applied to characterize the sample. And rs6505162 SNP genotyping were evaluated by real time PCR. MicroRNA-423-5p, microRNA-221-3p expression were evaluated by quantitative PCR. Bioinformatics analysis was performing using the DIANA Tools software, mirPath v.3. **Results:** Our results shows an association between the CC genotype and microRNA-221-3p ($p = 0.015$), as well as with allele C and microRNA-423-5p ($p = 0.037$) and microRNA-221-3p ($p = 0.025$). The association was maintained after the adjusted linear regression analysis. The C allele carriers have higher levels of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression in the blood serum. The correlation analysis showed a positive correlation between the microRNAs ($p = 0.0001$). The bioinformatics analysis revealed the estrogen signaling pathway ($p = 0.002$), and the

Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF1) gene. **Conclusions:** In conclusion, our results show that the rs6505162 SNP influences the peripheral blood expression of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p, and that both microRNAs expression are positively correlated in pregnancy. Thus, this SNP and microRNAs interaction could represent an important study target to seek biomarker for physiological and pathological conditions.

Introduction

With the onset of pregnancy, profound anatomical and physiological changes affect virtually all organs in the mother's body (Foo, Collins et al. 2017). These changes are mainly induced to meet the complex demands of fetal development and protection and to prepare the maternal organism for parturition. Changes start early in pregnancy and peak during the second trimester, after which they may remain constant or decrease towards term. Thus, pregnancy is a complex physiological process, and well-being depends on the establishment and maintenance of an appropriate maternal-fetal interface (Dallmann, Ince et al. 2017).

MicroRNAs are characterized as small non-coding endogenous molecules capable of regulating gene expression in the post-transcriptional period (Hinske, Galante et al. 2010). MicroRNAs have been recently studied in order to better comprehend the physiological and pathological conditions of pregnancy (Bidarimath, Khalaj et al. 2014, Floris, Kraft et al. 2016). Several studies have associated microRNA expression with adverse pregnancy events such as early pregnancy loss (Hosseini, Gunel et al. 2018), intrauterine growth restriction, preeclampsia (Hromadnikova, Kotlabova et al. 2016) and diabetes mellitus (Cao, Jia et al. 2017).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are single-base variations in DNA structure (Baine and Hui 2019), can provide greater insight in physiological and pathological conditions in pregnancy. MicroRNA SNPs in the pri-microRNAs and pre-microRNAs have shown to affect microRNA biogenesis and thus changing the mature microRNA expression levels. Other microRNA SNPs have shown the capacity to affect microRNA's ability to recognize their mRNA target sequences or influence microRNA – target duplex formation. Therefore microRNAs SNP could influence microRNAs activity

modulating different outcomes in pregnancy (Sun, Yan et al. 2009, Króliczewski, Sobolewska et al. 2018).

The rs6505162 SNP is located in pre-microRNA-423 and maps to 17q11.2, with a nucleotide change from C to A (Braza-Boïls, Marí-Alexandre et al. 2014, Amin-Beidokhti, Mirfakhraie et al. 2017). This polymorphism has been considered functional, regulating microRNA-423 expression (Su, Hu et al. 2015). Studies have associated the rs6505162 SNP with cancer susceptibility (Chen, Zheng et al. 2017), susceptibility to coronary artery disease (Jha, Mir et al. 2019), recurrent pregnancy loss (Su, Hu et al. 2015), among others. However, to date no study has related the rs6505162 SNP with microRNA-423-5p expression in pregnancy. Thus, this study aimed to evaluate the association between rs6505162 SNP and microRNAs (microRNA-423-5p and microRNA-221-3p) expression in pregnancy.

Materials and Methods

Study design

This cross-sectional study consisted of 173 individuals aged between 15 and 49 years, enrolled from a population-based study carried out in the urban area of the city of Pelotas, Southern Brazil, between April 2016 to December 2018. Sample selection was performed by multistage clusters, considering a population of 343.651 individuals in the current census of 488 sectors. To ensure the necessary sample inclusion, 244 census-based sectors were systematically drawn.

Women living in this sectors with up to 24 weeks of gestation were invited to participate, and answered a standard questionnaire to collect sociodemographic information, life style and comorbidities. After 60 days the pregnant women went through

a second stage of the study, performed ultrasound and answered a standard questionnaire to collect sociodemographic information, life style and comorbidities. We used a sociodemographic and economic questionnaire considering the following variables of the second stage of study: age, education, socioeconomic status and living with a partner. The Brazilian Association of Research Companies criteria was used to assess the socioeconomic status of families. This classification is based on the accumulation of material wealth and schooling of household head and others, classifying the subjects into five levels (A, B, C, D and E) in which the highest-income level is “A” and the lowest is “E”.

Blood sample collection and processing

Blood samples (15 mL) were obtained by venipuncture and divided into plasma (5 mL) and serum (10 mL). The plasma blood was immediately centrifuged at 3500 rpm for 15 min at 18°C and the leukocytes transferred to tubes and stored at –20°C until genotyping analysis. The serum blood was immediately centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C and the supernatant was transferred to RNase/DNase-free tubes and stored at –80°C microRNA analysis.

Genotyping

A method described by *Lahiri and Nurnberger (1987)* was used for DNA extraction from leukocytes. After DNA quantification was performed in a nanodrop (brand), normalized to 10ng/μl and stored at -20° C until use. The rs6505162 SNP genotyping was performed using the TaqMan SNP genotyping test (Thermo Fisher Scientific). For the qPCR reaction, 2.5μl TaqMan Master Mix Genotyping (Thermo Fisher Scientific), 0.25μl TaqMan Primer Probe (c__11613678_10, Thermo Fisher Scientific), 1.25μl Ultra-Pure Water and 1μl of genomic DNA was used for a final volume

of 5 μ l. The standardized PCR program for TaqMan assays was performed on a 7500 Fast Real-time PCR Systems (Applied Biosystems). Genotyping results were analyzed with 7500 Software v.2.3 (Applied Biosystems).

MicroRNA expression analysis

Total RNA was extracted from serum using a mirVana PARIS kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. The RNA was reverse transcribed to cDNA using TaqMan MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was performed using a TaqMan Fast Advanced Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific). Thermal cycling was conducted according to the manufacturer's recommended program, and all experiments were performed in duplicate. The TaqMan MicroRNA Assays used in this study and their Taqman assay IDs are as follows: hsa-microRNA-432-5p (TaqMan assay ID: 477848), has-microRNA-221-3p (TaqMan assay ID: 477981). The CT values were normalized according to the delta C_T method with the endogenous controls (microRNA-17-5p), our results showed that the C_T value of microRNA-17-5p in pregnant women are very stable (data no shown). To determine the corresponding Δ CT value, the CT value of the target gene microRNAs was subtracted from the microRNA-17-5p CT value to normalize the values.

Bioinformatics analysis

The microRNA-423-5p and microRNA-221-3p were inserted in the DIANA Tools software, mirPath v.3. The interaction dataset TarBase v7.0 and the pathway intersection were used. The microRNA functional analyses were performed in real-time using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoma (KEGG).

Statistical analysis

Allelic frequencies were determined by gene counting and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using X^2 -tests. Comparisons of allelic and genotypic frequencies among levels microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression were evaluated using X^2 -tests or One-Way ANOVA, as appropriated. A correlation analysis between the variables was performed by the Pearson Correlation. Linear regression of levels microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression was used for all variables with a p-value<0.20 when associated with exposure and outcome. We considered associations with a p-value<0.05 to be statistically significant. For the bioinformatics analysis the Fisher's Exact Test was used with a p-value threshold of 0.05.

Ethical aspects

This study was approved by the Catholic University of Pelotas (UCPel) Ethics Committee (protocol 1.729.653). The subjects signed a informed consent statement for the analysis and anonymous publication of the research findings.

Results

A total of 173 pregnant women between second and third trimester of pregnancy. Table 1 shows the samples overall distribution. The genotypes were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium for the rs6505162 SNP ($p \geq 0.05$), and the heterozygote allele was the most prevalent (48.5%).

Table 2 presents the association between the rs6505162 SNP genotypes and alleles and microRNAs. Result shows an association between the CC genotype and microRNA-221-3p ($p = 0.015$), as well as with allele C and microRNA-423-5p ($p = 0.037$) and microRNA-221-3p ($p = 0.025$). Thus, the C allele carriers have higher levels of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression in the blood serum.

Table 1

Sample distribution according to socio-demographic characteristics and genetics variables in pregnant women in the city of Pelotas.

Variables	N / Mean	% / \pm SD
Age (n=173)		
≤ 23 years	45	26
24 – 29 years	68	39.3
≥ 30 years	60	34.7
Education (n=173)		
Between 0 and 3 years	5	2.9
Between 4 and 7 years	23	13.3
Between 8 and 10 years	41	23.7
More than 11 years	104	60.1
Socioeconomic status (n=170)		
A+B	36	21.2
C	111	65.3
D+E	23	13.5
Lives with partner (n=173)		
No	29	16.8
Yes	144	83.2
Genotypes (n=169)		
AA	53	31.4
AC	82	48.5
CC	34	20.1
Alleles (n=169)		
CC/AC	116	68.6
AA	53	31.4
Gestational Age Fetal Biometry (weeks) (n=162)	27.60	\pm 5.67

Table 3 shows the correlation analysis between microRNA-423-5p and microRNA-221-3p. A positive correlation was found between the microRNAs ($p=0.0001$). MicroRNA-423-5p and microRNA-221-3p did not correlate with gestational age fetal biometry (weeks) determined by ultrasound.

Table 2

Association between microRNA423-5p and microRNA221-3p expression and rs6505162 SNP genotypes and alleles.

Variables	Genotypes			p value	Alleles		p value
	AA (n=48)	AC (n=70)	CC (n=32)		CC/AC (n=102)	AA (n=48)	
	Média (±SD)				Média (±SD)		
MicroRNA-423-5p expression	0.89 (1.23)	1.33 (1.41)	1.48 (1.19)	0.990	1.37 (1.34)	0.89 (1.23)	0.037*
MicroRNA-221-3p expression	- 0.54 (1.39)	- 0.16 (1.32)	0.37 (1.38)	0.015*	0.01 (1.36)	- 0.54 (1.39)	0.025*

Table 3

Correlation analysis between miR221-3p and miR423-5p.

Variables	MicroRNA-221-3 Expression		MicroRNA-423-5p Expression	
	Pearson Correlation	p Value	Pearson Correlation	p Value
MicroRNA-221-3p Expression	1	-		
MicroRNA-423-5p Expression	0.530	0.0001*	1	-
Gestational Age Fetal Biometry (weeks)	0.095	0.251	-0.105	0.201

The adjusted linear regression analysis, after correction for possible confounders factors, showed association between the microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression with the C allele (p=0.025) (Table 4).

The bioinformatics analysis revealed the estrogen signaling pathway as the statistically significant intersection pathways of microRNA-221-3p and microRNA-423-5p ($p = 0.002$). In addition, twenty-two target genes of microRNA-221-3p and microRNA-423-5p were identified in this pathway, where the *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF1)* gene was present in both microRNAs.

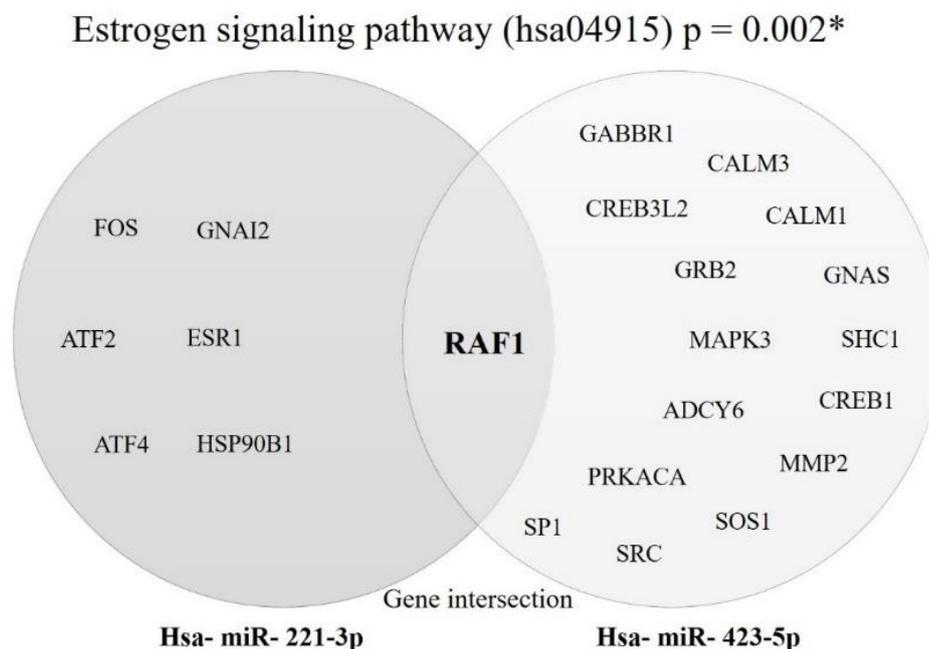


Figure 1: The target genes of microRNA-221-3p and microRNA-423-5p in the estrogen signaling pathway.

Discussion

Overall, our results show that the rs6505162 SNP influences the peripheral blood of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression. We found a significant association between microRNA-221-5p and the CC genotype, as well as with the C allele and microRNA-423-5p and microRNA-221-3p. Thus, C allele carriers present higher of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression in the blood serum. In this sense, studies have demonstrated that the rs6505162 SNP is located in the promote region of the

MIR423 gene (Su, Hu et al. 2015). Although studies have shown strong association between the rs6505162 SNP with microRNA-423-5p (Su, Hu et al. 2015, Chen, Zheng et al. 2017, Jha, Mir et al. 2019), no association has been established with microRNA-221-3p. Therefore, we used a correlation analysis to verify if the levels microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression were related. A positive correlation was found between both microRNAs, thus one can assume that the rs6505162 SNP regulates microRNA-423-5p expression, which influences the expression of microRNA-221-3p. Therefore, it is possible that rs6505162 SNP could modulate microRNA-221-3p expression indirectly. These results show an interesting relation between the microRNA-423-5p and microRNA-221-3p, which should be more carefully evaluated in further studies.

In order to further investigate the relationship between miR-221-3p and miR-423-5p, we explored the intersection signaling pathways between both microRNAs by bioinformatics analysis, and found the estrogen signaling pathway as statistical significant. Indeed the literature has consistently shown a fundamental role of this pathway in pregnancy, both in physiological and pathological conditions (Dallmann, Ince et al. 2017). However, the scientific data is scarce regarding the estrogen pathway and microRNA-423-5p and microRNA-221-3p. It has been shown that the microRNA-221 could negatively regulate the estrogen receptor- α by interacting directly with the 3'-untranslated region (3'UTR) (Chen, Tang et al. 2015), modulating the effect of estrogen (Sheng, Yuan et al. 2018).

Additionally, the *RAF1* gene was identified as a target gene for both microRNAs in the estrogen signaling pathway. *RAF1* is a member of the RAF kinase family of serine/threonine specific protein kinases, which is encoded by the *RAF1* gene. *RAF1* is

the major component of the ERK pathway (official symbol of the *MAPK1* gene). Activated *MAPK1* pleiotropic functions include regulation of genes involved in cell cycle division, apoptosis, cell differentiation and cell migration (Roskoski 2012). In this sense, *Lappas et al (2016)* demonstrated that *RAF1* expression is altered in the myometrium, and its regulation may constitute a useful therapeutic target for premature labor (Lappas 2016). In addition, studies have shown that the *MAPK* signaling pathway can be modulated by microRNA-221-3p (Dai, Li et al. 2010, Zhang, Mao et al. 2013), however the literature is still incipient.

Thus the association between rs6505162 SNP, microRNA-423-5p and microRNA-221-3p in pregnant women identified in our study, could represent an important biomarker in different maternal-fetal outcomes. In this sense, *Timofeeva et al (2018)* showed an association between microRNA-423-5p expression (in the blood plasma) and preeclampsia before clinical manifestation, suggesting this microRNA as a potential biomarker candidate (Timofeeva, Gusar et al. 2018). Additionally, a recent study identified a postpartum profile of microRNAs in the peripheral blood of patients with prior exposure to gestational hypertension, and the microRNA-221-3p showed statistically significant difference with the outcome (Hromadnikova, Kotlabova et al. 2016). Finally, other pathologies such unexplained recurrent spontaneous abortion (Qin, Tang et al. 2016), fetal growth restriction (Hromadnikova, Kotlabova et al. 2016) have been associated with the microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression, respectively.

In conclusion, our results show that the rs6505162 SNP influences the peripheral blood of microRNA-423-5p and microRNA-221-3p expression, and that both microRNAs expression are positively correlated with gestational period. Thus, this SNP

and microRNAs interaction could represent an important study target to seek biomarker for physiological and pathological conditions. Especially regarding the risk of adverse effects on pregnancy such as preeclampsia, intrauterine growth restriction and premature birth.

References

- Amin-Beidokhti, M., R. Mirfakhraie, S. Zare-Karizi and F. Karamoddin (2017). "The role of parental microRNA alleles in recurrent pregnancy loss: an association study." Reprod Biomed Online **34**(3): 325-330.
- Baine, I. and P. Hui (2019). "Practical applications of DNA genotyping in diagnostic pathology." Expert Rev Mol Diagn **19**(2): 175-188.
- Beck, A. T. and E. A. Haigh (2014). "Advances in cognitive theory and therapy: the generic cognitive model." Annu Rev Clin Psychol **10**: 1-24.
- Beijers, R., J. K. Buitelaar and C. de Weerth (2014). "Mechanisms underlying the effects of prenatal psychosocial stress on child outcomes: beyond the HPA axis." Eur Child Adolesc Psychiatry **23**(10): 943-956.
- Bidarimath, M., K. Khalaj, J. M. Wessels and C. Tayade (2014). "MicroRNAs, immune cells and pregnancy." Cell Mol Immunol **11**(6): 538-547.
- Blazej, R. G., B. M. Paegel and R. A. Mathies (2003). "Polymorphism ratio sequencing: a new approach for single nucleotide polymorphism discovery and genotyping." Genome Res **13**(2): 287-293.
- Braza-Boils, A., J. Marí-Alexandre, J. Gilabert, D. Sánchez-Izquierdo, F. España, A. Estellés and J. Gilabert-Estellés (2014). "MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors." Hum Reprod **29**(5): 978-988.

Brown, G. M., R. S. McIntyre, J. Rosenblat and R. Hardeland (2018). "Depressive disorders: Processes leading to neurogeneration and potential novel treatments." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **80**(Pt C): 189-204.

Buttenschon, H. N., D. Demontis, M. Kaas, B. Elfving, S. Molgaard, C. Gustafsen, L. Kaerlev, C. M. Petersen, A. D. Borglum, O. Mors and S. Glerup (2015). "Increased serum levels of sortilin are associated with depression and correlated with BDNF and VEGF." Transl Psychiatry **5**: e677.

Cao, Y. L., Y. J. Jia, B. H. Xing, D. D. Shi and X. J. Dong (2017). "Plasma microRNA-16-5p, -17-5p and -20a-5p: Novel diagnostic biomarkers for gestational diabetes mellitus." J Obstet Gynaecol Res **43**(6): 974-981.

Carvalho, A. F., C. A. Kohler, R. S. McIntyre, C. Knochel, A. R. Brunoni, M. E. Thase, J. Quevedo, B. S. Fernandes and M. Berk (2015). "Peripheral vascular endothelial growth factor as a novel depression biomarker: A meta-analysis." Psychoneuroendocrinology **62**: 18-26.

Chen, J. J., Y. S. Tang, S. F. Huang, J. G. Ai, H. X. Wang and L. P. Zhang (2015). "HBx protein-induced upregulation of microRNA-221 promotes aberrant proliferation in HBV-related hepatocellular carcinoma by targeting estrogen receptor- α ." Oncol Rep **33**(2): 792-798.

Chen, R., Y. Zheng, L. Zhuo and S. Wang (2017). "The association between miR-423 rs6505162 polymorphism and cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis." Oncotarget **8**(25): 40204-40213.

Coll, C. V. N., M. F. da Silveira, D. G. Bassani, E. Netsi, F. C. Wehrmeister, F. C. Barros and A. Stein (2017). "Antenatal depressive symptoms among pregnant women: Evidence from a Southern Brazilian population-based cohort study." J Affect Disord **209**: 140-146.

- da Silva, S. K., C. Wiener, G. Ghisleni, J. P. Oses, K. Jansen, M. L. Molina, R. Silva and L. D. Souza (2018). "Effects of cognitive-behavioral therapy on neurotrophic factors in patients with major depressive disorder." Rev Bras Psiquiatr **40**(4): 361-366.
- Dai, R., J. Li, Y. Liu, D. Yan, S. Chen, C. Duan, X. Liu, T. He and H. Li (2010). "miR-221/222 suppression protects against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via p27(Kip1)- and MEK/ERK-mediated cell cycle regulation." Biol Chem **391**(7): 791-801.
- Dallmann, A., I. Ince, M. Meyer, S. Willmann, T. Eissing and G. Hempel (2017). "Gestation-Specific Changes in the Anatomy and Physiology of Healthy Pregnant Women: An Extended Repository of Model Parameters for Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Pregnancy." Clin Pharmacokinet **56**(11): 1303-1330.
- Elfving, B., H. N. Buttenschon, L. Foldager, P. H. Poulsen, M. B. Grynderup, A. M. Hansen, H. A. Kolstad, L. Kaerlev, S. Mikkelsen, A. D. Borglum, G. Wegener and O. Mors (2014). "Depression and BMI influences the serum vascular endothelial growth factor level." Int J Neuropsychopharmacol **17**(9): 1409-1417.
- Faravelli, C., M. Alessandra Scarpato, G. Castellini and C. Lo Sauro (2013). "Gender differences in depression and anxiety: the role of age." Psychiatry Res **210**(3): 1301-1303.
- Floris, I., J. D. Kraft and I. Altosaar (2016). "Roles of MicroRNA across Prenatal and Postnatal Periods." Int J Mol Sci **17**(12).
- Foo, F. L., A. Collins, C. M. McEniery, P. R. Bennett, I. B. Wilkinson and C. C. Lees (2017). "Preconception and early pregnancy maternal haemodynamic changes in healthy women in relation to pregnancy viability." Hum Reprod **32**(5): 985-992.
- Galecki, P., E. Galecka, M. Maes, A. Orzechowska, D. Berent, M. Talarowska, K. Bobinska, A. Lewinski, M. Bienkiewicz and J. Szemraj (2013). "Vascular endothelial growth factor gene (VEGFA) polymorphisms may serve as prognostic factors for

recurrent depressive disorder development." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **45**: 117-124.

Gao, L., S. Zhou, H. Cai, Z. Gong and D. Zang (2014). "VEGF levels in CSF and serum in mild ALS patients." J Neurol Sci **346**(1-2): 216-220.

Gelman, P. L., M. Flores-Ramos, M. Lopez-Martinez, C. C. Fuentes and J. P. Grajeda (2015). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function during perinatal depression." Neurosci Bull **31**(3): 338-350.

Han, D., Z. Qiao, L. Chen, X. Qiu, D. Fang, X. Yang, J. Ma, M. Chen, J. Yang, L. Wang, X. Zhu, C. Zhang, Y. Yang and H. Pan (2017). "Interactions between the vascular endothelial growth factor gene polymorphism and life events in susceptibility to major depressive disorder in a Chinese population." J Affect Disord **217**: 295-298.

Hinske, L. C., P. A. Galante, W. P. Kuo and L. Ohno-Machado (2010). "A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome." BMC Genomics **11**: 533.

Hosseini, M. K., T. Gunel, E. Gumusoglu, A. Benian and K. Aydinli (2018). "MicroRNA expression profiling in placenta and maternal plasma in early pregnancy loss." Mol Med Rep **17**(4): 4941-4952.

Hromadnikova, I., K. Kotlabova, L. Hympanova and L. Krofta (2016). "Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood." Thromb Res **137**: 126-140.

Iga, J., S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Tayoshi-Shibuya, S. Kinouchi, M. Nakataki, H. Song, K. Hokoishi, H. Tanabe, A. Sano and T. Ohmori (2007). "Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **31**(3): 658-663.

- Jha, C. K., R. Mir, I. Elfaki, N. Khullar, S. Rehman, J. Javid, S. Banu and S. M. S. Chahal (2019). "Potential Impact of MicroRNA-423 Gene Variability in Coronary Artery Disease." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **19**(1): 67-74.
- Kirby, E. D., A. A. Kuwahara, R. L. Messer and T. Wyss-Coray (2015). "Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(13): 4128-4133.
- Króliczewski, J., A. Sobolewska, D. Lejnowski, J. F. Collawn and R. Bartoszewski (2018). "microRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity." Gene **640**: 66-72.
- Lappas, M. (2016). "RAF1 is increased in labouring myometrium and modulates inflammation-induced pro-labour mediators." Reproduction **151**(4): 411-420.
- Moraes, I. G., R. T. Pinheiro, R. A. Silva, B. L. Horta, P. L. Sousa and A. D. Faria (2006). "[Prevalence of postpartum depression and associated factors]." Rev Saude Publica **40**(1): 65-70.
- Moreira, F. P., A. Cardoso Tde, T. C. Mondin, L. D. Souza, R. Silva, K. Jansen, J. P. Oses and C. D. Wiener (2015). "The effect of proinflammatory cytokines in Cognitive Behavioral Therapy." J Neuroimmunol **285**: 143-146.
- Nowacka, M. M. and E. Obuchowicz (2012). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action." Neuropeptides **46**(1): 1-10.
- O'Hara, M. W. and K. L. Wisner (2014). "Perinatal mental illness: definition, description and aetiology." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **28**(1): 3-12.

- Parker, G., K. Fletcher, A. Paterson, J. Anderson and M. Hong (2014). "Gender differences in depression severity and symptoms across depressive sub-types." J Affect Disord **167**: 351-357.
- Pearlstein, T. (2015). "Depression during Pregnancy." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **29**(5): 754-764.
- Pope, C. J., V. Sharma, C. Sommerdyk and D. Mazmanian (2018). "Antidepressants and recurrence of depression in the postpartum period." Arch Womens Ment Health.
- Qin, W., Y. Tang, N. Yang, X. Wei and J. Wu (2016). "Potential role of circulating microRNAs as a biomarker for unexplained recurrent spontaneous abortion." Fertil Steril **105**(5): 1247-1254.e1243.
- Robinson, C. J. and S. E. Stringer (2001). "The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors." J Cell Sci **114**(Pt 5): 853-865.
- Roskoski, R. (2012). "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation." Pharmacol Res **66**(2): 105-143.
- Shakeel, N., M. Eberhard-Gran, L. Sletner, K. Slinning, E. W. Martinsen, I. Holme and A. K. Jenum (2015). "A prospective cohort study of depression in pregnancy, prevalence and risk factors in a multi-ethnic population." BMC Pregnancy Childbirth **15**: 5.
- Sharma, A. N., B. F. da Costa e Silva, J. C. Soares, A. F. Carvalho and J. Quevedo (2016). "Role of trophic factors GDNF, IGF-1 and VEGF in major depressive disorder: A comprehensive review of human studies." J Affect Disord **197**: 9-20.
- Shaw, G. (2013). "Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNPs)." BJU Int **112**(5): 664-665.
- Sheng, B., Y. Yuan, X. Liu, Y. Zhang, H. Liu, X. Shen, B. Liu and L. Chang (2018). "Protective effect of estrogen against intervertebral disc degeneration is attenuated by

miR-221 through targeting estrogen receptor α ." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **50**(4): 345-354.

Sidebottom, A. C., P. A. Harrison, A. Godecker and H. Kim (2012). "Validation of the Patient Health Questionnaire (PHQ)-9 for prenatal depression screening." Arch Womens Ment Health **15**(5): 367-374.

Silva, R., K. Jansen, L. Souza, L. Quevedo, L. Barbosa, I. Moraes, B. Horta and R. Pinheiro (2012). "Sociodemographic risk factors of perinatal depression: a cohort study in the public health care system." Rev Bras Psiquiatr **34**(2): 143-148.

Silva, R. A., K. Jansen, L. D. Souza, I. G. Moraes, E. Tomasi, G. Silva Gdel, S. Dias Mde and R. T. Pinheiro (2010). "Depression during pregnancy in the Brazilian public health care system." Rev Bras Psiquiatr **32**(2): 139-144.

Sockol, L. E. (2015). "A systematic review of the efficacy of cognitive behavioral therapy for treating and preventing perinatal depression." J Affect Disord **177**: 7-21.

Su, X., Y. Hu, Y. Li, J. L. Cao, X. Q. Wang, X. Ma and H. F. Xia (2015). "The polymorphism of rs6505162 in the MIR423 coding region and recurrent pregnancy loss." Reproduction **150**(1): 65-76.

Sun, G., J. Yan, K. Noltner, J. Feng, H. Li, D. A. Sarkis, S. S. Sommer and J. J. Rossi (2009). "SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function." RNA **15**(9): 1640-1651.

Thomson, M. (2013). "The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth." J Physiol Biochem **69**(3): 559-573.

Timofeeva, A. V., V. A. Gusar, N. E. Kan, K. N. Prozorovskaya, A. O. Karapetyan, O. R. Bayev, V. V. Chagovets, S. F. Kliver, D. Y. Iakovishina, V. E. Frankevich and G. T.

Sukhikh (2018). "Identification of potential early biomarkers of preeclampsia." Placenta **61**: 61-71.

Uher, R., J. L. Payne, B. Pavlova and R. H. Perlis (2014). "Major depressive disorder in DSM-5: implications for clinical practice and research of changes from DSM-IV." Depress Anxiety **31**(6): 459-471.

van Vliet, I. M. and E. de Beurs (2007). "[The MINI-International Neuropsychiatric Interview. A brief structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV en ICD-10 psychiatric disorders]." Tijdschr Psychiatr **49**(6): 393-397.

Vieira Da Silva Magalhaes, P., R. Tavares Pinheiro, B. Lessa Horta, K. Amaral Tavares Pinheiro and R. Azevedo Da Silva (2008). "Validity of the Beck Depression Inventory in the postpartum period." Int J Psychiatry Clin Pract **12**(1): 81-84.

Viguera, A. C., L. Tondo, A. E. Koukopoulos, D. Reginaldi, B. Lepri and R. J. Baldessarini (2011). "Episodes of mood disorders in 2,252 pregnancies and postpartum periods." Am J Psychiatry **168**(11): 1179-1185.

Viikki, M., S. Anttila, O. Kampman, A. Illi, M. Huuhka, E. Setälä-Soikkeli, N. Mononen, T. Lehtimäki and E. Leinonen (2010). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism is associated with treatment resistant depression." Neurosci Lett **477**(3): 105-108.

Wang, Y. P. and C. Gorenstein (2013). "Assessment of depression in medical patients: a systematic review of the utility of the Beck Depression Inventory-II." Clinics (Sao Paulo) **68**(9): 1274-1287.

Xie, T., M. G. Stathopoulou, F. de Andres, G. Siest, H. Murray, M. Martin, J. Cobaleda, A. Delgado, J. Lamont, L. E. Penas, L. L. A and S. Visvikis-Siest (2017). "VEGF-related

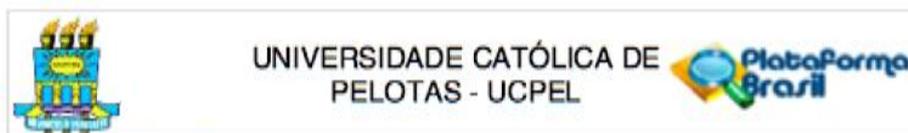
polymorphisms identified by GWAS and risk for major depression." Transl Psychiatry **7**(3): e1055.

Yim, I. S., L. R. Tanner Stapleton, C. M. Guardino, J. Hahn-Holbrook and C. Dunkel Schetter (2015). "Biological and psychosocial predictors of postpartum depression: systematic review and call for integration." Annu Rev Clin Psychol **11**: 99-137.

Zhang, X., H. Mao, J. Y. Chen, S. Wen, D. Li, M. Ye and Z. Lv (2013). "Increased expression of microRNA-221 inhibits PAK1 in endothelial progenitor cells and impairs its function via c-Raf/MEK/ERK pathway." Biochem Biophys Res Commun **431**(3): 404-408.

ANEXOS

Anexo A: Carta de aprovação do comitê de ética da instituição.



Continuação do Parecer: 1.729.653

avaliadas após 60 da primeira intervenção com as gestantes e 90 dias após o parto. O questionário que será empregado está incluído na documentação do projeto presente na Plataforma Brasil;

2) Avaliar a satisfação e as atitudes das gestantes com relação a imagem corporal, especialmente no que diz respeito ao ganho de peso durante a gestação. Os dados serão coletados após 60 dias da primeira avaliação com as gestantes e 90 dias após o parto através de uma escala denominada "Escala de Atitudes em Relação ao Ganho de Peso na Gestação";

3) Avaliar o reflexo vermelho no fundo do olho dos bebês. Esta avaliação é decorrência direta da realização do "teste do olhinho", que é preconizado pelo Ministério da Saúde. O teste será realizado por estudantes de medicina devidamente treinados para esta finalidade, sob acompanhamento de médico da área;

4) Avaliar o desenvolvimento da morfologia fetal, a movimentação do concepto e avaliação do líquido amniótico através de ecografia obstétrica no segundo trimestre da gravidez. Este procedimento de rotina não agrega riscos a mãe e nem ao bebê, sendo inclusive oportuna sua realização sistemática.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas para prevenir e tratar a depressão gestacional e do pós-parto, e concomitantemente identificar marcadores biológicos intimamente relacionados aos transtornos psiquiátricos, visando o desenvolvimento de um conjunto de testes que crie uma alternativa mais eficaz para a prevenção, diagnóstico e tratamento da depressão gestacional e pós-parto e da saúde da criança.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos potenciais envolvidos tendo em vista a abordagem considerada quando da aplicação dos instrumentais previstos no projeto. Por sua vez, os benefícios são amplos, abrangendo a prevenção, diagnóstico e o tratamento da TDM de maneira mais abrangente, bem como a saúde do bebê. Todas as investigações estão acompanhadas dos respectivos procedimentos de orientação e o respectivo tratamento das pessoas envolvidas, quando necessário.

O adendo que está sendo avaliado objetiva a realização de quatro medidas que não estavam previstas no projeto. Nenhuma delas gera risco para mãe ou bebê, sendo duas delas

Endereço:	Rua Felix da Cunha, 412	CEP:	96.010-000
Bairro:	Centro		
UF:	RS	Município:	PELOTAS
Telefone:	(53)2128-8023	Fax:	(53)2128-8298
		E-mail:	cep@ucpel.lche.br



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE
PELOTAS - UCPEL



Continuação do Parecer: 1.729.653

rotineiramente preconizadas no acompanhamento pre e perinatal. O princípio da beneficência é fortalecido com a garantia de realização destas medidas preconizadas, as quais nem sempre efetivadas pelo SUS em tempo hábil.

O TCLE empregado no projeto faz parte da documentação fornecida e as quatro medidas incluídas já estão cobertas pelo caráter amplo do mesmo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa se caracteriza por significativa relevância, tanto pela modernidade e importância das medidas previstas, como também pelo o objetivo de criar instrumentos mais eficazes para lidar com a TDM e a saúde do bebê.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram contemplados na documentação do projeto e estão de acordo com o recomendado.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é atual, de grande significado social e com objetivos relevantes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_784477 F1.pdf	30/08/2016 10:01:48		Aceito
Outros	Adendogates.pdf	30/08/2016 09:56:56	RICARDO TAVARES PINHEIRO	Aceito
Outros	cep_rtp_justificativa.pdf	31/07/2015 17:10:51		Aceito
Outros	MOTOR SCALE.pdf	30/07/2015 19:45:48		Aceito
Outros	MINI 500 Plus (1).pdf	30/07/2015 19:38:48		Aceito
Outros	Instrumento Gates MOCA.pdf	30/07/2015 19:34:51		Aceito
Outros	Instrumento GATES.pdf	30/07/2015 19:29:25		Aceito

Endereço: Rua Felix da Cunha, 412
Bairro: Centro **CEP:** 96.010-000
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)2128-8023 **Fax:** (53)2128-8298 **E-mail:** cep@ucpel.tche.br



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE
PELOTAS - UCPEL



Continuação do Parecer: 1.729.653

Outros	declar serv psiquiatria.pdf	30/07/2015 09:35:34		Aceito
Outros	Carta_de_Apresentação_Ricardo_Pinheiro.pdf	30/07/2015 09:32:12		Aceito
Folha de Rosto	Comite_de_ética_Ricardo_Pinheiro (1).pdf	30/07/2015 09:31:04		Aceito
Outros	Professores e link do lattes.pdf	30/07/2015 09:30:08		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Gattes CEP.pdf	29/07/2015 23:30:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Gattes.pdf	29/07/2015 23:26:42		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 15 de Setembro de 2016

Assinado por:
Sandro Schreiber de Oliveira
(Coordenador)

Endereço: Rua Felix da Cunha, 412
Bairro: Centro **CEP:** 96.010-000
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)2128-8023 **Fax:** (53)2128-8298 **E-mail:** oep@ucpel.tche.br

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para gestantes maiores de idade.



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Pesquisador Responsável: Ricardo Tavares Pinheiro

Contatos: E-mail: gravidezciudadabebesaudavel@gmail.com; Telefones: (53)2128-8246

Você está sendo convidada a participar como voluntária e autorizar a participação de seu bebê, da pesquisa “Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na triade familiar”.

OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas para prevenir e tratar a depressão gestacional e do pós-parto, e identificar fatores que possam estar alterados no sangue e que se relacionem aos transtornos psiquiátricos. Dessa forma procura-se uma alternativa mais eficaz para a prevenção, diagnóstico e tratamento da depressão gestacional, pós-parto e do desenvolvimento da criança.

PROCEDIMENTOS

Você será avaliada por testes psicológicos e será coletada pequena amostra de sangue da veia do seu braço no primeiro e segundo trimestre da gestação, assim como noventa dias após o nascimento do seu bebê. Nesta ocasião também será realizada avaliação sobre o desenvolvimento do seu bebê e coleta de pequena quantidade de saliva dele. Após as mulheres que apresentarem risco ou depressão serão divididas em dois grupos de psicoterapia.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:

Será utilizado material totalmente descartável evitando riscos de contaminação e a coleta realizada por equipe treinada. Em caso de vermelhidão ou desconforto local, você pode entrar em contato a qualquer momento com o pessoal de nossa equipe.

A participação no estudo pode trazer riscos ao perceber que apresenta depressão gestacional e/ou pós-parto, assim como na coleta do sangue. Sobre saber que apresenta depressão ou risco para depressão, isso poderá lhe trazer o benefício de ser tratada pela equipe da pesquisa. O sangue e a saliva do bebê ficarão armazenados em freezer para análises clínicas posteriores.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SEGREDO:

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar e é livre para recusar sua participação ou de seu filho(a), assim como interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não lhe trará qualquer prejuízo. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade em segredo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada com o responsável pela pesquisa e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO E RESSARCIMENTO:

A participação no estudo não lhe trará despesas, mas também não haverá nenhum tipo de pagamento.

Eu, _____, fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Declaro que concordo em participar deste estudo.

Declaro também aceitar que meu/minha filho(a) _____ participe da avaliação.

Pelotas, ___ de _____ de 201__.

Assinatura Entrevistador(a) Assinatura da Participante

Anexo C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para gestantes menores de idade



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Pesquisador Responsável: Ricardo Tavares Pinheiro

Contatos: E-mail: gravidezciudadabebesaudavel@gmail.com; Telefones: (53)2128-8246

Eu, _____, na condição de _____, autorizo _____, a participação como voluntária, assim como a de seu bebê, na pesquisa “Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na triade familiar”.

OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas para prevenir e tratar a depressão gestacional e do pós-parto, e identificar fatores que possam estar alterados no sangue e que se relacionem aos transtornos psiquiátricos. Dessa forma procura-se uma alternativa mais eficaz para a prevenção, diagnóstico e tratamento da depressão gestacional, pós-parto e do desenvolvimento da criança.

PROCEDIMENTOS

Você será avaliada por testes psicológicos e será coletada pequena amostra de sangue da veia do seu braço no primeiro e segundo trimestre da gestação, assim como noventa dias após o nascimento do seu bebê. Nesta ocasião também será realizada avaliação sobre o desenvolvimento do seu bebê e coleta de pequena quantidade de saliva dele. Após as mulheres que apresentarem risco ou depressão serão divididas em dois grupos de psicoterapia.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:

Será utilizado material totalmente descartável evitando riscos de contaminação e a coleta realizada por equipe treinada. Em caso de vermelhidão ou desconforto local, você pode entrar em contato a qualquer momento com o pessoal de nossa equipe.

A participação no estudo pode trazer riscos ao perceber que apresenta depressão gestacional e/ou pós-parto, assim como na coleta do sangue. Sobre saber que apresenta depressão ou risco para depressão, isso poderá lhe trazer o benefício de ser tratada pela equipe da pesquisa. O sangue e a saliva do bebê ficarão armazenados em freezer para análises clínicas posteriores.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SEGREDO:

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar e é livre para recusar sua participação ou de seu filho(a), assim como interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não lhe trará qualquer prejuízo. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade em segredo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada com o responsável pela pesquisa e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO E RESSARCIMENTO:

A participação no estudo não lhe trará despesas, mas também não haverá nenhum tipo de pagamento.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Declaro que autorizo e concordo com a participação de _____, neste estudo, assim como o seu/sua filho(a) _____ participem da avaliação.

Pelotas, ___ de _____ de 201_.

Assinatura Entrevistador(a) Assinatura do Responsável

Anexo D: Sistema de pontos para averiguação da classe social, segundo o Critério de Classificação Econômica - Brasil, do ano de 2015.

- Variáveis

	Quantidade				
	0	1	2	3	4 ou +
Banheiros	0	3	7	10	14
Empregados domésticos	0	3	7	10	13
Automóveis	0	3	5	8	11
Microcomputadores	0	3	6	8	11
Lava louça	0	3	6	6	6
Geladeira	0	2	3	5	5
Freezer	0	2	4	6	6
Lava roupa	0	2	4	6	6
DVD	0	1	3	4	6
Micro-ondas	0	2	4	4	4
Motocicleta	0	1	3	3	3
Secadora de roupa	0	2	2	2	2

- Grau de instrução do chefe de família

Escolaridade da pessoa de referência	
Analfabeto / Fundamental I incompleto	0
Fundamental I completo / Fundamental II incompleto	1
Fundamental II completo / Médio incompleto	2
Médio completo / Superior incompleto	4
Superior completo	7

- Acesso a serviços públicos

Serviços públicos		
	Não	Sim
Água encanada	0	4
Rua pavimentada	0	2

- Cortes do Critério Brasil 2015

Classe	Pontos
A	45 - 100
B1	38 - 44
B2	29 - 37
C1	23 - 28
C2	17 - 22

D-E	0 - 16
-----	--------

- Estimativa para a Renda Média Domiciliar para os estratos do Critério Brasil 2015

Estrato Sócio Econômico	Renda Média Domiciliar
A	20.272,56
B1	8.695,88
B2	4.427,36
C1	2.409,01
C2	1.446,24
D-E	639,78