



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA RISSE QUAIOTO

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DEPRESSÃO E HÁBITO
TABAGISTA NA METILAÇÃO DO GENE *BDNF***

VITÓRIA, ES

2021

BÁRBARA RISSE QUAIOTO

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DEPRESSÃO E HÁBITO
TABAGISTA NA METILAÇÃO DO GENE *BDNF***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva

VITÓRIA, ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Q1a Quaioto, Bárbara Risse, 1996-
Análise da relação entre depressão e hábito tabagista na metilação do gene BDNF / Bárbara Risse Quaioto. - 2021. 99 f. : il.

Orientadora: Adriana Madeira Álvares da Silva.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Epigenética. I. Silva, Adriana Madeira Álvares da. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

BÁRBARA RISSE QUAIOTO

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DEPRESSÃO E HÁBITO
TABAGISTA NA METILAÇÃO DO GENE *BDNF***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 07 de julho de 2021.

**Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da
Silva**

**Universidade Federal do Espírito Santo
- UFES**

**Prof. Dr. André Willian Hollais
Universidade Federal do Espírito Santo
- UFES**

**Prof^a. Dr^a. Lídia Maria Rebolho Batista
Arantes
Hospital de Câncer de Barretos**

VITÓRIA, ES

2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos na realização desse trabalho, por ter me sustentado e por ter colocado em minha vida pessoas tão importantes nessa trajetória.

A minha família, por acreditar, confiar e apoiar meus sonhos. Obrigada por sempre estarem ao meu lado!

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira, por abrir as portas do seu grupo de pesquisa, me acolher e acreditar no meu potencial. Agradeço imensamente a oportunidade de poder fazer ciência ao seu lado e por toda orientação que levarei para vida!

A neurocientista Dr^a. Aline Borçoi, a quem devo meus profundos agradecimentos por estar junto a mim durante todo o processo de construção dessa dissertação, contribuindo intensamente para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por todo apoio e atenção durante estes anos!

A banca de avaliação, composta pelo Prof. Dr. André Willian Hollais e pela Prof^a. Dr^a. Lídia Maria Rebolho Batista Arantes, que disponibilizaram seu tempo e dedicação para contribuírem nesse trabalho. Obrigada por aceitarem nosso convite e pelas contribuições enriquecedoras!

Aos colegas do Núcleo de Pesquisas em Saúde Anderson, Bruno, Érika, Ester, Joaquim, Julia, Juliana, Mayara, e em especial os integrantes do “*team BDNF*” Amanda, Bruna, Carlos, Eric, Ivana, Marcele, Paola, Suzanny e Tamires, por toda confiança, apoio, ajuda, discussões de artigo, aulas de estatística e “luzes no fim do túnel”. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho!

Aos queridos amigos que a vida acadêmica me presenteou, em especial as amigas Flávia, Luana, Larissa e Poliany, que me sustentaram, principalmente no início dessa trajetória, acreditaram em mim e sempre me deram muito apoio!

A todos os alunos voluntários do Núcleo de Pesquisas em Saúde – UFES envolvidos neste estudo, que contribuíram na aplicação dos questionários e iniciaram as análises em laboratório, muito obrigada pela dedicação do tempo de vocês!

Aos agentes comunitários de saúde, à equipe de atenção básica primária do município de Alegre e aos pacientes envolvidos, pois sem eles não seria possível a realização desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital do Câncer de Barretos - SP, em especial a cientista Bruna Sorroche, por toda dedicação, paciência e empenho nas análises laboratoriais.

A Universidade Federal do Espírito Santo, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de formação no curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e pelo fomento financeiro deste trabalho.

Por fim, a todos que de alguma forma me ajudaram ao longo dessa caminhada e a tornaram mais leve. É impossível citar todos, mas estão no meu coração. Muito obrigada!

“A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas. Para mim, a ciência dá uma explicação parcial da vida. Na medida em que avança, é baseada em fatos, experiências e experimentos”. (Rosalind Franklin)

RESUMO

QUAIOTO, B.R. **Análise da relação entre depressão e hábito tabagista na metilação do gene *BDNF***. 2021. 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A depressão é uma das doenças mais comuns dentre as causas de incapacidade global, com milhões de pessoas afetadas. É uma doença heterogênea e complexa, que envolve diversos fatores de risco. Embora não exista uma teoria única para explicar o seu desenvolvimento, estudos sugerem uma relação com menores níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Nesse sentido, a metilação do gene *BDNF*, influenciada por fatores ambientais, pode estar envolvida. Sabe-se que indivíduos com depressão são frequentemente fumantes e já foi demonstrada alterações nos níveis protéicos de BDNF em virtude do uso de tabaco. Porém, a investigação do efeito do tabaco na metilação do gene *BDNF* ainda não foi investigada. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre depressão e hábito tabagista em relação aos níveis de metilação do gene *BDNF*. Para tanto, realizou-se um estudo transversal, com indivíduos atendidos pela rede de atenção básica de saúde do SUS do município de Alegre – ES. A coleta de dados foi realizada por meio de um questionário de avaliação socioeconômica, saúde e estilo de vida, bem como avaliação antropométrica e de depressão, por meio do Inventário de Depressão de Beck II (BDI-II). Além disso, o sangue foi coletado para extração do DNA genômico e posterior análise de metilação. De acordo com a regressão de Poisson, a maior prevalência de depressão na amostra foi explicada pelo gênero feminino, não ter vínculo matrimonial, falta de atividade de lazer, ter hábito tabagista e a metilação do *BDNF*. Análises de Mann-Whitney e Modelo Linear Generalizado mostraram que pacientes depressivos tinham maiores níveis de metilação, assim como pacientes sem o hábito tabagista. Conforme demonstrado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post-hoc* de Dunn, o hábito tabagista reduz os níveis de metilação do *BDNF* em indivíduos depressivos, mas não em indivíduos não depressivos. Estes resultados proporcionam suporte para políticas de prevenção à depressão. Além disso, os dados contribuem para a compreensão da fisiopatologia e diagnóstico moleculares da depressão, envolvendo o gene *BDNF*. Adicionalmente, os resultados expõem a necessidade de se avaliar a influência do hábito tabagista em estudos sobre alterações epigenéticas na depressão.

Palavras-chave: Epigenética. Éxon IV. Pirosequenciamento. BDI-II. Tabaco.

ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN DEPRESSION AND SMOKING ON *BDNF* GENE METHYLATION

ABSTRACT

QUAIOTO, B.R. **Analysis of the relationship between depression and smoking on *BDNF* gene methylation**. 2021. 99f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Depression is one of the most common diseases between the cause of global inability, with millions of people affected. It is a heterogeneous and complex disease, which involves several risk factors. Although there is no single theory to explain its development, studies suggest a relationship with lower levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF). In this sense, *BDNF* gene methylation, influenced by environmental factors, may be involved. It is known that individuals with depression are frequently smokers and it has already been demonstrated that changes in BDNF protein levels can occur due to tobacco use. However, the investigation of tobacco effect on *BDNF* gene methylation has not yet been investigated. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationship between depression, smoking and *BDNF* gene methylation levels. To that end, a cross-sectional study was carried out with individuals assisted by the SUS primary health care network in the municipality of Alegre – ES. Data collection was performed using a socioeconomic, health and lifestyle assessment questionnaire, as well as anthropometric and depression assessment, using the Beck Depression Inventory-II (BDI-II). In addition, blood was collected for genomic DNA extraction and posterior methylation analysis. According to the Poisson regression, the highest prevalence of depression in the sample was explained by the female gender, not having a marriage bond, lack of leisure activities, smoking and *BDNF* methylation. Mann-Whitney and Generalized Linear Model analysis showed that depressed patients had higher levels of methylation, as well as non-smokers. As demonstrated by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-hoc test, smoking habit reduces *BDNF* methylation levels in depressed individuals, but not in non-depressed individuals. These results provide support for depression

prevention policies. Furthermore, the data contribute to the understanding of the pathophysiology and diagnosis molecular of depression, involving the *BDNF* gene. Additionally, the results expose the need to assess the influence of smoking habit in studies on epigenetic changes in depression.

Key words: Epigenetics. Exon IV. Pyrosequencing. BDI-II. Tobacco.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fórmula para o cálculo amostral onde: n = Tamanho da amostra; N = População; d = Precisão absoluta desejada; p = Proporção estimada do evento; $q= 1 - p$; $deff$ = Efeito de desenho.31
- Figura 2. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney • $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle (não depressivo).....44
- Figura 3. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. AD: antidepressivo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney.45
- Figura 4. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. AD: antidepressivo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney.46
- Figura 5. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney • $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle (sem hábito tabagista).47
- Figura 6. Comparações múltiplas dos níveis de metilação (%) na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, de acordo com os grupos: NDep - NTab: não depressivo sem hábito tabagista; NDep - Tab: não depressivo com hábito tabagista; Dep - NTab: depressivo sem hábito tabagista; e Dep - Tab: depressivo com hábito tabagista. Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn após ajuste por correção de Bonferroni. A) Níveis de metilação na CpG 1 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; B) Níveis de metilação na CpG 2 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; C) Níveis de metilação na CpG 3 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab e Dep-NTab x Dep-Tab; D) Níveis de metilação na CpG 4 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos 1 x 3, 1 x 4 e 3 x 4; E)

Níveis de metilação na CpG 5 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; F) Níveis de metilação na CpG 6 (%). Não houve diferença significativa entre os grupos; G) Níveis de metilação na CpG 7 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; H) Níveis de metilação na média das CpGs 1-7 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> e condições para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região de interesse.	36
Tabela 2. <i>Sequencing primers</i> utilizados para leitura da sequência da região promotora do éxon IV do gene <i>BDNF</i> , correspondente aos sítios CpG 1-7.	37
Tabela 3. Perfil socioeconômico da amostra.	39
Tabela 4. Variáveis numéricas de caracterização da amostra estudada.	39
Tabela 5. Caracterização do estilo de vida da amostra.	40
Tabela 6. Caracterização das variáveis relacionadas a depressão e uso autorreferido de medicamentos antidepressivos.	41
Tabela 7. Caracterização do perfil de metilação da região promotora do éxon IV do gene <i>BDNF</i> da amostra.	41
Tabela 8. Análise univariada de regressão de Poisson com variância robusta.	42
Tabela 9. Análise multivariada de regressão de Poisson com variância robusta, método <i>backward</i> , após ajuste pelo teste de Hosmer & Lemeshow.	43
Tabela 10. Modelo linear generalizado para a relação entre metilação das CpGs da região promotora do éxon IV do <i>BDNF</i> e depressão e hábito tabagista, ajustado para gênero, localização, consumo de álcool, uso de antidepressivo e idade.	48
Tabela 11. Teste de comparações múltiplas de Dunn.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Antidepressivo
BDI	Inventário de depressão de Beck (do inglês <i>Beck depression inventory</i>)
BDI – II	Inventário de depressão de Beck 2 (do inglês <i>Beck depression inventory 2</i>)
<i>BDNF</i>	gene Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>Brain derived neurotrophic factor</i>)
BDNF	proteína Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>Brain derived neurotrophic factor</i>)
CEP/CCS-UFES	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CpGi	Ilhas CpG
CpG	Citosina-fosfato-guanina (do inglês <i>cytosin- phosphate-guanine</i>)
Dep-NTab	Depressivo sem hábito tabagista
Dep-Tab	Depressivo com hábito tabagista
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA Metiltransferases
DSM-IV	Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais-4 (do inglês <i>Diagnostic and statistical manual of mental disorders</i>)
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético

HMT	Histona metiltransferase
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
H3K9me2	Histona H3 lisina 9 dimetilação
IMC	Índice de massa corporal
mRNA	RNA mensageiro
nAChRs	Receptor nicotínico de acetilcolina (do inglês <i>Nicotinic acetylcholine receptors</i>)
NDep-NTab	Não depressivo sem hábito tabagista
NDep-Tab	Não depressivo com hábito tabagista
PACs	Programa de Agentes Comunitários de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
UBS	Unidade básica de saúde
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
SUS	Sistema único de saúde
ssDNA	DNA de fita simples (do inglês <i>single-stranded DNA</i>)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
5-Mc	5-Metilcitosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 EPIGENÉTICA: METILAÇÃO DO DNA.....	20
2.2 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO – BDNF.....	22
2.3 BDNF E DEPRESSÃO.....	23
2.4 DEPRESSÃO.....	25
2.5 COMORBIDADE DEPRESSÃO E TABAGISMO.....	26
2.6 BDNF E TABAGISMO.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	30
4.2 CASUÍSTICA.....	30
4.3 CÁLCULO AMOSTRAL.....	31
4.4 AVALIAÇÃO SOCIOECONÔMICA, CONDIÇÕES DE SAÚDE MENTAL E ESTILO DE VIDA.....	31
4.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	32
4.6 AVALIAÇÃO DE DEPRESSÃO.....	32
4.7 COLETA DE SANGUE, ANÁLISE MOLECULAR E EPIGENÉTICA.....	33
4.7.1 Extração e quantificação do DNA genômico	34
4.7.2 Conversão por bissulfito	35

4.7.3 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	35
4.7.4 Pirosequenciamento	36
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
5 RESULTADOS	39
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA.....	39
5.2 FATORES DETERMINANTES PARA DEPRESSÃO.....	41
5.3 METILAÇÃO DO <i>BDNF</i> E DEPRESSÃO.....	43
5.4 METILAÇÃO DO <i>BDNF</i> E ANTIDEPRESSIVOS.....	44
5.5 METILAÇÃO DO <i>BDNF</i> E HÁBITO TABAGISTA.....	46
5.6 ANÁLISE MULTIVARIADA DA METILAÇÃO DO <i>BDNF</i>	47
5.7 DEPRESSÃO E HÁBITO TABAGISTA NA METILAÇÃO DO <i>BDNF</i>	49
6 DISCUSSÃO	54
6.1 FATORES DETERMINANTES PARA DEPRESSÃO.....	54
6.2 METILAÇÃO DO <i>BDNF</i> , DEPRESSÃO E HÁBITO TABAGISTA.....	56
6.2.1 Metilação do <i>BDNF</i> e depressão.....	56
6.2.2 Metilação do <i>BDNF</i> e hábito tabagista.....	60
6.2.3 Relação entre depressão e hábito tabagista na metilação do <i>BDNF</i>	62
7 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES	78
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization* - WHO) e a Associação Americana de Psiquiatria (do inglês *American Psychiatric Association* - APA), a depressão é caracterizada por humor deprimido, perda de interesse ou prazer, alterações no apetite e peso, bem como no sono, fadiga, falta de concentração, sentimentos de culpa ou inutilidade, falta de autoestima, além de, em seu estágio mais grave, poder levar ao suicídio (APA, 2014; WHO, 2017).

Mais de 264 milhões de pessoas são afetadas pela depressão (JAMES *et al.*, 2018), estimando-se que em 2030 esse transtorno poderá se destacar como a principal causa de doença mundial (WHO, 2008). Para as mulheres, a depressão é evidenciada como a terceira causa de morbidade, já para os homens ocupa o quinto lugar (JAMES *et al.*, 2018).

A suscetibilidade para o desenvolvimento da depressão é heterogênea, o que a torna altamente complexa, uma vez que envolve diversos fatores de risco, incluindo fatores ambientais, genéticos, epigenéticos, neuroendócrinos e neuroimunológicos (DUMAN *et al.*, 2016; LI; SOCZYNSKA; KENNEDY, 2011; NESTLER, 2014). Nos transtornos psiquiátricos existe uma interação de difícil compreensão entre fatores ambientais e diversos genes, os quais contribuem de forma distinta para o seu desenvolvimento (CATTANEO *et al.*, 2016).

Embora não exista uma teoria única para explicar a natureza da depressão, estudos sugerem que o fator inicial para o desenvolvimento da doença pode estar relacionado a uma redução da síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain derived neurotrophic factor* - BDNF) a nível transcricional, o que levaria ao comprometimento da neuroplasticidade. A neuroplasticidade prejudicada indica alterações anormais na neurogênese, ramificação do axônio, dendritos e sinapses (YANG *et al.*, 2020).

Nesse sentido, estudos sugerem que mecanismos epigenéticos acarretados por experiências ambientais influenciam dinamicamente os níveis BDNF (MIRANDA *et al.*, 2019; VIALOU *et al.*, 2013). Evidências indicam que modificações epigenéticas, que incluem a metilação de promotores do gene *BDNF*, estão

claramente associadas à fisiopatologia de distúrbios psiquiátricos, incluindo a depressão. Portanto, é necessário considerar quais fatores ambientais precisos influenciam os níveis de metilação do gene *BDNF* em pacientes depressivos (IKEGAME *et al.*, 2013).

Sabe-se que em indivíduos depressivos, o risco de fumar é maior do que em indivíduos não depressivos (JIMÉNEZ-TREVIÑO *et al.*, 2019; LUGER; SULS; VANDER WEG, 2014; WEINBERGER *et al.*, 2016). Dessa forma, ao avaliar os níveis periféricos de BDNF como biomarcador em pacientes depressivos, sugere-se levar em consideração a influência do hábito tabagista (COLLE *et al.*, 2016).

Apesar da literatura não apresentar dados com relação à metilação do gene *BDNF* e o hábito tabagista, alguns estudos demonstraram aumento dos níveis proteicos ou de mRNA de BDNF com hábito tabagista ou exposição crônica a nicotina (CZUBAK *et al.*, 2009; JAMAL *et al.*, 2015; KENNY; FILE; RATTRAY, 2000; NEVES *et al.*, 2017; SON; WINZER-SERHAN, 2009).

Portanto, diante do exposto, hipotetizamos que fatores socioeconômicos e de estilo de vida, em especial o hábito tabagista, assim como alterações epigenéticas podem estar associados à depressão em nossa amostra. Além disso, acreditamos que o hábito tabagista possa influenciar os níveis de metilação do gene *BDNF* em indivíduos depressivos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIGENÉTICA: METILAÇÃO DO DNA

Apesar de todas as células de um mesmo organismo compartilharem a mesma informação genética, sabe-se que nem todos os genes permanecem ativos o tempo todo (PORTELA; ESTELLER, 2010). As informações contidas no DNA são lidas de formas distintas pelos diferentes tipos de células, ou seja, embora todos os tipos celulares do corpo contenham a mesma sequência de DNA, diferentes genes são expressos por cada uma dessas células (DOR; CEDAR, 2018).

A expressão gênica pode ser modulada efetivamente pela regulação epigenética, sem que haja alterações na sequência de DNA. Os mecanismos da epigenética incluem a metilação do DNA, modificações de histonas e controle por RNAs não codificadores (CHEN; CHEN, 2017), sendo que a metilação de citosinas é a modificação epigenética mais estudada em seres humanos (PORTELA; ESTELLER, 2010).

O processo de metilação de citosinas consiste na adição de um grupo metil em citosinas que precedem as guaninas, ou seja, dinucleotídeos CpG (citosina - fosfato - guanina), na posição do quinto carbono, sendo catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs) (DELANEY; GARG; YUNG, 2015). Membros da família de enzimas DNMTs, mais especificamente DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, possuem atividade metiltransferase, catalisando a transferência de um grupo metil de S-adenosilmetionina para citosinas do DNA, resultando na formação de 5-metilcitosina (5-mC) (QURESHI; MEHLER, 2018).

Embora seja bem aceito que o meio ambiente não afeta diretamente as sequências gênicas, a metilação do DNA é resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo um processo dinâmico, exibindo efeitos em virtude de mudanças ambientais em vários momentos. Fatores ambientais podem afetar o DNA em nível de expressão gênica tanto no pré ou pós-natal (DOR; CEDAR, 2018; LIU *et al.*, 2018).

Nesse sentido, pesquisas têm evidenciado diversos fatores ambientais que podem implicar em modificações na metilação do DNA, como poluentes, elementos

químicos, aflatoxina B1, dieta e nutrição, estresse, atividade física e consumo de álcool e tabagismo (ALEGRÍA-TORRES; BACCARELLI; BOLLATI, 2011; MARTIN; FRY, 2018).

Inicialmente a metilação do DNA foi relacionada ao silenciamento gênico. Porém, avanços recentes nos estudos em epigenética mostraram que a função da metilação depende da sequência genômica e do contexto celular. Dessa forma, apenas a presença de 5-mC não é suficiente para determinar a sua relação com a transcrição (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019; JONES, 2012).

A compreensão dos efeitos da metilação no DNA ainda está avançando. Estudos têm mostrado que, geralmente, a metilação em regiões promotoras com ilhas CpG (CpGi) associa-se a inativação da transcrição (DOR; CEDAR, 2018; JONES, 2012; PORTELA; ESTELLER, 2010), da mesma forma ocorre em regiões promotoras não CpGi (HAN *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2018). Já a metilação no corpo gênico não associa-se ao silenciamento de genes, sendo que sua função ainda não é bem conhecida (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019; HAN *et al.*, 2011; PORTELA; ESTELLER, 2010).

A metilação do DNA possui um papel importante em diversos processos biológicos, incluindo a organização do genoma, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, *splicing* de RNA e expressão gênica, ativando ou reprimindo a transcrição (LIYANAGE *et al.*, 2014). Porém, apesar da metilação do DNA estar envolvida em diversos processos biológicos importantes, os avanços nos estudos da epigenética nos últimos anos mostraram que a metilação do DNA influencia muitas doenças, como câncer e doenças neurológicas (SALLUSTIO; GESUALDO; GALLONE, 2019).

Tanto o desenvolvimento quanto a função do sistema nervoso podem ser afetados por consequência da regulação epigenética. Desse modo, a epigenética também vem sendo associada a doenças neuropsiquiátricas, incluindo o autismo, X frágil, síndrome de Rett, esquizofrenia e depressão (KUEHNER *et al.*, 2019).

Com relação à depressão, dentre os principais genes candidatos para a fisiopatologia da doença inclui-se o *BDNF*. A maioria dos estudos constatou que em indivíduos deprimidos, regiões deste gene geralmente encontram-se hipermetiladas,

o que pode inibir a sua expressão (CHEN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2016).

2.2 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO - BDNF

O gene *BDNF* humano encontra-se localizado no cromossomo 11, região p13-14 (CATTANEO *et al.*, 2016). Contendo aproximadamente 70 kb, o *BDNF* possui nove promotores funcionais que regulam sua expressão e onze éxons, sendo que o éxon IX codifica a proteína BDNF (PRUUNSILD *et al.*, 2007).

Através das regiões promotoras e mecanismos de *splicing* alternativos, diferentes transcritos de BDNF podem ser gerados, mas todos eles traduzindo a mesma proteína, devido a região de codificação comum na extremidade 3', localizada no éxon IX, que contém a sequência comum para codificar a proteína pro-BDNF, a qual posteriormente é clivada em BDNF maduro (CATTANEO *et al.*, 2016).

O *BDNF* é altamente expresso no corpo mamilar, ponte, hipocampo, córtex frontal, colículos, trato olfativo, cerebelo, medula e infundíbulo. Transcritos contendo os éxons II, III, IV, V e VII são principalmente específicos do cérebro, enquanto os outros transcritos também são expressos em níveis variáveis em tecidos não neurais (PRUUNSILD *et al.*, 2007).

A proteína BDNF faz parte da família de neurotrofinas, sendo o membro mais amplamente distribuído, o qual está envolvido em uma infinidade de funções biológicas no cérebro (DWIVEDI, 2013). Os fatores neurotróficos são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento, função e plasticidade neural. Estudos apontaram que o BDNF além de apresentar efeitos na sobrevivência neuronal, influencia o desenvolvimento e plasticidade sináptica (IKEGAME *et al.*, 2013).

Dessa forma, estruturas cerebrais, bem como suas funções podem ser prejudicadas devido a alterações no nível de expressão do BDNF (HING *et al.*, 2012). Nesse sentido, acredita-se que uma redução na atividade do gene *BDNF* no hipocampo possa estar diretamente relacionada à fisiopatologia da depressão e essa atividade tem sido extensivamente estudada (HACIMUSALAR; EŞEL, 2018).

Devido à dificuldade de estudar os níveis de BDNF diretamente no cérebro, estudos têm avaliado o BDNF periférico, o qual pode ter seu nível obtido através de amostras de sangue (SEN; DUMAN; SANACORA, 2008). Portanto, considerando a vantagem de amostras periféricas, é possível que a utilização de níveis de BDNF no sangue possa ser um potencial biomarcador para a depressão (FUCHIKAMI *et al.*, 2011).

2.3 BDNF E DEPRESSÃO

Apesar de a depressão ser uma doença heterogênea, um fator altamente relevante para a sua compreensão é o estresse (NOTARAS; VAN DEN BUUSE, 2020), o qual também ocasiona menor disponibilidade de BDNF, levando ao comprometimento da sobrevivência e funções neuronais (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997; SMITH *et al.*, 1995).

Alterações na estrutura e função do hipocampo devido ao estresse embasaram a justificativa para a análise da associação de fatores neurotróficos na depressão. Estudos apontaram que o estresse diminui a expressão de fatores neurotróficos específicos em regiões límbicas do cérebro, enquanto que o uso de antidepressivos exerce ações opostas (DUMAN; MONTEGGIA, 2006). Foi demonstrado que o BDNF desempenha um papel importante na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, fornecendo evidências para apoiar a hipótese neurotrófica da depressão (YANG *et al.*, 2020).

Pesquisas relataram que em indivíduos deprimidos, os níveis séricos de BDNF eram menores quando comparados a controles saudáveis (BOCCHIO-CHIAVETTO *et al.*, 2010; BUS *et al.*, 2015; KAREGE *et al.*, 2002; MOLENDIJK *et al.*, 2011, 2014; POLYAKOVA *et al.*, 2015; SEN; DUMAN; SANACORA, 2008).

Adicionalmente, estudos avaliando tratamentos antidepressivos específicos em indivíduos deprimidos observaram aumento nos níveis de BDNF após o tratamento (BRUNONI; LOPES; FREGNI, 2008; CATTANEO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2001; DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997; MOLENDIJK *et al.*, 2014;

NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995; POLYAKOVA *et al.*, 2015; SEN; DUMAN; SANACORA, 2008; SHIMIZU *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2017).

Corroborando com esses resultados, pesquisas envolvendo modelo animal estressado/deprimido (ratos ou camundongos) encontraram resultados semelhantes, sustentando a associação entre BDNF e depressão (ANGELUCCI *et al.*, 2000, 2003; CAPIBARIBE *et al.*, 2019; PIZARRO *et al.*, 2004; QIAO *et al.*, 2017; RÉUS *et al.*, 2011; ROCERI *et al.*, 2004; SHIRAYAMA *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 1995; TSANKOVA *et al.*, 2006).

Além disso, estudos de neuroimagem relataram menor volume hipocampal em pacientes deprimidos, o que pode estar relacionado com a redução de neurotrofinas, bem como o posterior aumento do volume após o uso de antidepressivos (BARCH *et al.*, 2019; BREMNER *et al.*, 2000; COBB *et al.*, 2013; MALYKHIN *et al.*, 2010; RODDY *et al.*, 2019; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006).

Pesquisas sobre alterações epigenéticas também foram realizadas, envolvendo o papel da metilação do gene *BDNF* na depressão. Evidências indicam que pacientes depressivos possuem maiores níveis de metilação em regiões do gene *BDNF*, quando comparados a pacientes saudáveis (CARLBERG *et al.*, 2014; D'ADDARIO *et al.*, 2013; JANUAR *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2015; KELLER *et al.*, 2010; ROY; SHELTON; DWIVEDI, 2017; ZHENG *et al.*, 2016)

No entanto, algumas pesquisas investigando a relação entre BDNF e depressão não encontraram resultados semelhantes. Estudos envolvendo pacientes depressivos não observaram diferenças significativas nos níveis proteicos de BDNF entre os que fizeram tratamento antidepressivo e os controles (BAŞTERZI *et al.*, 2009; BRUNONI *et al.*, 2014). De forma semelhante, outros estudos não observaram alterações nos níveis de BDNF após terapia de estimulação cerebral não invasiva (BRUNONI *et al.*, 2015) e eletroconvulsoterapia (LIN *et al.*, 2013) em pacientes depressivos. Além disso, um estudo realizado por Fuchikami e colaboradores (2011) não encontrou alterações nos níveis de metilação em parte da região promotora do éxon IV entre pacientes deprimidos e controles.

Dessa forma, a hipótese neurotrófica da depressão ainda não se encontra bem consolidada, sugerindo a necessidade de mais pesquisas. Porém, estudos

envolvendo o papel do BDNF na depressão são justificadas, devido ao seu potencial uso terapêutico para a doença, bem como as limitações nos tratamentos antidepressivos atuais, como a não resposta ao tratamento (GROVES, 2007).

2.4 DEPRESSÃO

A depressão está entre os distúrbios psiquiátricos mais comuns para causa de incapacidade global (JAMES *et al.*, 2018; WHITEFORD *et al.*, 2013; WHO, 2008), com mais de 264 milhões de pessoas afetadas (JAMES *et al.*, 2018). Em 2030, a doença deve ocupar o primeiro lugar, destacando-se como a principal causa de doença mundial (WHO, 2008).

Conforme apresentado pela WHO (2017), entre os anos de 2005 a 2015, a estimativa total de pessoas que vivem com depressão aumentou 18,4%, sendo uma doença mais comum entre as mulheres do que homens. Para as mulheres, a depressão representa a terceira causa de morbidade desde 2007. Já para os homens, entre os anos de 2007 e 2017, a depressão passou a ocupar o quinto lugar (JAMES *et al.*, 2018).

A doença é frequentemente crônica e progressiva e aproximadamente 60% dos acometidos apresentam episódios recorrentes (MONROE; HARKNESS, 2011), sendo estes distintos e com duração de pelo menos duas semanas (APA, 2014). Além disso, pode afetar indivíduos em qualquer idade, sendo mais frequente em grupos etários mais velhos, e quando desenvolvida na adolescência, o risco para sua recorrência na idade adulta é alto (WHO, 2003).

Critérios diagnósticos para a depressão incluem humor deprimido na maior parte do dia, acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades, perda ou ganho significativo de peso sem fazer dieta, redução ou aumento do apetite, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, capacidade diminuída para pensar, se concentrar ou indecisão, pensamentos recorrentes de morte, ideação, tentativa ou plano suicida recorrente (APA, 2014; WHO, 2017).

Com base na quantidade de sintomas, bem como a gravidade que apresentam, um episódio depressivo pode ser dividido em três graus: leve, moderado e grave. No episódio leve, estão presentes pelo menos dois a três sintomas no paciente, porém, apesar de sofrer, provavelmente a maior parte de suas atividades não é prejudicada. No episódio moderado, estão presentes quatro ou mais sintomas, além de muita dificuldade para continuar as atividades de rotina. Já no episódio grave, vários sintomas estão presentes e são angustiantes, ocorrendo uma perda de auto-estima, ideias de culpa, atos suicidas e sintomas psicossomáticos. Além disso, episódios graves podem ainda apresentar-se com ou sem sintomas psicóticos (WHO, 1993).

O desenvolvimento da depressão é bastante heterogêneo, podendo envolver a anormalidade na função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), fatores neurotróficos, esteróides sexuais, neurotransmissores, sinalização intracelular, transcrição gênica, tradução e modificações epigenéticas que influenciam no comportamento neuronal (DUMAN *et al.*, 2016). Ou seja, é uma doença complexa, envolvendo fatores de risco psicossociais, genéticos, epigenéticos, neuroendócrinos e neuroimunológicos (DUMAN *et al.*, 2016; LI; SOCZYNSKA; KENNEDY, 2011; NESTLER, 2014).

Episódios depressivos podem ter causas distintas em diferentes pacientes, bem como um mesmo paciente pode apresentar episódios em momentos distintos, ocasionados também por fatores distintos. Dessa forma, estressores biológicos ou psicossociais resultam em diferentes patogêneses que respondem diferente e preferencialmente a determinadas intervenções (MALHI; MANN, 2018).

Apesar do crescimento substancial de pesquisas envolvendo regiões cerebrais candidatas, ainda permanecem lacunas para elucidar a complexidade dos diversos sintomas causados pela depressão, bem como seu tratamento (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Embora existam vários tratamentos disponíveis, muitos pacientes não respondem satisfatoriamente, apresentando depressão recorrente resistente ao tratamento (BERLIM; TURECKI, 2007).

2.5 COMORBIDADE DEPRESSÃO E TABAGISMO

A depressão e o tabagismo são altamente comórbidos. Diversos estudos relataram associação entre depressão e hábito tabagista (BORÇOI *et al.*, 2020; LUGER; SULS; VANDER WEG, 2014; WEINBERGER *et al.*, 2016). Além disso, comparado a indivíduos não depressivos, indivíduos com depressão apresentam maior risco de fumar (JIMÉNEZ-TREVIÑO *et al.*, 2019), bem como maior dificuldade para parar de fumar (WEINBERGER *et al.*, 2016).

De acordo com Cook e colaboradores (2014), entre os anos de 2004 e 2011, a porcentagem de fumantes sem doença mental diminuiu de 29,5% para 15,6%, enquanto que entre indivíduos com doença mental, a porcentagem caiu de 28,8% para 27%, não sendo considerada uma redução significativa.

Existem duas principais hipóteses que relacionam a depressão ao tabagismo, porém os resultados ainda são inconsistentes. Rubin e colaboradores (2020) sugerem que pacientes depressivos fumam para aliviar os sintomas da doença. A depressão frequentemente é associada a algum comportamento posterior do tabagismo, seja o seu início, aumento do consumo ou a dependência, sugerindo um efeito de causa (FLUHARTY *et al.*, 2017).

Paralelamente, diversos estudos apontam que ser fumante é uma condição que aumenta o risco de desenvolvimento de depressão (BAKHSHAIE; ZVOLENSKY; GOODWIN, 2015; WOOTTON *et al.*, 2020). Nesse caso, evidências da exposição ao fumo e o posterior desenvolvimento da depressão indicam um efeito de consequência (FLUHARTY *et al.*, 2017).

Em uma meta-análise, Luger, Suls e Vander Weg (2014) observaram que fumantes atuais e ex-fumantes tinham maior chance de depressão, comparado a indivíduos que nunca fumaram. Além disso, entre indivíduos fumantes e ex-fumantes, os fumantes atuais apresentaram maior probabilidade de desenvolverem depressão. Os resultados sugerem ainda que essa relação é independente de outros fatores que poderiam moderar a relação.

2.6 BDNF E TABAGISMO

Níveis de BDNF podem ser influenciados pelo comportamento tabagista (MACHAALANI; CHEN, 2018). Em um experimento envolvendo modelo animal, Maggio e colaboradores (1997) evidenciaram que a nicotina aumentou níveis de BDNF no corpo estriado, não verificando aumento em outras áreas do cérebro. Posteriormente, Kenny, File e Rattray (2000) observaram no hipocampo de camundongos, que o uso agudo de nicotina diminuiu a expressão de BDNF, enquanto o seu uso crônico aumentou a expressão.

A literatura sobre BDNF e tabagismo ainda apresenta inconsistência. Alguns estudos não encontraram diferenças significativas entre os níveis de BDNF em fumantes e não fumantes (BHANG; CHOI; AHN, 2010; XIA *et al.*, 2019). Por outro lado, outros estudos mostraram aumento da expressão de BDNF com o hábito tabagista ou exposição a nicotina (CZUBAK *et al.*, 2009; JAMAL *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2017; SON; WINZER-SERHAN, 2009).

Conforme sugerido por Neves e colaboradores (2017), as alterações nos níveis de BDNF podem ser dependentes do nível de consumo de cigarros. Os autores investigaram as diferenças nos níveis de BDNF entre fumantes pesados, fumantes leves e não fumantes e observaram níveis mais elevados de BDNF apenas nos fumantes pesados.

Estudos recentes têm observado alterações no epigenoma associadas ao tabaco. Com relação ao gene *BDNF*, Toledo-Rodriguez e colaboradores (2010) compararam adolescentes expostos ao tabagismo materno durante o pré-natal e adolescentes não expostos. Os autores observaram uma associação entre o tabagismo materno durante o pré-natal e maiores níveis de metilação nos filhos, no promotor do éxon VI do gene. No entanto, a literatura carece de estudos envolvendo a metilação do gene *BDNF* e o tabagismo atual.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre depressão e hábito tabagista em relação aos níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, em usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Alegre – Espírito Santo (ES).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil socioeconômico, condições de saúde e estilo de vida da amostra estudada;
- Verificar os fatores determinantes para depressão na amostra estudada;
- Verificar se há relação entre o hábito tabagista e depressão na amostra estudada;
- Verificar se há diferenças entre os níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em todas as CpGs analisadas entre indivíduos depressivos e controles;
- Verificar se há diferenças entre os níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em todas as CpGs analisadas entre indivíduos que fazem uso de medicação antidepressiva e os que não fazem;
- Verificar se há diferenças entre os níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em todas as CpGs analisadas entre indivíduos depressivos que fazem uso de medicação antidepressiva e os que não fazem;
- Verificar se existem diferenças entre níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em todas as CpGs analisadas entre indivíduos com hábito tabagista e sem o hábito tabagista;
- Verificar a relação entre depressão e hábito tabagista nos níveis de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em todas as CpGs analisadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS-UFES), sob os números 1.574.160/2016 e 3.420.734/2019 (Anexo 1 e 2). Vale ressaltar que essa dissertação integra o Projeto de Pesquisa “Avaliação epigenética dos genes *BDNF* e *NR3C1* e a relação com a segurança alimentar e nutricional, a saúde e o estilo de vida de adultos, usuários do SUS”.

4.2 CASUÍSTICA

Foi firmada parceria, por meio de carta de acordo e reunião expositiva com apresentação do projeto, entre a Secretaria de Saúde de Alegre – ES, o coordenador de todas as Unidades Básicas de Saúde (UBS) e Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACs) também do mesmo município.

Realizou-se um estudo transversal com indivíduos atendidos pela rede de atenção básica de saúde do SUS do município de Alegre – ES. Foram adotados como critérios de inclusão possuir faixa etária entre 20 e 59 anos, ser o único indivíduo residente no domicílio a participar da pesquisa e possuir condições cognitivas para responder aos questionários. Os indivíduos que não se enquadraram nos critérios acima foram excluídos da pesquisa.

As UBSs e PACs forneceram o cadastro de todas as famílias assistidas pelo SUS. A partir dos dados coletados, a seleção dos entrevistados foi realizada por conveniência e recrutados por meio dos agentes comunitários de saúde de cada UBSs e PACs, com apresentação, divulgação do estudo e convite para participação. A partir da adesão, os indivíduos que se voluntariaram assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3), conforme a Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

A coleta de dados foi realizada nas UBSs por meio de um questionário de avaliação socioeconômica, saúde e estilo de vida (Apêndice 1). Além disso, realizou-

se coleta de sangue dos indivíduos, avaliação antropométrica e aplicou-se o Inventário de Depressão de Beck II (BDI-II) (Anexo 4).

4.3 CÁLCULO AMOSTRAL

A amostra foi calculada por meio do programa OpenEpi versão 3.01, que utiliza a fórmula abaixo (Figura 1). Assumiu-se precisão absoluta de 5%, intervalo de confiança de 95% e efeito de desenho de 1, considerando amostra aleatória. Em relação à população, foi utilizado como base o cadastro E-SUS do município de Alegre - ES, que forneceu um total de 10.222 habitantes entre 20-59 anos, correspondente à população adulta do município atendida pela Rede de Atenção Básica em Saúde.

$$n = deff \times \frac{N\hat{p}\hat{q}}{\frac{d^2}{1.96^2}(N-1) + \hat{p}\hat{q}}$$

Figura 1. Fórmula para o cálculo amostral onde: n= Tamanho da amostra; deff= Efeito de desenho; N= População; p= Proporção estimada do evento; q= 1 – p; d= Precisão absoluta desejada.

A amostra foi estratificada por UBSs e PACs e por localização rural e urbana, segundo os dados da Secretaria Municipal de Saúde de Alegre – ES. As UBSs e PACs envolvidas foram incluídas com probabilidade igual a 1 e tomou-se por referência a proporção estimada de depressão de 19% (BORÇOI *et al.*, 2020). Por fim, a amostra estimada foi de 232 indivíduos.

4.4 AVALIAÇÃO SOCIOECONÔMICA, CONDIÇÕES DE SAÚDE MENTAL E ESTILO DE VIDA

O levantamento socioeconômico, condições de saúde e estilo de vida foi realizado por meio de questionário individual, o qual incluiu perguntas sobre gênero, idade, situação conjugal, escolaridade, localização da residência e renda, sendo

definida baixa renda por uma renda *per capita*/dia inferior a \$ 5 (cinco dólares americanos) (NERI, 2008).

Além disso, condições de saúde mental incluíram autorreferência de depressão e utilização de antidepressivos (AD), identificando os seguintes AD: venlafaxina, duloxetina, fluoxetina, paroxetina, amitriptilina, bupropiona, trazodona e desvenlafaxina. Já as condições de estilo de vida incluíram a prática de atividade de lazer e atividade física, bem como o consumo de tabaco e álcool.

4.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

A avaliação antropométrica foi realizada entre 7h e 8h da manhã, com os indivíduos em jejum mínimo de 8 horas. A estatura foi avaliada com o uso de estadiômetro Altuxata® (com capacidade máxima de 2,10 m), com os indivíduos descalços, eretos e com os braços esticados ao longo do corpo, cabeça alinhada à postura, estabelecendo-se um ponto fixo do olhar (BRASIL, 2011).

O peso foi aferido em uma balança de bioimpedância bipolar Tanita®, com monitor de gordura corporal acoplado, de marca BC601® (com divisão de 100g e capacidade máxima de 150kg), usando o mínimo de roupas, descalços, em pé na plataforma da balança, de maneira que os pés estivessem em contato com a superfície metálica da balança e os braços estendidos ao longo do corpo, conforme indicação do manual.

O percentual de gordura corporal foi classificado de acordo com faixa etária e sexo, com base no manual da balança. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado e classificado seguindo a referência para adultos (20-59 anos) (GALLAGHER *et al.*, 2000; WHO, 2000).

4.6 AVALIAÇÃO DE DEPRESSÃO

O Inventário de Depressão de Beck (BDI) desenvolvido originariamente em 1961 trata-se de uma escala de auto-relato capaz de avaliar a presença, intensidade e gravidade dos sintomas depressivos (BECK *et al.*, 1961). Uma nova versão, BDI-II,

foi publicada em 1996, com base em modificações no diagnóstico de depressão introduzidas pelo DSM-IV (Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais-4), com mudanças em alguns critérios para o diagnóstico e severidade (WANG; GORENSTEIN, 2013).

O BDI-II consiste em um questionário contendo 21 itens, que avaliam sentimentos da pessoa nas últimas duas semanas, conforme DSM-IV, classificados em uma escala de 4 pontos, que varia entre 0 e 3, com pontuações mais altas consideradas indicativas de sintomas mais graves de depressão, sendo a pontuação máxima possível de 63 pontos (JACKSON-KOKU, 2016). Neste estudo, utilizamos a versão revisada (BDI-II) traduzida ao português e para minimizar o viés, o questionário foi preenchido individual e pessoalmente, sendo aplicado por apenas uma pessoa treinada.

Embora seja um instrumento particularmente adequado para uso com pacientes psiquiátricos, tem sido amplamente usado na clínica e em pesquisa com pacientes não psiquiátricos e na população geral, com validação e confiabilidade na população brasileira em sua versão em português. O coeficiente de correlação intraclassa do BDI-II foi de 0,89 e o coeficiente alfa de consistência interna de Cronbach foi de 0,93 (GOMES-OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Ainda que o BDI-II não seja um instrumento para diagnóstico de depressão, na comunidade e populações de pacientes de cuidados primários, a depressão clínica é estimada com precisão (sensibilidade de 94% e especificidade de 92%) utilizando o ponto de corte 18 para o BDI-II (ARNAU *et al.*, 2001; HAMID *et al.*, 2004; WANG; GORENSTEIN, 2013). Dessa forma, a variável desfecho estudada foi denominada depressão, com triagem positiva definida por *score* BDI-II ≥ 18 (BORÇOI *et al.*, 2020).

4.7 COLETA DE SANGUE, ANÁLISE MOLECULAR E EPIGENÉTICA

A coleta de sangue foi realizada em local apropriado nas UBSs, por profissionais habilitados, entre 7 e 8 horas da manhã. Foram coletadas amostras de 10 mL, por punção venosa, em seringas descartáveis e transferidos 3mL para um

tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), homogeneizados por inversão de 5 a 8 vezes e mantidos sob refrigeração.

O DNA contido no sangue coletado dos indivíduos foi extraído no Laboratório de Biotecnologia da UFES, para posterior análise do estado de metilação em dinucleotídeos CpG da região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, o qual foi quantificado por pirosequenciamento pós conversão por bissulfito no Laboratório de Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos - SP.

4.7.1 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada a partir de uma alíquota de 500 µL de sangue total proveniente de tubo contendo anticoagulante EDTA. Foi utilizado o método de Salting-Out com precipitação salina, de acordo com a metodologia adaptada de Salazar e colaboradores (1998).

Aos 500µL de sangue, foi adicionado 1,5 mL de tampão de lise de células sanguíneas (Cloreto de Amônio, Carbonato ácido de Potássio, EDTA) em um tubo tipo *ependorf*. Após processo de homogeneização por inversão, o tubo permaneceu em gelo por, no mínimo, 30 minutos, para que as células vermelhas fossem lisadas. Centrifugou-se por 15 minutos a 3100 rpm a 4°C, com posterior descarte do sobrenadante. Estes passos foram repetidos até a obtenção de um *pellet* de cor esbranquiçada.

Em seguida, ressuspendeu-se o *pellet* com 300µL tampão de lise nuclear (Tris-HCl, NaCl, EDTA) (1x) com posterior agitação em vórtex por 30 segundos. Adicionou-se 1µL de proteinase K (20 mg/mL) e misturou-se cuidadosamente com a solução anterior. Após esta etapa foi adicionado 30µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10% e misturou-se cuidadosamente o tubo até formação de uma solução viscosa. Incubou-se por 12h a 37°C. Adicionou-se 160 µL de NaCl (5M) e 140 mL de tampão TE (Tris-EDTA) e misturou-se vigorosamente por 30 segundos em vórtex. O tubo permaneceu em gelo por 10 min. Em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 16000xg a 4°C.

Com o resultado da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto

(temperatura ambiente). Procedeu-se centrifugação por 10 minutos a 10000rpm. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1mL de etanol 70% (temperatura ambiente), para a retirada de sal. Novamente a amostra foi centrifugada, porém por 10 minutos a 16000xg, 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1mL de etanol 70% (temperatura ambiente), seguido de centrifugação por 5 minutos a 16000xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a amostra descansou em temperatura ambiente até evaporação completa do álcool. Por fim, o DNA presente no fundo do tubo foi ressuscitado em 80 µL tampão TE e incubado a 65°C por 30 minutos em banho maria. O material foi armazenado a -80°C para uso futuro.

Para verificação da qualidade e concentração do DNA, executou-se leitura em NANODROP® em comprimento de onda $\lambda = 260$ e 280nm (BARBOSA, 1998). A razão entre as leituras de 260nm e 280nm pode ser considerada um indicador de pureza da amostra. Razões com valores aproximados de 1,8 a 2,0 podem ser consideradas livres de contaminantes (Manual Nanodrop® 2000c).

4.7.2 Conversão por bissulfito

A partir do DNA genômico extraído, foi utilizado 1 ng de cada paciente para tratamento com bissulfito de sódio utilizando-se *EZ DNA Methylation™ Kit* (Zymo Research), de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes.

O protocolo consiste em etapas de desnaturação, purificação, dessulfonação, precipitação e eluição. No final, as citosinas não metiladas se convertem em uracilas e posteriormente em timinas, enquanto que não ocorre alteração das 5-mC, por serem resistentes à reação (FROMMER *et al.*, 1992).

Por oferecer uma abordagem qualitativa, quantitativa e eficiente para identificação de 5-mC, esta técnica é considerada padrão-ouro para a detecção da metilação do DNA (LI; TOLLEFSBOL, 2011).

4.7.3 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A região de interesse amplificada compreende a região promotora do éxon IV do gene *BDNF* (chr11:27.701.519-27.701.826), contendo 308 pares de bases.

Foi utilizado *HotStart Taq DNA Polymerase* (Qiagen®) e *primers* descritos por Braithwaite e colaboradores (2015). As condições de PCR e os *primers* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* e condições para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região de interesse.

<i>Primers BDNF</i>	<i>Condições de PCR</i>	
Forward	95° (14'30'')	
GGGTTGGAAGTGAAAATATTTGTAAA	94° (30'')	45x
Reverse biotínido	59° (30'')	
CCCCATCAACCAAAAACCTCCATTTAATCTC	72° (30'')	
	72° (10')	
	4° ∞	

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR: reação em cadeia da polimerase.

O produto da reação de PCR foi confirmado em gel de agarose (2%) utilizando *GelRed™* (*Uniscience*®).

4.7.4 Pirosequenciamento

Foi realizado o pirosequenciamento em *PSQ96ID* (*Qiagen*®, Valencia, CA) com o kit reagente *PyroMark Gold Q96* (*Qiagen*®, Valencia, CA), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante.

O pirosequenciamento requer uma fita simples de DNA (ssDNA), gerada a partir do produto de PCR biotínido, o qual permite a separação das duas cadeias do *amplicon*. O método é baseado em um sistema de sequenciamento por síntese, no qual nucleotídeos são dispensados e incorporados na cadeia de extensão. Para

isso, além do ssDNA e dos nucleotídeos, são necessárias quatro enzimas (DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase), bem como dois substratos diferentes, incluindo adenosina 5 'fosfossulfato (APS) e luciferina (DELANEY; GARG; YUNG, 2015).

Foram utilizados dois *sequencing primers* para obtenção de duas sequências de dispensação, devido ao tamanho do *amplicon* (Tabela 2). A região lida inclui a sequência onde se liga o fator de transcrição e os sítios CpG analisados correspondem a CpGs 1-7, conforme Braithwaite e colaboradores (2015).

Tabela 2. *Sequencing primers* utilizados para leitura da sequência da região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, correspondente aos sítios CpG 1-7.

Sequencing primer	Sítios CpG
GGTAGAGGAGGTATTATATGATAG	1 – 2 – 3 – 4
TTTAGTGGATTTTATTTATTTTTT	5 – 6 – 7

CpG: citosina-fosfato-guanina.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para examinar a normalidade de cada variável quantitativa. A descrição da amostra foi realizada apresentando as frequências relativas e absolutas para variáveis qualitativas, além de mediana e valores mínimo e máximo para variáveis quantitativas.

A análise univariada foi realizada utilizando modelo de regressão de Poisson com variância robusta para identificar potenciais fatores associados à depressão na amostra. Variáveis preditivas que obtiveram um valor $p < 0,20$ foram inseridas pelo método *backward* nas análises multivariadas de regressão de Poisson com variância robusta, permanecendo em cada etapa variáveis significativas com $p < 0,05$, até obtenção de um modelo final, em que todas as variáveis apresentaram $p < 0,05$. Para verificar a aderência final deste modelo, um ajuste foi realizado, utilizando o teste de Hosmer & Lemeshow.

Níveis de metilação foram comparados por meio do teste U de Mann-Whitney entre os pacientes: Não depressivos x Depressivos; Não uso de AD x Uso de AD;

Depressivos sem uso de AD x Depressivos com uso de AD; e Sem hábito tabagista x Com hábito tabagista.

Pacientes com níveis de metilação > 0 foram incluídos em um Modelo Linear Generalizado (GLzM), assumindo distribuição Gamma, incorporando as variáveis depressão e hábito tabagista, bem como potenciais fatores de confusão.

Por fim, níveis de metilação foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn, entre os grupos: não depressivo sem hábito tabagista (NDep-NTab); não depressivo com hábito tabagista (NDep-Tab); depressivo sem hábito tabagista (Dep-NTab); e depressivo com hábito tabagista (Dep-Tab).

Todos os testes utilizaram intervalo de confiança de 95% e foi considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os *Software* IBM SPSS *Statistics*®, versão 20 e STATA/MP®, versão 14.1.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

A amostra foi constituída por 382 indivíduos, sendo a maioria do gênero feminino (81,2%), residentes da área urbana (64,7%) e com idade mediana de 42,5 anos, conforme apresentado nas Tabelas 3 e 4. As demais características do perfil socioeconômico estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil socioeconômico da amostra.

Variáveis	N	%
Gênero		
Masculino	72	18,8
Feminino	310	81,2
Localização da Residência		
Rural	133	34,8
Urbana	247	64,7
Não avaliado	2	0,5
Escolaridade		
≤ 9 anos de estudo	162	42,4
> 9 anos de estudo	212	55,5
Não avaliado	8	2,1
Situação conjugal		
Sem vínculo matrimonial	145	38,0
Com vínculo matrimonial	227	59,4
Não avaliado	10	2,6
Classificação de renda		
Baixa renda (< \$ 5,00/dia)	157	41,1
Não baixa renda (≥ \$ 5,00/dia)	223	58,4
Não avaliado	2	0,5
Total	382	100

Tabela 4. Variáveis numéricas de caracterização da amostra estudada.

Variáveis	N	Mediana (DP)	Min-Max
Idade	382	42,5 (10,98)	20 – 59
IMC	380	27,0 (5,81)	17 – 50

IMC: índice de massa corporal; DP: desvio padrão; Min: mínimo; Max: máximo.

Com relação ao estilo de vida, 45,3% dos indivíduos afirmaram praticar alguma atividade de lazer e 36,1% praticarem alguma atividade física. O consumo de álcool foi relatado por 32,2% dos indivíduos e o consumo de tabaco por apenas 7,3% da amostra (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização do estilo de vida da amostra.

Variáveis	N	%
Atividade de lazer		
Não	203	53,1
Sim	173	45,3
Não avaliado	6	1,6
Atividade física		
Não	237	62,0
Sim	138	36,1
Não avaliado	7	1,9
Consumo de álcool		
Não	257	67,3
Sim	123	32,2
Não avaliado	2	0,5
Hábito tabagista		
Não	353	92,4
Sim	28	7,3
Não avaliado	1	0,3
Total	382	100

A prevalência da depressão na amostra estudada foi de 20,2% e o uso de algum antidepressivo foi relatado por 9,7% dos indivíduos (Tabela 6).

Tabela 6. Caracterização das variáveis relacionadas a depressão e uso autorreferido de medicamentos antidepressivos.

Variáveis	N	%
Depressão autorreferida		
Não	319	83,5
Sim	62	16,2
Não avaliado	1	0,3
Depressão (BDI-II ≥ 18)		
Não	272	71,2
Sim	77	20,2
Não avaliado	33	8,6
Uso de antidepressivo		
Não	266	69,6
Sim	37	9,7
Não avaliado	79	20,7
Total	382	100

BDI-II: inventário de depressão de Beck II.

Para análises de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, contendo 7 sítios CpGs, foi realizado pirosequenciamento pós conversão por bissulfito em amostras de DNA de 302 pacientes (Tabela 7).

Tabela 7. Caracterização do perfil de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* da amostra.

Sítio CpG	N	Mediana (DP)	Min-Max
CpG 1	302	4,24 (1,90)	0,00 – 12,27
CpG 2	302	2,33 (3,20)	0,00 – 13,22
CpG 3	302	4,86 (5,76)	0,00 – 23,13
CpG 4	302	3,94 (5,32)	0,00 – 25,95
CpG 5	302	6,26 (8,02)	0,00 – 32,11
CpG 6	302	0,00 (1,93)	0,00 – 16,87
CpG 7	302	4,27 (6,02)	0,00 – 38,28
Média CpG 1-7	302	4,05 (4,14)	0,00 – 16,93

CpG: citosina-fosfato-guanina; DP: desvio padrão; Min: mínimo; Max: máximo.

5.2 FATORES DETERMINANTES PARA DEPRESSÃO

De acordo com o teste univariado de regressão de Poisson com variância robusta, os seguintes fatores foram associados positivamente ($p < 0,20$) com a

depressão: gênero, situação conjugal, atividade de lazer, hábito tabagista e a metilação das CpGs 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* (Tabela 8).

Tabela 8. Análise univariada de regressão de Poisson com variância robusta.

Variável dependente: Depressão Fatores independentes	Regressão de Poisson Univariada	
	IRR (IC 95%)	Valor p
Gênero	3,48 (1,46 – 8,30)	0,005 **
Idade	1,00 (0,98 – 1,02)	0,828
Localização da residência	1,26 (0,81 – 1,97)	0,300
Escolaridade	0,68 (0,46 – 1,01)	0,057 *
Situação conjugal	0,60 (0,41 – 0,89)	0,012 **
Classificação de renda	0,75 (0,50 – 1,11)	0,151 *
Atividade lazer	0,53 (0,34 – 0,81)	0,004 **
Atividade física	0,78 (0,45 – 1,33)	0,359
Consome álcool	0,87 (0,56 – 1,34)	0,531
Hábito tabagista	2,41 (1,54 – 3,78)	<0,000 **
IMC	1,02 (0,99 – 1,06)	0,208
Metilação <i>BDNF</i> CpG 1	1,12 (1,02 – 1,23)	0,021 **
Metilação <i>BDNF</i> CpG 2	1,10 (1,05 – 1,17)	<0,000 **
Metilação <i>BDNF</i> CpG 3	1,04 (1,00 – 1,07)	0,013 **
Metilação <i>BDNF</i> CpG 4	1,04 (1,01 – 1,08)	0,014 **
Metilação <i>BDNF</i> CpG 5	1,04 (1,01 – 1,06)	0,002 **
Metilação <i>BDNF</i> CpG 6	1,02 (0,92 – 1,12)	0,756
Metilação <i>BDNF</i> CpG 7	1,04 (1,01 – 1,07)	0,012 **

IMC: índice de massa corporal; *BDNF*: Fator neurotrófico derivado do cérebro; CpG: citosina-fosfato-guanina; IIR: valor de prevalência; IC: intervalo de confiança; valor p para regressão univariada de Poisson com variância robusta, com significância de 5% e depressão (BDI-II ≥ 18) como variável dependente, * p <0,20, ** p <0,05.

A regressão multivariada de Poisson com variância robusta foi realizada usando variáveis preditivas considerando p<0,20, e após ajuste pelo teste de Hosmer & Lemeshow, a maior prevalência de depressão na amostra foi explicada em 13% pelo gênero, situação conjugal, atividade de lazer, hábito tabagista e a metilação da CpG 2 da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* (Tabela 9).

Tabela 9. Análise multivariada de regressão de Poisson com variância robusta, método *backward*, após ajuste pelo teste de Hosmer & Lemeshow.

Variável dependente: Depressão	Regressão de Poisson Multivariada	
Fatores independentes	IRR (IC 95%)	Valor p
Gênero	5,10 (1,76 – 14,98)	0,003
Situação conjugal	0,64 (0,44 – 0,92)	0,018
Atividade de lazer	0,53 (0,33 – 0,84)	0,007
Hábito tabagista	3,29 (1,90 – 5,69)	<0,000
Metilação <i>BDNF</i> CpG 2	1,14 (1,08 – 1,19)	<0,000

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro; CpG: citosina-fosfato-guanina; IIR: valor de prevalência; IC: intervalo de confiança; Valor p <0,05 para regressão multivariada de Poisson com variância robusta, com significância de 5% e depressão (BDI-II ≥ 18) como variável dependente.

Observa-se que a prevalência de depressão na amostra é 5,10 vezes maior entre aqueles que pertencem ao gênero feminino e 3,29 vezes maior entre os que possuem hábito tabagista. Além disso, a cada 1% de aumento na metilação da CpG 2 da região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, aumenta em 1,14 vezes a prevalência de depressão.

Destaca-se que ter vínculo matrimonial diminui em 36% a prevalência de depressão e o hábito de praticar alguma atividade de lazer diminui em 47%, sendo, portanto, considerados fatores de proteção.

5.3 METILAÇÃO DO *BDNF* E DEPRESSÃO

Considerando o resultado da análise multivariada, o qual inclui a metilação da CpG 6 da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* nos fatores que explicam a prevalência de depressão, foi realizado teste de Mann-Whitney entre os indivíduos não depressivos e depressivos, a fim de comparar a metilação dos sítios CpG estudados, bem como da média das CpG 1-7.

O teste de Mann-Whitney mostrou que os participantes depressivos apresentam níveis significativamente mais altos de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* na CpG 2 ($p=0,001$), CpG 3 ($p=0,030$), CpG 4 ($p=0,022$), CpG 5 ($p=0,018$), CpG 7 ($p=0,028$) e na média das CpG 1-7 ($p=0,036$) em

comparação com o respectivo grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas para CpG 1 ($p=0,059$) e CpG 6 ($p=0,713$) (Figura 2).

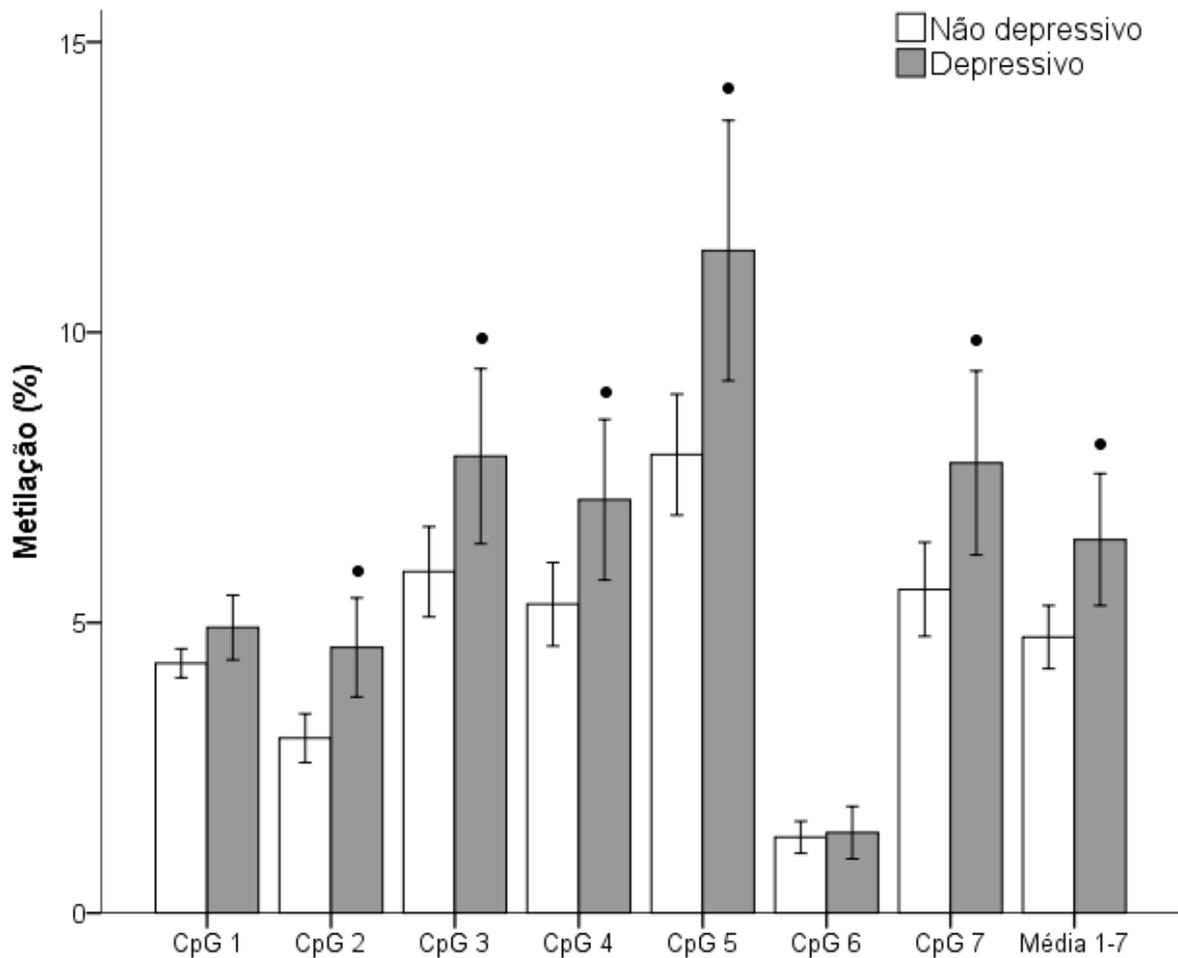


Figura 2. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney • $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle (não depressivo).

5.4 METILAÇÃO DO *BDNF* E ANTIDEPRESSIVOS

Para verificar se o uso de AD afeta os níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, os indivíduos foram distribuídos conforme o uso de medicação antidepressiva em: não uso de AD e uso de AD. Foi realizado teste de Mann-Whitney entre os grupos para comparar a metilação dos sítios CpG estudados, bem como da média das CpG 1-7.

O teste de Mann-Whitney mostrou que não há diferenças significativas na metilação das CpGs estudadas entre os dois grupos CpG 1 ($p=0,336$), CpG 2 ($p=0,856$), CpG 3 ($p=0,844$), CpG 4 ($p=0,978$), CpG 5 ($p=0,770$), CpG 6 ($p=0,393$), CpG 7 ($p=0,250$) e na média das CpG 1-7 ($p=0,663$) (Figura 3).

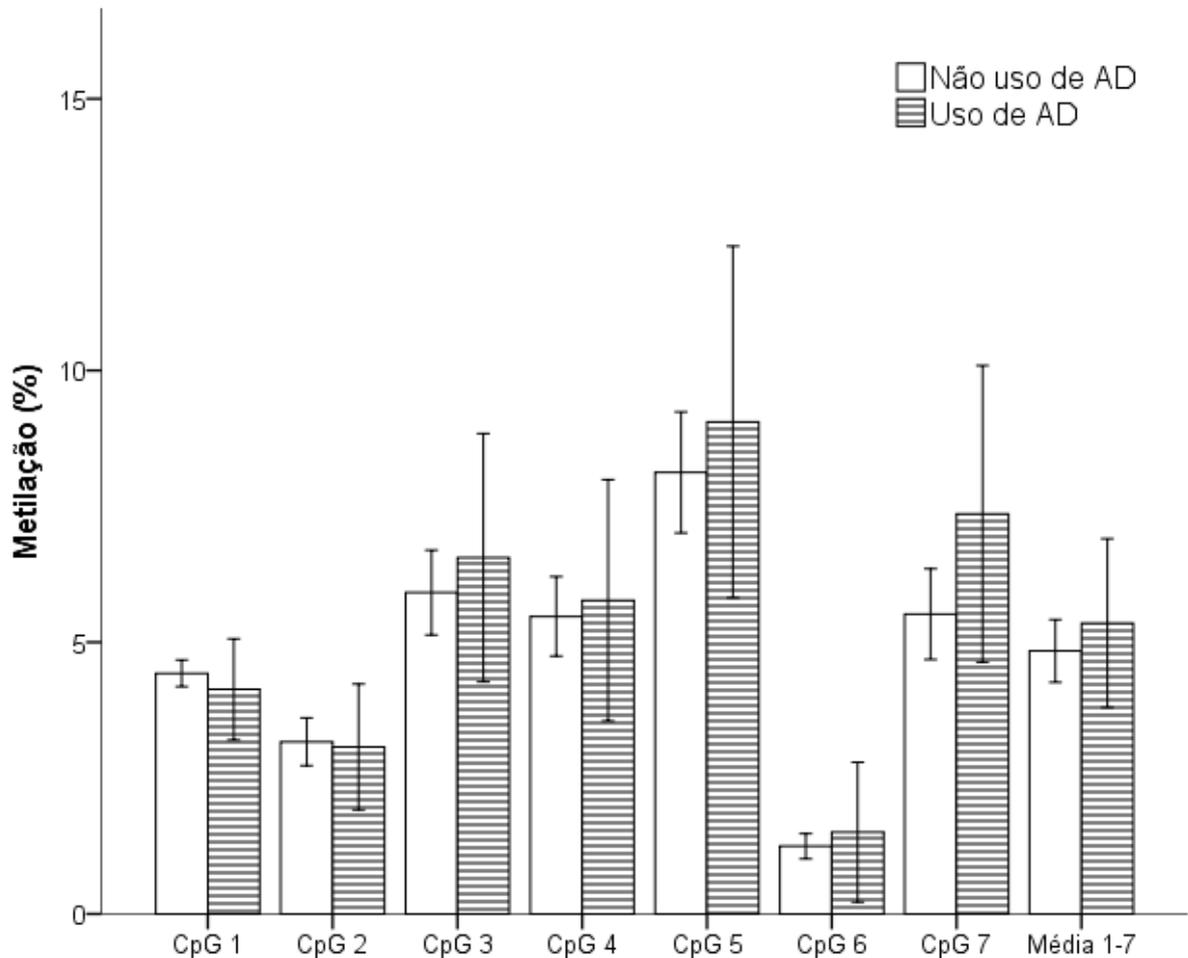


Figura 3. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. AD: antidepressivo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney.

Para verificar se o uso de AD afeta os níveis de metilação entre indivíduos depressivos, os mesmos foram subdivididos entre os que fazem uso de algum AD e os que não fazem. O teste de Mann-Whitney mostrou que não há diferenças significativas na metilação das CpGs estudadas entre os dois grupos CpG 1 ($p=0,857$), CpG 2 ($p=0,760$), CpG 3 ($p=0,641$), CpG 4 ($p=0,390$), CpG 5 ($p=0,409$), CpG 6 ($p=0,181$), CpG 7 ($p=0,405$) e na média das CpG 1-7 ($p=0,470$) (Figura 4).

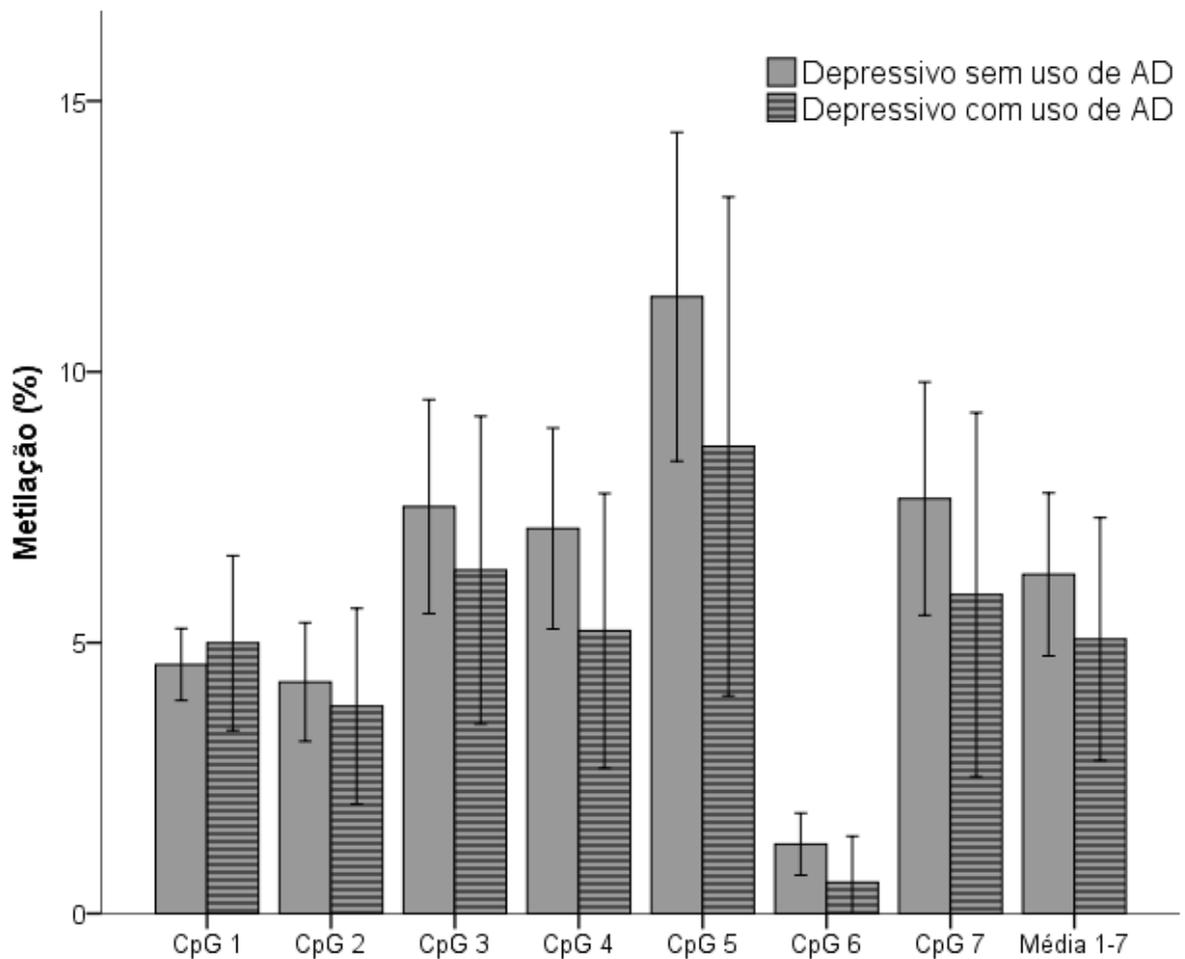


Figura 4. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. AD: antidepressivo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney.

5.5 METILAÇÃO DO *BDNF* E HÁBITO TABAGISTA

Tendo em vista o hábito tabagista presente na amostra estudada, os indivíduos foram distribuídos entre os que possuem hábito tabagista e os que não possuem, a fim de comparar os níveis de metilação dos sítios CpG estudados, bem como da média das CpG 1-7.

O teste de Mann-Whitney mostrou que participantes sem hábito tabagista apresentam níveis significativamente mais altos de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* na CpG 1 ($p < 0,000$), CpG 2 ($p = 0,001$), CpG 3 ($p = 0,005$), CpG 4 ($p = 0,005$), CpG 5 ($p < 0,000$), CpG 7 ($p < 0,000$) e na média das CpG 1-7

($p < 0,000$) quando comparados a indivíduos com hábito tabagista. Não foram observadas diferenças significativas para CpG 6 ($p = 0,208$) (Figura 5).

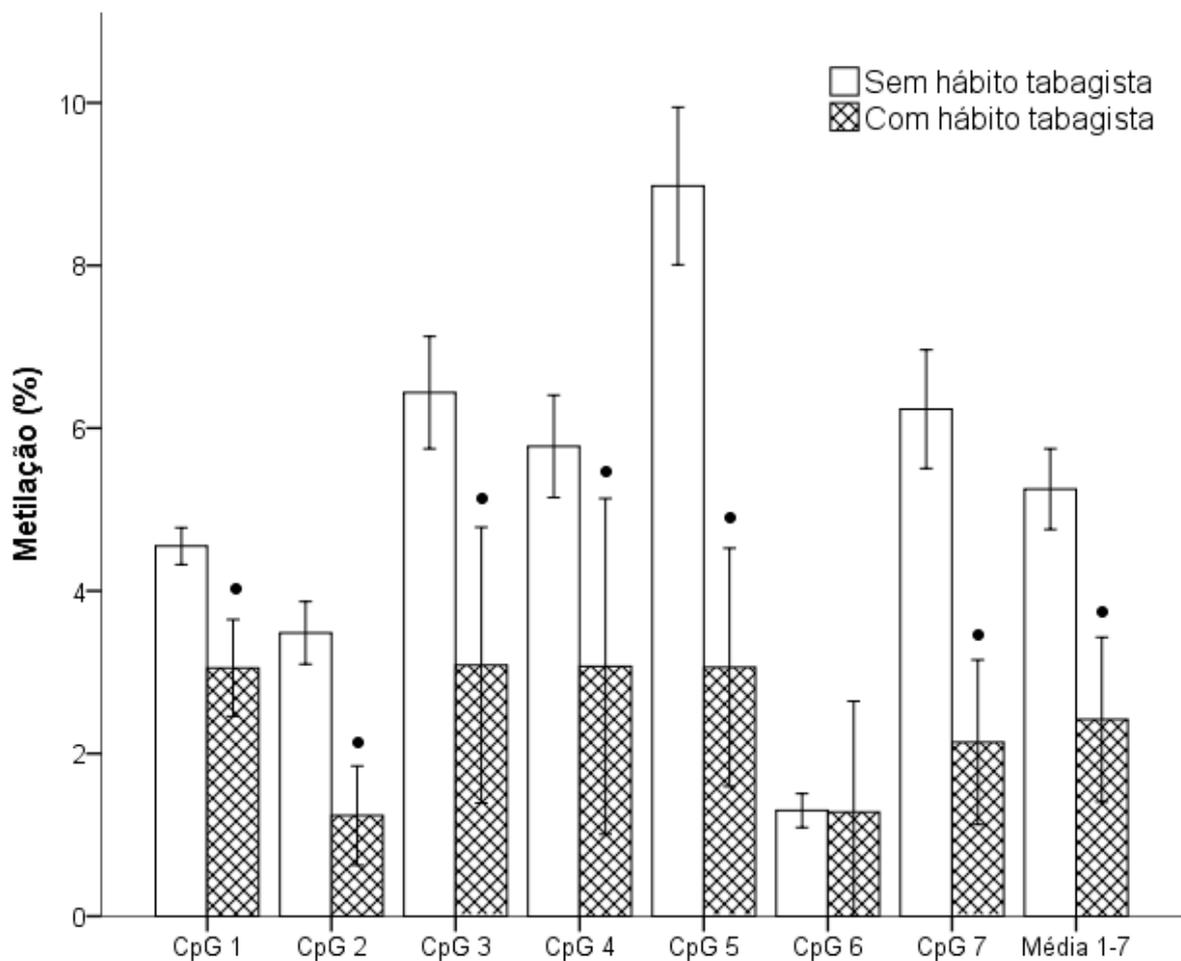


Figura 5. Porcentagem de metilação da região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, bem como média das CpGs 1-7. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney • $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle (sem hábito tabagista).

5.6 ANÁLISE MULTIVARIADA DA METILAÇÃO DO *BDNF*

Para verificar o efeito da depressão e do tabagismo na metilação das CpGs da região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, garantindo que potenciais fatores de confusão não alterassem a relação, um modelo multivariado foi realizado, incluindo apenas os pacientes que apresentaram níveis de metilação > 0 .

Os seguintes fatores foram incorporados ao modelo: gênero, localização, consumo de álcool e idade (BUS *et al.*, 2011, 2012), bem como o uso de AD. Para

tanto, realizou-se um GLzM para cada sítio CpG estudado, bem como para média das CpG 1-7 (Tabela 10).

Tabela 10. Modelo linear generalizado para a relação entre metilação das CpGs da região promotora do éxon IV do *BDNF* e depressão e hábito tabagista, ajustado para gênero, localização, consumo de álcool, uso de antidepressivo e idade.

Sítio CpG	Depressão				Hábito tabagista			
	β	Erro padrão	95% IC	Valor p	β	Erro padrão	95 % IC	Valor p
1	0,118	0,060	1,06 – 1,56	0,049*	-0,409	0,085	-0,58 – -0,24	<0,000*
2	0,138	0,120	-0,10 – 0,37	0,250	-0,921	0,211	-1,34 – -0,51	<0,000*
3	0,070	0,132	-0,19 – 0,33	0,597	-0,794	0,200	-1,19 – -0,40	<0,000*
4	0,051	0,127	-0,20 – 0,30	0,685	-0,514	0,209	-0,92 – -0,10	0,014*
5	0,347	0,134	0,09 – 0,61	0,010*	-1,102	0,205	-1,50 – -0,70	<0,000*
6	0,047	0,124	-0,20 – 0,29	0,705	0,259	0,225	-0,18 – 0,70	0,250
7	0,277	0,132	0,02 – 0,54	0,036*	-0,874	0,214	-1,29 – -0,46	<0,000*
Média 1-7	0,150	0,133	-0,11 – 0,41	0,260	-0,971	0,187	-1,34 – -0,61	<0,000*

IC: intervalo de confiança; * p <0,05.

Após ajuste com potenciais variáveis de confusão, as CpGs 1 ($\beta = 0,118$ e $p = 0,049$), 5 ($\beta = 0,347$ e $p = 0,010$) e 7 ($\beta = 0,277$ e $p = 0,036$) foram significativamente associadas à depressão. Estes resultados indicam que a chance de ocorrer maiores níveis de metilação em indivíduos depressivos, quando comparados a indivíduos sem depressão, é 0,118 vezes maior na CpG 1, 0,347 vezes maior na CpG 5 e 0,277 vezes maior na CpG 7.

Com relação ao hábito tabagista, as CpGs 1 ($\beta = -0,409$ e $p < 0,000$), 2 ($\beta = -0,921$ e $p < 0,000$), 3 ($\beta = -0,794$ e $p < 0,000$), 4 ($\beta = -0,514$ e $p = 0,014$), 5 ($\beta = -1,102$ e $p < 0,000$) e 7 ($\beta = -0,874$ e $p < 0,000$), bem como a média das CpGs 1-7 ($\beta = -0,971$ e $p < 0,000$) permaneceram significativamente associadas ao hábito tabagista.

Esses resultados demonstram que possuir hábito tabagista reduz as chances de maiores níveis de metilação na CpG 1 em 0,409 vezes, na CpG 2 em 0,921 vezes, na CpG 3 em 0,794 vezes, na CpG 4 em 0,514 vezes, na CpG 5 em 1,102 vezes, na CpG 7 em 0,874 vezes e na média das CpGs 1-7 em 0,971 vezes, em relação a indivíduos que não possuem hábito tabagista.

5.7 DEPRESSÃO E HÁBITO TABAGISTA NA METILAÇÃO DO *BDNF*

Considerando a relação entre o hábito tabagista e a prevalência de depressão na amostra estudada, conforme apresentado na regressão de Poisson, os indivíduos foram distribuídos entre os grupos: NDep-NTab; NDep-Tab; Dep-NTab; e Dep-Tab.

De acordo com o Teste de Kruskal-Wallis, os grupos apresentaram diferenças nos níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* na CpG 1 ($p < 0,000$), CpG 2 ($p < 0,000$), CpG 3 ($p < 0,000$), CpG 4 ($p < 0,000$), CpG 5 ($p < 0,000$), CpG 7 ($p < 0,000$) e na média das CpG 1-7 ($p < 0,000$). Não foram observadas diferenças significativas para CpG 6 ($p = 0,195$).

As comparações múltiplas foram realizadas por meio do teste *post-hoc* de Dunn, o qual mostrou que apenas os grupos NDep-NTab x NDep-Tab e NDep-Tab x Dep-Tab não apresentaram diferenças significativas em nenhuma CpG estudada. As análises de comparações múltiplas são apresentadas na Tabela 11 e Figura 6.

Tabela 11. Teste de comparações múltiplas de Dunn.

Grupos	Sítios CpG						
	1	2	3	4	5	7	Média 1-7
NDep-NTab x NDep-Tab	0,125	0,816	1,000	1,000	0,254	0,597	1,000
NDep-NTab x Dep-NTab	0,011*	<0,000*	0,003*	0,001*	0,002*	0,003*	0,002*
NDep-NTab x Dep-Tab	0,012*	0,043*	0,041*	0,016*	0,016*	0,020*	0,004*
NDep-Tab x Dep-NTab	0,001*	0,001*	0,066	0,110	0,001*	0,007*	0,017*
NDep-Tab x Dep-Tab	1,000	1,000	1,000	0,391	1,000	1,000	0,621
Dep-NTab x Dep-Tab	<0,000*	<0,000*	<0,000*	<0,000*	<0,000*	<0,000*	<0,000*

* $p < 0,05$. NDep-NTab: não depressivo sem hábito tabagista; NDep-Tab: não depressivo com hábito tabagista; Dep-NTab: depressivo sem hábito tabagista; e Dep-Tab: depressivo com hábito tabagista.

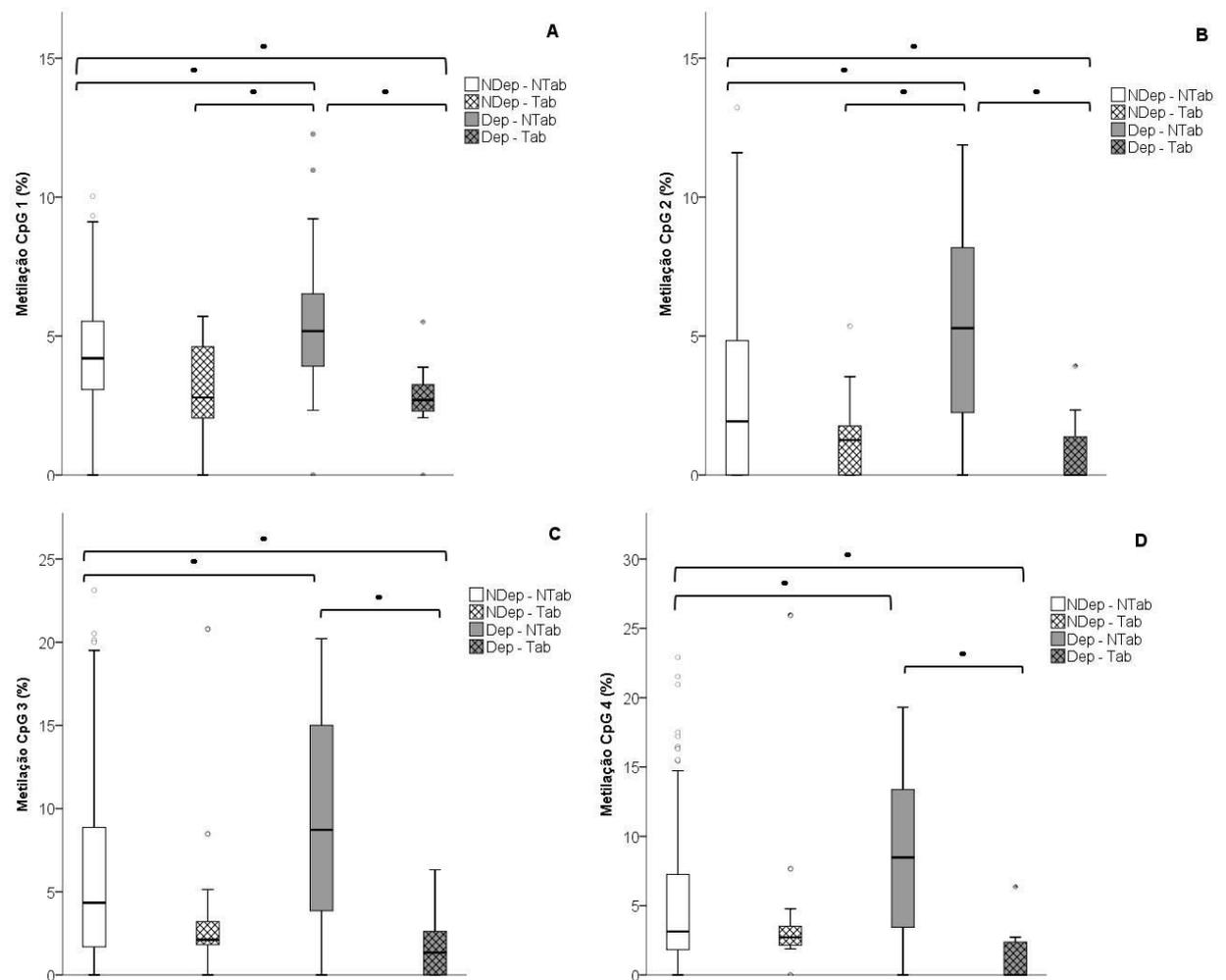


Figura 6. Comparações múltiplas dos níveis de metilação (%) na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, de acordo com os grupos: NDep - NTab: não depressivo sem hábito tabagista; NDep - Tab: não depressivo com hábito tabagista; Dep - NTab: depressivo sem hábito tabagista; e Dep - Tab: depressivo com hábito tabagista. Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn após ajuste por correção de Bonferroni. A) Níveis de metilação na CpG 1 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; B) Níveis de metilação na CpG 2 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; C) Níveis de metilação na CpG 3 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab e Dep-NTab x Dep-Tab; D) Níveis de metilação na CpG 4 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos 1 x 3, 1 x 4 e 3 x 4; E) Níveis de metilação na CpG 5 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; F) Níveis de metilação na CpG 6 (%). Não houve diferença significativa entre os grupos; G) Níveis de metilação na CpG 7 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; H) Níveis de metilação na média das CpGs 1-7 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab.

(Continua)

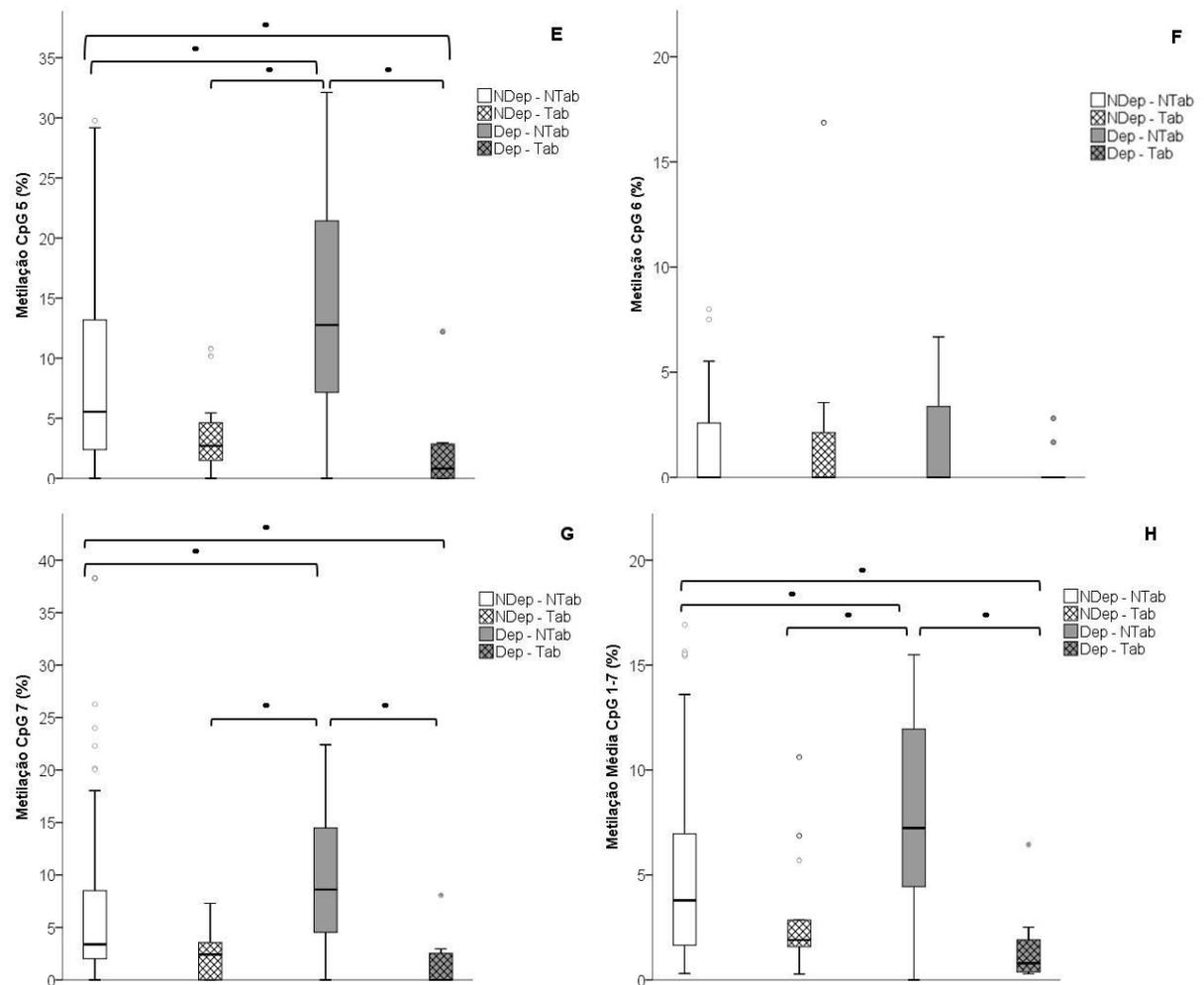


Figura 6. Comparações múltiplas dos níveis de metilação (%) na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em cada CpG estudada, de acordo com os grupos: NDep - NTab: não depressivo sem hábito tabagista; NDep - Tab: não depressivo com hábito tabagista; Dep - NTab: depressivo sem hábito tabagista; e Dep - Tab: depressivo com hábito tabagista. Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn após ajuste por correção de Bonferroni. A) Níveis de metilação na CpG 1 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; B) Níveis de metilação na CpG 2 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; C) Níveis de metilação na CpG 3 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab e Dep-NTab x Dep-Tab; D) Níveis de metilação na CpG 4 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos 1 x 3, 1 x 4 e 3 x 4; E) Níveis de metilação na CpG 5 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; F) Níveis de metilação na CpG 6 (%). Não houve diferença significativa entre os grupos; G) Níveis de metilação na CpG 7 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab; H) Níveis de metilação na média das CpGs 1-7 (%). • $p < 0,05$ entre os grupos NDep-NTab x Dep-NTab, NDep-NTab x Dep-Tab, NDep-Tab x Dep-NTab e Dep-NTab x Dep-Tab.

(Continuação)

De acordo com a Figura 6, observa-se que pacientes NDep-NTab apresentaram maiores níveis de metilação quando comparados aos pacientes Dep-Tab nas CpGs 1, 2, 3, 4, 5 e 7, bem como na média das CpGs 1-7. Em

contrapartida, comparando pacientes NDep-NTab e Dep-NTab, pacientes Dep-NTab apresentaram maiores níveis de metilação nas CpGs 1, 2, 3, 4, 5 e 7, bem como na média das CpGs 1-7.

Ainda de acordo com a Figura 6, entre os pacientes NDep-Tab e Dep-NTab, ser Dep-NTab mostrou maiores níveis de metilação nas CpGs 1, 2, 5 e 7, bem como na média das CpGs 1-7. Além disso, entre Dep-NTab e Dep-Tab, os pacientes Dep-NTab apresentaram maiores níveis de metilação nas CpGs 1, 2, 3, 4, 5 e 7, bem como na média das CpGs 1-7.

Adicionalmente, a Figura 6 aponta que entre os pacientes não depressivos, ter ou não hábito tabagista não influencia significativamente os níveis de metilação em nenhuma CpG estudada entre estes pacientes. Além disso, comparando pacientes depressivos e não depressivos, ter hábito tabagista não influencia significativamente os níveis de metilação em nenhuma CpG estudada.

6 DISCUSSÃO

6.1 FATORES DETERMINANTES PARA DEPRESSÃO

A depressão é uma doença complexa e heterogênea que envolve diversos fatores de risco genéticos e ambientais. Desta forma, hipotetizamos que fatores socioeconômicos e de estilo de vida, assim como alterações epigenéticas podem estar associados à depressão. Para tanto, foi realizada análise multivariada de regressão de Poisson e a depressão na amostra estudada foi explicada em 13% pelos seguintes fatores: gênero feminino, não ter vínculo matrimonial, falta de atividade de lazer, hábito tabagista e metilação da CpG 2 do gene *BDNF*.

Embora o BDI-II não seja um instrumento indicado para diagnóstico de depressão, é possível estimar com precisão a depressão clínica na comunidade e populações de pacientes de cuidados primários utilizando o ponto de corte 18 para o BDI-II, o qual apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 92% (ARNAU *et al.*, 2001; HAMID *et al.*, 2004; WANG; GORENSTEIN, 2013).

De acordo com o BDI-II, a prevalência de depressão neste estudo foi de 20,1% (Tabela 6), mostrando-se superior à prevalência de transtornos depressivos no Brasil (5,8%) (WHO, 2017). Tal preeminência pode estar relacionada ao fato de 80,9% da amostra ter sido constituída pelo gênero feminino (Tabela 3), uma vez que sabe-se que a depressão é mais comum entre mulheres (JAMES *et al.*, 2018; WHO, 2017). De fato, o fator gênero feminino foi um dos fatores determinantes para depressão na nossa amostra, aumentando em 5,10 vezes a prevalência de depressão (Tabela 9).

Os resultados também mostraram que ter vínculo matrimonial é considerado um fator protetor para a depressão, o qual diminuiu a prevalência de depressão em 36% na nossa amostra. Essa relação já é bem descrita na literatura e corrobora com outros estudos, os quais verificaram que a prevalência de depressão em indivíduos casados é menor comparada a grupos solteiros, divorciados ou viúvos (INABA *et al.*, 2005; LAPIERRE, 2009; MILANOVIĆ *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2011). Geralmente, fatores econômicos, sociais e psicológicos, além de estabilidade relacional ou ausência de rompimentos e escolha por parceiros com menores problemas de

saúde mental podem explicar a relação entre ter vínculo matrimonial e melhor saúde mental (UECKER, 2012).

No mesmo sentido, o hábito de praticar alguma atividade de lazer diminui em 47% a prevalência de depressão, sendo também um fator de proteção. Esse resultado corrobora com outros estudos que verificaram associação entre menor prevalência de depressão ou melhora dos sintomas depressivos, bem como da qualidade de vida em indivíduos que realizam tal prática (BORÇOI *et al.*, 2020; JAMES *et al.*, 2018; JEONG; PARK, 2020; NAGATA; MCCORMICK; PIATT, 2019; TORRES *et al.*, 2013).

O lazer é um meio importante para lidar com o estresse. Atividades de lazer permitem aos indivíduos desviarem a atenção de emoções negativas e situações estressantes, contribuindo, dessa forma, na melhora do humor e da saúde mental dos indivíduos (IWASAKI; MANNELL, 2000; KLEIBER; HUTCHINSON; WILLIAMS, 2002). A melhora na qualidade de vida em virtude da participação em atividades de lazer pode ser devido à construção de relacionamentos sociais, habilidades e conhecimentos adicionais, bem como às emoções positivas vivenciadas (BRAJŠA-ŽGANEC; MERKAŠ; ŠVERKO, 2011).

Outro fator associado à depressão na amostra foi possuir hábito tabagista, o qual aumenta em 3,29 vezes a prevalência de depressão (Tabela 9). Corroborando com este resultado, outros estudos também evidenciaram essa associação entre depressão e hábito tabagista (BORÇOI *et al.*, 2020; LUGER; SULS; VANDER WEG, 2014; WEINBERGER *et al.*, 2016). Além disso, indivíduos depressivos apresentam maior prevalência de tabagismo, quando comparados à população geral (JIMÉNEZ-TREVIÑO *et al.*, 2019).

A relação entre tabagismo e depressão é bastante complexa, além de inconsistente. O hábito tabagista praticado por indivíduos depressivos pode estar relacionado ao alívio dos sintomas depressivos, na tentativa de manter o bom humor (RUBIN *et al.*, 2020), ou ainda provocando uma sensação de relaxamento devido ao mecanismo de recompensa da nicotina (CONTI *et al.*, 2020). Outros estudos sugerem que possuir o hábito tabagista é uma condição que aumenta o risco de desenvolvimento de depressão (BAKHSHAIE; ZVOLENSKY; GOODWIN, 2015;

WOOTTON *et al.*, 2020). Portanto, essas duas principais hipóteses vinculam o tabagismo à depressão, indicando efeito de consequência ou causa (FLUHARTY *et al.*, 2017).

Adicionalmente, a metilação da CpG 2 do gene *BDNF* também foi associada à depressão na amostra. Os resultados indicam que a cada 1% de metilação nessa CpG aumenta em 1,14 vezes a prevalência de depressão (Tabela 9).

Evidências indicam que a metilação do *BDNF* está relacionada com a depressão, desempenhando um importante papel no desenvolvimento da doença, bem como no possível tratamento (CHEN *et al.*, 2017). No entanto, ainda não está claro se a metilação do *BDNF* relaciona-se com a depressão como causa ou consequência, ou ainda uma combinação de ambos (JANUAR *et al.*, 2015). Dessa forma, explorar essa associação é de grande relevância para a compreensão da depressão.

6.2 METILAÇÃO DO *BDNF*, DEPRESSÃO E HÁBITO TABAGISTA

Embora a literatura tenha investigado o papel do gene *BDNF* na depressão e apoiado a hipótese neurotrófica da depressão, ainda existem lacunas na explicação da fisiopatologia da doença. Alguns estudos demonstram que a metilação de promotores do *BDNF* pode estar associada à depressão. No entanto, a pergunta de quais fatores ambientais influenciam seus níveis continua sem resposta.

Tendo em vista que indivíduos depressivos possuem frequentemente hábito tabagista e a relação entre depressão e hábito tabagista nos níveis de metilação do gene *BDNF* ainda não foi investigada, o presente trabalho possui como segunda hipótese que os níveis de metilação em indivíduos depressivos são influenciados pelo hábito tabagista. Para tanto, foi realizado pirosequenciamento da região promotora do gene *BDNF* de 302 pacientes e foram identificadas alterações nos níveis de metilação nessa região do gene, em indivíduos depressivos com hábito tabagista.

6.2.1 Metilação do *BDNF* e depressão

Ao analisar os níveis de metilação do *BDNF* entre indivíduos depressivos e não depressivos, observamos que os indivíduos depressivos apresentam níveis significativamente mais altos de metilação nas CpG 2, 3, 4, 5, 7 e na média das CpG 1-7 (Figura 2). Após ajuste incluindo variáveis de confusão, a metilação das CpGs 1, 5 e 7 foram associadas a depressão, indicando que nessas CpGs a chance de ocorrer maiores níveis de metilação é aumentada em indivíduos com depressão (Tabela 10).

Diversos estudos investigaram o papel da metilação do *BDNF* em transtornos psiquiátricos, concentrando-se principalmente nos promotores I e IV do gene (HING *et al.*, 2012; IKEGAME *et al.*, 2013). Fuchikami e colaboradores (2011) comparando níveis de metilação em pacientes depressivos e saudáveis não observaram diferenças significativas na metilação do promotor IV do gene *BDNF*. No entanto, vale ressaltar que esses autores investigaram uma sequência posterior a sequência investigada no presente estudo.

Em contrapartida, corroborando com nossos resultados, apesar de também não ter sido a mesma sequência estudada, Januar e colaboradores (2015) comparando amostras de DNA bucal de pacientes idosos deprimidos e controles saudáveis, identificaram níveis mais elevados de metilação do *BDNF* em CpGs do promotor I e IV nos indivíduos deprimidos.

Da mesma forma, Keller e colaboradores (2010) analisando amostras de tecido cerebral pós-morte de indivíduos suicidas e controles não suicidas observaram maiores níveis de metilação na região promotora do éxon IV do *BDNF* nos indivíduos suicidas. Além disso, os autores sugerem que níveis aumentados de metilação nessa região do gene podem regular negativamente a sua expressão, uma vez que nesses pacientes foram encontrados níveis mais baixos do transcrito IV do *BDNF*.

De forma semelhante, foi demonstrado que a região promotora do éxon I do *BDNF* frequentemente encontra-se com maiores níveis de metilação em pacientes depressivos, comparado a pacientes sem depressão (CARLBERG *et al.*, 2014; D'ADDARIO *et al.*, 2013; FUCHIKAMI *et al.*, 2011).

A metilação do DNA exhibe padrões dinâmicos e sua função depende da sequência genômica onde a 5-mC está presente. Estudos se concentraram principalmente em sequências promotoras CpGi, em que a metilação foi relacionada com o silenciamento gênico, contribuindo para impedir a transcrição (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019; JONES, 2012).

A região estudada compreende uma das regiões promotoras não CpGi do gene *BDNF*, compreendendo 7 sítios CpG. De forma semelhante, outros estudos envolvendo regiões promotoras não CpGi de genes distintos sugerem que promotores não CpGi também possuem importante função no silenciamento gênico (HAN *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2018). Outros estudos sugerem que a metilação de CpGs do éxon IV do gene *BDNF* pode interagir seletivamente com outras moléculas repressoras, formando um complexo que remodela a cromatina para um estado inativo, reprimindo a expressão do gene (BOULLE *et al.*, 2012; MARTINOWICH *et al.*, 2003).

Além disso, a CpG 2 está localizada no sítio de ligação do fator de transcrição CREB e a CpG 1 está extremamente próxima (BRAITHWAITE *et al.*, 2015), portanto, quando metiladas, podem prejudicar a ligação de CREB, a qual já foi sugerida ser impedida nessa situação, contribuindo também para o silenciamento gênico (IGUCHI-ARIGA; SCHAFFNER, 1989).

Dessa forma, a metilação de CpGs do gene *BDNF* na região estudada poderia influenciar a sua expressão e afetar níveis de proteína BDNF, frequentemente reduzindo a sua concentração. Por consequência, estruturas cerebrais e suas funções podem ser prejudicadas, devido à redução no nível de expressão de BDNF (HING *et al.*, 2012).

A redução na atividade de *BDNF* no hipocampo pode estar diretamente relacionada à fisiopatologia da depressão e estudos nesse sentido vêm sendo realizados (HACIMUSALAR; EŞEL, 2018), incluindo estudos de neuroimagem, em que foi demonstrado menor volume hipocampal em pacientes deprimidos (BARCH *et al.*, 2019; BREMNER *et al.*, 2000; COBB *et al.*, 2013; MALYKHIN *et al.*, 2010; RODDY *et al.*, 2019; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006).

Devido à dificuldade de estudar os níveis de BDNF diretamente no cérebro, pesquisas têm avaliado o BDNF periférico, o qual pode ser um potencial biomarcador para a depressão (FUCHIKAMI *et al.*, 2011; SEN; DUMAN; SANACORA, 2008). Dessa forma, estudos demonstraram menores níveis séricos de proteína BDNF em pacientes deprimidos (BOCCHIO-CHIAVETTO *et al.*, 2010; BUS *et al.*, 2015; KAREGE *et al.*, 2002; MOLENDIJK *et al.*, 2011; POLYAKOVA *et al.*, 2015; SEN; DUMAN; SANACORA, 2008).

Molendijk e colaboradores (2011) acreditam que níveis mais baixos de BDNF são uma consequência dos sintomas depressivos. Porém, ainda não é bem compreendido o mecanismo que acarreta essa situação. Por outro lado, Bus e colaboradores (2015) sugerem que o estresse crônico diminui níveis de BDNF e consequentemente torna o cérebro suscetível à depressão.

De fato, a exposição a eventos estressantes ao longo da vida é um fator proposto para fundamentar os baixos níveis de BDNF na depressão e estudos nesse sentido embasaram a hipótese neurotrófica da depressão. Conforme evidenciado em alguns estudos, o estresse ocasiona menor disponibilidade de BDNF, comprometendo a sobrevivência e funções neuronais (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997; DUMAN; MONTEGGIA, 2006; SMITH *et al.*, 1995) e apesar de a depressão ser heterogênea, o estresse se mostrou altamente relevante para a sua compreensão (NOTARAS; VAN DEN BUUSE, 2020). Alterações no epigenoma em virtude do estresse também são relatadas. Foi demonstrado em modelo animal que o estresse crônico aumentou níveis de metilação na região promotora do exon IV do gene *BDNF* (NIKNAZAR *et al.*, 2016).

Contudo, o gene *BDNF* apresenta uma estrutura complexa, possuindo nove promotores funcionais. Portanto, não sabemos até que ponto a metilação de um de seus promotores implicaria no prejuízo de sua expressão, bem como níveis proteicos. Diante disso, seria interessante que estudos futuros, ao compararem níveis de metilação em pacientes deprimidos e controles, avaliassem conjuntamente a expressão gênica (mRNA) e proteica de BDNF.

Apoiando ainda a hipótese neurotrófica da depressão, sugere-se que o uso de antidepressivos reverte os efeitos do estresse sobre os níveis de BDNF (DUMAN;

MONTEGGIA, 2006). De fato, alguns estudos mencionam a influência dos tratamentos antidepressivos no aumento dos níveis de proteína BDNF (CATTANEO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2001; MOLENDIJK *et al.*, 2014; SEN; DUMAN; SANACORA, 2008; SHIMIZU *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2017).

Para minimizar este possível viés, analisamos se há diferenças nos níveis de metilação do gene *BDNF* entre indivíduos que faziam uso de medicamentos antidepressivos na amostra. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de metilação do gene *BDNF* na região estudada entre estes indivíduos (Figura 3). Dentre os pacientes depressivos também não foram observadas diferenças nos níveis de metilação do gene *BDNF* entre os que fazem uso de antidepressivos e os que não fazem (Figura 4). De qualquer forma, mantivemos o uso de antidepressivos como fator de confusão na análise multivariada dos fatores determinantes da metilação do gene *BDNF*.

Nossos resultados corroboram os achados de Tadic e colaboradores (2014), que investigaram efeitos do tratamento antidepressivo com escitalopram, fluoxetina, sertralina, venlafaxina, duloxetina, mirtazapina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina e tranilcipromina na metilação da região promotora do éxon IV de 39 indivíduos depressivos. Os autores não evidenciaram mudanças na metilação durante os 42 dias de tratamento, sugerindo que essa região do gene não está envolvida na resposta ao tratamento antidepressivo.

6.2.2 Metilação do *BDNF* e hábito tabagista

Ao investigar os níveis de metilação do *BDNF* em indivíduos com e sem hábito tabagista, os resultados indicaram que os indivíduos com hábito tabagista apresentam níveis significativamente mais baixos de metilação nas CpG 1, 2, 3, 4, 5, 7 e na média das CpG 1-7 quando comparados a indivíduos sem hábito tabagista (Figura 5).

Após ajuste incluindo as variáveis de confusão, a metilação de todas as CpGs permaneceu significativamente associada ao hábito tabagista, indicando que possuir o hábito tabagista reduz as chances de maiores níveis de metilação nas CpGs 1, 2,

3, 4, 5 e 7, bem como na média das CpG 1-7 (Tabela 10). Este achado é de grande importância, uma vez que a literatura ainda carece de estudos que investiguem o papel do uso de tabaco na metilação do gene *BDNF*.

Até onde sabemos, os efeitos do hábito tabagista na metilação do *BDNF* ainda não foram investigados. Toledo-Rodriguez e colaboradores (2010) verificaram os efeitos pré-natais do uso materno de tabaco em adolescentes na metilação do promotor do éxon VI do *BDNF*. Os autores observaram uma associação entre o tabagismo materno e maiores níveis de metilação nessa região do gene nos filhos na adolescência. Dessa forma, sugerimos que o hábito tabagista possa ter efeitos sobre a metilação do DNA.

Similarmente Chase e Sharma (2013) sugerem atuação da nicotina como um modificador de cromatina. Seu experimento envolveu dois modelos de camundongos (*in vitro* e *in vivo*) e um modelo humano (*in vitro*), em que foi demonstrado que a nicotina reduziu o mRNA de Histona Metiltransferase (HMT), bem como os níveis de histona H3 lisina 9 dimetilação (H3K9me2), resultando no aumento dos níveis de mRNA de *BDNF*. Ainda não foram realizados estudos nesse sentido envolvendo outros mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA. Portanto, sugerimos que seria interessante estudos futuros investigarem os efeitos da nicotina no gene *BDNF* nessa perspectiva.

Estudos que verificaram níveis da proteína *BDNF* diante do tabagismo ou nicotina apresentam inconsistências. Mas, apesar de alguns estudos não encontrarem diferenças significativas entre os níveis de *BDNF* em fumantes e não fumantes (BHANG; CHOI; AHN, 2010; XIA *et al.*, 2019), a maioria dos estudos evidenciou aumento da expressão de *BDNF* com o hábito tabagista ou exposição crônica a nicotina (CZUBAK *et al.*, 2009; JAMAL *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2017; SON; WINZER-SERHAN, 2009).

Diante disso, embora nosso estudo não tenha medido níveis proteicos de *BDNF*, é possível que menores níveis de metilação em pacientes com hábito tabagista possam refletir maiores níveis de expressão da proteína *BDNF* nesses pacientes.

Apesar de ainda não estar claro, a literatura aponta alguns mecanismos que possivelmente podem estar influenciando o aumento de BDNF em virtude do hábito tabagista. Hipóxia induzida pelo hábito tabagista pode estar envolvida com o aumento da expressão de fatores de crescimento, incluindo BDNF (DALE; BEN MABROUK; MITCHELL, 2014; KUSHWAH *et al.*, 2016; WAKHLOO *et al.*, 2020). Ou ainda, o influxo de Ca²⁺ gerado pela ativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) pela ligação da nicotina poderia acarretar maior liberação de BDNF (MACHAALANI; CHEN, 2018), o qual já foi demonstrado ser um importante regulador da sua transcrição (ZHENG *et al.*, 2011). Contudo, não sabemos se esses possíveis mecanismos implicam na redução dos níveis de metilação do *BDNF*.

6.2.3 Relação entre depressão e hábito tabagista na metilação do *BDNF*

Tendo em vista o fato de que a depressão frequentemente está associada ao hábito tabagista e que os níveis de metilação do gene *BDNF* são diferentes entre indivíduos com e sem hábito tabagista, seria interessante ao avaliar o papel do gene *BDNF* na depressão, levar em consideração o uso de tabaco. Entretanto, a relação entre depressão e hábito tabagista nos níveis de metilação do gene *BDNF* ainda não foi investigada. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que encontrou a relação entre a metilação do gene *BDNF* e depressão influenciada pelo hábito tabagista.

Conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post-hoc* de Dunn, não houve diferença estatística entre os níveis de metilação do gene *BDNF* de pacientes não deprimidos que fumam ou não fumam. Entretanto, dentre os indivíduos com depressão, os que possuem hábito tabagista apresentaram menores níveis de metilação do *BDNF* em relação aos indivíduos que não utilizam tabaco.

Além disso, há diferenças na metilação do gene *BDNF* entre deprimidos e não deprimidos somente entre indivíduos que não fumam, com maiores níveis de metilação em indivíduos com depressão. Entre usuários de tabaco, indivíduos com depressão deixam de apresentar maiores níveis de metilação (Tabela 11 e Figura 6).

Dessa forma, verifica-se que, níveis de metilação mais baixos entre indivíduos usuários de tabaco só são observados entre pacientes com depressão. Essa diferença não é encontrada entre pacientes que não possuem depressão. De maneira semelhante, maiores níveis de metilação observados entre indivíduos com depressão deixam de existir entre usuários de tabaco.

Estes resultados corroboram com os resultados dos testes anteriores deste estudo, em que pacientes depressivos apresentaram maiores níveis de metilação do gene *BDNF* em relação a pacientes não depressivos. Da mesma forma, pacientes sem hábito tabagista apresentaram maiores níveis de metilação do gene *BDNF*, quando comparados a pacientes com hábito tabagista. Assim, nossos resultados sugerem que o hábito tabagista parece interferir na metilação do gene *BDNF* em pacientes depressivos, promovendo a redução dos níveis de metilação.

Estudos nesse sentido já foram realizados apenas envolvendo níveis periféricos da proteína BDNF. Colle e colaboradores (2016) investigaram alterações nos níveis de BDNF em pacientes depressivos fumantes e não fumantes. Os autores observaram que os usuários de tabaco tinham níveis de BDNF plasmáticos significativamente mais elevados, o que vai ao encontro dos nossos achados de menores níveis de metilação no gene *BDNF* entre depressivos fumantes em relação aos não fumantes. Até onde sabemos, não existem estudos que abordam alterações epigenéticas no gene *BDNF* em pacientes depressivos com hábito tabagista.

Assim como na depressão, resultados semelhantes foram encontrados em indivíduos com esquizofrenia em um estudo envolvendo níveis séricos de proteína BDNF entre indivíduos do gênero masculino fumantes e não fumantes. Zhang e colaboradores (2010) identificaram que os fumantes tinham maiores níveis de BDNF e menos sintomas da doença.

A principal limitação desses dois estudos é não possuírem um grupo controle saudável. Já no nosso estudo, o grupo controle saudável (sem depressão) não apresentou diferença significativa entre indivíduos com e sem hábito tabagista.

Como já citado anteriormente, a literatura indica que em relação à população geral, indivíduos depressivos apresentam maior prevalência de tabagismo (JIMÉNEZ-TREVIÑO *et al.*, 2019), bem como início mais precoce, maior quantidade

de cigarros consumida e tendência maior ao vício (FLUHARTY *et al.*, 2017). Neves e colaboradores (2017) propuseram que as alterações nos níveis de BDNF são dependentes da intensidade do consumo de cigarro. Outros estudos sugerem que a cronicidade do uso seja um preditor para níveis mais elevados de BDNF (JAMAL *et al.*, 2015; KENNY; FILE; RATTRAY, 2000). Apesar de nosso estudo não apresentar dados nesse sentido, uma hipótese poderia ser que o uso do tabaco mais pesado e/ou por mais tempo poderia resultar em efeitos mais intensos dos mecanismos que revertem a metilação do *BDNF* nos pacientes depressivos.

Além disso, considerando que o estresse crônico poderia reduzir níveis de BDNF, conforme citado anteriormente (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997; DUMAN; MONTEGGIA, 2006; SMITH *et al.*, 1995) e frequentemente está associado ao desenvolvimento da depressão (BORÇOI *et al.*, 2021), a ação do hábito tabagista no aumento de níveis de BDNF, ao contrário do efeito da exposição aguda (NAHA *et al.*, 2018), pode estar relacionada ao alívio do estresse e anedonia (BORÇOI *et al.*, 2020), o que poderia retroalimentar a depressão.

Portanto, é fundamental que estudos futuros comparando indivíduos com e sem depressão avaliem o hábito tabagista atual, bem como características quanto a quantidade de cigarros consumidas por dia e o tempo de tabagismo.

Outra hipótese para explicar este resultado seria que o tabaco possui um papel na depressão além do já descrito na literatura, envolvendo alterações específicas no epigenoma de indivíduos depressivos.

Nesse sentido, sugerimos que a ação do tabaco seria de remover marcas de metilação em locais CpG mais suscetíveis, como os que já foram modificados anteriormente pela ação da depressão. Dessa forma, o tabaco agiria em locais específicos metilados pela depressão, já em locais não modificados pela depressão, ele não seria capaz de remover. A literatura ainda carece de estudos nesse sentido e tal hipótese seria interessante ser avaliada em estudos futuros.

Os resultados aqui descritos proporcionam suporte para políticas de prevenção à depressão, ao evidenciarem fatores socioeconômicos, de estilo de vida e alterações epigenéticas relacionados à doença. Além disso, fornecem dados para

compreensão da fisiopatologia e diagnóstico moleculares da depressão, envolvendo o gene *BDNF*. Complementarmente, os resultados expõem a necessidade de se avaliar a influência do estilo de vida, em especial do hábito tabagista, em estudos sobre alterações epigenéticas na depressão.

7 CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho indicam que fatores como gênero feminino, não ter vínculo matrimonial, não praticar atividade de lazer, ter hábito tabagista e a metilação do gene *BDNF* estão associados à maior prevalência de depressão.

Além disso, indivíduos com depressão possuem maiores níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF*, assim como indivíduos que não possuem hábito tabagista.

Adicionalmente, nossos resultados apontam que o hábito tabagista reduz os níveis de metilação na região promotora do éxon IV do gene *BDNF* em indivíduos depressivos, mas não em indivíduos não depressivos.

REFERÊNCIAS

- ALEGRÍA-TORRES, J. A.; BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and lifestyle. **Epigenomics**, v. 3, n. 3, p. 267–277, 2011.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ANGELUCCI, F. *et al.* Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. **NeuroReport**, v. 11, n. 6, p. 1369–1373, 2000.
- ANGELUCCI, F. *et al.* Lithium treatment alters brain concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 225–231, 2003.
- ARNAU, R. C. *et al.* Psychometric evaluation of the Beck Depression Inventory-II with primary care medical patients. **Health Psychology**, v. 20, n. 2, p. 112–119, 2001.
- BAKHSHAIE, J.; ZVOLENSKY, M. J.; GOODWIN, R. D. Cigarette smoking and the onset and persistence of depression among adults in the United States: 1994–2005. **Comprehensive Psychiatry**, v. 60, p. 142–148, 2015.
- BARBOSA, M. M. **Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico**. In: MILACH, S. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre. p. 99-106, 1998.
- BARCH, D. M. *et al.* Hippocampal volume and depression among young children. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 288, n. 1, p. 21–28, 2019.
- BAŞTERZI, A. D. *et al.* Effects of fluoxetine and venlafaxine on serum brain derived neurotrophic factor levels in depressed patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 281–285, 2009.
- BECK, A. T. *et al.* An Inventory for Measuring Depression The difficulties inherent in obtaining. **Archives of General Psychiatry**, p. 561–571, 1961.
- BERLIM, M. T.; TURECKI, G. Definition, assessment, and staging of treatment-resistant refractory major depression: A review of current concepts and methods. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 52, n. 1, p. 46–54, 2007.
- BHANG, S. Y.; CHOI, S. W.; AHN, J. H. Changes in plasma brain-derived neurotrophic factor levels in smokers after smoking cessation. **Neuroscience Letters**, v. 468, n. 1, p. 7–11, 2010.
- BOCCHIO-CHIAVETTO, L. *et al.* Serum and plasma BDNF levels in major depression: A replication study and meta-analyses. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. 763–773, 2010.

- BORÇOI, A. R. *et al.* Risk factors for depression in adults: NR3C1 DNA methylation and lifestyle association. **Journal of Psychiatric Research**, v. 121, p. 24–30, 2020.
- BORÇOI, A. R. *et al.* Food and nutritional insecurity is associated with depressive symptoms mediated by NR3C1 gene promoter 1F methylation. **Stress**, p. 1–8, 2021.
- BOULLE, F. *et al.* Epigenetic regulation of the BDNF gene: Implications for psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 584–596, 2012.
- BRAITHWAITE, E. C. *et al.* Maternal prenatal depressive symptoms predict infant NR3C1 1F and BDNF IV DNA methylation. **Epigenetics**, v. 10, n. 5, p. 408–417, 2015.
- BRAJŠA-ŽGANEC, A.; MERKAŠ, M.; ŠVERKO, I. Quality of life and leisure activities: how do leisure activities contribute to subjective well-being? **Social Indicators Research**, v. 102, n. 1, p. 81–91, 2011.
- BRASIL. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BREMNER, J. D. *et al.* Hippocampal volume reduction in major depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 1, p. 115–117, 2000.
- BRUNONI, A. R. *et al.* BDNF plasma levels after antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation: Results from a factorial, randomized, sham-controlled trial. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 7, p. 1144–1151, 2014.
- BRUNONI, A. R. *et al.* BDNF blood levels after non-invasive brain stimulation interventions in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 16, n. 2, p. 114–122, 2015.
- BRUNONI, A. R.; LOPES, M.; FREGNI, F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: Implications for the role of neuroplasticity in depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 8, p. 1169–1180, 2008.
- BUS, B. A. A. *et al.* Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 2, p. 228–239, 2011.
- BUS, B. A. A. *et al.* Serum brain-derived neurotrophic factor: Determinants and relationship with depressive symptoms in a community population of middle-aged and elderly people. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 39–47, 2012.
- BUS, B. A. A. *et al.* Chronic depression is associated with a pronounced decrease in serum brain-derived neurotrophic factor over time. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 5, p. 602–608, 2015.

- CAPIBARIBE, V. C. C. *et al.* Thymol reverses depression-like behaviour and upregulates hippocampal BDNF levels in chronic corticosterone-induced depression model in female mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 12, p. 1774–1783, 2019.
- CARLBERG, L. *et al.* Brain derived neurotrophic factor (BDNF) - Epigenetic regulation in unipolar and bipolar affective disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 168, p. 399–406, 2014.
- CATTANEO, A. *et al.* Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 103–108, 2010.
- CATTANEO, A. *et al.* The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. **Translational psychiatry**, v. 6, n. 11, p. 1–10, 2016.
- CHASE, K. A.; SHARMA, R. P. Nicotine induces chromatin remodelling through decreases in the methyltransferases GLP, G9a, Setdb1 and levels of H3K9me2. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 1129–1138, 2013.
- CHEN, B. *et al.* Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260–265, 2001.
- CHEN, D. *et al.* A review of DNA methylation in depression. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 43, p. 39–46, 2017.
- CHEN, K. W.; CHEN, L. Epigenetic regulation of BDNF gene during development and diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1–10, 2017.
- COBB, J. A. *et al.* Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 3, p. 299–306, 2013.
- COLLE, R. *et al.* Tobacco use is associated with increased plasma BDNF levels in depressed patients. **Psychiatry Research**, v. 246, p. 370–372, 2016.
- CONTI, C. L. *et al.* Factors associated with depressive symptoms among rural residents from remote areas. **Community Mental Health Journal**, v. 56, n. 7, p. 1292–1297, 2020.
- COOK, B. L. *et al.* Trends in smoking among adults with mental illness and association between mental health treatment and smoking cessation. **JAMA**, v. 311, n. 2, p. 172–182, 2014.

- CZUBAK, A. *et al.* Influences of chronic venlafaxine, olanzapine and nicotine on the hippocampal and cortical concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 6, p. 1017–1023, 2009.
- D'ADDARIO, C. *et al.* Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 2, p. 6–7, 2013.
- DALE, E. A.; BEN MABROUK, F.; MITCHELL, G. S. Unexpected benefits of intermittent hypoxia: Enhanced respiratory and nonrespiratory motor function. **Physiology**, v. 29, n. 1, p. 39–48, 2014.
- DELANEY, C.; GARG, S. K.; YUNG, R. Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. In: **Methods in molecular biology**. v. 1343 p. 249–264, 2015.
- DOR, Y.; CEDAR, H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. **The Lancet**, v. 392, n. 10149, p. 777–786, 2018.
- DUMAN, R. S. *et al.* Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nature Medicine**, v. 22, n. 3, p. 238–249, 2016.
- DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives Of General Psychiatry**, v. 54, p. 597–606, 1997.
- DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.
- DWIVEDI, Y. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in late-life depression. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 21, n. 5, p. 433–449, 2013.
- FLUHARTY, M. *et al.* The association of cigarette smoking with depression and anxiety: A systematic review. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 19, n. 1, p. 3–13, 2017.
- FROMMER, M. *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5- methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 1827–1831, 1992.
- FUCHIKAMI, M. *et al.* DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 4–10, 2011.
- GALLAGHER, D. *et al.* Healthy percentage body fat ranges: An approach for developing guidelines based on body mass index. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 3, p. 694–701, 2000.
- GOMES-OLIVEIRA, M. H. *et al.* Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample Marcio. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 4, p. 389–394, 2012.

- GREENBERG, M. V. C.; BOURC'HIS, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 10, p. 590–607, 2019.
- GROVES, J. O. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 12, p. 1079–1088, 2007.
- HACIMUSALAR, Y.; EŞEL, E. Suggested biomarkers for major depressive disorder. **Archives Neuropsychiatry**, v. 55, n. 3, p. 280–290, 2018.
- HAMID, H. *et al.* A Primary Care Study of the Correlates of Depressive Symptoms Among Jordanian Women. **Transcultural Psychiatry**, v. 41, n. 4, p. 487–496, 2004.
- HAN, H. *et al.* DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 22, p. 4299–4310, 2011.
- HING, B. *et al.* A polymorphism associated with depressive disorders differentially regulates brain derived neurotrophic factor promoter IV activity. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 618–626, 2012.
- HUANG, N. *et al.* DNA methylation of a non-CpG island promoter represses NQO1 expression in rat arsenic-transformed lung epithelial cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 50, n. 8, p. 733–739, 2018.
- IGUCHI-ARIGA, S. M.; SCHAFFNER, W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. **Genes e development**, v. 3, n. 5, p. 612–619, 1989.
- IKEGAME, T. *et al.* DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. **Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 7, p. 434–438, 2013.
- INABA, A. *et al.* Depression in the United States and Japan: Gender, marital status, and SES patterns. **Social Science and Medicine**, v. 61, n. 11, p. 2280–2292, 2005.
- IWASAKI, Y.; MANNELL, R. C. Hierarchical dimensions of leisure stress coping. **Leisure Sciences**, v. 22, n. 3, p. 163–181, 2000.
- JACKSON-KOKU, G. Beck depression inventory. **Occupational Medicine**, v. 66, n. 2, p. 174–175, 2016.
- JAMAL, M. *et al.* Association between smoking, nicotine dependence, and BDNF Val66Met polymorphism with BDNF concentrations in serum. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 17, n. 3, p. 323–329, 2015.
- JAMES, S. L. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018.

JANUAR, V. *et al.* BDNF promoter methylation and genetic variation in late-life depression. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 8, p. 1–7, 2015.

JEONG, E.-H.; PARK, J.-H. The Relationship Among Leisure Activities, Depression and Quality of Life in Community-Dwelling Elderly Koreans. **Gerontology and Geriatric Medicine**, v. 6, p. 1–7, 2020.

JIMÉNEZ-TREVIÑO, L. *et al.* Factors associated with tobacco consumption in patients with depression. **Adicciones**, v. 31, n. 4, p. 298–308, 2019.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–492, 2012.

KANG, H. J. *et al.* Longitudinal associations between BDNF promoter methylation and late-life depression. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 4, p. 1–7, 2015.

KAREGE, F. *et al.* Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Research**, v. 109, n. 2, p. 143–148, 2002.

KELLER, S. *et al.* Increased BDNF Promoter Methylation in the Wernicke Area of Suicide Subjects. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 258–267, 2010.

KENNY, P. J.; FILE, S. E.; RATTRAY, M. Acute nicotine decreases, and chronic nicotine increases the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus. **Molecular Brain Research**, v. 85, n. 1–2, p. 234–238, 2000.

KLEIBER, D. A.; HUTCHINSON, S. L.; WILLIAMS, R. Leisure as a resource in transcending negative life events: Self-protection, self-restoration, and personal transformation. **Leisure Sciences**, v. 24, n. 2, p. 219–235, 2002.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008.

KUEHNER, J. N. *et al.* Epigenetic regulations in neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. APR, p. 1–30, 2019.

KUSHWAH, N. *et al.* Neuroprotective role of intermittent hypobaric hypoxia in unpredictable chronic mild stress induced depression in rats. **Plos One**, v. 11, n. 2, p. 1–20, 2016.

LAPIERRE, T. A. Marital status and depressive symptoms over time: Age and gender variations. **Family Relations**, v. 58, n. 4, p. 404–416, 2009.

LI, M. *et al.* What do DNA methylation studies tell us about depression? A systematic review. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 68, p. 1–14, 2019.

LI, M.; SOCZYNSKA, J. K.; KENNEDY, S. H. Inflammatory biomarkers in depression: An opportunity for novel therapeutic interventions. **Current Psychiatry Reports**, v. 13, n. 5, p. 316–320, 2011.

LI, Y.; TOLLEFSBOL, T. O. DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 791, n. 3, p. 11–21, 2011.

LIN, C. H. *et al.* Electroconvulsive therapy improves clinical manifestation with plasma BDNF levels unchanged in treatment-resistant depression patients. **Neuropsychobiology**, v. 68, n. 2, p. 110–115, 2013.

LIU, C. *et al.* DNA Methylation and Psychiatric Disorders. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 157, p. 175-232, 2018.

LIYANAGE, V. R. B. *et al.* DNA Modifications: Function and Applications in Normal and Disease States. **Biology**, v. 3, n. 4, p. 670–723, 2014.

LUGER, T. M.; SULS, J.; VANDER WEG, M. W. How robust is the association between smoking and depression in adults? A meta-analysis using linear mixed-effects models. **Addictive Behaviors**, v. 39, n. 10, p. 1418–1429, 2014.

MACHAALANI, R.; CHEN, H. Brain derived neurotrophic factor (BDNF), its tyrosine kinase receptor B (TrkB) and nicotine. **NeuroToxicology**, v. 65, p. 186–195, 2018.

MAGGIO, R. *et al.* Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental parkinsonism. **Journal of Neural Transmission**, v. 104, n. 10, p. 1113–1123, 1997.

MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression. **The Lancet**, v. 392, n. 10161, p. 2299–2312, 2018.

MALYKHIN, N. V. *et al.* Structural changes in the hippocampus in major depressive disorder: Contributions of disease and treatment. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 35, n. 5, p. 337–343, 2010.

MARTIN, E. M.; FRY, R. C. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure-Associated DNA Methylation in Human Populations. **Annual Review of Public Health**, v. 39, p. 309–333, 2018.

MARTINOWICH, K. *et al.* DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation. **Science**, v. 302, n. 5646, p. 890–893, 2003.

MILANOVIĆ, S. M. *et al.* Prevalence of depression symptoms and associated socio-demographic factors in primary health care patients. **Psychiatria Danubina**, v. 27, n. 1, p. 31–37, 2015.

MIRANDA, M. *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. 363, p. 1–25, 2019.

MOLENDIJK, M. L. *et al.* Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: State-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 11, p. 1088–1095, 2011.

MOLENDIJK, M. L. *et al.* Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: Evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 791–800, 2014.

MONROE, S. M.; HARKNESS, K. L. Recurrence in major depression: a conceptual analysis. **Psychological Review**, v. 118, n. 4, p. 655–674, 2011.

NAGATA, S.; MCCORMICK, B.; PIATT, J. The effect of leisure coping on depressive symptoms among individuals with depression: examination of potential confounding effects of physical activity and extraversion. **Psychology, Health and Medicine**, v. 24, n. 6, p. 654–666, 2019.

NAHA, N. *et al.* Nicotine and cigarette smoke modulate Nrf2-BDNF-dopaminergic signal and neurobehavioral disorders in adult rat cerebral cortex. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37, n. 5, p. 540–556, 2018.

NERI, M. **A nova classe média**. Rio de Janeiro: Centro de Políticas Sociais, Instituto Brasileiro de Economia, Fundação Getulio Vargas, 2008.

NESTLER, E. J. Epigenetic mechanisms of depression. **JAMA Psychiatry**, v. 71, n. 4, p. 454–456, 2014.

NEVES, C. D. C. *et al.* Different levels of brain-derived neurotrophic factor and cortisol in healthy heavy smokers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, p. 1–5, 2017.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7539–7547, 1995.

NIKNAZAR, S. *et al.* Comparison of the Adulthood Chronic Stress Effect on Hippocampal BDNF Signaling in Male and Female Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4026–4033, 2016.

NOTARAS, M.; VAN DEN BUUSE, M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 10, p. 2251–2274, 2020.

PARK, C. *et al.* Stress, epigenetics and depression: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 102, n. December 2018, p. 139–152, 2019.

PIZARRO, J. M. *et al.* Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. **Brain Research**, v. 1025, p. 10–20, 2004.

POLYAKOVA, M. *et al.* BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic & quantitative meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 174, p. 432–440, 2015.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, 2010.

PRUUNSILD, P. *et al.* Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. **Genomics**, v. 90, n. 3, p. 397–406, 2007.

QIAO, H. *et al.* Role of proBDNF and BDNF in dendritic spine plasticity and depressive-like behaviors induced by an animal model of depression. **Brain Research**, v. 1663, p. 29–37, 2017.

QURESHI, I. A.; MEHLER, M. F. Epigenetic mechanisms underlying nervous system diseases. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 147, p. 43–58, 2018.

RÉUS, G. Z. *et al.* Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 3, p. 460–466, 2011.

ROCERI, M. *et al.* Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 708–714, 2004.

RODDY, D. W. *et al.* The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 6, p. 487–497, 2019.

ROY, B.; SHELTON, R. C.; DWIVEDI, Y. DNA methylation and expression of stress related genes in PBMC of MDD patients with and without serious suicidal ideation. **Journal of Psychiatric Research**, v. 89, p. 115–124, 2017.

RUBIN, L. F. *et al.* Depression as a moderator of the prospective relationship between mood and smoking. **Health Psychology**, v. 39, n. 2, p. 99–106, 2020.

SALAZAR, L. A. *et al.* Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8 I, p. 1748–1750, 1998.

SALLUSTIO, F.; GESUALDO, L.; GALLONE, A. New findings showing how DNA methylation influences diseases. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2019.

SEN, S.; DUMAN, R.; SANACORA, G. Serum BDNF, Depression and Anti-Depressant Medications: Meta-Analyses and Implications. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 527–532, 2008.

SHIMIZU, E. *et al.* Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70–75, 2003.

SHIRAYAMA, Y. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3251–3261, 2002.

SMITH, M. A. *et al.* Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, n. 1, p. 234–239, 1995.

SON, J. H.; WINZER-SERHAN, U. H. Chronic neonatal nicotine exposure increases mRNA expression of neurotrophic factors in the postnatal rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1278, p. 1–14, 2009.

TADIĆ, A. *et al.* Methylation of the promoter of brain-derived neurotrophic factor exon IV and antidepressant response in major depression. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 281–283, 2014.

TOLEDO-RODRIGUEZ, M. *et al.* Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 153, n. 7, p. 1350–1354, 2010.

TORRES, E. R. *et al.* Leisure-time physical activity in relation to depressive symptoms in African-Americans: Results from the National Survey of American Life. **Preventive Medicine**, v. 56, n. 6, p. 410–412, 2013.

TSANKOVA, N. M. *et al.* Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 519–525, 2006.

UECKER, J. E. Marriage and mental health among young adults. **Journal of Health and Social Behavior**, v. 53, n. 1, p. 67–83, 2012.

VIALOU, V. *et al.* Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 5, p. 59–87, 2013.

WAKHLOO, D. *et al.* Functional hypoxia drives neuroplasticity and neurogenesis via brain erythropoietin. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

WANG, Y. P.; GORENSTEIN, C. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory-II: A comprehensive review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 4, p. 416–431, 2013.

WARNER-SCHMIDT, J. L.; DUMAN, R. S. Hippocampal neurogenesis: Opposing effects of stress and antidepressant treatment. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 239–249, 2006.

WEINBERGER, A. H. *et al.* Depression and cigarette smoking behavior: A critical review of population-based studies. **American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 43, n. 4, p. 416–431, 2016.

WHITEFORD, H. A. *et al.* Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1575–1586, 2013.

WOOTTON, R. E. *et al.* Evidence for causal effects of lifetime smoking on risk for depression and schizophrenia: A Mendelian randomisation study. **Psychological Medicine**, v. 50, n. 14, p. 2435–2443, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10**. Porto Alegre: Artmed, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: World Health Organization, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing in Mental Health**. Geneva: World Health Organization, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva: World Health Organization, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global health estimates**. Geneva: World Health Organization, 2017.

XIA, H. *et al.* Effects of smoking on cognition and BDNF levels in a male Chinese population: relationship with BDNF Val66Met polymorphism. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

XIAO, L. *et al.* Rhythmic low-field magnetic stimulation may improve depression by increasing brain-derived neurotrophic factor. **CNS Spectrums**, v. 24, n. 3, p. 313–321, 2018.

YAN, X. Y. *et al.* Marital status and risk for late life depression: A meta-analysis of the published literature. **Journal of International Medical Research**, v. 39, n. 4, p. 1142–1154, 2011.

YANG, T. *et al.* The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, n. 82, p. 1–12, 2020.

ZHANG, X. Y. *et al.* Nicotine dependence and serum BDNF levels in male patients with schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 212, n. 3, p. 301–307, 2010.

ZHENG, F. *et al.* Regulation of brain-derived neurotrophic factor exon IV transcription through calcium responsive elements in cortical neurons. **Plos One**, v. 6, n. 12, p. 1–14, 2011.

ZHENG, Y. *et al.* Gestational stress induces depressive-like and anxiety-like phenotypes through epigenetic regulation of BDNF expression in offspring hippocampus. **Epigenetics**, v. 11, n. 2, p. 150–162, 2016.

ZHOU, C. *et al.* Meta-analyses of comparative efficacy of antidepressant medications on peripheral BDNF concentration in patients with depression. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. 1–18, 2017.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Questionário de avaliação socioeconômica, saúde e estilo de vida.

Cadastro SUS

Código: |__|__|__|__|

Cadastro Individual	
Identificação do usuário/Cidadão	
Nome completo: _____	
Número do cartão SUS: _____	Data de nascimento: ____/____/____
Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino	Raça: <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Preta <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Indígena
Informações sociodemográficas	
Situação Conjugal: <input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/> Casado(a) <input type="checkbox"/> Divorciado/ Separado <input type="checkbox"/> Viúvo (a) <input type="checkbox"/> Outra	
Ocupação: _____	
<input type="checkbox"/> Creche <input type="checkbox"/> Pré escola <input type="checkbox"/> Classe Alfabetizada <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental 1ª-4ª séries <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental 5ª-8ª séries <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental Completo <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental especial <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental EJA (1ª-4ª)	Escolaridade: <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental EJA (5ª-8ª) <input type="checkbox"/> Ensino Médio <input type="checkbox"/> Ensino Médio especial <input type="checkbox"/> Ensino Médio EJA <input type="checkbox"/> Superior, Aperfeiçoamento, Especialização, Mestrado <input type="checkbox"/> Doutorado <input type="checkbox"/> Alfabetização Para Adultos <input type="checkbox"/> Nenhum
<input type="checkbox"/> Empregador <input type="checkbox"/> Assalariado com carteira de trabalho <input type="checkbox"/> Assalariado sem carteira de trabalho <input type="checkbox"/> Autônomo com previdência social <input type="checkbox"/> Autônomo sem previdência social	Situação no mercado de trabalho: <input type="checkbox"/> Aposentado/Pensionista <input type="checkbox"/> Desempregado <input type="checkbox"/> Não trabalha <input type="checkbox"/> Outro
Possui deficiência? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Se sim, qual?	
<input type="checkbox"/> Auditiva <input type="checkbox"/> Visual <input type="checkbox"/> Intelectual/ Cognitiva	<input type="checkbox"/> Física <input type="checkbox"/> Outra
Cadastro Domiciliar	
Endereço/ Telefone para contato	
Tipo de Logradouro: _____	
Nome do logradouro: _____ Nº e complemento: _____	
Bairro: _____	Telefone: _____
Condições de Moradia	
Situação de moradia/Posse de terra:	
<input type="checkbox"/> Próprio <input type="checkbox"/> Financiado <input type="checkbox"/> Alugado <input type="checkbox"/> Arrendado	<input type="checkbox"/> Cedido <input type="checkbox"/> Ocupação <input type="checkbox"/> Situação de Rua <input type="checkbox"/> Outra
Localização: <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Urbana	
Em caso de Produção Rural: Condição de Posse e Uso de Terra	
<input type="checkbox"/> Proprietário <input type="checkbox"/> Parceiro/ Meeiro <input type="checkbox"/> Assentado(a) <input type="checkbox"/> Possseiro	<input type="checkbox"/> Arrendatário (a) <input type="checkbox"/> Comodatário (a) <input type="checkbox"/> Beneficiário (a) do banco da terra <input type="checkbox"/> Não se aplica
Abastecimento da água:	
<input type="checkbox"/> Rede encanada até o domicílio <input type="checkbox"/> Poço/Nascente do domicílio <input type="checkbox"/> Cisterna	<input type="checkbox"/> Carro Pipa <input type="checkbox"/> Outro
Forma de escoamento do banheiro ou sanitário:	
<input type="checkbox"/> Rede coletora de esgoto ou Pluvial <input type="checkbox"/> Fossa séptica <input type="checkbox"/> Fossa rudimentar	<input type="checkbox"/> Direto para o Rio, Lago ou mar <input type="checkbox"/> Céu aberto <input type="checkbox"/> Outra forma

QUESTIONÁRIO		Código: __ _ _ _ _ _ _ _ _							
Data:									
Entrevistador:									
MÓDULO 1: INFORMAÇÕES GERAIS									
1	Nome:								
2	Telefone:	CEL: _____	Idade: _____						
3	Possui filhos?	() sim	() não						
4	Quantos filhos?	_____							
5	Renda pessoal (mês anterior): ou em salários mínimos	R\$ _____							
		<input type="checkbox"/> Sem rendimento	<input type="checkbox"/> Entre 1 e 3 SM	<input type="checkbox"/> Mais de 5 SM					
		<input type="checkbox"/> Até 1 salário mínimo	<input type="checkbox"/> Entre 3 e 5 SM						
6	Renda familiar (mês anterior) (toda família): ou em salários mínimos	R\$ _____							
		<input type="checkbox"/> Sem rendimento	<input type="checkbox"/> Entre 1 e 3 SM	<input type="checkbox"/> Mais de 5 SM					
		<input type="checkbox"/> Até 1 salário mínimo (SM)	<input type="checkbox"/> Entre 3 e 5 SM						
MÓDULO 2: CONDIÇÕES DE SAÚDE E ESTILO DE VIDA									
1	Fuma (cigarro, charuto, etc.)?	<input type="checkbox"/> Nunca fumou (pule para Q3)							
		<input type="checkbox"/> Já fumou e não fuma atualmente							
		<input type="checkbox"/> Fuma atualmente	Quantos cigarros por dia? _____						
2	Qual o tipo de cigarro?								
3	Você consome bebidas alcoólicas?	<input type="checkbox"/> Nunca bebeu (pule para Q7)							
		<input type="checkbox"/> Já bebeu no passado e atualmente não bebe							
		<input type="checkbox"/> Bebe atualmente							
4	Quantas doses (1 copo americano cheio) por semana?	<input type="checkbox"/> Até 2 doses							
		<input type="checkbox"/> Entre 2 e 7 doses							
		<input type="checkbox"/> Acima de 7 doses							
5	No ato de beber, acontece de beber grande quantidade de uma vez só?	() não () sim							
6	Qual o tipo de bebida alcoólica que você consome com maior frequência?	<input type="checkbox"/> Cerveja	<input type="checkbox"/> Destilados em geral						
		<input type="checkbox"/> Cachaça	<input type="checkbox"/> Outras: _____						
		<input type="checkbox"/> Vinho							
7	Quais sintomas você tem apresentado?	<input type="checkbox"/> Irritação ocular	<input type="checkbox"/> Lacrimejamento	<input type="checkbox"/> Dor de cabeça					
		<input type="checkbox"/> Queimaduras na pele	<input type="checkbox"/> Tonturas/Vertigens	<input type="checkbox"/> Suor excessivo					
		<input type="checkbox"/> Náuseas/ânsia de vômito	<input type="checkbox"/> Tosse	<input type="checkbox"/> Salivação					
		<input type="checkbox"/> Catarro	<input type="checkbox"/> Falta de ar/dispneia	<input type="checkbox"/> Agitação/irritabilidade					
		<input type="checkbox"/> Dor abdominal	<input type="checkbox"/> Visão turva	<input type="checkbox"/> Formigamento					
		<input type="checkbox"/> Diarreia	<input type="checkbox"/> Tremores	<input type="checkbox"/> Palpitação cardíaca					
		<input type="checkbox"/> Digestão difícil	<input type="checkbox"/> Vômitos	<input type="checkbox"/> Câimbras					
		<input type="checkbox"/> Chiado/síbilos	<input type="checkbox"/> Dor articulações	<input type="checkbox"/> Dor no corpo (musculatura)					
		() estresse	() falta de memória	() fraqueza					
		() ansiedade	() dor no peito						
8	Você tem alguma dessas doenças?								
		<input type="checkbox"/> Leões na pele/Alergia	<input type="checkbox"/> Hepatite	<input type="checkbox"/> Depressão					
		<input type="checkbox"/> Asma	<input type="checkbox"/> Doenças ósseas	<input type="checkbox"/> Doenças cardiovasculares					
		<input type="checkbox"/> Inflamações gástricas	<input type="checkbox"/> Doenças renais	<input type="checkbox"/> Câncer					
		<input type="checkbox"/> Doenças hepáticas	<input type="checkbox"/> Doença respiratória	<input type="checkbox"/> Hiperatividade					
		<input type="checkbox"/> Hipertensão arterial	<input type="checkbox"/> Déficit de atenção	() Déficit de atenção					
		<input type="checkbox"/> Infertilidade	<input type="checkbox"/> Abortamentos	() hipoglicemia					
		() hipotireoidismo	() obesidade	() diabetes					
		() hipertireoidismo	() síndrome metabólica						
		() doenças auto-imunes							
9	Você faz uso de algum medicamento contínuo?	<input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> SIM							
10	Qual(is) medicamento(s) de uso contínuo você faz uso?								
	Tipo de medicamento:	<input type="checkbox"/> Medicamento para dormir	<input type="checkbox"/> Rémedio para coração						
		<input type="checkbox"/> Rémedio para depressão	<input type="checkbox"/> Rémedio para diabetes						
		<input type="checkbox"/> Rémedio para pressão arterial	Outros: Quais? _____						
11	Você faz uso de suplemento de vitamina D?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim							
12	Você faz uso de protetor solar?	<input type="checkbox"/> Diariamente							
		<input type="checkbox"/> Somente quando exposto ao sol							
		<input type="checkbox"/> Raramente							
		<input type="checkbox"/> Não faz uso							
13	Possui atividade de lazer/ recreação?	() semanal () mensal							
		() quinzenal () não							
14	Pratica atividade física?	() sim () não							
15	Pratica atividade física sob sob exposição solar?	() Mais que 2 horas na semana	() Em média, 30 minutos na semana						
		() Em média, 2 horas na semana	() Não pratica						
		() Em média, 1 hora na semana							
16	No trabalho, quantas horas, por dia, você é exposto à luz solar?								

		() 0 horas	() de 1h a 4 horas			
		() até 1 hora	() a partir de 5 horas			
17	No geral, como você avalia a sua saúde?	() muito boa	() ruim			
		() boa	() muito ruim			
		() regular				
18	Fez ou faz tratamento com psiquiatra ou teve Internação por problema de saúde mental? __ Sim __ Não					
19	Usa Plantas medicinais? __ Sim __ Não	Se sim, Quais?				
20	Usa outras práticas integrativas e complementares? __ Sim __ Não					

ANEXOS

Anexo 1 – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS-UFES), sob o número 1.574.160/2016.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto do programa de capacitação de agentes SUS no estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão, câncer, metilação do Receptor do Glicocorticoide e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba

Pesquisador: ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 52830216.5.0000.5060

Instituição Proponente: CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.574.160

Apresentação do Projeto:

Pesquisador responsável: ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA

Instituição: CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO-CCA-UFES

Finalidade: PPSUS

Curso: Biologia/Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO da UFES

JUSTIFICATIVA: A vitamina D é um hormônio esteroide que atua como fator de transcrição nuclear que exerce papel importante no metabolismo ósseo, com propriedades anti-inflamatórias e moduladoras do sistema imune. Estudos recentes mostram uma correlação entre níveis baixos de vitamina D e o aparecimento de doenças, incidência de câncer e mortalidade, e doenças autoimunes. A fonte mais importante para sua obtenção é o sol, que contribui com 80 a 90% na produção da vitamina, apenas cerca de 10 a 20% provém dos alimentos. Ocorre que a descoberta de que a radiação ultravioleta do sol poderia provocar câncer de pele, associada ao estilo de vida e trabalho, em locais sem insolação, levou grande parte da população mundial à

Endereço: Av. Marechal Campos 1468	CEP: 29.040-091
Bairro: S/N	Município: VITORIA
UF: ES	E-mail: cep@ccs.ufes.br
Telefone: (27)3335-7211	

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

hipovitaminose D. A reposição desta vitamina é simples, pois sendo o sol uma fonte inesgotável de obtenção e de baixo custo, mesmo na necessidade de suplementação vitamínica. Níveis anormais de vitamina D estão relacionados ao câncer, depressão, obesidade, diabetes e outras condições de alto custo para o SUS. Assim como a vitamina D, o Receptor do Glicocorticoide (GR), também está correlacionado com câncer, depressão e obesidade. Ele é sujeito à metilação e perde a função de controle do stress.

OBJETIVO PRINCIPAL: Avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação dos agentes do SUS quanto ao estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer georreferenciado, além de investigar a prevalência de hipovitaminose D e doenças correlacionadas, além disso, pretendemos realizar averiguação da metilação do GR e sua correlação com as doenças.

LOCAL DO ESTUDO: Agentes de Unidade Básicas de Saúde do SUS e indivíduos da cidade e do campo na região do Caparaó Capixaba.

INTERVENÇÃO/PROCEDIMENTOS: Será realizada avaliação bioquímica, antropométrica, alimentar e socioeconômica da população da cidade e do campo para a obtenção dos dados de prevalência. A avaliação socioeconômica, de saúde e estilo de vida será feita por meio da aplicação de questionário junto à população, serão averiguadas 300 pessoas na zona urbana e 300 na zona rural. Para a antropometria, serão aferidos peso, altura e circunferência da cintura (CC), segundo SISVAN. Será feito o cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC) e classificação quanto ao estado nutricional baseada nos pontos de corte da OMS. A avaliação bioquímica consistirá na determinação dos níveis séricos de vitamina D, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), parâmetros bioquímicos séricos e hemograma completo por kits comerciais para automação, a análise molecular será por extração do DNA, com posterior determinação da metilação do gene Receptor de Glicocorticoide. A avaliação do consumo alimentar de vitamina D será feita por meio de Questionário de Frequência de Consumo Alimentar (QFA). Para a avaliar do estado de depressão será aplicado o Inventário de Beck de autoavaliação, com 21 itens, cuja intensidade varia de 0 a 3. O stress será avaliado pelo inventário de Lipp segundo protocolo. Os casos de câncer atendidos pelo HECI desde 2010 serão tabulados e georreferenciados.

BENEFÍCIOS: Os dados gerados poderão ser utilizados pelo SUS na implantação do programa em

Endereço: Av. Marechal Campos 1468	CEP: 29.040-091
Bairro: S/N	
UF: ES	Município: VITORIA
Telefone: (27)3335-7211	E-mail: cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

outros municípios, no fomento de políticas públicas de saúde no país e como medida de economia para o SUS, já que índices normais de vitamina D poderiam promover a redução de casos de tumores, depressão e obesidade, doenças consideradas de alto custo. Além disso, a capacitação de profissionais do SUS na região de menor IDH do Estado do Espírito Santo é importante para a melhoria e desenvolvimento da região.

Objetivo da Pesquisa:

A proposta tem como objetivo geral avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação dos agentes do SUS quanto ao estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer, bem como investigar a prevalência de hipovitaminose D e suas doenças correlacionadas em grupos de indivíduos da área urbana e rural na região do Caparaó Capixaba, assim como avaliar o status de metilação do gene receptor do glicocorticoide para a possibilidade de utilização como marcador de doenças.

- 1 - Avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação para os agentes SUS sobre o estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer.
- 2 - Envolver os profissionais do SUS em um projeto de investigação da hipovitaminose D e prevalência de suas doenças correlacionadas, na região, de modo que possam se capacitar com benefício para a população atendida.
- 3 – Levantar dados populacionais da região do Caparaó Capixaba quanto à condição socioeconômica, estilo de vida, condições de saúde da população urbana e rural do Caparaó Capixaba e correlacionar com a hipovitaminose D.
- 4 - Realizar a avaliação bioquímica, hematológica, antropométrica e alimentar e relacionar com hipovitaminose D e suas doenças relacionadas.
- 5 – Realizar a análise molecular do gene Receptor de Glicocorticoide (RG) por estudo de metilação e relacionar com depressão, câncer, obesidade e hipovitaminose D e como possível marcador para detecção de depressão e stress.
- 6 - Identificar os casos de câncer na população investigada e caracterizá-los quanto aos casos familiares e não familiares.
- 7 - Georreferenciar os casos de câncer da região por meio dos Registros Hospitalares de Câncer (RHC) do Hospital Evangélico de Cachoeiro de Itapemirim (HECI) e correlacionar a doença com as possíveis causas ambientais como ocupação, acesso à água, uso de agrotóxicos e outros.
- 8 - Realizar avaliação do estado de depressão e stress na população investigada e correlacionar com a hipovitaminose D e a metilação do receptor do glicocorticoide.

Endereço: Av. Marechal Campos 1468	CEP: 29.040-091
Bairro: S/N	
UF: ES	Município: VITORIA
Telefone: (27)3335-7211	E-mail: cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

9 – Realizar capacitação continuada para os profissionais do SUS nas áreas de nutrição, com enfoque para vitamina D, obesidade e educação alimentar, além de atividade física; saúde mental e stress e depressão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos: de acordo com a pesquisadora, "População 1: Em relação a população em que serão realizadas a coleta de material biológico e de dados (população urbana e rural), os riscos envolvem os procedimentos usados na coleta de sangue por punção venosa em seringa estéril e descartável, realizada por profissional habilitado. Todos os frascos e tubos receberão uma etiqueta de código de barras para que os pacientes não sejam identificados por seus nomes. Os materiais coletados serão transportados em gelo até o laboratório. Entre os procedimentos, o que causa maior desconforto é o de coleta de sangue, podendo levar a um hematoma local, porém com pequeno risco à saúde. Alguns sujeitos podem sentir um desconforto maior, como alteração da pressão arterial. Para minimizar os riscos a coleta será feita somente por profissionais habilitados e devidamente treinados e a utilização de materiais estéreis e descartáveis. Outro risco inerente ao projeto é a identificação dos indivíduos participantes da pesquisa através dos resultados dos exames e da tabulação de dados. Para minimizar estes riscos, os sujeitos serão identificados por códigos numéricos e a planilha com a tradução dos códigos ficará sob a guarda da pesquisadora responsável. Ainda assim existe o risco de identificação do sujeito já que os resultados dos exames terão que ser digitados e impressos. Para minimizar este risco, a digitação será feita por uma única pessoa treinada e sob a supervisão da responsável pelo projeto. Durante a coleta, tabulação e impressão dos dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados obtidos. População 2: Dos sujeitos do estudo que serão submetidos à avaliação de conhecimentos prévios e treinamento, existe o risco de identificação do sujeito, especialmente no caso dos profissionais contratados em pequeno número. Para se evitar o risco de identificação dos indivíduos, os questionários de avaliação não serão identificados por nomes, pois a análise dos resultados será feita de forma coletiva. Outra forma adotada para a não identificação dos sujeitos e não vazamento de informações será através da tabulação de dados de forma sigilosa, afim de que os piores resultados não sejam identificados. Durante a coleta e tabulação dos dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados obtidos. Além disto, para evitar qualquer tipo de constrangimento o sujeito poderá responder quantas questões quiser do questionário e se achar que alguma pergunta é ofensiva poderá deixar de responder ou mesmo se recusar. O sujeito não terá nenhum

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-091

E-mail: cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

ônus na participação desta pesquisa.”.

- Benefícios: de acordo com a pesquisadora, “População 1: Os benefícios imediatos decorrentes desta pesquisa para os indivíduos que se dispuserem a participar serão o fornecimento dos resultados dos exames realizados, além de informações e orientações quanto ao conteúdo dos exames e encaminhamento para os profissionais qualificados. Esses resultados poderão beneficiar, no futuro, outras pessoas e a ciência. Os dados secundários gerados pela pesquisa não beneficiarão diretamente os sujeitos da pesquisa. População 2: O benefício direto decorrente da pesquisa para essa população será a realização de atividades educativas propostas no projeto, que capacitarão os profissionais de saúde do SUS e o fornecimento dos certificados de participação/capacitação nos referidos cursos. Esses resultados também poderão beneficiar, no futuro, outras pessoas e a ciência. Os dados secundários gerados pela pesquisa não beneficiarão diretamente os sujeitos da pesquisa.”.
- Os riscos e benefícios, conforme descritos pelo pesquisador, atendem as exigências da Resolução CNS nº 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa potencialmente relevante, com benefícios previstos prevalecendo sobre os riscos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- A folha de rosto está adequada;
- o projeto de pesquisa está adequado;
- o TCLE está adequado;
- o orçamento é apresentado de forma adequada;
- os documentos autorizando o desenvolvimento do projeto na instituição/uso de dados são apresentados.

Recomendações:

Antes de submeter ou ressubmeter seu projeto de pesquisa para o CEP verifique as recomendações abaixo:

Alguns projetos encaminhados ao CEP têm apresentado problemas que tem dificultado a apreciação dos mesmos, atrasando a emissão do parecer e sobrecarregando o colegiado com o grande número de projetos com pendências. Desta forma, o CEP, vem por meio desse encaminhar algumas recomendações, baseadas na RESOLUÇÃO CNS Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012 a

Endereço: Av. Marechal Campos 1468	CEP: 29.040-091
Bairro: S/N	
UF: ES	Município: VITORIA
Telefone: (27)3335-7211	E-mail: cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

serem observadas para agilizar a avaliação dos projetos.

1. De acordo com a referida resolução, XI.2 “Cabe ao pesquisador: a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa”, ou seja, **NENHUMA ETAPA DA PESQUISA QUE ENVOLVA QUALQUER CONTATO COM OS PARTICIPANTES OU SEUS DADOS PODE SER INICIADA ANTES DA APROVAÇÃO DO CEP.**
2. A res. CNS 466/12 dispõe: “V – DOS RISCOS E BENEFÍCIOS; Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados”, portanto o pesquisador deverá prever quais situações poderão atingir física ou mentalmente um sujeito. Questionários, por exemplo, podem demandar tempo, causar constrangimento, fazer a pessoa a reviver experiências que podem causar sofrimento psíquico, causar ansiedade, expor informações de um grupo ou comunidade específica, etc. Assim o pesquisador deverá, em todo tipo de projeto, relatar os possíveis riscos mesmo que mínimos, e também as providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir os riscos citados.
3. O cronograma deve prever o tempo para os trâmites no CEP. Deve-se considerar a possibilidade do projeto não ser aprovado na primeira avaliação e possuir pendências, além do calendário de reuniões. Dessa forma, o projeto depois de adaptado terá que ser novamente avaliado. Isso pode acarretar em atrasos. Assim, nunca deixe para submeter o projeto, contanto com a aprovação na primeira avaliação.
4. Cumprir com rigor as exigências da Res. CNS 466/12, IV, que trata do Consentimento Livre e Esclarecido. Foi disponibilizado um modelo de TCLE pelo CEP – CCS/UFES a fim de auxiliar na elaboração do referido documento.
5. Verificar se o projeto está sendo vinculando ao CCS, pois caso contrário o projeto pode ser encaminhado para outro CEP/UFES.
6. A Folha de Rosto que deverá ser digitalizada e anexada ao protocolo será gerada pela plataforma. Não usar o modelo disponível no site do CONEP.
7. Caso tenha alguma dificuldade em utilizar a Plataforma Brasil (como inclusão de anexo, etc), sugerimos mudar de navegador.
8. Informar e comprovar a existência de Biorrepositório ou Biobanco. A não comprovação inviabiliza a aprovação do projeto.
9. Caso o acesso aos participantes ocorra em local diferente da instituição proponente, uma carta de anuência assinada pelo responsável por este local precisa ser apresentada — por exemplo, hospital, unidade de saúde, escola, asilo, creche, etc.

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

10. Caso no projeto conste o uso de dados secundários, como prontuários médicos ou outros bancos de dados do tipo, uma carta de anuência assinada pelo responsável pelos dados precisa ser apresentada. Neste caso, ainda é obrigatório a apresentação de um termo de sigilo, privacidade e confidencialidade assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto proposto.

11. O orçamento detalhado precisa ser apresentado, independentemente se o projeto caracteriza-se como “financiamento próprio” ou não.

ALGUNS DOCUMENTOS IMPORTANTES

- Resolução CNS nº 466/12 — diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos

<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>

- Resolução CNS nº 441/11 — armazenamento e utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa (Biorrepositório ou Biobanco).

<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>

- Modelo para elaboração do TCLE preparado pelo CEP/CCS/UFES

<http://ccs.ufes.br/sites/ccs.ufes.br/files/Modelo%20de%20TCLE.pdf>

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram adequadas. O projeto está de acordo com as exigências d sistema CEP/CONEP, de acordo com a Resolução do CNS 466/12.

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_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_657299.pdf	30/05/2016 11:49:14		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartaresposta2.pdf	30/05/2016 11:39:48	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ppsusVitDV3.pdf	30/05/2016 11:35:31	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPPSUS_AG.docx	30/05/2016 11:35:10	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLEPPSUS_BIO.docx	30/05/2016	ADRIANA MADEIRA	Aceito

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPPSUS_BIO.docx	11:34:59	ALVARES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	anumunicipios0001.pdf	16/05/2016 09:45:36	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Outros	RHC.pdf	16/05/2016 09:43:31	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorreppsus_1.pdf	29/01/2016 10:11:35	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhappsusass_1.pdf	29/01/2016 10:11:17	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITORIA, 03 de Junho de 2016

Assinado por:
Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni
(Coordenador)

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

Anexo 2 – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS-UFES), sob o número 3.420.734/2019.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação epigenética dos genes BDNF e NR3C1 e a relação com a Segurança Alimentar e Nutricional, a saúde e o estilo de vida de adultos, usuários do SUS

Pesquisador: Wagner Miranda Barbosa

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 08454919.5.0000.8151

Instituição Proponente: COORDENACAO ADMINISTRATIVA DO SUL DO ESPIRITO SANTO - CASES -

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESPIRITO SANTO - FAPES
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E
TECNOLOGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.420.734

Apresentação do Projeto:

O projeto aborda problemas que interferem na oferta de alimentos, no acesso físico e econômico, no consumo ou no padrão de sua utilização biológica, resultando em situação de (IN)Segurança Alimentar e Nutricional (INSAN) e comprometimento do estado de saúde e bem-estar, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças e agravos endêmicos. Tais agravos envolvem tanto situações carenciais como desnutrição e deficiências nutricionais específicas quanto situações relacionadas à ingestão calórica excessiva, como a obesidade e seus desdobramentos, e as associações com outras doenças crônicas de reconhecida relevância epidemiológica. O comprometimento do estado nutricional e de saúde relaciona-se com os hábitos de vida de forma bidirecional e a investigação sociodemográfica deve ser realizada nos estudos de saúde. Tanto as situações de agravos à saúde quanto as de comprometimento do acesso às necessidades básicas estão diretamente relacionadas ao estresse psicossocial e este, por sua vez, ao maior risco de ansiedade, depressão e outras alterações psiquiátricas. Pesquisas em epigenética tem despontado nos últimos tempos, de modo que a epigenética tem sido reconhecida como a resposta do indivíduo ao ambiente no sentido de adaptação por meio da expressão diferencial de genes, ou seja, são modificações que afetam a expressão gênica decorrentes de alterações como metilação e acetilação das caudas de histonas e metilação do DNA, que acabam por aumentar ou reduzir a expressão gênica. Alterações na

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema
Bairro: CENTRO **CEP:** 29.500-000
UF: ES **Município:** ALEGRE
Telefone: (28)3552-8771 **E-mail:** cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

metilação do DNA têm sido sugeridas como possíveis moduladoras da saúde a longo prazo em resposta a eventos ambientais e que podem ser passadas para as gerações futuras. Considerando que o estudo da regulação epigenética auxilia na compreensão do comportamento fisiológico, bem como a etiologia dessas doenças consideradas limitantes, complexas e multifatoriais, este projeto pretende investigar, na população usuária do SUS (400 indivíduos recrutados), o perfil de metilação dos genes NR3C1 e BDNF e a sua relação com o estado de saúde, de (IN)Segurança Alimentar e Nutricional (INSAN) e com o estilo de vida (consumo alimentar, hábito tabagista e etilista). A proposta busca, por meio de análises epigenéticas, possíveis marcadores do estado de saúde, INSAN, padrão alimentar e estilo de vida para a melhor compreensão, prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Para tanto, a pesquisa será realizada com indivíduos adultos usuários do SUS e a coleta de dados (a ser realizada somente após aprovação do CEP/Alegre/UFES), se dará por meio de entrevista individual, com aplicação de questionários de avaliação socioeconômica, de INSAN, de saúde e estilo de vida. Além da entrevista, será feita avaliação antropométrica, aferição da pressão arterial e coleta de sangue para análises bioquímicas e moleculares.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o pesquisador responsável, os objetivos da pesquisa são: "Objetivo Primário: Investigar, na população usuária do SUS, o perfil de metilação dos genes NR3C1 e BDNF e a sua relação com o estado de saúde, de Insegurança Alimentar e Nutricional (INSAN) e com o estilo de vida (relato de estresse e ansiedade como traço de personalidade, consumo alimentar, hábito tabagista e etilista)"; e "Objetivo Secundário: Avaliar as condições socioeconômicas da população pesquisada; Avaliar prevalência de Insegurança alimentar e nutricional; Avaliar o consumo alimentar e identificar hábitos alimentares; Realizar avaliação antropométrica; Avaliar a pressão arterial; Avaliar a prevalência de sintomas de depressão; Investigar hábito tabagista e etilista; Realizar avaliação bioquímica; Avaliar alterações moleculares relacionadas ao perfil de metilação dos genes NR3C1 e BDNF; Investigar a associação entre a metilação dos genes NR3C1 e BDNF, o estado nutricional e de saúde, de INSAN e o estilo de vida da população."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o pesquisador responsável, os riscos e benefícios da pesquisa são: "Riscos: O risco proveniente da avaliação proposta (socioeconômica/ de saúde, hábitos de vida e de insegurança alimentar e nutricional) seria o possível constrangimento dos participantes durante a aplicação dos questionários de avaliação socioeconômica, de hábitos alimentares, de condições de saúde e estilo de vida. Os participantes

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema	CEP: 29.500-000
Bairro: CENTRO	
UF: ES	Município: ALEGRE
Telefone: (28)3552-8771	E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

serão informados que poderão responder quantas questões quiserem dos questionários e, se acharem que alguma pergunta é ofensiva poderão deixar de responder ou mesmo recusar. Durante a coleta do sangue, o paciente pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que o paciente apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes da participação no estudo, o paciente será tratado pelos profissionais da equipe, terá assistência integral, bem como manterá seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais. Para minimizar os riscos da ocorrência de inchaços/hematomas durante a coleta sanguínea, o paciente será orientado a não se movimentar durante o procedimento, o que evitaria qualquer erro no momento da punção. Além disso, será explicado que não é recomendável massagear o local da picada, pois ao invés de ajudar a diminuir o desconforto, irá facilitar o surgimento de hematomas na região. O paciente também será orientado a retirar qualquer acessório, como pulseiras e relógios, e evitar usar roupas que possam apertar o braço. Ademais, será recomendado que ele não faça qualquer exercício físico ou pegue peso com o braço no qual foi feita a coleta de sangue por pelo menos uma hora. O paciente também será aconselhado no caso de aparecimento de hematomas e/ou inchaço, para que as lesões desapareçam mais facilmente. As recomendações serão: aplicar gelo no local ou usar cremes específicos com orientação médica. Em relação aos dados de prontuários que farão parte do estudo, sempre existe risco de identificação e vazamento de informação sigilosa do paciente. Para minimizar os riscos, este levantamento será feito por colaboradores de dentro das instituições envolvidas, o prontuário não sairá da UFES e as equipes de pesquisa receberão apenas uma planilha identificada numericamente sem o nome ou qualquer identificação do paciente. Durante a coleta de dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados". E: Benefícios: "Como benefício direto, o participante receberá os resultados das avaliações e exames realizados, além de informações e orientações quanto ao conteúdo dos exames e encaminhamento para os profissionais de saúde. Indiretamente, proposta é promissora para a melhoria do comportamento e hábitos alimentares e melhoria do estilo de vida dos adultos participantes do estudo. Para o Sistema Único de Saúde, a pesquisa que tem um aspecto importante de inovação busca justamente a contribuição para a inclusão de soluções de baixo custo para as problemáticas de alto custo. O conhecimento das possíveis deficiências e excessos alimentares constituirão a base para elaboração do programa de educação alimentar e nutricional voltados à adoção de práticas

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema
Bairro: CENTRO **CEP:** 29.500-000
UF: ES **Município:** ALEGRE
Telefone: (28)3552-8771 **E-mail:** cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

saudáveis de alimentação. Os estudos de epigenética propostos no projeto trarão inovação científica para as pesquisas no Estado do Espírito Santo, tanto para alunos, pesquisadores e para a população abrangida.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto com condições de realização, claramente definido e de muita relevância. Pesquisa bem fundamentada. As pendências apontadas pelo CEP foram corrigidas pelo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: apresentada e adequada.
- Projeto detalhado: apresentado e adequado.
- TCLE: apresentado e adequado.
- Termo de anuência da instituição onde a pesquisa será realizada: apresentado e adequado.
- Questionários: apresentados e adequados.
- Regulamento do biorrepositório: apresentado e adequado.
- Cronograma: apresentado e adequado.
- Orçamento: apresentado e adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências. As pendências apontadas pelo CEP foram corrigidas pelo pesquisador.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. O CEP/Alegre/UFES deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
2. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP/Alegre/UFES deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
3. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o sujeito de pesquisa.
4. Em conformidade com a Carta Circular nº.003/2011CONEP/CNS, faz-se obrigatória a rubrica em todas as páginas do TCLE pelos participantes de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador.
5. Em muitos estudos, para que os benefícios aos participantes sejam efetivos, posteriormente à realização da pesquisa, é de grande importância o pesquisador retornar à Instituição onde foi realizada a pesquisa e apresentar os resultados e conclusões.

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema
 Bairro: CENTRO CEP: 29.500-000
 UF: ES Município: ALEGRE
 Telefone: (28)3552-8771 E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1301171.pdf	26/06/2019 14:16:09		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3415067.pdf	26/06/2019 14:14:39	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	26/06/2019 14:14:11	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_vs_3.pdf	27/05/2019 14:41:47	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_brochura__Etica_vs2.pdf	23/05/2019 17:25:23	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_vs_2.pdf	23/05/2019 17:24:18	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3299029.pdf	23/05/2019 17:23:53	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_brochura__Etica.pdf	23/05/2019 17:20:53	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Suzanny_Mendes.pdf	23/05/2019 17:07:07	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	termo_flavia.pdf	02/04/2019 18:04:57	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	lattes_Elizeu_Batista.pdf	29/03/2019 17:08:04	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Tamires_Vieira.pdf	29/03/2019 17:07:39	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Flavia.pdf	29/03/2019 17:07:13	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Anderson_Barros.pdf	29/03/2019 17:05:02	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Adriana_Madeira.pdf	29/03/2019 17:03:58	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	29/03/2019 16:45:09	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	anuencia_assinado.pdf	29/03/2019 16:40:52	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	biorrepositorio.pdf	29/03/2019 16:39:05	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/02/2019 12:27:29	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	termo_de_sigilo.pdf	22/02/2019	Wagner Miranda	Aceito

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema

Bairro: CENTRO

CEP: 29.500-000

UF: ES

Município: ALEGRE

Telefone: (28)3552-8771

E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

Outros	termo_de_sigilo.pdf	12:05:31	Barbosa	Aceito
Outros	questSocioEconSaudeEstVida.pdf	21/02/2019 14:41:05	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	cadIndviDomiciliar.pdf	21/02/2019 14:39:58	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	qfcaeantropometria.pdf	21/02/2019 09:34:16	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	EBIA.pdf	21/02/2019 09:32:11	Wagner Miranda Barbosa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ALEGRE, 27 de Junho de 2019

Assinado por:
JUSSARA MOREIRA COELHO
(Coordenador(a))

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema
 Bairro: CENTRO CEP: 29.500-000
 UF: ES Município: ALEGRE
 Telefone: (28)3552-8771 E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIMENTO

Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva (28) 3552-8624; (28) 99271-9791

Dados de Identificação do Voluntário

Nome: _____ Sexo: F () M ()
 Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Fumante () Não Fumante ()
 Endereço: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Telefones: (____) _____
 / _____

Título do estudo: “Impacto do programa de capacitação de agentes SUS no estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão, câncer, metilação do Receptor do Glicocorticoide e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba”

Natureza e objetivo do estudo: Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação dos agentes do SUS quanto ao estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer, bem como investigar a prevalência de hipovitaminose D e suas doenças correlacionadas em grupos de indivíduos da área urbana e rural na região do Caparaó Capixaba, assim como avaliar o status de metilação do gene receptor do glicocorticoide para a possibilidade de utilização como marcador de doenças.

Local do estudo: Esse estudo será realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES).

Procedimentos do estudo: Para esse estudo você responderá a um questionário sobre os hábitos, ocupação, exposição, presença de depressão, ansiedade e stress. Você terá o **direito** de se recusar a responder as perguntas, se assim achar conveniente. **Serão colhidas amostras:** coleta de sangue através de punção venosa através de utilização de seringa descartável estéril, coletada por profissional habilitado, **com a duração aproximada de 30 minutos.** O material coletado será identificado com código de barras e seu nome não ficará exposto nos tubos e frascos mantendo o **sigilo** de sua identidade, em seguida o material será transportado em gelo e levado ao laboratório de Biotecnologia do CCA/UFES. Depois de utilizadas, as amostras de sangue (soro e plasma) e material genético (DAN e RNA) serão armazenadas no Biorrepositório de Materiais Biológicos do CCA-UFES até o final do estudo.

Riscos e Benefícios: Você terá direito de responder quantas questões quiser do questionário e se você achar que alguma pergunta é ofensiva, poderá deixar de responder ou mesmo se recusar. Você sentirá desconforto na coleta de sangue (uma picada de agulha), poderá ficar com o braço roxo no local da picada e sentir alguma dor. Todo o material coletado será analisado no laboratório sob a responsabilidade da Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva, se você assim concordar. O uso e coleta de sua amostra de sangue não implicarão em riscos adicionais para a sua saúde, nem exigirão que você se submeta a qualquer outro procedimento depois. Você não terá nenhum ônus na participação desta pesquisa. Como benefício você receberá os resultados dos exames realizados, além de informações e orientações quanto ao conteúdo dos exames e encaminhamento para os profissionais qualificados. Esses resultados poderão beneficiar, no futuro, outras pessoas e a ciência.

Confidencialidade dos registros: Nesse estudo, todos os frascos e tubos receberão uma etiqueta de código de barras para manutenção de **sigilo**, em conformidade com Resolução 466/12 do CNS, de forma que você, paciente não seja identificado por seu nome. Caso os resultados do estudo sejam publicados ou apresentados em congresso a confidencialidade das informações serão garantidas e sua identidade não será revelada. **Você receberá uma via desse termo, ficando a outra com o pesquisador.**

Esclarecimento de Dúvidas: Em caso de dúvida ligue para o pesquisador responsável **Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva** nos telefones **(28) 3552-8622, 3552-8624; (28) 99271-9791.** Você poderá retirar o consentimento para pesquisa em qualquer época do estudo. O Comitê de Ética em Pesquisa responsável pela autorização do estudo atende pelo telefone **(27) 3335-7211** e o link na internet é www.ccs.ufes.br/cep - o e-mail é cep.ufes@hotmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFES fica na Rua Marechal Campos, número 1468, Bairro Maruípe, CEP 29.040-090, Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Prédio da Direção, Vitória, ES.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o teor do presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, como também, os meus direitos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinada pelo(a) pesquisador(a). Autorizo também o uso das informações obtidas na pesquisa em publicações em revista médicas e apresentações em congressos (desde que meus dados de identificação pessoal sejam mantidos em sigilo).

Na qualidade de pesquisador responsável pela pesquisa "Impacto do programa de capacitação de agentes SUS no estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão, câncer, metilação do Receptor do Glicocorticoide e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba", eu, ADRIANA MADEIRA ÁLVARES DA SILVA, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

(LOCAL/DATA)

Participante da pesquisa

Pesquisador colaborador

Pesquisador Principal
Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva

Anexo 4 - Inventário de Depressão de Beck II (BDI-II) versão traduzida ao português.



Data: ___/___/___

Nome: _____ Estado Civil: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Ocupação: _____ Escolaridade: _____

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve **melhor** a maneira que você tem se sentido na **última semana, incluindo hoje**. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. **Tome o cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer a sua escolha.**

<p>1 0 Não me sinto triste. 1 Eu me sinto triste. 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto. 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.</p> <p>2 0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro. 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro. 2 Acho que nada tenho a esperar. 3 Acho o futuro sem esperança e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar.</p> <p>3 0 Não me sinto um fracasso. 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum. 2 Quando olho para trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos. 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso.</p> <p>4 0 Tenho tanto prazer em tudo como antes. 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes. 2 Não encontro um prazer real em mais nada. 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.</p> <p>5 0 Não me sinto especialmente culpado. 1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo. 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo. 3 Eu me sinto sempre culpado.</p> <p>6 0 Não acho que esteja sendo punido. 1 Acho que posso ser punido. 2 Creio que vou ser punido. 3 Acho que estou sendo punido.</p> <p>7 0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo. 1 Estou decepcionado comigo mesmo. 2 Estou enojado de mim. 3 Eu me odeio.</p>	<p>8 0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros. 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros. 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas. 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece.</p> <p>9 0 Não tenho quaisquer idéias de me matar. 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria. 2 Gostaria de me matar. 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade.</p> <p>10 0 Não choro mais que o habitual. 1 Choro mais agora do que costumava. 2 Agora, choro o tempo todo. 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queira.</p> <p>11 0 Não sou mais irritado agora do que já fui. 1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava. 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo. 3 Não me irrito mais com coisas que costumavam me irritar.</p> <p>12 0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas. 1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar. 2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas. 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas.</p> <p>13 0 Tomo decisões tão bem quanto antes. 1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava. 2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes. 3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões.</p>
---	---

Subtotal da Página 1 **CONTINUAÇÃO NO VERSO**

