

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

TALITA SIARA ALMEIDA BAPTISTA

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA (*OXTR*) NO
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE BEBÊS EXPOSTOS AO CRACK DURANTE O
DESENVOLVIMENTO UTERINO**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

TALITA SIARA ALMEIDA BAPTISTA

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA
(*OXTR*) NO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE BEBÊS EXPOSTOS AO
CRACK DURANTE O DESENVOLVIMENTO UTERINO**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor (a) pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi Oliveira

Porto Alegre
2019

Ficha Catalográfica

B222a Baptista, Talita Siara Almeida

Alterações epigenéticas do gene do receptor de ocitocina (OXTR) no sangue de cordão umbilical de bebês expostos ao crack durante o desenvolvimento uterino / Talita Siara Almeida Baptista . – 2019.

71 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi Oliveira.

1. cocaína. 2. crack. 3. ocitocina. 4. OXTR. 5. metilação. I. Oliveira, Rodrigo Grassi. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

TALITA SIARA ALMEIDA BAPTISTA

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA
(OXTR) NO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE BEBÊS EXPOSTOS AO
CRACK DURANTE O DESENVOLVIMENTO UTERINO**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor (a) pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul.

Aprovada em: 30 de agosto de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Prof. Dr. Thiago Wendt Viola

Dr. Diego Luiz Rovaris

Porto Alegre

2019

RESUMO

Introdução: O gene do receptor de ocitocina (*OXTR*) demonstra alta plasticidade epigenética em resposta a eventos ocorridos no período pré-natal, especialmente através do mecanismo de metilação de DNA. Nesse sentido, destacamos as disfuncionalidades sociais e cognitivas observadas em crianças expostas a cocaína no período pré-natal, o que sugere alterações na sinalização do neuropeptídeo ocitocina. Esta questão torna-se ainda mais relevante quando se considera a capacidade da cocaína de influenciar os componentes da maquinaria de metilação e alterar o epigenoma fetal. **Objetivo:** os objetivos deste estudo foram comparar os índices de metilação do gene *OXTR* de recém-nascidos expostos a cocaína-crack no período pré-natal e investigar a relação dos níveis de metilação com a gravidade de uso materno da droga durante a gestação no grupo exposto. **Métodos:** 29 amostras de DNA de sangue de cordão umbilical (SCU) de recém-nascidos expostos a cocaína-crack no período pré-natal e 30 amostras de DNA de SCU de recém-nascidos não expostos a droga foram submetidas a análises de qualidade seguidas de tratamento com bissulfito de sódio, PCR e pirosequenciamento para análise de duas sequências situadas no éxon III do gene *OXTR*. Os dados sociodemográficos e clínicos (maternos e neonatais) foram obtidos através de questionários padronizados e da revisão de prontuários. A presença de psicopatologia materna foi investigada através da utilização da escala *International Neuropsychiatric Interview* (MINI) versão Brasileira 5.0.0. Para a avaliação da gravidade de uso de substâncias lícitas e ilícitas no grupo de mães usuárias utilizamos a escala *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test* (ASSIST) versão 2.0. **Resultados:** os índices de metilação do gene *OXTR* nas amostras de SCU de crianças expostas a cocaína-crack no período pré-natal não diferiram dos índices encontrados nas amostras de SCU de crianças não expostas. Contudo, foi possível observar uma correlação positiva entre os scores da escala ASSIST com os níveis de metilação do gene *OXTR* no SCU das crianças expostas. Ainda, a análise de regressão demonstrou que a gravidade de uso da droga pela mãe atuou como preditora dos níveis de metilação de *OXTR* no SCU de seus filhos. **Conclusões:** nossos resultados sugerem que a gravidade do uso materno de cocaína-crack está associada a maiores índices de metilação do gene *OXTR* em seus filhos.

Palavras-chave: cocaína, crack, ocitocina, *OXTR*, metilação, recém-nascidos.

ABSTRACT

Background: The oxytocin receptor gene (*OXTR*) shows epigenetic plasticity in response to early life events, especially through of the DNA methylation. In this sense, considering the effects attributed to oxytocin signaling, we highlight the impairment in social and cognitive behaviors displayed by prenatal cocaine exposed (PCE) children. This is particularly relevant given the fact that the cocaine exposure may influence methylation machinery components, lead to changes in the fetal epigenome. Here we investigated the methylation indices in two sequences located in the *OXTR* exon III gene in umbilical cord blood (UCB) DNA from prenatal crack cocaine newborns and investigate the relationship between methylation levels and maternal crack-cocaine use gravity during pregnancy. **Methods:** In this cross-sectional study, 29 UCB samples of newborns with a history of crack-cocaine exposure in utero (PCE) and 30 UCB of non-exposed newborns (NEC) were compared for methylation levels in two genomic locus in the exon III of the *OXTR* gene (*OXTR1* and *OXTR2*) through pyrosequencing. Newborns clinical information was assessed through medical records. Maternal sociodemographic and clinical information was collected using a standardized questionnaire. Maternal psychopathology was investigated using the Mini International Neuropsychiatric and substance use characteristics and addiction severity were assessed with the Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST). **Results:** No differences between PCE and NEC groups were observed in *OXTR1* or *OXTR2* methylation levels. Regression analyses showed that *OXTR2* methylation levels could predict ASSIST scores to crack-cocaine use within PCE group. **Conclusion:** To our knowledge, this is the first study showing an association between the ASSIST scores and increased levels of *OXTR* methylation in exon III. Our data suggested that *OXTR* methylation levels in UCB of children may be affected by maternal crack-cocaine gravity.

Key words: cocaine, crack, oxytocin, *OXTR*, methylation, newborns.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sobreposição das vias de sinalização de dopamina e ocitocina.....	23
Figura 2 - Organização genômica do gene <i>OXTR</i>	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações dos kits de <i>primers</i> OXTR1 e OXTR2.....	42
---	----

LISTA DE SIGLAS

ASSIST - Teste de rastreamento de envolvimento com álcool, tabagismo e outras substâncias do inglês *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test*

ATP – Adenosina Trifosfato

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BOLD - Nível de Oxigenação Sanguínea Efeito Dependente do inglês *Blood Oxygenation Level Dependent effect*

BSCUP - Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário

Cdk15 – Ciclina dependente de quinase -5 do inglês *Cyclin-dependent kinase-like 5*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CNS- Conselho Nacional de Ética em Pesquisa e Saúde

CS - Cognição Social

DA – Dopamina

DAG - Diacilglicerol

DAT - Transportador de Dopamina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DNMT – DNA metiltransferase do inglês *DNA Methyltransferase*

DNMT1 – DNA metiltransferase -1 do inglês *DNA Methyltransferase 1*

DNMT3A – DNA metiltransferase – 3A do inglês *DNA Methyltransferase 3A*

DNMT3B - DNA metiltransferase – 3B do inglês *DNA Methyltransferase 3B*

DNMT3L – DNA metiltransferase - 3L do inglês *DNA Methyltransferase 3L*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular do inglês *Extracellular signal-Regulated kinases*

GTP – Guanosina trifosfato do inglês *Guanosine Triphosphate*

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPA –Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal do inglês *Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis*

InsP3 -Inositol 1,4,5 trifosfato do inglês *Inositol 1,4,5- trisphosphate*

MBDs – Proteínas Ligadoras do Radical Metil do inglês *Methyl-Binding proteins*

MINI - Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional do inglês *International Neuropsychiatric Interview*

NAc - Núcleo Accumbens

OC – Ocitocina

OXTR - Gene do Receptor de Ocitocina do inglês *Oxytocin Receptor gene*

OXT – Receptor de Ocitocina do inglês *oxytocin receptor*

PBMC -Células Mononucleares de Sangue Periférico do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5 - bisfosfato do inglês *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PKC – Proteína quinase C do inglês *Protein kinase C*

PPi – Pirofosfato Inorgânico do inglês *Inorganic Pyrophosphate*

PVN – Núcleo Paraventricular do inglês *Paraventricular Nucleus*

RNA – Ácido Ribonucleico do inglês *Ribonucleic Acid*

SCU - Sangue de Cordão Umbilical

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

SON – Núcleo Supraóptico do inglês *Supraoptic Nucleus*

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TEPT - Transtorno de Estresse Pós-Traumático

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TOC - Transtorno Obsessivo Compulsivo

VTA – Área tegumentar Ventral do inglês *Ventral Tegmental Area*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	COCAÍNA-CRACK	15
2.2	EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL A COCAÍNA-CRACK	17
2.3	SINALIZAÇÃO DE OCITOCINA E RESPOSTA FISIOLÓGICA	19
2.3.1	Relação entre ocitocina, dopamina e dependência de cocaína	22
2.4	VARIABILIDADE EPIGENÉTICA DO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA – <i>OXTR</i>	26
2.4.1	Metilação do gene <i>OXTR</i> e seus efeitos biológicos.....	26
2.5	METILAÇÃO DE DNA EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL	29
2.6	EFEITOS DA COCAÍNA NA MAQUINARIA DE METILAÇÃO GÊNICA	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	METODOLOGIA.....	34
4.1	DELINEAMENTO	34
4.2	AMOSTRAS.....	34
4.3	INSTRUMENTOS DE COLETAS DE DADOS	35
4.4	COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	37
4.5	ANÁLISES MOLECULARES	38
4.5.1	Tratamento com bissulfito de sódio.....	38
4.5.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
4.5.3	Reação de pirosequenciamento	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	43
	ANEXO A - Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST).....	64
	ANEXO B - Aprovação SIPESQ.....	66
	ANEXO C - Parecer consubstanciado do CEP PUCRS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O uso de cocaína-crack é um grave problema de saúde pública, contudo, quando o consumo se dá durante o período gestacional, ele se torna ainda mais complexo. A prevalência dos transtornos por abuso de substâncias em jovens adultos aumentou significativamente ao longo dos últimos anos ^{1,2}. No Brasil, em um estudo de 2014 conduzido pelo Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, sobre consumo de substâncias, apontou que aproximadamente 13% das mulheres usuárias entrevistadas referiram estar grávidas no momento da entrevista e 60% das usuárias já haviam engravidado ao menos uma vez, desde que haviam iniciado o uso de cocaína-crack e/ou similares ³. Considerando o contexto regional de uso da droga, em um estudo transversal desenvolvido em Porto Alegre, os autores observaram que 4,6% dos recém-nascidos foram expostos à cocaína no ambiente uterino ⁴. Estes dados demonstram a alarmante proporção da exposição pré-natal a cocaína-crack e justificam os esforços para o desenvolvimento deste trabalho.

Devido ao seu baixo peso molecular, a cocaína e seus metabólitos atravessam rapidamente a placenta e atingem os tecidos fetais em altas concentrações ⁵. Os efeitos neuroquímicos da droga podem ser explicados por sua ação sobre diversos neurotransmissores, contudo, o efeito mais emblemático da exposição a cocaína se dá por sua ação inibitória sobre o transportador de dopamina (DAT), resultando no aumento da concentração extracelular do neurotransmissor ⁶. Dentre as inúmeras consequências da exposição uterina a droga, se destacam as malformações, alterações do desenvolvimento neuronal e dificuldades de interação social, bem como o prejuízo no desenvolvimento e manutenção de comportamentos afiliativos ⁷⁻⁹. Crianças expostas a droga no período pré-natal apresentam dificuldades de aprendizado e déficits de atenção e memória, além disso, são consideradas pouco adaptáveis e demonstram apego social diminuído ao longo da vida ¹⁰⁻¹³. Estas alterações relacionadas a interpretação do ambiente sugerem alterações na sinalização de ocitocina (OC), um neuropeptídeo facilitador de interações sociais, envolvido no desenvolvimento de aspectos cognitivos, como memória e aprendizado e na dependência química ^{14,15}.

A relação entre ocitocina e dependência química, parece resultar da neurobiologia compartilhada entre este neuropeptídeo e a dopamina (DA). O cruzamento das vias de OC e

DA em determinadas regiões cerebrais, permite que o sistema ocitocinérgico vincule estímulos sociais e afiliativos, e aqueles advindos do uso de cocaína, as vias dopaminérgicas de reforço¹⁶. A liberação de dopamina no tecido nervoso induz a ativação de neurônios ocitocinérgicos, da mesma forma que a secreção de ocitocina já demonstrou ser capaz de ativar a sinalização dopaminérgica¹⁷⁻¹⁹. Essa interação bidirecional entre a sinalização de dopamina e ocitocina explica a capacidade da OC de interferir na resposta neuroadaptativa induzida pelo uso de cocaína, e consequentemente no desenvolvimento da dependência química²⁰⁻²². Desta forma, a OC emerge como um alvo de estudo interessante no que diz respeito aos fatores envolvidos na dependência de cocaína-crack.

Os efeitos fisiológicos da sinalização de OC são dependentes da ligação deste neuropeptídeo a seu receptor, chamado OXT (*oxytocin receptor*). Portanto, é esperado que a regulação da expressão de oxtrs possa ser um importante mecanismo subjacente a alterações na sinalização ocitocinérgica²³. O gene que codifica o receptor de ocitocina, o *OXTR* (*oxytocin receptor gene*) é caracterizado como suscetível a alterações epigenéticas, como a metilação²⁴. Este processo consiste na adição de grupos metil a determinadas regiões gênicas, promovendo alterações na conformação da cromatina e, desta forma, regulando a transcrição do gene^{25,26}. Apesar da metilação de DNA ser um processo dinâmico que pode ocorrer ao longo da vida, grande parte do epigenoma é estabelecido durante a embriogênese²⁷.

O epigenoma é altamente sensível durante os estágios iniciais de desenvolvimento, tornando-se mais vulnerável à influência de diversos fatores ambientais, como a exposição da mãe a situações de estresse, a dieta materna, e o uso de substâncias durante a gestação²⁸. Estes fatores são capazes de alterar os padrões de metilação que definem as características fenotípicas do feto²⁹. Em modelos animais, a exposição fetal a drogas de abuso como a cocaína, é capaz de influenciar a maquinaria responsável pela metilação, modificando a expressão de diversos genes, especialmente aqueles considerados sensíveis a estes processos^{25,26 30-34}. Apesar da relação entre OC e dependência química e das evidências apontando prejuízos nas relações sociais e afiliativas em crianças expostas a cocaína intraútero, não existem na literatura estudos analisando o padrão de metilação de *OXTR* após exposição pré-natal a cocaína-crack.

Considerando o exposto acima, o objetivo desta pesquisa foi investigar a existência de possíveis alterações nos índices de metilação do gene que codifica o receptor de ocitocina em recém-nascidos expostos a cocaína-crack no ambiente uterino. Em razão da escassez de

publicações específicas sobre o crack, em muitos momentos desta revisão serão apresentados dados sobre cocaína, visto que os metabólitos gerados após o uso da droga são os mesmos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COCAÍNA-CRACK

O crack é um dos vários derivados da cocaína, apresenta-se sob a forma de pedras e o produto consumido no Brasil é normalmente produzido a partir de sais de cocaína ou da pasta base de coca, obtida da primeira extração das folhas do arbusto “*Erytroxylon coca*”³⁵. A composição da pedra de crack, bem como a pureza (porcentagem de cocaína) varia de acordo com a origem do produto (país ou região) e processo de preparação³⁶. A fração cocaína presente na pedra de crack é um aspecto importante no que diz respeito a metabolização da droga. Carvalho e colaboradores (1997) investigaram a pureza média de 389 pedras de crack apreendidas no estado de São Paulo e apresentaram resultados em que 37,5% da pedra era composta por cocaína. Por outro lado, também no estado de São Paulo, Fukushima (2014) relatou uma porcentagem média de cocaína de 71,3% após avaliar a pureza de 404 pedras de crack apreendidas. O restante da pedra de crack que não é definido como cocaína, é composto por diversas substâncias consideradas adulterantes, com inúmeras possibilidades de associação entre elas. Os principais adulterantes, encontrados nas drogas apreendidas no Brasil, são: cafeína, antiparasitários (levamisol), além de medicações antianginosas (diltiazem), anestésicas (lidocaína), antipiréticas e analgésicas (paracetamol e fenacetina)³⁶.

A cocaína fumada sob a forma de crack gera altos picos plasmáticos da droga, estes iniciam-se entre oito a dez segundos após a tragada. O efeito tem duração de apenas cinco a dez minutos, o que contribui para o comportamento compulsivo de uso da droga^{35,37}. A respeito da farmacodinâmica a cocaína é metabolizada primeiramente em metil éster ecgonina e benzoilecgonina – ambos excretados por via renal, representando 75 – 90% dos metabólitos gerados. Também são formados, em pequena quantidade, ecgonina e norcocaína (metabólito biologicamente ativo). A norcocaína é gerada no tecido hepático através de um processo de desmetilação realizado pelo sistema oxidase de função mista³⁵. Os metabólitos se distribuem rapidamente pelos tecidos e tem a capacidade de atravessar barreira hematoencefálica, bem como a barreira placentária³⁸.

Os efeitos neuroquímicos da cocaína podem ser explicados por diversos mecanismos: bloqueando os canais de sódio dependentes de voltagem, atuando nos terminais

monoaminérgicos e inibindo a receptação de dopamina, serotonina e noradrenalina ³⁹. Contudo, o efeito mais emblemático do uso da droga se dá por sua ação inibitória sobre o transportador de dopamina (DAT), responsável pela receptação do neurotransmissor da fenda sináptica ⁴⁰. O resultado é o aumento da concentração extracelular de dopamina e a consequente estimulação dos receptores pós-sinápticos ⁶. As características da dependência relacionadas ao uso da droga se devem não só pela inibição de DAT, mas também pela indução de um sutil aumento da liberação de dopamina. Além disso, é importante salientar que regiões cerebrais com maior concentração de DATs são obviamente mais afetadas pelo uso de cocaína ⁴¹.

A distribuição cerebral dos transportadores de dopamina vai de encontro com os circuitos neuronais envolvidos na dependência de cocaína, os quais funcionam de forma interdependente e sobreposta, sendo eles: a) sistemas de memória e aprendizagem, especialmente a amígdala e o hipocampo; b) sistema de recompensas, que envolve o Núcleo Accumbens (NAc), o pallidum ventral, o córtex ventral estriado (CVE) e parte do sistema límbico; c) o sistema motivacional, localizado no córtex pré-frontal orbital, d) sistema de controle cognitivo, incluindo o córtex pré-frontal e córtex cingulado dorsal anterior. ^{42,43}. Estes circuitos neurais atuam orientando o comportamento humano. No entanto, na dependência química, o sistema de controle destes circuitos acaba desregulado em resposta a hiperestimulação dopaminérgica, resultando em comportamentos estereotipados do usuário da droga ⁴⁴. Por exemplo, a hiperatividade motora é resposta a estimulação dopaminérgica na região nigroestriatal ⁴⁵. De forma semelhante, o aumento extracelular de dopamina na via mesocorticolímbica, especialmente nas regiões da ínsula e córtex estriado ventral, resulta na incapacidade de se abster do uso da droga e em alterações motivacionais em prol do consumo de cocaína ^{43,46}.

Estas alterações comportamentais decorrem de processos neuroadaptativos via cascatas de sinalização que culminam com eventos nucleares ⁴⁷⁻⁴⁹. Nesse sentido, a exposição a droga é capaz de ativar rotas intracelulares, ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) por exemplo, envolvida na formação de memórias relacionadas à dependência, estimulando a via dopaminérgica mesocorticolímbica ⁵⁰⁻⁵³. Além disso, o uso de cocaína está associado ao aumento na transcrição de genes que intensificam a sensibilidade neuronal à dopamina, em áreas relacionadas ao sistema de recompensas como o NAc e a VTA ⁵⁴.

Processos neuroadaptativos de forma geral, são mecanismos essenciais durante o desenvolvimento de qualquer indivíduo e ocorrem intensamente durante o período embrionário,

por exemplo ⁵. Considerando a fase intrauterina como um período sensível a agentes externos, qualquer interferente é potencialmente danoso ao neurodesenvolvimento fetal ⁵⁵. Nesse sentido, fatores externos como a cocaína, capazes de induzir alterações neuroadaptativas configuram fatores de risco importantes para complicações neonatais de diferentes ordens e magnitudes ⁵.

2.2 EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL A COCAÍNA-CRACK

Sabe-se que o uso de cocaína-crack representa atualmente um dos problemas mais graves em saúde pública, contudo, dados epidemiológicos a respeito do uso da droga durante a gestação, ainda são escassos no Brasil. Um levantamento nacional, que ouviu 25.000 pessoas revelou que cerca de 2,4% (2.500) das mulheres que usavam cocaína mencionaram estar grávidas no momento da entrevista, ou que haviam engravidado ao menos uma vez após iniciarem o uso da droga³. Estes resultados vão de encontro aos achados de Mitsuhiro (2006)⁵⁶, que investigou a presença de cocaína no cabelo e urina de 1.000 gestantes em um centro obstétrico de São Paulo, nesse estudo, 1,7% das amostras biológicas foram positivas para cocaína. Apesar da maioria dos poucos estudos disponíveis avaliarem apenas o uso materno de cocaína pela mãe, Cunha e colaboradores (2001)⁵⁷ investigou a presença da droga diretamente no mecônio de 739 recém-nascidos em um grande hospital de Porto Alegre. Os autores reportaram 25 casos (3,4%) positivos, sendo que a prevalência final da exposição pré-natal a cocaína foi estimada em 4,6% na amostra estudada.

O período embrionário é considerado uma das fases de alta sensibilidade do desenvolvimento, sendo considerado mais suscetível a qualquer evento que perturbe a homeostase, como a exposição a drogas de abuso ⁵⁸. Nesse sentido, consideramos inicialmente a fisiologia de distribuição da droga nos tecidos fetais. A permeabilidade placentária a qualquer substância é dependente das características bioquímicas, especialmente a lipossolubilidade e o peso molecular ⁵⁹. A cocaína é consideravelmente hidrofílica e capaz de atravessar a placenta permitindo que a droga atinja altos níveis na circulação placentária. Aproximadamente 3 a 5% da cocaína concentra-se no líquido amniótico, que fornece um ambiente constante de exposição fetal a droga mesmo quando a gestante interrompe o uso ³⁸.

A cocaína é capaz de induzir a liberação de norepinefrina e epinefrina na circulação materna, o que promove vasoconstrição uterina e diminuição do aporte sanguíneo para o feto

⁶⁰. Na circulação fetal a droga inibe a receptação de noradrenalina e adrenalina nos neurônios do sistema nervoso simpático, provocando elevação da concentração desses mediadores, resultando em taquicardia, vasoconstrição e hipertensão arterial fetal ¹¹. Considerando os efeitos cardiovasculares desses hormônios, observa-se que, em casos extremos, a exposição a cocaína no período uterino pode induzir acidente vascular cerebral seguido de abortamento e morte fetal ⁵⁹. Além disso, o feto exposto a droga está sujeito ao desenvolvimento da síndrome de aspiração de mecônio, prematuridade, crescimento intrauterino retardado, bem como à diminuição do peso e do comprimento e perímetro cefálico médio ^{61,62}. Ainda, o neonato pode apresentar manifestações clínicas perinatais relativas a abstinência da droga, como dificuldades na alimentação, agitação, irritabilidade, tremores, hiper-hidrose e choro agudo ^{7,55,63}.

Estudos apontam diferentes níveis de comprometimento intelectual e cognitivo após exposição pré-natal a cocaína. Singer e colaboradores (2005) ⁶⁴ demonstraram que crianças expostas a cocaína no período uterino possuem um risco aumentado de retardo mental, déficits de aprendizado e memória aos dois anos de idade, quando comparadas a crianças não expostas. Além disso, outras pesquisas relatam menor expressividade emocional, alterações na resposta reflexa, no desempenho motor e na orientação espacial durante o desenvolvimento de bebês expostos a cocaína durante o período embrionário ⁶⁵⁻⁶⁷. Os prejuízos da exposição a droga, também podem ser vistos ao longo do desenvolvimento infantil. Crianças de cinco anos expostas à cocaína no período fetal demonstram maior ativação do córtex frontal inferior direito e caudado durante inibição da resposta, enquanto crianças não expostas apresentaram maior ativação em regiões temporal e occipital na mesma situação ⁶⁸. Ainda, crianças expostas a cocaína intraútero apresentam comportamento irritativo, tem dificuldades em tolerar mudanças de ambiente, e são definidas como pouco adaptáveis ^{69,70}. Algumas alterações comportamentais e cognitivas também são observadas na adolescência de indivíduos expostos a cocaína durante o desenvolvimento fetal. Autores encontraram associações significativas entre a exposição a droga e dificuldades de atenção ⁷¹ e da organização viso-motora ⁷², prejuízo na regulação emocional e no controle de impulsos, dificuldades de externalização ⁶⁹ e comportamentos delinquentes e agressivos ⁷⁰.

A vulnerabilidade do indivíduo exposto a cocaína no ambiente uterino também está associada a prejuízos no comportamento social ao longo da vida ^{73,74}. Bebês e crianças até três anos, expostos à droga no período pré-natal, demonstram apego social diminuído ^{10,11}. Em estudos observacionais onde os autores compararam o comportamento de crianças expostas a cocaína no ambiente uterino com aquelas não expostas, foi possível constatar que, quando

separadas das mães ou dos cuidadores habituais, as crianças expostas não demonstraram nenhum sofrimento ou mesmo buscaram contato físico de outros colegas ou dos adultos presentes. Além disso, estas crianças não estavam dispostas a dividir os brinquedos disponíveis ou a brincar em grupos e não demonstraram sentimento de prazer em nenhuma das atividades sociais propostas ^{12,13}.

Estas evidências a respeito de alterações relacionadas ao ambiente social têm motivado a elaboração de hipóteses para a reduzida sensibilidade social que pode ser observada em indivíduos expostos a cocaína-crack no período pré-natal. A principal delas aponta para uma etiologia ocitocinérgica, considerando a atuação pró-social e afiliativa da OC ^{75,76}, e a influência deste neuropeptídeo sobre o sistema dopaminérgico ^{75,77}.

2.3 SINALIZAÇÃO DE OCITOCINA E RESPOSTA FISIOLÓGICA

A ocitocina é um nonapeptídeo de atuação central e periférica ⁷⁸. A OC é sintetizada no núcleo paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo e a secreção desta molécula no tecido nervoso se dá através da glândula pituitária posterior ^{79,80}. Os neurônios ocitocinérgicos magnocelulares e parvocelulares hipotalâmicos possuem projeções axonais colaterais e direcionadas aos sistemas proencefálico, límbico e de recompensa, o que inclui as regiões da amígdala central e medial, septo lateral, leito do núcleo da estria terminal, hipocampo, córtex pré-frontal, núcleo olfatório anterior e núcleo accumbens ^{79,80}. Ainda, a molécula pode ser lançada para a circulação através da neurohipófise, ou ser secretada por tecidos periféricos ^{78,81,82}.

A sinalização ocitocinérgica seja na periferia ou no SNC, depende da ligação da OC a seu receptor específico, o oxtr que ativa segundos mensageiros intracelulares desencadeando os inúmeros efeitos atribuídos a este neuropeptídeo ^{78,83}. O OXT é uma proteína de 389 aminoácidos, apresenta sete domínios transmembrana, e pertence à família de receptores acoplados à proteína G, especificamente a proteína Gq/11 de ligação de guanosina trifosfato (GTP). A ligação de OC ao receptor induz a hidrólise intracelular de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂⁺) em Inositol 1,4,5- trisfosfato (InsP₃) e diacilglicerol (DAG). O InsP₃ promove a liberação de íons Ca²⁺ do compartimento intracelular, enquanto DAG ativa a proteína quinase C (PKC) e ambos fosforilam outras proteínas, o que, por fim, induz a

expressão de genes que codificam os substratos necessários aos efeitos fisiológicos da ocitocina^{78,84}.

Na periferia o OXT é expresso por células mioepiteliais da glândula mamária, no miométrio, no endométrio no final da gravidez e em outros tecidos, incluindo o rim, coração, timo, pâncreas e adipócitos^{78,83}. No cérebro humano, o oxtr é altamente expresso no NAc, amígdala, no septo e no leito nuclear da estria terminal, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo^{78,83,85}. Estas regiões cerebrais são responsáveis por diversas funções, dentre elas o aprendizado, processamento de informações e consolidação da memória^{78,84,86-88}. De fato, em modelos animais, a ocitocina é capaz de melhorar a consolidação da memória e a capacidade de aprendizado após tarefas que avaliam estes domínios cognitivos⁸⁹. Da mesma forma, após a administração de ocitocina intranasal em humanos, é possível observar um melhor desempenho dos participantes em tarefas de memória^{87,88}). o sistema ocitocinérgico está implicado na resposta homeostática ao estresse, através da inibição indireta da liberação de hormônio adrenocorticotrófico e cortisol e atenuando a ativação da amígdala após estímulos sócio emocionais, modulando o medo e ansiedade⁹²⁻⁹⁴.

O padrão de expressão do receptor de OC varia conforme a fase de desenvolvimento do tecido nervoso⁹⁵. No cérebro embrionário ou juvenil observa-se maior expressão de oxtr em áreas relacionadas à recompensa e memória social e espacial, enquanto que em adultos a densidade de oxtrs é maior em regiões corticais e naquelas relacionadas à tomada de decisão social^{95,96}. Estas alterações na densidade de oxtrs de acordo com o período da vida, são provavelmente o mecanismo molecular responsável pelas adaptações comportamentais necessárias em cada fase do desenvolvimento.

A OC está associada a sentimentos de confiança e empatia, sendo caracterizada como um neuropeptídeo facilitador de interações sociais¹⁵. A sinalização ocitocinérgica aumenta a sensibilidade a pistas sociais que auxiliam o desenvolvimento de comportamentos adaptativos^{14,15}. Desta forma, a ocitocina desempenha papel central em aspectos que mediam comportamentos pró-sociais, como a cognição social (CS), e comportamentos afiliativos, como as relações monogâmicas e o comportamento maternal. A CS abrange processos de codificação, interpretação e manipulação de informações do contexto social através de procedimentos avaliativos e inferenciais que serão utilizados posteriormente em processos de julgamento e tomada de decisão^{97,98}. As rotas ocitocinérgicas cerebrais são intensamente ativadas no

processamento social e manipulação das informações relacionadas ao ambiente, permeando a relação entre um estímulo social externo e as respostas comportamentais observáveis⁹⁹⁻¹⁰¹.

A ocitocina regula aspectos como reconhecimento e memória social, elementos indispensáveis na relação do indivíduo com o ambiente¹⁰²⁻¹⁰⁴. Quando administrada por via intranasal em humanos, a OC estimula comportamentos consistentes com aumento da confiança interpessoal durante jogos cognitivos^{93,105}. A sinalização ocitocinérgica parece facilitar o desenvolvimento e manutenção de habilidades sociais. Em modelos animais, mecanismos de plasticidade sináptica hipocampal, imprescindíveis para o armazenamento da memória social, são fortemente regulados pela expressão e ativação de oxtrs, assim como a administração intracerebral de OC facilita a transmissão de informações acerca do ambiente no hipocampo⁸⁸.

Conexões neurais ocitocinérgicas originam condutas de escolha e manutenção de parceiros sexuais em uma relação afetiva¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Estudos em roedores de espécies monogâmicas, demonstram que a OC é capaz de mediar a conexão entre a codificação de informações sócio-sensoriais vinculadas a comportamentos afiliativos e um estímulo recompensador, reforçando o valor da relação frente a outros estímulos¹⁶. Em humanos, as concentrações basais de OC periférica são mais altas em casais durante os estágios iniciais do amor romântico, quando comparadas as concentrações plasmáticas de indivíduos solteiros¹⁰⁹. Scheele e colaboradores (2013)¹¹⁰ demonstraram que, após utilização de ocitocina intranasal, houve aumento da intensidade de sinal (BOLD- *Blood Oxygenation Level Dependent effect*) no NAc de homens casados expostos as fotografias de seus parceiros (as) durante ressonância magnética funcional. Além disso, a OC é capaz de motivar homens com vínculos monogâmicos, mas não solteiros, a manter uma distância maior entre si e uma mulher atraente que não sua parceira¹⁰⁹. Desta forma, a ocitocina parece induzir comportamentos relacionados a formação de vínculo a um parceiro, ao mesmo tempo que inibe a procura por outros.

O desenvolvimento do comportamento materno, também mediado pela sinalização de ocitocina, envolve um conjunto de mudanças comportamentais na mãe que necessárias a sobrevivência do recém-nascido. Estas mudanças promovem maior responsividade materna em relação ao bebê e resulta na formação do vínculo entre mãe e filho^{107,111,112}. Em humanos a ativação de vias ocitocinérgicas é essencial para aumentar a capacidade da mãe de reconhecer e interpretar sinais fornecidos pelo bebê. De forma semelhante, em modelos animais, a liberação de ocitocina central em ratas prenhas induz a expressão de comportamento materno caracterizado pela construção de ninhos, lambedura e amamentação dos filhotes¹⁰⁷. Já a

utilização intracerebroventricular de antagonistas de OC, bloqueia o início do comportamento materno em ratas que acabaram de dar à luz ¹¹³. Além disso, no período pós natal, fêmeas prenhas que receberam ocitocina no NAc e córtex pré-límbico, apresentam maior saliência as pistas sociais fornecidas pela prole ¹¹³⁻¹¹⁵. Ainda, a maior sensibilidade da mãe para com o recém-nascido e menor atenção a outros estímulos é reforçada pela ativação ocitocinérgica no circuito de recompensa da dopamina ⁸⁰.

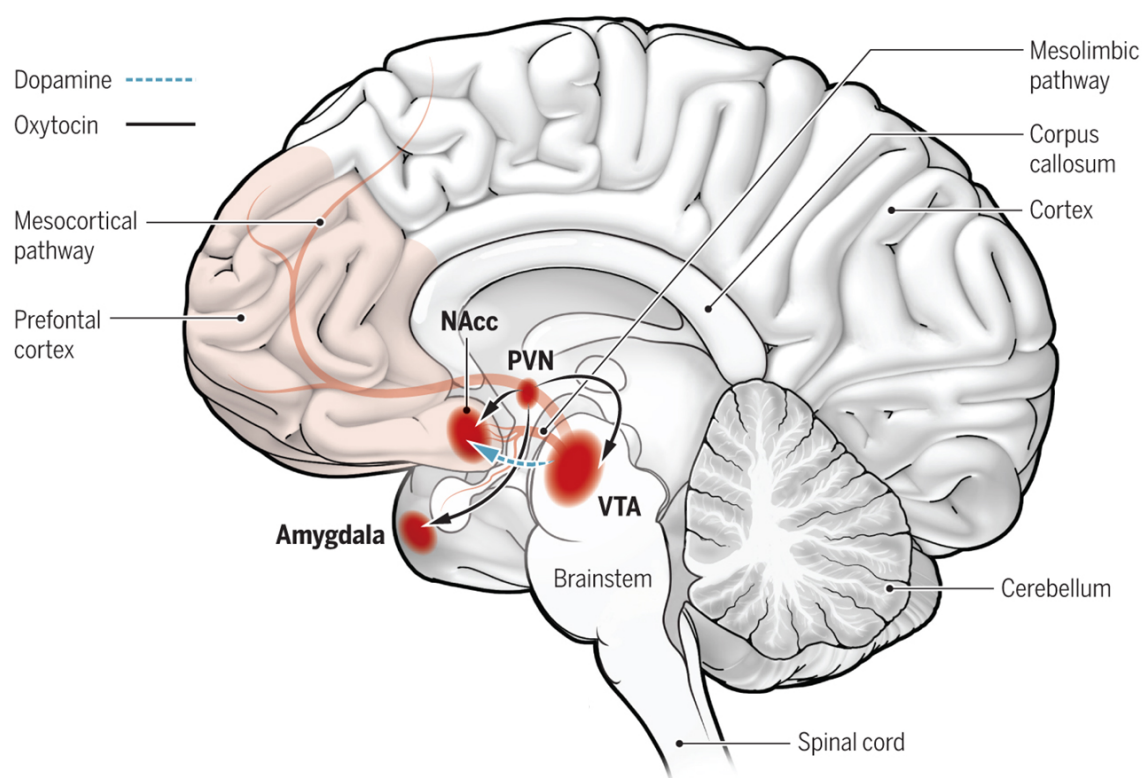
Evidências sugerem que este efeito reforçador observado em comportamentos afiliativos e pró-sociais ocorre em virtude da interação entre ocitocina e dopamina na via mesocorticolímbica ¹¹⁶. O sistema ocitocinérgico é capaz de vincular os estímulos sociais à vias de dopaminérgicas de reforço no NAc, região que aparece como um componente central do sistema de recompensa ¹¹⁷. Em humanos e modelos animais o NAc apresenta alta densidade de receptores ocitocinérgicos e projeções de dopamina da área tegumentar ventral ¹¹⁸⁻¹²⁰. Em roedores, durante o acasalamento e após o parto, ocorre intensa liberação de dopamina no NAc o que se torna substrato para o reforço positivo e o condicionamento que ocorre como resultado da sinalização de dopaminérgica ^{121,122}. Da mesma forma, a preferência e escolha de um parceiro é inibida quando os receptores dopaminérgicos (receptor de dopamina 1 -D1 e receptor de dopamina 2- D2) são bloqueados no NAc ^{120,121}. Estes resultados demonstram a interação entre estas vias é observada tanto perante comportamentos afiliativos ²² quanto na dependência química.

2.3.1 Relação entre ocitocina, dopamina e dependência de cocaína

Comportamentos pró-sociais e afiliativos são semelhantes a comportamentos característicos da dependência química o que se deve possivelmente a neurobiologia compartilhada entre as vias ocitocinérgica e dopaminérgica ¹²³. A sobreposição destas vias torna-se evidente quando se observa o efeito da utilização de ocitocina em áreas cerebrais com projeções dopaminérgicas. Enquanto a OC é capaz de regular a liberação de dopamina em regiões extra-hipotalâmicas, os neurônios ocitocinérgicos, que expressam receptores de DA, são sensíveis à modulação pela dopamina ¹²⁴. Em modelos animais, a liberação de dopamina no NAc induz a estimulação de neurônios dopaminérgicos no núcleo paraventricular e resulta na ativação de neurônios ocitocinérgicos ¹⁷⁻¹⁹. Da mesma forma, a secreção de ocitocina na área tegumentar ventral é capaz de ativar neurônios dopaminérgicos que se projetam para o NAc

(Figura 1) Bowen and Neumann (2017). Ainda, a administração de OC nos núcleos subtalâmicos de roedores é capaz de bloquear o processo de aprendizagem relacionado a sinalização de DA; efeito semelhante é observado quando utiliza-se um antagonista dos receptores de dopamina ^{124,125}. Os cruzamentos das rotas de OC e DA no NAc e através do córtex cingulado anterior, apontam para uma ativação conjunta durante formação de vínculos, quer sejam com outros indivíduos, ou aqueles estabelecidos com drogas de abuso ¹²⁵.

Figura 1 - Sobreposição das vias de sinalização de dopamina e ocitocina.



A Síntese e liberação de ocitocina do núcleo paraventricular do hipotálamo (paraventricular nucleus - PVN) e na área tegumentar ventral (*ventral tegmental área* - VTA) ativa os neurônios dopaminérgicos que se projetam para o núcleo accumbens (*Núcleo accumbens* - NAcc). Fonte: Bowen and Neumann (2017) ²².

De forma semelhante ao observado em comportamentos pró-sociais, as vias ocitocinérgicas e dopaminérgicas convergem durante a interpretação de estímulos advindos do uso de drogas e durante o estabelecimento da dependência química ¹²⁶⁻¹²⁸. Esta relação pode ser observada a partir da manipulação de receptores de dopamina e ocitocina em modelos experimentais. Ao mesmo tempo que o bloqueio farmacológico de receptores de dopamina ou ocitocina no NAc de roedores inibe a escolha de um parceiro para acasalamento ^{121,129} a infusão

cerebral de OC nesta região é capaz de diminuir a busca pela droga em animais expostos a cocaína²⁰. Além disso, a OC é capaz de postergar a habituação e o desenvolvimento da dependência química em modelos animais exposto a cocaína de forma crônica ²⁰⁻²².

O acentuado interesse pela droga na dependência química, assemelha-se aquele observado durante a escolha e manutenção de relações afiliativas. Em ratos machos de espécies monogâmicas, onde a preferência por uma parceira de acasalamento se sobrepõe a procura de novas parceiras, a administração de cocaína resulta em aumento da expressão de D1 na via mesocorticolímbica e impede o envolvimento dos animais em qualquer relação afiliativa, ou seja, a preferência pela droga diminui a capacidade de formação de outros vínculos ¹³⁰. O mesmo efeito pode ser visto em ratos machos não expostos a cocaína, que passam a rejeitar novas fêmeas após a escolha de apenas uma parceira para acasalamento ¹³⁰. Ainda, após administração de cocaína no NAc de ratas que acabaram de dar a luz, ocorre a diminuição da interação das fêmeas com a prole, sugerindo que também possa haver prejuízo do comportamento materno na presença da droga ^{131,132}.

Alterações relacionadas a interpretação do ambiente social e formação de vínculos, já foram demonstradas em usuários de cocaína ¹³³. Gestantes e puérperas usuárias de cocaína demonstram insensibilidade frente aos sinais sociais fornecidos pelo bebê, prejudicando ou mesmo impedindo a formação do vínculo com a criança ¹³⁴. Da mesma forma, alguns prejuízos em relação a CS já foram reportados em usuários de cocaína-crack. Em estudo de nosso grupo de pesquisa, investigou-se a capacidade de mulheres usuárias de cocaína-crack, de inferirem e interpretar estados mentais de terceiros. Os resultados demonstram que os usuários apresentam dificuldade na leitura de estados mentais baseado em pistas visuais ou verbais ¹³⁵, o que se assemelha ao encontrado em outras pesquisas ^{136,137}. Ainda, usuários de cocaína-crack também apresentam prejuízos na tomada de decisão relacionada ao ambiente social, e não social ¹³⁶ além de um comprometimento da capacidade de reconhecer expressões emocionais, quando são comparados a indivíduos não usuários ^{138,139}. Nesse sentido, estudos que reportam prejuízos de relações sociais e afiliativas têm reforçado cada vez o papel central da ocitocina nas disfuncionalidades sociais observadas em usuários de cocaína-crack ⁹⁷.

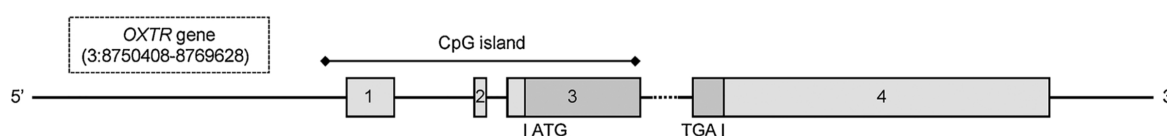
Especula-se que as alterações na relação com o ambiente social reportadas em usuários adultos, equivalem aquelas observadas em crianças que foram expostas a cocaína durante o desenvolvimento fetal: indiferença quanto a presença do cuidador, dificuldades na interação social e em resposta aos estímulos parentais ^{12,13}. Ressalta-se que a regulação destes

comportamentos sociais, prejudicados em crianças expostas a droga no ambiente uterino, é mediada pela OC ¹⁰⁶. Portanto, qualquer perturbação na sinalização ocitocinérgica pode estar associada as disfuncionalidades sociais após exposição pré-natal a droga ^{134,140}. Considerando que os efeitos fisiológicos da sinalização da OC são dependentes da ligação deste neuropeptídeo a seu receptor, é esperado que a regulação da expressão de oxtrs possa ser um mecanismo subjacente a alterações de comportamentos atribuídos sinalização de ocitocina ²³.

2.4 VARIABILIDADE EPIGENÉTICA DO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA – *OXTR*

O gene que codifica o receptor de ocitocina (OXT) em humanos é conhecido como *OXTR* (*oxytocin receptor gene*), presente em cópia única no genoma humano, cujo *locus* encontra-se na posição 3p25.3 (GRCh38/hg38 3:8750408-8769628). O *OXTR* é composto por 19.210 pares de bases, possui tamanho de 17 kb e contém três íntrons e quatro éxons. Os éxons I e II correspondem a regiões não codificantes enquanto os éxons III e IV codificam o receptor ⁷⁸. Em humanos, o gene *OXTR* contém uma extensa ilha CpG, região abrangendo 2.318 pares de bases (hg38, 3: 8768045-8770525) na direção 5' → 3', cobrindo o éxon um, dois, grande parte do éxon III e dois íntrons (Figura 2) ^{24,141,142}.

Figura 2 - Organização genômica do gene *OXTR*



O gene *OXTR* está localizado no cromossomo 3p25-3p26.2 (GRCh38/hg38 3:8750408-8769628), abrange 17 kb e contém quatro éxons (cinza claro) e três íntrons. Os éxons III e IV contêm a região codificante da proteína (cinza escuro) começando com o códon de início da tradução (AUG) e terminando com o códon de parada da tradução (UGA). A linha acima do gene mostra a localização da ilha CpG (GRCh38/hg38, 3: 8768045-8770525). Fonte: Kumsta and Heinrichs (2013)¹⁴¹.

De modo geral, é possível observar grande variabilidade genética no gene *OXTR*, o que parece ser resultado tanto de variações comuns do genoma (polimorfismos de nucleotídeo

único, inserção/deleção e duplicação), quanto de alterações epigenéticas como a metilação de DNA¹⁴³⁻¹⁴⁷.

2.4.1 Metilação do gene *OXTR* e seus efeitos biológicos

Dentre os processos epigenéticos que normalmente refletem alterações funcionais no receptor de ocitocina, destaca-se a metilação, uma alteração química que não altera a sequência de DNA, mas é capaz de modificar a expressão gênica^{171,172}. Este mecanismo epigenético resulta da atividade de algumas famílias de enzimas, especialmente as DNA metiltransferases (*DNA Methyltransferases* - DNMTs) e as proteínas de ligação ao radical metil (*Methyl-binding proteins* - MBDs)¹⁷³. As DNMTs são enzimas capazes de catalisar a adição de um grupo metil na posição 5' do anel da citosina em dinucleotídeos CpGs, formando a 5-metilcitosina. Estes dinucleotídeos CpGs no genoma humano podem apresentar-se metilados, parcialmente metilados ou abundantemente metilados, variando de acordo com a região no cromossomo, alelos, tipo de célula ou fase de desenvolvimento¹⁷⁴.

A família das proteínas DNMTs inclui a DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. A DNMT1 tem como função a manutenção do padrão de metilação já existente. As DNMT3A e DNMT3B, possuem preferência por dinucleotídeos CpG desmetilados, ou seja, atuam na metilação *de novo*¹⁷⁴. A DNMT3L por sua vez, não possui atividade catalítica independente, mas auxilia as enzimas 3A e 3B, aumentando sua afinidade de ligação ao grupo doador de metil S-adenosil-L-metionina, estimulando a atividade enzimática¹⁷⁴. Já as MBDs têm a capacidade de reconhecer as citosinas metiladas. Estas proteínas atraem complexos de reestruturação da cromatina, o que resulta em um estado de condensação que impede ou regula a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA, convertendo o padrão de metilação na alteração transcricional específica¹⁷⁵.

Esses componentes da maquinaria de metilação atuam especialmente em regiões ricas em dinucleotídeos CpGs. Conforme citado anteriormente, *OXTR* é considerado sensível a processos epigenéticos, uma vez que apresenta uma extensa ilha CpG na sequência genômica. A metilação em regiões da ilha CpG de *OXTR* já foi descrita como capaz de regular a transcrição do RNAm do receptor em diversos tecidos^{24,141,142,148,176}. Kusui e colaboradores, utilizando uma linhagem de células de hepatoblastoma humano, avaliaram o efeito da metilação de regiões do éxon III, dentro da ilha CpG, sobre a transcrição de *OXTR*. Os autores compararam a expressão

do RNAm de *OXTR* na linhagem celular tratada com um inibidor de metiltransferases e após a retirada deste inibidor. Os resultados demonstraram que, quando o inibidor de metiltransferases foi retirado houve a diminuição da supressão da transcrição do gene. Em outro experimento do mesmo estudo, os autores observaram que a desmetilação de pontos dentro da ilha CpG de *OXTR* poderia reverter a supressão da transcrição gênica, em células tratadas com os mesmos inibidores ²⁴.

Diferentes padrões de metilação em *OXTR* tem sido considerados como precursores de alterações na sinalização ocitocinérgica ^{141,178,182}. Dois estudos investigaram a existência de associação entre a metilação de *OXTR* e atividade cerebral, ambos compararam resultados de ressonância magnética cerebral durante tarefas de percepção social, com os índices de metilação de *OXTR* dentro da ilha CpG em amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de participantes saudáveis. O aumento dos índices de metilação de *OXTR* nas PBMCs foi associado à diminuição da conectividade entre os sistemas neurais que sustentam a percepção social ¹⁸³, bem como à diminuição do acoplamento funcional da amígdala em regiões associadas a regulação emocional ¹⁸⁴.

Ao longo do tempo, a metilação de *OXTR* emergiu como importante objeto de estudo, especialmente quando associada a comportamentos considerados patológicos. Evidências sugerem que as modificações neurofuncionais do receptor de OC estão associadas a distúrbios psiquiátricos ¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. A hipermetilação de regiões não codificantes de *OXTR* já foi associada com diminuição de RNAm do receptor em PBMCs de crianças autistas comparadas a controles não autistas ¹⁸⁷. Além disso, em crianças com problemas de conduta e com traços *callous-unemotional*, os índices de metilação de *OXTR* foram positivamente associados a maior sintomatologia; e negativamente associados com a capacidade de empatia ¹⁶⁷.

A psicopatologia do Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC) também parece estar associada a metilação de *OXTR*. Cappi e colaboradores (2016) ¹⁸⁸ analisaram as PBMCs de 42 pacientes com TOC e 31 controles saudáveis. Foram investigados os índices de metilação de *OXTR* em 9 sítios CpGs localizados no éxon III, bem como a gravidade dos sintomas do TOC. Os autores observaram níveis mais altos de metilação de *OXTR* em pacientes com TOC quando comparados aos controles saudáveis, além disso, demonstraram a existência de uma correlação positiva entre a metilação do gene e a gravidade dos sintomas do transtorno.

Outras distúrbios psiquiátricos, como ansiedade e depressão compartilham componentes sintomatológicos e clínicos, o que pode indicar padrões epigenéticos semelhantes.

Chagnon (2015) ¹⁸⁹ investigou os índices de metilação de *OXTR* em indivíduos com depressão e/ou transtorno de ansiedade. Amostras de saliva foram coletadas de 19 participantes do sexo feminino com transtorno de ansiedade e / ou depressão e de 24 participantes do mesmo gênero, mas sem nenhum transtorno. Os autores demonstraram um estado de hipermetilação em 9 sítios CpGs localizados no éxon III em amostras de pacientes com ansiedade e/ou depressão quando comparados aos controles. Em contrapartida, outro estudo demonstrou a diminuição dos índices de metilação em 12 pontos CpG do éxon III de *OXTR* em PBMCs de 110 adultos com ansiedade social quando comparados a participantes não ansiosos. Além disso, os autores observaram uma correlação negativa entre os sintomas de ansiedade e a metilação de *OXTR* ¹⁸¹. Estes resultados sustentam evidências de que esta alteração epigenética reflete em consequências comportamentais e clínicas.

A metilação de *OXTR* foi estudada de forma retrospectiva por Unternaehrer e colaboradores (2015) ¹⁸⁶. Neste estudo, os autores compararam o padrão de metilação de *OXTR* em PBMCs de 85 estudantes universitários divididos em dois grupos: o primeiro grupo declarou ter recebido cuidado materno significativo durante a infância e o segundo grupo que relatou cuidado materno insuficiente. De forma geral, foi possível observar maiores índices de metilação no éxon III de *OXTR* no grupo que relatou pouca atenção materna. Os autores especulam a existência da associação entre o cuidado materno pobre em estímulos e os índices de metilação de *OXTR*, contudo, consideraram como um fator limitante do estudo a passagem do tempo entre o evento (cuidado materno na infância) e a avaliação do desfecho esperado (metilação de *OXTR*).

Na tentativa de investigar a influência ambiental durante o desenvolvimento fetal sobre os padrões de metilação de *OXTR* de recém-nascidos, o mesmo grupo de Unternaehrer desenvolveu uma pesquisa transversal, na qual analisou o efeito de eventos estressantes maternos sobre a metilação de *OXTR* em amostras de sangue de cordão umbilical (SCU). Neste estudo, foram avaliados os índices de metilação de 13 sítios CpGs localizados no éxon III de *OXTR* no SCU de 39 bebês de mães submetidas a testes psicológicos para avaliação da percepção do estresse no período gestacional. Os autores demonstraram que maior percepção de estresse pela mãe relacionou-se positivamente aos índices de metilação de *OXTR* nas amostras de SCU dos bebês ¹⁹⁰.

Também utilizando SCU como matriz de análise, Milaniaki (2017) ¹⁷⁹ investigou se os índices de metilação de *OXTR* estavam relacionados a comportamentos considerados resilientes

em crianças até 7 anos de idade. Neste caso, a hipermetilação de pontos CpG no éxon III de *OXTR* estava associada a maior resiliência na condução de problemas sociais na infância. Ainda, o grupo de crianças definido como mais resiliente, demonstrou comportamentos pró-sociais e melhor cognição social em comparação ao grupo menos resiliente. Por outro lado, Cecil e colaboradores (2014) ¹⁹¹ reportaram a associação entre a diminuição dos índices de metilação de *OXTR* e comportamentos insensíveis e a traços *Callous-unemotional* aos 13 anos de idade.

Estes dados sugerem que os índices de metilação do gene *OXTR* observados no SCU estão associados a alterações de comportamento atribuídas a sinalização ocitocinérgica. Uma vez que o período embrionário é considerado uma fase sensível do desenvolvimento, e a exposição a fatores ambientais é capaz de influenciar a maquinaria de metilação ²⁷ a utilização de SCU como matriz de análise configura uma ferramenta superior na investigação de efeitos oriundos da exposição uterina, visto que ainda não sofreu influencia do ambiente pós-natal ^{192,193}.

2.5 METILAÇÃO DE DNA EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL

O SCU expressa a variabilidade interindividual da metilação do DNA, o que por sua vez é determinado pela relação entre a condição materna, o genótipo infantil e a exposição ambiental durante a gestação ²⁷. A partir da concepção e durante a embriogênese ocorrem duas torrentes de desmetilação, que apagam padrões específicos da geração anterior, seguidas de remetilação (*de novo*) global, especificamente na gametogênese, responsável pelo *imprinting* parental referente ao sexo, e no início do desenvolvimento embrionário, relacionada à diferenciação dos tipos celulares e expressão gênica de forma geral ¹⁹⁴. Estas ondas de metilação e metilação *de novo*, bem como todo o período embrionário, são especialmente sensíveis a fatores ambientais, capazes de induzir um processo de metilação diferencial em genes suscetíveis a este processo ²⁸.

Dada a alta plasticidade epigenômica do período uterino, fatores externos, como a exposição a drogas atuam como “programadores” da diferenciação e expressão molecular via metilação, influenciando o fenótipo resultante ^{193,195}. Nesse sentido, o SCU é tido como um material biológico superior a outros tecidos quando a intenção é avaliar o efeito da exposição

pré-natal sobre mecanismos epigenéticos, uma vez que compreende o tecido sanguíneo do feto que ainda não sofreu influência do ambiente extraútero ¹⁹². Além disso, evidências apontam que o sangue de cordão umbilical é capaz de mimetizar a concentração de metabólitos de substâncias utilizadas pela mãe durante a gestação, incluindo drogas de abuso (cocaína, opiáceos, metadona e anfetaminas) ^{196–199}

Estudos em animais e humanos, investigando o perfil epigenômico no SCU de recém-nascidos expostos a drogas de abuso já foram conduzidos, contudo, a grande maioria concentra-se na avaliação de padrões de metilação em resposta ao tabaco e álcool e não se referem ao gene *OXTR* ^{192,200}. Em um dos maiores estudos de associação ampla do epigenoma, a partir da análise de 1.052 amostras de SCU, foi possível observar que o tabagismo materno pode atuar como um elemento capaz de influenciar a maquinaria de metilação, culminando com um estado de hipometilação global ²⁰¹. De forma semelhante, a exposição pré-natal ao álcool resultou na diminuição da metilação de diversos genes no SCU de recém-nascidos expostos quando comparados aqueles não expostos ^{202–204}. Contudo ainda não há na literatura estudos avaliando a metilação do gene *OXTR* em SCU de recém-nascidos expostos a cocaína-crack.

Considerando a dificuldade de acesso a tecido cerebral humano, ao investigar alterações epigenéticas em genes associados a dependência química, é imprescindível a escolha de um tecido periférico acessível e que possa representar as possíveis alterações induzidas pela droga no SNC. Nesse sentido, existem evidências de que o epigenoma observado no sangue periférico possa equivaler aquele encontrado no tecido nervoso ²⁰⁵. Em amostras *post-mortem* de tecido cerebral humanos observa-se uma correlação positiva significativa entre os padrões de metilação de DNA de PBMCs e os padrões encontrados em regiões cerebrais como o cerebelo (correlação = 0,76, $P < 0,001$) e córtex (correlação = 0,69, $P < 0,001$) ²⁰⁵. Embora o SCU contenha tipos celulares únicos, como eritrócitos nucleados, é um tecido de fácil acesso e considerado como o sangue periférico do neonato ¹⁹⁵.

2.6 EFEITOS DA COCAÍNA NA MAQUINARIA DE METILAÇÃO GÊNICA

Em modelos animais diversos estudos vêm associando a exposição a cocaína à alterações nos índices de metilação gênica, especialmente em regiões cerebrais associadas à dependência química, como o NAc, córtex pré-frontal e hipocampo ^{30–34}. A cocaína, é capaz de induzir efeitos

celulares estáveis e duradouros através da maquinaria de metilação ²⁰⁶. Alguns autores já demonstraram alterações nos índices de metilação de genes essenciais ao neurodesenvolvimento após exposição à cocaína. Em um protocolo de administração aguda à droga seguida de treino de autoadministração, foi possível observar a diminuição da metilação em genes da família Fos, codificadores de fatores de transcrição envolvidos em processos neuroadaptativos, no NAc e região mesocortical de camundongos ²⁶. Em contrapartida, ratos tratados com cocaína de forma crônica apresentaram aumento da metilação do gene *Cdk15* (*Cyclin-dependent kinase-like 5*), uma quinase envolvida nos mecanismos de plasticidade cerebral ^{207,208}.

É provável que os mecanismos através dos quais ocorram alterações nos índices de metilação após exposição à cocaína, sejam uma resposta a ação da droga sobre as proteínas que compõe a maquinaria de metilação ¹⁷⁵. Anier e colaboradores (2010) observaram que a injeção intraperitoneal de cocaína em camundongos adultos foi relacionada ao aumento da transcrição de DNMT3 no NAc e hipocampo. Em estudo semelhante, os autores demonstraram a diminuição do mRNA e da proteína DNMT3 no córtex pré-frontal de camundongos após treinamento de auto-administração de cocaína ²⁰⁹. As proteínas MBDs também são influenciadas pela presença da droga, especialmente a proteína de ligação metil-CpG (MeCP2). Após análise imunohistoquímica do tecido nervoso de camundongos expostos cronicamente a cocaína (6 dias) os pesquisadores demonstraram aumento do número de células positivas para MeCP2 e MBD1 no corpo estriado dorsal e córtex pré-frontal, bem como no giro dentado do hipocampo, reiterando a capacidade da droga de induzir a remodelação da cromatina no tecido nervoso ²¹⁰.

A alterações na metilação do DNA podem ocorrer ao longo da vida, contudo grande parte do perfil epigenômico é definido durante a embriogênese e desenvolvimento fetal ²⁷. Nesse sentido, algumas pesquisas em modelos animais, demonstram alterações nos índices de metilação gênica, após exposição a cocaína intraútero. Mahna e colaboradores (2018) ²¹¹ relataram aumento dos índices de metilação em células hipocâmpais de ratos recém-nascidos expostos a cocaína no ambiente uterino, quando estes foram comparados a recém-nascidos não expostos, o que foi acompanhado por aumento da expressão de DNMT1 e DNMT3a. Em contrapartida, Novikova (2008) ²⁵ observou a diminuição da expressão das metiltransferases 1 e 3 no hipocampo de roedores expostos a cocaína intraútero, bem como a diminuição da atividade da proteína MBD1 e da metilação global de DNA no NAc dos animais no período pós parto imediato.

Em conjunto, os dados apresentados aqui demonstram a sensibilidade epigenômica do período pré-natal a fatores externos como a cocaína, bem como a suscetibilidade do gene *OXTR* a processos epigenéticos. Nesse sentido, considerando a inexistência de estudos investigando os índices de metilação do gene *OXTR* em recém-nascidos expostos a cocaína-crack no período uterino, estudos como esse são de grande valia, visto que aprofundam os conhecimentos a cerca de alterações da sinalização ocitocinérgica em um contexto de dependência química.

3 OBJETIVOS

Investigar os índices de metilação do gene do receptor de ocitocina, *OXTR*, em recém-nascidos expostos a cocaína-crack intraútero.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os índices de metilação do receptor de ocitocina, *OXTR*, entre o sangue de cordão umbilical recém-nascidos expostos a cocaína-crack no período pré-natal e o sangue de cordão umbilical recém-nascidos não expostos a cocaína-crack.
- Investigar se a gravidade do uso materno de cocaína-crack está associada aos índices de metilação do gene *OXTR* no sangue de cordão umbilical dos recém-nascidos expostos a droga.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO

Esta pesquisa caracteriza-se como um estudo transversal, comparativo de dois grupos.

4.2 AMOSTRAS

As amostras incluídas neste estudo consistem em sangue do cordão umbilical (SCU) de recém-nascidos expostos a cocaína-crack intraútero e sangue do cordão umbilical de recém-nascidos não expostos a cocaína-crack intraútero. As amostras biológicas e o banco de dados clínicos e demográficos incluídos nesta pesquisa, foram cedidas a nós pela professora Claudia Maciel Szobot responsável pela coleta das mesmas durante o desenvolvimento de projeto registrado no CEP do HCPA sob número 110095. O uso dessas amostras no presente estudo e todas as questões éticas relacionadas foram autorizadas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS sob o número 2.255.141. Em todas as etapas desta pesquisa nós seguimos todas as condições estabelecidas na Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa e Saúde (CNS), e respeitamos em caráter integral os termos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Ainda, esta pesquisa só foi iniciada após a avaliação e aprovação do CEP PUCRS.

Foram consideradas elegíveis para o grupo de casos, as amostras de sangue de cordão umbilical (SCU) de recém-nascidos de mães que fizeram uso de cocaína-crack durante a gestação. Do total de amostras de sangue de cordão cedidas a nós, 29 foram elegíveis para comporem o grupo de casos do presente estudo. Os critérios de inclusão de amostras para o grupo de casos foram baseados nas informações das gestantes contidas no banco de dados clínicos e sociodemográficos: a) amostras de SCU de recém nascidos de mães que aceitaram participar do estudo original e assinaram o TCLE, b) amostras de SCU de recém nascidos de mães que declararam utilizar cocaína-crack durante a gestação c) amostras de SCU de recém nascidos de mães que apresentaram resultado positivo para cocaína no teste de triagem para drogas d) amostras de SCU de recém nascidos de mães que apresentaram resultados negativos

na investigação sorológica para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), para o Vírus da hepatite C (HCV), para a Sífilis e para qualquer outra doença infectocontagiosa.

O grupo controle de SCU de recém-nascidos sem história de exposição à cocaína-crack foi composta por amostras doadas ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre HCPA, mas que foram descartadas pelo banco devido à baixa celularidade e/ou baixo volume sanguíneo. Os fatores de inclusão neste grupo foram: a) amostras de SCU de recém nascidos de mães que aceitaram participar do estudo original e assinaram o TCLE, b) amostras de SCU de recém nascidos de mães que declaram não utilizar drogas durante a gestação, c) amostras de SCU de recém nascidos de mães que apresentaram resultados negativos nos testes urinários de triagem para drogas (Multi-drogas one step test, INLAB®, Brasil) e d) amostras de SCU de recém nascidos de mães que apresentaram resultados negativos na sorologia para HIV, HCV, Sífilis ou para qualquer doença infectocontagiosa.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: a) baixa qualidade do DNA a partir da análise da pureza e concentração da amostra, bem como do resultado de eletroforese em gel de agarose e b) ausência total ou parcial de informações clínicas e sociodemográficas no banco de dados.

4.3 INSTRUMENTOS DE COLETAS DE DADOS

O banco de dados com as informações da gestante e neonatais cedido a nós, foi coletado através da utilização de escalas e questionários padronizados e validados e aplicados por profissionais capacitados. Utilizando-se formulário padrão, foram coletadas as seguintes informações maternas: idade, etnia autorreferida, realização do acompanhamento pré-natal, escolaridade e nível socioeconômico. O nível socioeconômico foi dicotomizado em “baixo nível socioeconômico” (classes C, D e E) e “alto nível socioeconômico” (classes A e B). A variável etnia autorreferida foi dicotomizada como “branca” e “não branca”. De forma semelhante, o nível educacional foi dicotomizado como “primário iniciado, primário concluído, ou secundário não concluído” e “secundário completo, superior iniciado ou concluído ou pós-graduação”. Através da revisão de prontuários hospitalares foram obtidos os seguintes dados

neonatais: sexo, etnia, peso e pontuação na escala APGAR no 1º e 5º minuto de vida. Outras informações clínicas foram obtidas utilizando-se as escalas abaixo:

- *International Neuropsychiatric Interview (MINI)*

Para avaliar a presença de psicopatologias maternas foi utilizada a escala *International Neuropsychiatric Interview* (MINI) versão Brasileira 5.0.0 (Anexo A). A MINI é uma entrevista diagnóstica estruturada desenvolvida com a intenção de avaliar os principais transtornos psiquiátricos do Eixo I do DSM-IV e da CID-10 de forma simples e breve. Compreende 19 módulos que exploram 17 transtornos do eixo I do DSM-IV ²¹².

- *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST)*

Para avaliação da história de uso de substâncias lícitas e ilícitas do grupo de casos foi utilizada a escala *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test* (ASSIST) (Anexo B), traduzida para o português e validada para a população Brasileira ²¹³²¹⁴. A escala ASSIST permite mensurar a gravidade de uso de substâncias psicoativas e possibilita, a partir da percepção do usuário, determinar quais são os riscos atuais e os futuros problemas decorrentes do uso, além de verificar se o respondente já possui indícios de dependência. Este instrumento é composto por oito questões, sendo que as questões 1 a 7 abordam o uso e os problemas relacionados a substâncias tabaco, álcool, maconha, cocaína/crack, estimulantes, inalantes, hipnóticos/sedativos, alucinógenos e opioides e a questão 8 é voltada ao uso de drogas injetáveis.

Na primeira questão o sujeito entrevistado responde sobre o uso ou não de cada droga. A questão 2 trata a respeito da frequência do uso de cada substância nos últimos três meses. As questões 3 a 6 investigam a frequência com que problemas de saúde, sociais, jurídicos ou financeiros foram causados pelo uso de cada substância psicoativa, bem como o impacto destes problemas na vida do usuário. Cada questão apresenta respostas estruturadas e cada resposta apresenta um valor numérico correspondente. No fim da entrevista, esses valores são somados e obtém-se um escore total da ASSIST para cada substância avaliada, o que representa de forma sensível e específica a gravidade do uso de cada substância e o impacto negativo deste uso na vida do sujeito. A partir dos scores totais pode-se classificar os usuários de acordo com a gravidade do uso: indivíduos com escores até 10 para álcool e até 3 para as outras drogas são considerados usuários de baixa gravidade, ou seja, embora usem substâncias ocasionalmente, eles ainda não percebem e relatam problemas relacionados a esse uso. Usuários com escores

entre 11 e 26 para álcool e entre 4 e 26 para outras drogas podem fazer um uso nocivo ou problemático de substâncias e apresentam gravidade moderada e risco intermediário de desenvolvimento de problemas devido ao uso de drogas. Usuários com escores de 27 ou mais para qualquer droga apresentam alta gravidade e os problemas gerados pela dependência da droga são considerados altamente prejudiciais.

Apesar das classificações geradas por este instrumento de avaliação serem relevantes, nesta pesquisa, as usuárias não foram estratificadas em grupos de acordo com a gravidade de uso de substâncias. Em nossas análises utilizamos o escore da escala ASSIST como variável contínua, de forma semelhante a outros estudos²¹⁵⁻²¹⁷. Esta escolha baseou-se na observação de que, nos escores para cocaína-crack, uma de nossas variáveis principais de análise, 90% (27) das usuárias apresentaram pontuação de 27 ou mais e apenas 10% (2) das usuárias apresentaram pontuação entre 21 e 24. Portanto, de acordo com nossos objetivos, não há justificativa estatística para criação de grupos considerando a gravidade de uso de substâncias.

- *Multi-Drogas One Step Test*

O kit comercializado pela INLAB® possibilita a detecção do uso de seis das principais drogas de abuso: metanfetamina, opiáceos, maconha, anfetamina, cocaína e benzodiazepínicos, com limiares de detecção de 500, 300, 50, 1000, 300 e 300 ng/ml respectivamente. O kit contém tiras reativas, que após serem mergulhadas por dez minutos na urina, detectam se há presença de algum dos metabólitos acima descritos.

4.4 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram coletadas em tubos BD Vacutainer com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e centrifugadas a 4.000 rotações por minuto, por 10 minutos, a 4°C. As células mononucleares foram lisadas e o DNA isolado e purificado utilizando-se *Gentra Puregene Bllod Kit®*, (QIAGEN). O DNA foi então alíquotado em microtubos contendo aproximadamente 200 nanogramas e armazenado a -20 °C. Os microtubos contendo DNA foram então transportados, sob congelamento, para o Grupo de Pesquisa neurociência cognitiva

do desenvolvimento (DCNL) da PUCRS, sob responsabilidade do Prof. Rodrigo Grassi-Oliveira.

4.5 ANÁLISES MOLECULARES

4.5.1 Tratamento com bissulfito de sódio

No DCNL, as alíquotas de DNA foram descongeladas para avaliação da pureza (Abs 260 / 280nm ~ 2,0) e concentração (Nanodrop® Lite) e submetidas ao campo elétrico da eletroforese em gel de agarose 1,5% preparado em tampão TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) e azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 500 pb DNA lambda digerido com Hind III® (Sigma-Aldrich EUA), foi utilizado a fim de definir o tamanho dos fragmentos encontrados. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio a 1 µg/mL e expostos à luz UV (Tranluminador BioAnalyzer® – Agilent) para observação. As amostras que apresentaram resultados satisfatórios a cerca da concentração, pureza e integridade do DNA, foram sujeitadas a reação de bissulfito.

A reação de bissulfito consiste na conversão dos resíduos de citosinas não metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas, dando origem a duas sequências diferentes que podem ser distinguidas. Ainda, as citosinas que não são seguidas por guanina na sequência molde, e, portanto, não são caracterizadas como pontos CpG, não são metiladas e sim convertidas em timina na reação de PCR posterior. Os parâmetros necessários ao sucesso da reação foram alcançados utilizando-se o kit *EpiTect DNA Bisulfite*® (QIAGEN), que fornece um protocolo eficiente para a conversão de até 99,8% das citocinas não metiladas em uracilas. O produto amplificado após reação de bissulfito foi novamente avaliado quanto à pureza e concentração (Nanodrop® Lite). Após, o DNA bissulfitado de cada amostra foi alíquotado (20 nanogramas), congelado a – 80 °C e transportado, sob congelamento, para o Centro de Sequenciamento do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer de São Paulo (CTO-ICESP) para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e pirosequenciamento. Importante ressaltar, que durante o protocolo de conversão de bissulfito o kit provê reagentes responsáveis pela proteção do DNA bissulfitado, garantindo a integridade da amostra após o descongelamento.

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA bissulfitado foram descongeladas sob protocolo de descongelamento lento até alcançarem temperatura de refrigeração (2 °C a 8 °C). Para amplificação específica do *template* de DNA gerado na reação de bissulfito, utilizou-se o *PyroMark PCR Kit®* (QIAGEN) e iniciadores comerciais e específicos para o ensaio: *PyroMark CpG assay®* PM00016821, denominado OXTR1 e *PyroMark CpG assay®* PM00016828, denominado OXTR2 (QIAGEN). Cada kit, OXTR1 e OXTR2, tem como alvo uma sequência situada no éxon III do gene *OXTR* e fornece um iniciador complementar a sequência de interesse e uma sonda reversa biotinilada. As sequências dos iniciadores, as sequências alvo, a localização cromossômica destas sequências e os sítios CpG analisados estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – Especificações dos kits de *primers* OXTR1 e OXTR2.

Especificações	PyroMark CpG assay OXTR1	PyroMark CpG assay OXTR1
Forward (5'-3')	TTTAGGGATATGAGTAGTAGTAGGTAGG	GAGGATTTTGGTTTTGGAGATGAGTT
Reverse (5'-3')	ACCCCTCTTCTTCTTCTTCATAAAACACC	CTTCATCCAACCCTAAAAACCCA
Sequência alvo	AGGCGGTATAGTAGGTGGGTTCTGTAGAAGCGGA	TCTGTAGTAGGTAGCGAGTACGATGATCGGTACGA
Sítios CpG	4 sítios – sublinhados na sequência alvo	5 sítios – sublinhados na sequência alvo
Localização	8809467pb – 8809658 pb	8809533pb – 8809566 pb

O mix utilizado na reação de PCR contendo os reagentes do *PyroMark PCR Kit®* compreendeu: 12,5 µl de *PyroMark PCR Master Mix*, 2,5 µl de *CoralLoad*, 2,5 µl de cada iniciador A e B, 5,5 µl de água RNase DNase free, e 2u (10 nanogramas) do DNA bissulfitado de cada amostra. As condições de ciclagem da reação foram: um passo inicial de ativação da polimerase durante 15 min a 95 ° C, 40 ciclos de 30 s a 94 ° C para desnaturação, 30 s a 56 ° C para anelamento e 30 s a 72 ° C para alongamento. Em todos os ensaios foram incluídos, controle negativo da reação de PCR substituindo os moldes de DNA por água destilada livre de DNase / RNase. Além disso, considerando o controle de qualidade da reação de pirosequenciamento subsequente, foi adicionado em cada reação de PCR (placa) controles

comerciais (QIAGEN) com sequências completamente metiladas (*EpiTect Control DNA, methylated*®) ou completamente não-metiladas (*EpiTect Control DNA, unmethylated*®).

O êxito da reação de PCR, a integridade dos fragmentos gerados e a presença de dímeros de *primers*, foram avaliados pelo resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% preparado em tampão TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) e azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 500 pb DNA lambda digerido com Hind III® (Sigma-Aldrich EUA), foi utilizado a fim de definir o tamanho dos fragmentos encontrados. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio a 1 µg/mL, expostos à luz UV (Tranluminador BioAnalyzer® – Agilent) para avaliação e fotodocumentados.

4.5.3 Reação de pirosequenciamento

Inicialmente isolamos os produtos de PCR biotinilados de fita simples para sequenciamento utilizando esferas de sefarose ligadas a estreptavidina fornecidas pelo kit *Pyromark Gold Q24 reagents*® (QIAGEN) em conjunto com a ferramenta de vácuo Pyrosequencing® (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A seguir, a fita de DNA foi incubada com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase, apirase, e com seus substratos adenosina 5' fosfossulfato e luciferina. Todos os reagentes são providos pelo kit *Pyromark Gold Q24 reagents*®.

Utilizando o sequenciador *Pyromark Q24*®, foram adicionados à reação desoxirribonucleotídeos (dNTP), um a um em ordem específica de acordo com as instruções do fabricante. A DNA polimerase catalisa a incorporação do dNTP na fita de DNA, se este for complementar à fita molde. Cada evento de incorporação é acompanhado pela liberação de pirofosfato (PPi) numa quantidade equivalente à quantidade de nucleotídeo incorporado. ATP sulfúrilase converte PPi em ATP na presença de adenosina 5' fosfossulfato. O ATP gerado é utilizado pela luciferase para conversão de luciferina em oxiluciferina gerando um sinal luminoso em níveis proporcionais à quantidade de ATP. O sequenciador converte o sinal luminoso em um gráfico em forma de pico, chamado pirograma. Os pirogramas a porcentagem de metilação de cada sítio CpG, calculada automaticamente pelo software *Pyromark Q24*® a partir da quantificação dos sinais luminosos gerados durante a reação.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico – SPSS 21.0 (IBM, Chicago, IL, EUA). A normalidade das variáveis maternas e infantis foi investigada através do teste Shapiro-Wilk. As frequências das variáveis dicotômicas em cada grupo foram apresentadas em porcentagem e número absoluto e analisadas através do teste Chi-quadrado. As variáveis contínuas foram apresentadas em média e desvio padrão e para as análises comparativas entre os grupos utilizou-se o Teste *t* de Student's. Para avaliar diferenças nos índices de metilação de *OXTR* entre casos e controles, calculamos a média dos 4 sítios CpG da região coberta pelo conjunto de primers OXTR1 e a média dos 5 sítios CpG da região coberta pelo conjunto de primers OXTR2. Desta forma, os valores das médias geraram as variáveis denominadas OXTR1 e OXTR2. A relação entre as variáveis clínicas e sociodemográficas e os índices de metilação de OXTR1 e OXTR2 foi investigada utilizando-se correlação de Pearson. Para as análises de predição construímos um modelo de regressão linear sendo OXTR1 e OXTR2 as variáveis independentes e o escore total da escala ASSIST para cocaína-crack a variável dependente. Foi considerada diferença estatística quando $p \leq 0,05$ e os valores de *p* foram ajustados utilizando-se a correção de Bonferroni.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo nós focamos na interação entre uso de cocaína-crack no período pré-natal, os níveis de metilação do gene *OXTR* e a gravidade do uso materno da droga. De acordo com estudos anteriores está claro que a cocaína e outras drogas de abuso podem afetar a sinalização de ocitocina através de diversos mecanismos e em diferentes fases da vida, contudo, este é o primeiro estudo avaliando a metilação de *OXTR* em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos expostos a droga. Considerando nossos achados, concluímos que, além da multiplicidade de outros fatores que podem influenciar o epigenoma do feto durante o desenvolvimento embrionário, a gravidade do uso materno de cocaína-crack nos últimos três meses de gestação também está associado ao aumento nos índices de metilação do gene *OXTR*. Conforme outros estudos apresentados aqui, alterações na regulação epigenética da sinalização

de ocitocina, combinadas com outras inúmeras teratologias induzidas pela exposição a cocaína-crack no período embrionário, podem contribuir para fenótipos comportamentais alterados, incluindo disfunções sociais e de comportamentos afiliativos.

Além disso, é importante destacar a relação existente entre o uso de cocaína pela mãe e os prejuízos no desenvolvimento do comportamento materno. O que provavelmente ocorre através dos efeitos da droga na sinalização de OC, responsável pela qualidade e quantidade de cuidados parentais em animais e humanos. Portanto, considerando o controle epigenético do sistema ocitocinérgico e a herdabilidade de padrões de metilação, também é possível que a dinâmica alterada da sinalização materna de ocitocina contribua para alterações fenotípicas na prole, gerando um ciclo contínuo de disfunções sociais e afiliativas entre gerações. Considerando a relevância dos problemas relacionados ao uso de cocaína, as possíveis consequências da exposição pré-natal a droga no sistema ocitocinérgico, e os prejuízos sociais e afiliativos resultantes, os dados apresentados aqui contribuem para o desenvolvimento de estudos futuros que aprofundem a investigação dos mecanismos através dos quais a cocaína-crack interage com a regulação epigenética da sinalização de ocitocina.

REFERÊNCIAS

1. Kuczkowski KM. Anesthetic implications of drug abuse in pregnancy. *J Clin Anesth.* 2003;15(5):382–94.
2. Vucinovic M, Roje D, Vucinovic Z, Capkun V, Bucat M, Banovic I. Maternal and neonatal effects of substance abuse during pregnancy: our ten-year experience. *Yonsei Med J.*
3. Bastos FIPM, Bertoni N. Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? quantos são nas capitais brasileiras? 2014;
4. Cunha G. Exposição pré-natal à cocaína e efeitos neurocomportamentais no recém-nascido. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
5. Smith LM, Santos LS. Perinatal cocaine and methamphetamine exposure: Maternal and neonatal correlates. *Birth Defects Res C Embryo Today*
6. Reith ME, Blough BE, Hong WC, Jones KT, Schmitt KC, Baumann MH, et al. Behavioral, biological, and chemical perspectives on atypical agents targeting the dopamine transporter. *Drug Alcohol Depend*, 2015.
7. Behnke M, Smith VC. Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics*
8. Martin MM, Graham DL, McCarthy DM, Bhide PG, Stanwood GD. Cocaine-induced neurodevelopmental deficits and underlying mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today* 08(2):147–73.
9. Scott-Goodwin AC, Puerto M, Moreno I. Toxic effects of prenatal exposure to alcohol, tobacco and other drugs. *Reprod Toxicol*
10. Oro AS, Dixon SD. Perinatal cocaine and methamphetamine exposure: Maternal and neonatal correlates. *J Pediatr.* 1987;111(4):571–8.
11. Chasnoff IJ, Burns WJ, Schnoll SH, Burns KA. Cocaine use in pregnancy. *N Engl J Med.*

1985;313(11):666–9.

12. Chasnoff, Howard, Schydlower. Cocaine babies. *Manag Healthc Exec.* 1990;34(1):1–8.
13. Rodning C, Beckwith L HJ. Prenatal exposure to drugs: behavioral distortions reflecting CNS impairment? *Neurotoxicology.* 1999;10(3):629–34.
14. Shamay-Tsoory SG, Abu-Akel A. The Social Salience Hypothesis of Oxytocin. *Biol Psychiatry.* 2016;79(3):194–202.
15. Tillman R, Gordon I, Naples A, Rolison M, Leckman JF, Feldman R, et al. Oxytocin Enhances the Neural Efficiency of Social Perception. *Front Hum Neurosci.* 2019;13(March):1–13.
16. Bielsky IF, Young LJ. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides.* 2004;25(9):1565–74.
17. Ferri G-L, Cocco C, Succu S, Boi A, Melis MR, Argiolas A, et al. Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *Eur J Neurosci.* 2007;26(4):1026–35.
18. Succu S, Sanna F, Melis T, Boi A, Argiolas A, Melis MR. Stimulation of dopamine receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces penile erection and increases extra-cellular dopamine in the nucleus accumbens: Involvement of central oxytocin. *Neuropharmacology.* 2007;52(3):1034–43.
19. Melis MR, Succu S, Sanna F, Boi A, Argiolas A. Oxytocin injected into the ventral subiculum or the posteromedial cortical nucleus of the amygdala induces penile erection and increases extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens of male rats. *Eur J Neurosci.* 2009;30(7):1349–57.
20. Sarnyai Z. Oxytocin as a potential mediator and modulator of drug addiction. *Addict Biol.* 2011;199–201.
21. Kovács G, Sarnyai Z, Szabó G. Oxytocin and addiction: A review. *Psychoneuroendocrinology.* 1998;23(8):945–62.

22. Bowen MT, Neumann ID. Rebalancing the Addicted Brain: Oxytocin Interference with the Neural Substrates of Addiction. *Trends Neurosci.* 2017;40(12):691–708.
23. Beery AK, McEwen LM, MacIsaac JL, Francis DD, Kobor MS. Natural variation in maternal care and cross-tissue patterns of oxytocin receptor gene methylation in rats. *Horm Behav.* 2016;77:42–52.
24. Kusui C, Kimura T, Ogita K, Nakamura H, Matsumura Y, Koyama M, et al. DNA methylation of the human oxytocin receptor gene promoter regulates tissue-specific gene suppression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(3):681–6.
25. Novikova SI, He F, Bai J, Cutrufello NJ, Lidow MS, Undieh AS. Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring. *PLoS One.* 2008;3(4):1919.
26. Wright KN, Hollis F, Duclot F, Dossat AM, Strong CE, Francis TC, et al. Methyl supplementation attenuates cocaine-seeking behaviors and cocaine-induced c-Fos activation in a DNA methylation-dependent manner. *J Neurosci.* 2015;35(23):8948–58.
27. O'Donnell K, Meaney J. Fetal origins of mental health: The developmental origins of health and disease hypothesis. *Am J Psychiatry.* 2017;174(4):319–28.
28. Sliker RC, Roost MS, van Iperen L, Suchiman HE, Tobi EW, Carlotti F, et al. DNA Methylation Landscapes of Human Fetal Development. *PLoS Genet.* 2015;11(10):e1005583.
29. Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikuchi T, et al. Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem.* 1994;269(51):32451–6.
30. Day JJ, Childs D, Guzman-karlsson MC, Kibe M, Moulden J, Song E, et al. DNA methylation regulates associative reward learning. *Nat Neurosci.* 2013;(August):1–11.
31. Han J, Li Y, Wang D, Wei C, Yang X, Sui N. Effect of 5-aza-2-deoxycytidine microinjecting into hippocampus and prelimbic cortex on acquisition and retrieval of cocaine-induced place preference in C57BL / 6 mice. *Eur J Pharmacol.* 2010;642(1–3):93–8.
32. Massart R, Barnea R, Dikshtein Y, Suderman M, Meir O, Hallett M, et al. Role of DNA

- Methylation in the Nucleus Accumbens in Incubation of Cocaine Craving. 2015;35(21):8042–58.
33. Robison AJ, Vialou V, Mazei-robison M, Feng J, Kourrich S, Collins M, et al. Behavioral and Structural Responses to Chronic Cocaine Require a Feedforward Loop Involving δ FosB and Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in the Nucleus Accumbens Shell. 2013;33(10):4295–307.
 34. Bodetto SP, Carouge D, Fonteneau M, Dietrich J, Zwiller J, Anglard P. Neuropharmacology Cocaine represses protein phosphatase-1C b through DNA methylation and Methyl-CpG Binding Protein-2 recruitment in adult rat brain. Neuropharmacology. 2013;73:31–40.
 35. Dinis-Oliveira RJ. Metabolomics of cocaine: implications in toxicity. Toxicol Mech Methods. 2015;25(6):494–500.
 36. Fernandes S, Gonc G, Bairros V De, Yonamine M. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. 2015;247:48–53.
 37. Broderick PA, Rosenbaum T. Sex-Specific Brain Deficits in Auditory Processing in an Animal Model of Cocaine-Related Schizophrenic Disorders. Brain Sci. 1997
 38. De Giovanni N, Marchetti D. Cocaine and its metabolites in the placenta: a systematic review of the literature. Reprod Toxicol. 2012;33(1):1–14.
 39. dela Pena I, Gevorkiana R, Shi WX. Psychostimulants affect dopamine transmission through both dopamine transporter-dependent and independent mechanisms. Eur J Pharmacol. 2015;764:562–70.
 40. Borroto-Escuela DO, Wydra K, Filip M, Fuxe K. A2AR-D2R Heteroreceptor Complexes in Cocaine Reward and Addiction. Trends Pharmacol Sci. 2018;39(12):1008–20.
 41. Galaj E, Ewing S, Ranaldi R. Dopamine D1 and D3 receptor polypharmacology as a potential treatment approach for substance use disorder. Neurosci Biobehav Rev 2018;89(March):13–28.
 42. Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS. Reward Circuitry in Addiction.

- Neurotherapeutics. 2017;14(3):687–97.
43. Lüscher C. The Emergence of a Circuit Model for Addiction. *Annu Rev Neurosci.* 2016;39(1):257–76.
 44. Kim HJ, Lee H, Yun K, Kim J-H. Minireview Alterations in Striatal Circuits Underlying Addiction-Like Behaviors. *Mol Cells.* 2017;40(6):379.
 45. McDougall SA, Rudberg KN, Veliz A, Dhargalkar JM, Garcia AS, Romero LC, et al. Importance of D1 and D2 receptor stimulation for the induction and expression of cocaine-induced behavioral sensitization in preweanling rats. *Behav Brain Res.* 2017 May;326:226–36.
 46. Kuhar MJ, Pilotte NS. Neurochemical changes in cocaine withdrawal. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17(7):260–4.
 47. Homberg JR, Wardeh G, Raasø HS, Schoffelmeer ANM, De Vries TJ. Neuroadaptive changes in mesocorticolimbic dopamine and acetylcholine neurons following cocaine or saline self-administration are dependent on pre-existing individual differences. *Neuroscience.* 2003;121(4):829–36.
 48. Neuhofer D, Kalivas P. Metaplasticity at the addicted tetrapartite synapse: A common denominator of drug induced adaptations and potential treatment target for addiction. *Neurobiol Learn Mem.* 2018;154(February):97–111.
 49. Wiskerke J, Schoffelmeer ANM, De Vries TJ. Response contingency directs long-term cocaine-induced neuroplasticity in prefrontal and striatal dopamine terminals. *Eur Neuropsychopharmacol* 2016;26(10):1667–72.
 50. Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2002;78(3):637–47.
 51. Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology.* 2004;47:61–79.
 52. Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci.* 2005;8(11):1481–9.

53. Kalivas PW, O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):166–80.
54. Walters CL, Kuo Y, Blendy JA. Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. 2003;1237–44.
55. dos Santos JF, de Melo Bastos Cavalcante C, Barbosa FT, Gitaí DLG, Duzzioni M, Tilelli CQ, et al. Maternal, fetal and neonatal consequences associated with the use of crack cocaine during the gestational period: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2018;298(3):487–503.
56. Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MM, Guinsburg R, Laranjeira R. Teenage pregnancy: use of drugs in the third trimester and prevalence of psychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28(2):122–5.
57. Cunha GB da, Rotta NT, Silva AR, Dieder AL, Wolf AL, Moser C, et al. Prevalência da exposição pré-natal à cocaína em uma amostra de recém-nascidos de um hospital geral universitário. *J Pediatr (Rio J)*;77(5):369–73.
58. Rutherford HJV, Williams SK, Moy S, Mayes LC, Johns JM. Disruption of maternal parenting circuitry by addictive process: Rewiring of reward and stress systems. *Front Psychiatry*. 2011;2(JUL):1–17.
59. Pichini S, Puig C, Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Murillo J, et al. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the “Meconium Project.” *Forensic Sci Int*. 2005;153(1):59–65.
60. Woods Jr. JR, Scott KJ, Plessinger MA. Pregnancy enhances cocaine's actions on the heart and within the peripheral circulation. *Am J Obs Gynecol*. 1994;170(4):1025–7.
61. Lester BM, Corwin MJ, Sepkoski C, Seifer R, Peucker M, McLaughlin S, et al. Neurobehavioral syndromes in cocaine-exposed newborn infants. *Child Dev*. 1991;62(4):694–705.
62. Janisse JJ, Bailey BA, Ager J, Sokol RJ. Alcohol, tobacco, cocaine, and marijuana use: relative contributions to preterm delivery and fetal growth restriction. *Subst Abus*. 2014;35(1):60–7.
63. Gewolb IH, Fishman D, Qureshi MA, Vice FL. Coordination of suck-swallow-respiration in infants born to mothers with drug-abuse problems. *Dev Med Child Neurol*.

2004;46(10):700–5.

64. Singer LT, Eisengart LJ, Minnes S, Noland J, Jey A, Lane C, et al. Prenatal cocaine exposure and infant cognition. *Infant Behav Dev.* 2005;28(4):431–44.
65. Howell EM, Heiser N, Harrington M. A review of recent findings on substance abuse treatment for pregnant women. *J Subst Abus Treat.* 1999;16(3):195–219.
66. Frank DA, Augustyn M, Knight WG, Pell T, Zuckerman B. Growth, development, and behavior in early childhood following prenatal cocaine exposure: a systematic review. *JAMA* 2001;285(12):1613–25.
67. Bandstra ES, Morrow CE, Mansoor E, Accornero VH. Prenatal drug exposure: infant and toddler outcomes. *J Addict Dis.* 2010;29(2):245–58.
68. Sheinkopf SJ, Lester BM, Sanes JN, Eliassen JC, Hutchison ER, Seifer R, et al. Functional MRI and response inhibition in children exposed to cocaine in utero. Preliminary findings. *Dev Neurosci* 8. 2009;31(1–2):159–66.
69. Meeyoung O. Min, Sonia Minnes, Adelaide Lang, Paul Weishampel, Elizabeth J. Short, Susan Yoon LTS. Externalizing Behavior and Substance Use Related Problems at 15 Years in Prenatally Cocaine Exposed Adolescents. 2014;37(6):269–79.
70. Gerteis J, Chartrand M, Martin B, Cabral HJ, Rose-Jacobs R, Crooks D, et al. Are there effects of intrauterine cocaine exposure on delinquency during early adolescence? A preliminary report. *J Dev Behav Pediatr.* 2011;32(5):393–401.
71. Minnes S, Singer L, Mina MO, Langa AM, Ben-Harushd A, Shortc E, et al. Comparison of 12-Year-Old Children with Prenatal Exposure to Cocaine and Non-Exposed Controls on Caregiver Ratings of Executive Function. 2015;185(2):974–81.
72. Buckingham-Howes SBSSSLABMM. Systematic Review of Prenatal Cocaine Exposure and Adolescent Development. *Tehran Univ Med J.* 2013;70(11):709–16.
73. Abraham E, Hendler T, Zagoory-Sharon O, Feldman R. Network integrity of the parental brain in infancy supports the development of children's social competencies. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 2016;11(11):1707–18.

74. Sobrian SK, Holson RR. Social behavior of offspring following prenatal cocaine exposure in rodents: A comparison with prenatal alcohol. *Front Psychiatry*. 2011;2(NOV):1–17.
75. Buisman-Pijlman FTA, Sumracki NM, Gordon JJ, Hull PR, Carter CS, Tops M. Individual differences underlying susceptibility to addiction: Role for the endogenous oxytocin system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;119:22–38.
76. McGregor IS, Bowen MT. Breaking the loop: Oxytocin as a potential treatment for drug addiction. *Horm Behav*. 2012;61(3):331–9.
77. Kovács GL, Van Ree JM. Behaviorally active oxytocin fragments simultaneously attenuate heroin self-administration and tolerance in rats. *Life Sci*. 1985;37(20):1895–900.
78. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001;81(2):629–83.
79. Weisman O, Zagoory-Sharon O, Schneiderman I, Gordon I, Feldman R. Plasma oxytocin distributions in a large cohort of women and men and their gender-specific associations with anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(5):694–701.
80. Love TM. Oxytocin, motivation and the role of dopamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;119:49–60.
81. Strunecka A, Hynie S, Klenerova V. Role of oxytocin/oxytocin receptor system in regulation of cell growth and neoplastic processes. *Folia Biol*. 2009;55(5):159–65.
82. Wu N, Li Z, Su Y. The association between oxytocin receptor gene polymorphism (OXTR) and trait empathy. *J Affect Disord*. 2012;138(3):468–72.
83. Zhao Q, Hou J, Chen B, Shao X, Zhu R, Bu Q, et al. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *J Neurosci*. 2012;35(2):629–83.
84. Vaidyanathan R, Hammock EAD. Oxytocin receptor dynamics in the brain across development and species. *Dev Neurobiol*. 2017;77(2):143–57.

85. Jurek B, Neumann ID. The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1805–908.
86. Bakos J, Srancikova A, Havranek T, Bacova Z. Molecular Mechanisms of Oxytocin Signaling at the Synaptic Connection. *Neural Plast.* 2018;2018:1–9.
87. Long C, Hu J, Wang Z, Schiller D, Feng X. Post-retrieval oxytocin facilitates next day extinction of threat memory in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 2018;
88. Lin YT, Hsu K Sen. Oxytocin receptor signaling in the hippocampus: Role in regulating neuronal excitability, network oscillatory activity, synaptic plasticity and social memory. *Prog Neurobiol* 2018;171(1):1–14.
89. Gard PR, Naylor C, Ali S, Partington C. Blockade of pro-cognitive effects of angiotensin IV and physostigmine in mice by oxytocin antagonism. *Eur J Pharmacol.* 2012;683(1–3):155–60.
90. Guastella AJ, Mitchell PB, Mathews F. Oxytocin enhances the encoding of positive social memories in humans. *Biol Psychiatry.* 2008;64(3):256–8.
91. Savaskan E, Ehrhardt R, Schulz A, Walter M, Schachinger H. Post-learning intranasal oxytocin modulates human memory for facial identity. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(3):368–74.
92. Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M. Roles of Oxytocin Neurones in the Control of Stress, Energy Metabolism, and Social Behaviour. *J Neuroendocrinol.* 2012;24(4):587–98.
93. Kirsch P, Esslinger C, Chen Q, Mier D, Lis S, Siddhanti S, et al. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J Neurosci.* 2005;25(49):11489–93.
94. Kudwa AE, McGivern RF, Handa RJ. Estrogen receptor beta and oxytocin interact to modulate anxiety-like behavior and neuroendocrine stress reactivity in adult male and female rats. *Physiol Behav.* 2014;129:287–96.
95. Bredewold R, Smith CJW, Dumais KM, Veenema AH, Sullivan RM, Kline N. Sex-specific modulation of juvenile social play behavior by vasopressin and oxytocin depends on social context. 2014;8(June):1–11.

96. Smith CJW, Poehlmann ML, Li S, Ratnaseelan AM, Bredewold R, Veenema AH. Age and sex differences in oxytocin and vasopressin V1a receptor binding densities in the rat brain : focus on the social decision- making network. *Brain Struct Funct*. 2016;
97. Ebert, Andreas MB. Oxytocin and Social Cognition. *Behav Pharmacol Neuropeptides*. 2017;5(4)35.
98. Hurlemann AP. Social Cognition. *Cogn Enhanc*. 2015;228.
99. Kumar J, J. Iwabuchi S, A. Völm B, Palaniyappan L. Oxytocin modulates the effective connectivity between the precuneus and the dorsolateral prefrontal cortex. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2019;0(0)
100. Ebner NC, Chen H, Porges E, Lin T, Feifel D, Cohen RA, et al. Oxytocin's Effect on Resting-State Functional Connectivity Varies by Age and Sex. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;69:50–9.
101. Veenema AH, Neumann ID. Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. *Prog Brain Res*. 2008;170(08):261–76.
102. Oettl L, Ravi N, Schneider M, Scheller MF, Mitre M, Gouveia S, et al. Oxytocin Enhances Social Recognition by Modulating Cortical Control of Early Olfactory Processing. *Neuron*. 2016;90(3):609–21.
103. Hammock EAD. Developmental perspectives on oxytocin and vasopressin. *Neuropsychopharmacology* 2015;40(1):24–42.
104. Cardoso C, Orlando M, Brown C, Ellenbogen M. Oxytocin and enhancement of the positive valence of social affiliation memorie. 2014;9(2):186–95.
105. Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005;435(7042):673–6.
106. Bosch OJ, Young LJ. Oxytocin and Social Relationships: From Attachment to Bond Disruption. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017;35.

107. Yoshihara C, Numana M, Kuroda KO. Oxytocin and Parental Behaviors. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017.
108. Hurlemann A, Patin S, Dirk R. Oxytocin and Interpersonal Relationships. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017;35.
109. Schneiderman I, Zagoory-Sharon O, Leckman JF, Feldman R. Oxytocin during the initial stages of romantic attachment: Relations to couples' interactive reciprocity. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(8):1277–85.
110. Scheele D, Wille A, Kendrick KM, Becker B, Hurlemann R, Maier W, et al. Oxytocin enhances brain reward system responses in men viewing the face of their female partner. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(50):20308–13.
111. Feldman R, Bakermans-Kranenburg MJ. Oxytocin: a parenting hormone. *Curr Opin Psychol*. 2017;15:13–8.
112. Bridges RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocr*. 2015;36:178–96.
113. Ross HE, Freeman SM, Spiegel LL, Ren X, F E, Young LJ. Variation in oxytocin receptor density in the nucleus accumbens has differential effects on affiliative behaviors in monogamous and polygamous voles. *October*. 2009;29(5):1312–8.
114. Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, et al. Central oxytocin receptors mediate mating-induced partner preferences and enhance correlated activation across forebrain nuclei in male prairie voles. *Horm Behav*. 2017;165(7):1789–802.
115. Insel TR, Hulihan TJ. A Gender-Specific Mechanism for Pair Bonding: Oxytocin and Partner Preference Formation in Monogamous Voles. *Behav Neurosci*. 1995;109(4):782–9.
116. Torregrossa M, Taylor RJ. Neuroscience of learning and memory for addiction medicine: from habit formation to memory reconsolidation. *Prog Brain Res*. 2016;223:91–113.
117. Hikida T, Morita M, Macpherson T. Neural mechanisms of the nucleus accumbens circuit in reward and aversive learning. *Neurosci Res*. 2016;108:1–5.

118. Barrett LF, Salcedo S, Catana C, Feldman R, Dickerson BC, Touroutoglou A, et al. Dopamine in the medial amygdala network mediates human bonding. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(9):2361–6.
119. Insel TR, Cascio C, Gingrich B, Wang Z, Liu Y. Dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens are important for social attachment in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Neurosci*. 2005;114(1):173–83.
120. Aragona B, Yu L, Curtis J, Insel T, Wang Z. Nucleus accumbens dopamine differentially mediates the formation and maintenance of monogamous pair bonds. *Nat Neurosci*. 2006;9(1):133–9.
121. Liu Y, Wang ZX. Nucleus accumbens oxytocin and dopamine interact to regulate pair bond formation in female prairie voles. *Neuroscience*. 2003;121(3):537–44.
122. Post C, Leuner B. The maternal reward system in postpartum depression. *Arch Womens Ment Health*. 2018;
123. Marlin BJ, Chao M V., Aoki CJ, Norden SE, Hackett TA, Mitre M, et al. A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors. *J Neurosci*. 2016;36(8):2517–35.
124. Baskerville TA, Douglas AJ. Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: Potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neurosci Ther*. 2010;16(3):92–123.
125. Baracz SJ, Cornish JL. Oxytocin modulates dopamine-mediated reward in the rat subthalamic nucleus. *Horm Behav*. 2013;63(2):370–5.
126. Reynaud M, Karila L, Blecha L, Benyamina A. Is love passion an addictive disorder. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2010;36(5):261–7.
127. Insel TR. Is social attachment an addictive disorder? *Physiol Behav*. 2003;79(3):351–7.
128. Nelson EE, Pankseep J. Brain Substrates of Infant–Mother Attachment: Contributions of Opioids, Oxytocin, and Norepinephrine. 1998;22(3):437–452.
129. Wang Z, Gobrogge KL, Young KA, Wang H, Liu Y. Oxytocin Reverses Amphetamine-

- Induced Deficits in Social Bonding: Evidence for an Interaction with Nucleus Accumbens Dopamine. *J Neurosci*. 2014;34(25):8499–506.
130. Burkett JP, Young LJ. The behavioral, anatomical and pharmacological parallels between social attachment, love and addiction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;224(1):1–26.
 131. Francis DD, Champagne FC, Meaney MJ. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J Neuroendocrinol*. 2000;12(12):1145–8.
 132. McMurray M, Joyner P, Middleton C, Jarrett T, DL E, MA B, et al. Intergenerational effects of cocaine on maternal aggressive behavior and brain oxytocin in rat dams. *Stress*. 2008;11(5):398–410.
 133. Lee MR, Glassman M, King-Casas B, Kelly DL, Stein EA, Schroeder J, et al. Complexity of oxytocin's effects in a chronic cocaine dependent population. *Eur Neuropsychopharmacol*;24(9):1483–91.
 134. Strathearn L, Mayes LC. Cocaine addiction in mothers: Potential effects on maternal care and infant development. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1187:172–83.
 135. Sanvicente-Vieira B, Kluwe-Schiavon B, Grassi-Oliveira R. Theory of Mind Impairments in Women With Cocaine Addiction. *J Stud Alcohol Drugs*. 2017;72(2):258–67.
 136. Hulka LM, Eisenegger C, Preller KH, Vonmoos M, Jenni D, Bendrick K, et al. Altered social and non-social decision-making in recreational and dependent cocaine users. *Psychol Med*. 2013;44(05):1015–28.
 137. Prellera K, Herdenera M, Schilbachb L, Stämpfli P, Hulkaa LM, Vonmoosa M, et al. Functional changes of the reward system underlie blunted response to social gaze in cocaine users. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(7):2842–7.
 138. Ersche KD, Hagan CC, Smith DG, Jones PS, Calder AJ, Williams GB. In the face of threat: Neural and endocrine correlates of impaired facial emotion recognition in cocaine dependence. *Transl Psychiatry* 2015;5(5):e570–10.

139. Kuypers KPC, Steenbergen L, Theunissen EL, Toennes SW, Ramaekers JG. Emotion recognition during cocaine intoxication. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(11):1914–21.
140. Williams SK, Barber JS, Jamieson-Drake AW, Enns JA, Townsend LB, Walker CH, et al. Chronic cocaine exposure during pregnancy increases postpartum neuroendocrine stress responses. *J Neuroendocr.* 2014;24(4):701–11.
141. Kumsta R, Hummel E, Chen FS, Heinrichs M. Epigenetic regulation of the oxytocin receptor gene: implications for behavioral neuroscience. *Front Neurosci.* 2013;7:83.
142. Tops S, Habel U, Radke S. Genetic and epigenetic regulatory mechanisms of the oxytocin receptor gene (OXTR) and the (clinical) implications for social behavior. *Horm Behav.* 2018;
143. Hedges DJ, Hamilton-Nelson KL, Sacharow SJ, Nations L, Beecham GW, Kozhekbaeva ZM, et al. Evidence of novel fine-scale structural variation at autism spectrum disorder candidate loci. *Mol Autism.* 2012;3(1):2.
144. Gregory SG, Connelly JJ, Towers AJ, Johnson J, Biscocho D, Markunas CA, et al. Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Med.* 2009;
145. Wang H, Duclot F, Liu Y, Wang Z, Kabbaj M. Histone deacetylase inhibitors facilitate partner preference formation in female prairie voles. 2013;16(7):919–924.
146. Glendining KA, Jasoni CL. Maternal high fat diet-induced obesity modifies histone binding and expression of oxtr in offspring hippocampus in a sex-specific manner. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2).
147. Nöthling J, Malan-Müller S, Abrahams N, Hemmings SMJ, Seedat S. Epigenetic alterations associated with childhood trauma and adult mental health outcomes: A systematic review. *World J Biol Psychiatry* 2019;0(0):1–58.
148. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. 1999;22:231–8.
149. Faber K, Mueller PJ, Hotz-Wagenblatt A, Risch A, Glatting K-H. Genome-wide

- prediction of splice-modifying SNPs in human genes using a new analysis pipeline called AASSites. *BMC Bioinformatics* 2011;12(Suppl 4):S2.
150. Fredman D, Sarah L. S, Mottagui S, Kidd KK, Wahlestedt C, Chanock SJ, et al. Nonsynonymous SNPs: Validation Characteristics, Derived Allele Frequency Patterns, and Suggestive Evidence for Natural Selection. *Hum Mutat.* 2007;28(6):540–53.
 151. Frazer K.A, Ballinger D.G, Cox D, Hinds R, Stuve D.A, Gibbs R, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449(7164):851–61.
 152. Saphire-Bernstein S, Way BM, Kim HS, Sherman DK, Taylor SE. Oxytocin receptor gene (OXTR) is related to psychological resources. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(37):15118–22.
 153. Skuse DH, Young LJ, Conneely KN, Binder EB, Lee I, Lehtimäki T, et al. Common polymorphism in the oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with human social recognition skills. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;111(5):1987–92.
 154. Tost H, Kolachana B, Hakimi S, Lemaitre H, Verchinski BA, Mattay VS, et al. A common allele in the oxytocin receptor gene (OXTR) impacts prosocial temperament and human hypothalamic-limbic structure and function. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(31):13936–41.
 155. Kim HS, Sherman DK, Sasaki JY, Xu J, Chu TQ, Ryu C, et al. Culture, distress, and oxytocin receptor polymorphism (OXTR) interact to influence emotional support seeking. 2010;107(36):15717–21.
 156. Bakermans-kranenburg MJ, Ijzendoorn MH Van. Oxytocin receptor (OXTR) and serotonin transporter (5-HTT) genes associated with observed parenting. 2008;128–34.
 157. Feldman R, Zagoory-Sharon O, Weisman O, Schneiderman I, Gordon I, Maoz R, et al. Sensitive parenting is associated with plasma oxytocin and polymorphisms in the OXTR and CD38 genes. *Biol Psychiatry* 2012;72(3):175–81.
 158. Cost KT, Unternaehrer E, Plamondon A, Steiner M, Meaney M, Atkinson L, et al. Thinking and Doing: The Effects of Dopamine and Oxytocin Genes and Executive Function on Mothering Behaviours. *Genes Brain Behav.* 2017;16(2):285–95.
 159. Park J, Willmott M, Vetuz G, Toye C, Kirley A, Hawi Z, et al. Evidence that genetic

- variation in the oxytocin receptor (OXTR) gene influences social cognition in ADHD. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*, 2010;34(4):697–702.
160. Uzefovsky F, Bethlehem RAI, Shamay-Tsoory S, Ruigrok A, Holt R, Spencer M, et al. The oxytocin receptor gene predicts brain activity during an emotion recognition task in autism. *Mol Autism*. 2019;10(1):1–13.
 161. de Oliveira Pereira Ribeiro L, Vargas-Pinilla P, Kappel DB, Longo D, Ranzan J, Becker MM, et al. Evidence for Association Between OXTR Gene and ASD Clinical Phenotypes. *J Mol Neurosci*. 2018;65(2):213–21.
 162. Montag C, Sindermann C, Melchers M, Jung S, Luo R, Becker B, et al. A functional polymorphism of the OXTR gene is associated with autistic traits in Caucasian and Asian populations. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2017;174(8):808–16.
 163. LoParo D, Waldman ID. The oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2015;20(5):640–6.
 164. Yamasue H. Function and structure in social brain regions can link oxytocin-receptor genes with autistic social behavior. *Brain Dev*. 2013;35(2):111–8.
 165. Jacob S, Brune CW, Carter CS, Leventhal BL, Lord C, Jr. EHC. Association of the Oxytocin Receptor Gene (OXTR) in Caucasian Children and Adolescents with Autism. 2007;417(1):6–9.
 166. Muir K, Berall L, Nowrouzi B, Choi E, Kennedy JL. Childhood aggression , callous-unemotional traits and oxytocin genes. 2012;125–32.
 167. Dadds M, Moul C, Cauchi A, Dobson-Stone C, Hawes D, Brennan J, et al. Polymorphisms in the oxytocin receptor gene are associated with the development of psychopathy. *Dev Psychopathol*, 2014;26(1):21–31.
 168. Hovey D, Lindstedt M, Zettergren A, Jonsson L, Johansson A, Melke J, et al. Antisocial behavior and polymorphisms in the oxytocin receptor gene : findings in two independent samples. *Nat Publ Gr* 2015;(July):1–6.
 169. Lucas-thompson RG, Holman EA. Hormones and Behavior Environmental stress, oxytocin receptor gene (OXTR) polymorphism, and mental health following collective

- stress. *Horm Behav* 2013;63(4):615–24.
170. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68–74.
 171. Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *The Lancet*. 2018.
 172. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013.
 173. Auclair G, Weber M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* 2012;94(11):2202–11.
 174. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet* 2018;19(2):81–92.
 175. Gigeck CO, Chen ES, Smith MA. Methyl-CpG-Binding Protein (MBD) Family: Epigenomic Read-Outs Functions and Roles in Tumorigenesis and Psychiatric Diseases. *J Cell Biochem*. 2016;117(1):29–38.
 176. Illingworth, Kerr, Desousa D, Jorgensen H, Ellis P, Stalker J, et al. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol*. 2008;6(1):e22.
 177. Reiner I, Van IJzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Bleich S, Beutel M, Frieling H. Methylation of the oxytocin receptor gene in clinically depressed patients compared to controls: The role of OXTR rs53576 genotype. *J Psychiatr Res*. 2015;65:9–15.
 178. Kim YR, Kim JH, Kim MJ, Treasure J. Differential methylation of the oxytocin receptor gene in patients with anorexia nervosa: a pilot study. *PLoS One*. 2014;9(2):e88673.
 179. Milaniak I, Cecil CAM, Barker ED, Relton CL, Gaunt TR, McArdle W, et al. Variation in DNA methylation of the oxytocin receptor gene predicts children's resilience to prenatal stress. *Dev Psychopathol*. 2017;29(05):1663–74.
 180. Gouin JP, Zhou QQ, Booij L, Boivin M, Côté SM, Hébert M, et al. Associations among oxytocin receptor gene (OXTR) DNA methylation in adulthood, exposure to early life

- adversity, and childhood trajectories of anxiousness. *Sci Rep*. 2017;
181. Ziegler C, Dannlowski U, Bräuer D, Stevens S, Laeger I, Wittmann H, et al. Oxytocin Receptor Gene Methylation: Converging Multilevel Evidence for a Role in Social Anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(6):1528–38.
 182. Dadds MR, Moul C, Cauchi A, Dobson-Stone C, Hawes DJ, Brennan J, et al. Methylation of the oxytocin receptor gene and oxytocin blood levels in the development of psychopathy. *Dev Psychopathol*. 2014;26(1):33–40.
 183. Puglia MH, Connelly JJ, Morris JP. Epigenetic regulation of the oxytocin receptor is associated with neural response during selective social attention. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1).
 184. Jack A, Connelly JJ, Morris JP. DNA methylation of the oxytocin receptor gene predicts neural response to ambiguous social stimuli. *Front Hum Neurosci*. 2012;6(October):1–7.
 185. Cushing BS, Kramer KM. Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: the role of neuropeptides and steroids. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(7):1089–105.
 186. Unternaehrer, Luers, Mill, Dempster E, Meyer AH, Staehli S, et al. Dynamic changes in DNA methylation of stress-associated genes (OXTR, BDNF) after acute psychosocial stress. *Transl Psychiatry* 2012;2:e150.
 187. Gregory C, Lough S, Stone V, Erzinclioglu S, Martin L, Baron-Cohen S, et al. Theory of mind in patients with frontal variant frontotemporal dementia and Alzheimer's disease: theoretical and practical implications. *Brain* 2002;125(Pt 4):752–64.
 188. Cappi C, Diniz JB, Requena GL, Lourenço T, Lisboa BCG, Batistuzzo MC, et al. Epigenetic evidence for involvement of the oxytocin receptor gene in obsessive-compulsive disorder. *BMC Neurosci*. 2016;17(1):1–8.
 189. Chagnon YC, Potvin O, Hudon C, Prévile M. DNA methylation and single nucleotide variants in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and oxytocin receptor (OXTR) genes are associated with anxiety/depression in older women. *Front Genet*. 2015;6(JUN):1–9.
 190. Unternaehrer E, Bolten M, Nast I, Staehli S, Meyer AH, Dempster E, et al. Maternal

- adversities during pregnancy and cord blood oxytocin receptor (OXTR) DNA methylation. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2016;11(9):1460–70.
191. Cecil CA, Lysenko LJ, Jaffee SR, Pingault JB, Smith RG, Relton CL, et al. Environmental risk, Oxytocin Receptor Gene (OXTR) methylation and youth callous-unemotional traits: a 13-year longitudinal study. *Mol Psychiatry* 2014;19(10):1071–7.
 192. Lozano J, Garcia-Algar O, Vall O, De La Torre R, Scaravelli G, Pichini S. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit*. 2007;29(6):711–34.
 193. Knopik VS, Marceau K, Bidwell LC, Rolan E. Prenatal substance exposure and offspring development: Does DNA methylation play a role? *Neurotoxicol Teratol*. 2018;(January).
 194. Hackett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci*. 2013;368(1609):20110328.
 195. Bouwland-Both MI, van Mil NH, Tolhoek CP, Stolk L, Eilers PHC, Verbiest MMPJ, et al. Prenatal parental tobacco smoking, gene specific DNA methylation, and newborns size: the Generation R study. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):1–11.
 196. Concheiro M, González-Colmenero E, Lendoiro E, Concheiro-Guisán E, De Castro A, Cruz-Landeira A, et al. Alternative matrices for cocaine, heroin, and methadone in utero drug exposure detection. *Ther Drug Monit*. 2013;35(4):502–9.
 197. Marin SJ, Metcalf A, Krasowski MD, Linert BS, Clark CJ, Strathmann FG, et al. Detection of neonatal drug exposure using umbilical cord tissue and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Ther Drug Monit*. 2014;36(1):119–24.
 198. Colby JM. Comparison of umbilical cord tissue and meconium for the confirmation of in utero drug exposure. *Clin Biochem*. 2017;50(13–14):784–90.
 199. Palmer KL, Wood KE, Krasowski MD. Evaluating a switch from meconium to umbilical cord tissue for newborn drug testing: A retrospective study at an academic medical center. *Clin Biochem*. 2017;50(6):255–61.
 200. Zakarya R, Adcock I, Oliver BG. Epigenetic impacts of maternal tobacco and e-vapour

- exposure on the offspring lung. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):1–11.
201. Joubert BR, Haberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Env Heal Perspect*. 2012;120(10):1425–31.
 202. Bager H, Christensen LP, Husby S, Bjerregaard L. Biomarkers for the Detection of Prenatal Alcohol Exposure: A Review. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017;41(2):251–61.
 203. Muggli E, O’Leary C, Forster D, Anderson P, Lewis S, Nagle C, et al. Study protocol: Asking QUestions about Alcohol in pregnancy (AQUA): A longitudinal cohort study of fetal effects of low to moderate alcohol exposure. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14(1).
 204. Mandal C, Halder D, Jung KH, Chai YG. Gestational alcohol exposure altered DNA methylation status in the developing fetus. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
 205. Davies M, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, et al. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol*. 2016;13(6):43.
 206. Cecil, Walton, Smith, Viding E, McCrory EJ, Relton CL, et al. DNA methylation and substance-use risk: a prospective, genome-wide study spanning gestation to adolescence. *Transl Psychiatry*. 2016;6(12):e976.
 207. Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, et al. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 2006;70(2):487–92.
 208. Carouge D, Host L, Aunis D, Zwiller J, Anglard P. CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiol Dis*. 2010;38(3):414–24.
 209. Tian W, Zhao M, Li M, Song T, Zhang M, Quan L, et al. Reversal of cocaine-conditioned place preference through methyl supplementation in mice: altering global DNA methylation in the prefrontal cortex. *PLoS One*. 2012;7(3):e33435.
 210. Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci*.

2010;13(9):1120–7.

211. Mahna D, Puri S, Sharma S. DNA methylation signatures: Biomarkers of drug and alcohol abuse. *Mutat Res Mutat Res*. 2018;777(May):19–28.
212. Amorim P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validation of a short structured diagnostic psychiatric interview. *Rev Bras Psiquiatr* 2000;22(3)106-15. 2000;22(3):106–15.
213. Henrique IF, De Micheli D, Lacerda RB, Lacerda LA, Formigoni ML. [Validation of the Brazilian version of Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST)]. *Rev Assoc Med Bras*. 2004;50(2):199–206.
215. Pereira CM, Pacagnella RC, Parpinelli MA, Andreucci CB, Zanardi DM, Souza R, et al. Drug Use during Pregnancy and its Consequences: A Nested Case Control Study on Severe Maternal Morbidity TT - Uso de drogas na gestação e suas consequências: um estudo de caso-controle aninhado sobre morbidade materna grave. *Rev Bras Ginecol e Obs*. 2018;40(9):518–26.
216. Parcianello RR, Ceresér KMM, Rhode LAP, Pechansky F, Szobot CM, Mardini V, et al. Increased cocaine and amphetamine-regulated transcript cord blood levels in the newborns exposed to crack cocaine in utero. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018;235(1):215–22.
217. Gilmore D, Zorland J, Akin J, Johnson JA, Emshoff JG, Kuperminc GP. Mortality risk in a sample of emergency department patients who use cocaine with alcohol and/or cannabis. *Subst Abus*. 2018;39(3):266–70.

ANEXO A- Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST).

Nome: _____ Registro _____

Entrevistador: _____ DATA: ____/____/____

ASSIST - OMS

1. Na sua vida qual(is) dessa(s) substâncias você já usou? (somente uso não prescrito pelo médico)	NÃO	SIM
a. derivados do tabaco	0	3
b. bebidas alcoólicas	0	3
c. maconha	0	3
d. cocaína, crack	0	3
e. anfetaminas ou éxtase	0	3
f. inalantes	0	3
g. hipnóticos/sedativos	0	3
h. alucinógenos	0	3
i. opióides	0	3
j. outras, especificar	0	3

- Se "NÃO" em todos os itens investigue:
Nem mesmo quando estava na escola?
- Se "NÃO" em todos os itens, pare a entrevista
- Se "SIM" para alguma droga, continue com as demais questões

3. Durante os três últimos meses, com que frequência você teve um forte desejo ou urgência em consumir? (primeira droga, segunda droga, etc)	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	3	4	5	6
b. bebidas alcoólicas	0	3	4	5	6
c. maconha	0	3	4	5	6
d. cocaína, crack	0	3	4	5	6
e. anfetaminas ou éxtase	0	3	4	5	6
f. inalantes	0	3	4	5	6
g. hipnóticos/sedativos	0	3	4	5	6
h. alucinógenos	0	3	4	5	6
i. opióides	0	3	4	5	6
j. outras, especificar	0	3	4	5	6

QUESTIONÁRIO PARA TRIAGEM DO USO DE ÁLCOOL, TABACO E OUTRAS SUBSTÂNCIAS.

2. Durante os três últimos meses, com que frequência você utilizou essa(s) substância(s) que mencionou? (primeira droga, depois a segunda droga, etc)	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	2	3	4	6
b. bebidas alcoólicas	0	2	3	4	6
c. maconha	0	2	3	4	6
d. cocaína, crack	0	2	3	4	6
e. anfetaminas ou éxtase	0	2	3	4	6
f. inalantes	0	2	3	4	6
g. hipnóticos/sedativos	0	2	3	4	6
h. alucinógenos	0	2	3	4	6
i. opióides	0	2	3	4	6
j. outras, especificar	0	2	3	4	6

- Se "NUNCA" em todos os itens da questão 2 pule para a questão 6, com outras respostas continue com as demais questões

4. Durante os três últimos meses, com que frequência o seu consumo de (primeira droga, depois a segunda droga, etc) resultou em problema de saúde, social, legal ou financeiro?	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	4	5	6	7
b. bebidas alcoólicas	0	4	5	6	7
c. maconha	0	4	5	6	7
d. cocaína, crack	0	4	5	6	7
e. anfetaminas ou éxtase	0	4	5	6	7
f. inalantes	0	4	5	6	7
g. hipnóticos/sedativos	0	4	5	6	7
h. alucinógenos	0	4	5	6	7
i. opióides	0	4	5	6	7
j. outras, especificar	0	4	5	6	7

NOMES POPULARES OU COMERCIAIS DAS DROGAS

- a. produtos do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda)
- b. bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, champagne, licor, pinga uísque, vodca, vermouths, caninha, rum tequila, gin)
- c. maconha (baseado, erva, liamba, diamba, birra, fuminho, fumo, mato, bagulho, pango, manga-rosa, massa, haxixe, skank, etc)
- d. cocaína, crack (coca, pó, branquinha, nuvem, farinha, neve, pedra, caximbo, brilho)
- e. estimulantes como anfetaminas (bolinhas, rebites, bifetamina, moderine, MDMA)
- f. inalantes (solventes, cola de sapateiro, tinta, esmalte, corretivo, verniz, tinner, clorofórmio, tolueno, gasolina, éter, lança perfume, cheirinho da loló)
- g. hipnóticos, sedativos (ansiolíticos, tranquilizantes, barbitúricos, fenobarbital, pentobarbital, benzodiazepínicos, diazepam)
- h. alucinógenos (LSD, chá-de-lírio, ácido, passaporte, mescalina, peiote, cacto)
- i. opiáceos (morfina, codeína, ópio, heroína elixir, metadona)
- j. outras – especificar:

5. Durante os três últimos meses, com que frequência, por causa do seu uso de *(primeira droga, depois a segunda droga, etc)*, você deixou de fazer coisas que eram normalmente esperadas de você?

	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	5	6	7	8
b. bebidas alcoólicas	0	5	6	7	8
c. maconha	0	5	6	7	8
d. cocaína, crack	0	5	6	7	8
e. anfetaminas ou êxtase	0	5	6	7	8
f. inalantes	0	5	6	7	8
g. hipnóticos/sedativos	0	5	6	7	8
h. alucinógenos	0	5	6	7	8
i. opióides	0	5	6	7	8
j. outras, especificar	0	5	6	7	8

7. Alguma vez você já tentou controlar, diminuir ou parar o uso de *(primeira droga, depois a segunda droga, etc...)* e não conseguiu?

	NÃO, Nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses
a. derivados do tabaco	0	6	3
b. bebidas alcoólicas	0	6	3
c. maconha	0	6	3
d. cocaína, crack	0	6	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	6	3
f. inalantes	0	6	3
g. hipnóticos/sedativos	0	6	3
h. alucinógenos	0	6	3
i. opióides	0	6	3
j. outras, especificar	0	6	3

- **FAÇA as questões 6 e 7 para todas as substâncias mencionadas na questão 1**

6. Há amigos, parentes ou outra pessoa que tenha demonstrado preocupação com seu uso de *(primeira droga, depois a segunda droga, etc...)* ?

	NÃO, Nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses
a. derivados do tabaco	0	6	3
b. bebidas alcoólicas	0	6	3
c. maconha	0	6	3
d. cocaína, crack	0	6	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	6	3
f. inalantes	0	6	3
g. hipnóticos/sedativos	0	6	3
h. alucinógenos	0	6	3
i. opióides	0	6	3
j. outras, especificar	0	6	3

Nota Importante: Pacientes que tenham usado drogas injetáveis nos últimos 3 meses devem ser perguntados sobre seu padrão de uso injetável durante este período, para determinar seus níveis de risco e a melhor forma de intervenção.

8- Alguma vez você já usou drogas por injeção?
(Apenas uso não médico)

NÃO, nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses

Guia de Intervenção para Padrão de uso injetável

Uma vez por semana ou menos Ou menos de três dias seguidos	Intervenção Breve incluindo cartão de "riscos associados com o uso injetável"
Mais do que uma vez por semana Ou mais do que três dias seguidos	Intervenção mais aprofundada e tratamento intensivo*

PONTUAÇÃO PARA CADA DROGA

	Anote a pontuação para cada droga. SOME SOMENTE das Questões 2, 3, 4, 5, 6 e 7	Nenhuma intervenção	Receber Intervenção Breve	Encaminhar para tratamento mais intensivo
Tabaco		0-3	4-26	27 ou mais
Alcool		0-10	11-26	27 ou mais
Maconha		0-3	4-26	27 ou mais
Cocaína		0-3	4-26	27 ou mais
Anfetaminas		0-3	4-26	27 ou mais
Inalantes		0-3	4-26	27 ou mais
Hipnóticos/sedativos		0-3	4-26	27 ou mais
Alucinógenos		0-3	4-26	27 ou mais
Opióides		0-3	4-26	27 ou mais

Cálculo do escore de envolvimento com uma substância específica.

Para cada substância (de 'a' a 'j') some os escores obtidos nas questões 2 a 7 (inclusive). Não inclua os resultados das questões 1 e 8 aqui.
Por exemplo, um escore para maconha deverá ser calculado do seguinte modo: Q2c + Q3c + Q4c + Q5c + Q6c + Q7c.
Note que Q5 para tabaco não é codificada, sendo a pontuação para tabaco = Q2a + Q3a + Q4a + Q6a + Q7a

ANEXO B – Aprovação SIPESQ

SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7883

Porto Alegre, 29 de março de 2017.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMEDICAS da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "RELAÇÃO DO VÍNCULO MATERNO-INFANTIL COM ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA (OXTR) EM GESTANTES USUÁRIAS DE CRACK E EM SEUS FILHOS". Este projeto necessita da apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMEDICAS

ANEXO C – Parecer consubstanciado do CEP PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: RELAÇÃO DO VÍNCULO MATERNO-INFANTIL COM ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO GÊNE DO RECEPTOR DE OCITOCINA (OXTR) EM GESTANTES USUÁRIAS DE CRACK E EM SEUS FILHOS

Pesquisador: Rodrigo Grassi de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69771217.3.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.255.141

Apresentação do Projeto:

O uso de cocaína-crack é um grave problema de saúde pública, contudo, quando o uso se dá durante o período gestacional ele se torna ainda mais complexo. A cocaína-crack e seus metabolitos tem a capacidade de atravessar rapidamente a placenta e a barreira hematoencefálica com trágicos efeitos ao desenvolvimento infantil. Além disso, nas mães, a exposição a cocaína-crack durante o período gestacional pode afetar negativamente

vias de sinalização fundamentais para a construção do comportamento cuidador materno, essencial ao desenvolvimento saudável do bebê. O sistema de sinalização de ocitocina, um pequeno neuropeptídeo, tem papel central no estabelecimento da vinculação materno-infantil. O comportamento negligente observado em muitas mães expostas a cocaína-crack durante a gestação pode ser induzido por alterações endócrinas promovidas pela droga, em especial sobre o sistema de sinalização de ocitocina. É possível que modificações epigenéticas no gene codificador dos receptores de ocitocina (OXTR) possam estar envolvidas na alteração do sistema ocitocinérgico, contudo não existe na literatura estudos abordando o efeito de modificações epigenéticas na sinalização de ocitocina em mulheres usuárias de cocaína-crack e em seus bebês. Portanto, através do presente projeto de pesquisa, pretendemos investigar possíveis alterações do vínculo materno e se este, está associado a modificações

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS**



Continuação do Parecer: 2.255.141

epigenéticas relacionadas ao sistema ocitocinérgico da mãe e do bebê expostos a droga no período pré-natal.

Objetivo da Pesquisa:

Fase 1 - Objetivo geral Investigar possíveis relações entre a níveis periféricos de ocitocina e alterações no padrão de metilação do gene do receptor de ocitocina em mães usuárias de cocaína- crack e em seus bebês, em amostras de sangue de cordão umbilical (SCU) e no sangue periférico das mães coletadas no pós-parto imediato. Fase 2 - Objetivo geral Investigar possíveis relações entre o vínculo materno- infantil, os níveis periféricos de ocitocina e alterações no padrão de metilação da região promotora do gene do receptor de ocitocina na população de mães usuárias de cocaína-crack e seus filhos participantes do primeiro estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos mínimos são previstos durante esta pesquisa, contudo durante a coleta de sangue, no momento da punção, a agulha pode causar dor de intensidade semelhante a uma picada de inseto e algumas pessoas podem se sentir incomodadas durante esta coleta de sangue. Um profissional treinado realizará a coleta de sangue e todo cuidado será tomado para que o procedimento seja o mais rápido e indolor possível. Além disso algumas pessoas podem se sentir incomodadas durante o preenchimento dos questionários. Em ambos os casos a equipe de pesquisa tentará minimizar o mal-estar do participante. Caso necessário o participante receberá todo tipo de assistência de forma imediata e gratuita. Além disso, caso ocorram complicações decorrentes da participação, de forma direta ou indireta, o participante receberá assistência imediata e integral sem nenhum tipo de custo.

Benefícios:

Os benefícios desta pesquisa baseiam-se na determinação de variáveis biológicas que podem influenciar o vínculo entre mãe e filho. A qualidade do vínculo entre mãe e filho é importante não só para o desenvolvimento neuroadaptativo do bebê, (como aprendizagem, memória e comportamento social) mas também para a mãe. Considerando o perfil emocional das mães usuárias de cocaína – crack o vínculo materno pode atuar como uma alavanca que auxiliaria na tentativa destas mulheres em deixar a droga. Este estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens no que diz respeito ao vínculo das mães usuárias de crack com seus bebês, o que poderia representar, em segunda instância, mais um reforço positivo durante um período de desintoxicação.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pu.rs.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS**



Continuação do Parecer: 2.255.141

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A importância deste estudo baseia-se no fato da inexistência de dados relacionados ao uso da cocaína-crack e os mecanismos epigenéticos que podem estar subjacentes às alterações comportamentais e biológicas em gestantes e bebês, assim como a associação dessas alterações com o desenvolvimento do comportamento materno são de grande valia e justificam os esforços para o desenvolvimento desta investigação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_892349.pdf	17/08/2017 14:53:19		Aceito
Outros	cartaderespostaCEP1708.docx	17/08/2017 14:52:55	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	CartaRespostaCEP02.pdf	05/07/2017 16:06:51	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	CartaRespostaCEP0507.pdf	05/07/2017 16:05:48	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	QRSH.pdf	05/07/2017 16:03:58	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	SDQ_Portuguesedoble.pdf	05/07/2017 16:03:07	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	ASI6.pdf	05/07/2017 16:02:20	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	MAInventariopercepcaovinculacaomater na.pdf	05/07/2017 16:01:15	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	14ANEXO4TCLEFASE2CRIANCA.pdf	05/07/2017 15:59:46	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS**



Continuação do Parecer: 2.255.141

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	13ANEXO3TCLEFASE2MAE.pdf	05/07/2017 15:59:31	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PPDoutoradoCompleto.pdf	05/07/2017 15:58:55	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Orçamento	orcamento0507.pdf	05/07/2017 15:56:56	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	cartaEncaminhamentoApresentacao.pdf	13/06/2017 17:05:25	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	Cartadeconhecimentochefedoservico.pdf	07/06/2017 16:55:41	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	DeclaracaodelgualdadedeDocumentos.pdf	07/06/2017 16:52:54	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	CartadeAprovaodaCC1490792753156.pdf	07/06/2017 16:50:15	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	CartadeApresentacaodoProjetoCC.pdf	07/06/2017 16:48:49	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	DocumentoUnificado1490792753156.pdf	07/06/2017 16:47:40	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Outros	Linklattes.pdf	07/06/2017 16:46:25	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anexo7cartasainclusaoodopesquisador.pdf	07/06/2017 16:44:44	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	16ANEXO6Termodedoacaodeamostra.pdf	07/06/2017 16:40:39	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	15ANEXO5CARTADEAPROVACAOCEPHCPA.pdf	07/06/2017 16:39:16	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	07/06/2017 16:27:54	Talita Siara Almeida Baptista	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 2.255.141

PORTO ALEGRE, 01 de Setembro de 2017

Assinado por:
Denise Cantarelli Machado
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br