

ARTIGO ORIGINAL

# Uso de drogas psicotrópicas e sintomas sugestivos de depressão associados à metilação do DNA do NR3C1

## *Psychotropic drug use and suggestive depression symptoms associated with NR3C1 DNA methylation*

Júlia de Assis Pinheiro<sup>a</sup>, Aline Ribeiro Borçoi<sup>a</sup>, Flávia Vitorino Freitas<sup>a,f</sup>, Suzanny Oliveira Mendes<sup>a</sup>, Anderson Barros Archanjo<sup>a</sup>, Mayara Mota de Oliveira<sup>a</sup>, Joaquim Gasparini dos Santos<sup>a</sup>, Juliana Krüger Arpini<sup>b</sup>, Rafael Assis de Souza<sup>d</sup>, Ivana Alece Arantes Moreno<sup>a</sup>, Marcele Lorentz Mattos de Souza<sup>a</sup>, Dirceu Pereira dos Santos<sup>e</sup>, Wagner Miranda Barbosa<sup>f</sup>, José Claudio Casali-da-Rocha<sup>g</sup>, Bruna Pereira Sorroche<sup>c</sup>, Leonardo Oliveira Trivilin<sup>h</sup>, Elizeu Batista Borloti<sup>i</sup>, Letícia Batista Azevedo Rangel<sup>a</sup>, Lidia Maria Rebolho Batista Arantes<sup>c</sup>, Adriana Madeira Alvares-da-Silva<sup>a,b\*</sup>



<sup>a</sup>Biotecnologia/Renorbio Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil;

<sup>b</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil;

<sup>c</sup>Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos – São Paulo, Brasil;

<sup>d</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil;

<sup>e</sup>Instituto Federal Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil;

<sup>f</sup>Departamento de Farmácia e Nutrição, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil;

<sup>g</sup>A.C. Camargo Câncer Center, São Paulo, SP, Brasil;

<sup>h</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil;

<sup>i</sup>Programa de Graduação em Psicologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.

**Autor correspondente**  
adriana.m.silva@ufes.br

Manuscrito recebido: maio 2022

Manuscrito aceito: dezembro 2022

Versão online: março 2023

### Resumo

**Introdução:** os distúrbios psiquiátricos tornaram-se um problema global que leva milhões de pessoas ao uso de medicamentos psicotrópicos. Os efeitos dessas substâncias são amplamente conhecidos quanto à tolerância e dependência química, porém, do ponto de vista epigenético, ainda são pouco conhecidos.

**Objetivos:** avaliar a associação entre o uso de drogas psicotrópicas, metilação do gene NR3C1 e sua relação com sintomas sugestivos de depressão em indivíduos entre 20 a 59 anos usuários da rede pública de saúde.

**Método:** 385 voluntários de 20-59 anos, usuários do Sistema Único de Saúde brasileiro foram recrutados para avaliação das condições socioeconômicas, de saúde e de estilo de vida em estudo transversal. O BDI-II avaliou sintomas sugestivos de depressão e o pirosequenciamento avaliou a metilação do DNA de NR3C1. Modelo de regressão de Poisson bivariado e multivariado com variância robusta ( $p < 0,05$ ) avaliou a associação entre o uso de drogas psicotrópicas e metilação do gene NR3C1.

**Resultados:** sintomas depressivos específicos como irritabilidade, insônia e fadiga foram associados ao uso de medicamentos psicotrópicos. Sintomas de fracasso passado, indecisão e perda de apetite foram associados a padrões de hipermetilação nos CpGs 40 a 47 do gene NR3C1. Além disso, o uso de psicofármacos está associado à redução de 50% na metilação do gene NR3C1, por meio de modelo ajustado com variáveis de confusão socioeconômicas, de saúde e estilo de vida.

**Conclusão:** o uso de drogas psicotrópicas e sintomas específicos depressivos foram associados a alterações na metilação do DNA de NR3C1.

**Palavras-chave:** Metilação, NR3C1, uso de drogas psicotrópicas, sintomas depressivos.

**Suggested citation:** Pinheiro JA, Borçoi AR, Freitas FV, Mendes SO, Archanjo AB, Oliveira MM, Santosa JG, Arpini JK, Souza RA, Moreno IAA, Souza MLM, Santos DP, Barbosa WM, Casali-da-Rocha JC, Sorroche BP, Trivilin LO, Borloti EB, Rangel LBA, Arantes LMRB, Alvares-da-Silva AM. Psychotropic drug use and suggestive depression symptoms associated with NR3C1 DNA methylation. *J Hum Growth Dev.* 2023; 33(1):139-152. DOI: <http://doi.org/10.36311/jhgd.v33.14300>

## Síntese dos autores

### Por que este estudo foi feito?

A epigenética é o elo entre o ambiente e a genética. Alterações epigenéticas em genes associados ao estresse têm sido associadas com transtornos mentais como depressão e estresse pós-traumático. O uso de psicofármaco está entre os medicamentos mais prescritos no mundo, entretanto pouco se sabe sobre a associação entre modificações epigenéticas e uso de psicofármacos.

### O que os pesquisadores fizeram e encontraram?

O presente estudo avaliou de forma transversal 385 indivíduos de 20-59 anos quanto ao uso de fármacos, sintomas depressivos, condições socioeconômicas, de saúde e de estilo de vida. Uma amostra do sangue foi coletada e o DNA foi extraído para pirosequenciamento do DNA pós conversão por bissulfito. Em análise de regressão multivariada, sintomas de sensação de fracasso, indecisão e perda de apetite foram associados à hipermetilação do gene NR3C1 e o uso de drogas psicotrópicas está associado à redução de 50% na metilação do gene NR3C1, por meio de modelo ajustado com variáveis de confusão socioeconômicas, de saúde e estilo de vida.

### O que essas descobertas significam?

O uso de drogas psicotrópicas e sintomas específicos depressivos estão associados a alterações na metilação do gene NR3C1, o que demonstra que o crescente uso de medicamentos psiquiátricos pode interferir de forma epigenética em genes envolvidos com a resposta ao estresse. Além disso, demonstra a importância destas variáveis serem consideradas como variáveis de confusão em futuras pesquisas epigenéticas.

### Highlights

O uso de drogas psicotrópicas está associado à hipometilação do gene NR3C1.

Sintomas sugestivos depressivos estão associados à hipermetilação do gene NR3C1.

Alterações na metilação do NR3C1 estão associadas a eventos estressantes da vida e a sintomas específicos de depressão.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em seu plano de ação em saúde mental 2013-2020, uma em cada dez pessoas sofre de alguma desordem de saúde mental no mundo<sup>1</sup>, cujas principais doenças são depressão, transtorno afetivo bipolar e esquizofrenia<sup>2</sup>. A depressão é um problema de saúde pública global, pois 17% da população geral do mundo apresenta comorbidades<sup>3,4</sup>. No Brasil, o transtorno depressivo maior tem prevalência de aproximadamente 20% em São Paulo e 17% no Rio de Janeiro<sup>5</sup>.

As drogas psicotrópicas são uma importante ferramenta no tratamento e controle de diversas condições psicopatológicas. Considerando a prevalência e a relevância dos transtornos mentais, observa-se o alto uso de psicofármacos em muitos países e esses medicamentos estão entre os medicamentos mais prescritos<sup>6</sup>. Em estudo realizado em 2015 em dez países europeus, ao avaliar indivíduos deprimidos, verificou-se que a prevalência anual de uso de psicofármacos foi de 15,1% entre as mulheres e 8,0% entre os homens<sup>7</sup>. Outro estudo realizado no Brasil com 1.999 indivíduos relatou prevalência de 11,7% de uso de drogas psicotrópicas, 7,3% entre homens e 15,8% entre mulheres. As classes terapêuticas mais comuns foram antidepressivos (38,2%) e benzodiazepínicos (24%)<sup>8</sup>.

O clonazepam é um benzodiazepínico que se liga ao receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC) que pode causar tolerância, dependência e alterações fisiológicas no organismo humano. É indicado para ansiedade, insônia, relaxamento muscular e epilepsia<sup>9</sup>.

Estudos têm demonstrado que alterações epigenéticas e consequente alteração da expressão gênica podem ser decorrentes do uso de drogas<sup>10-12</sup>. Uma potencial alteração do epigenoma deve ser considerada devido aos efeitos colaterais e impacto no tratamento<sup>10-12</sup>. Assim, algumas drogas podem atuar como um fator adicional na modulação de mecanismos epigenéticos<sup>13</sup>, como drogas antiepilépticas que modificam histonas por meio

de interação química direta com a histona desacetilase<sup>14</sup>, assim como os canabinóides e opiáceos que desencadeiam a hipermetilação do DNA<sup>15,16</sup>.

O uso de medicamentos para tratamento de transtornos psiquiátricos também tem sido associado a alterações epigenéticas<sup>17</sup>, uma vez que o papel das alterações epigenéticas na regulação do epigenoma tem sido amplamente abordado em todo o mundo<sup>18</sup> com estudo aprofundado de várias modificações, incluindo metilação do DNA, modificações de histonas, remodelação da cromatina e microRNA<sup>19</sup>.

A metilação do DNA é um mecanismo de regulação da expressão gênica amplamente conhecido<sup>20</sup>. No entanto, recentemente foi descrito como o “modus operandi” do processo de adaptação ao ambiente, uma resposta rápida a eventos de exposição<sup>21</sup>. A metilação é considerada a forma mais estável de alteração epigenética. Tipicamente, consiste na adição de um grupo metil nos locais onde um nucleotídeo de citosina ocorre próximo a um nucleotídeo de guanina (CpG) e quando localizado em um promotor de gene, a metilação do DNA normalmente atua para reprimir a transcrição do gene<sup>22</sup>.

Assim, eventos estressantes percebidos pelo indivíduo podem resultar na adição ou retirada de marcas epigenéticas em posições específicas do DNA resultando na alteração da expressão gênica<sup>22-24</sup>.

Eventos estressantes em humanos ou em modelos animais têm sido relacionados à hipermetilação em posições específicas do DNA na região promotora do receptor de glicocorticóide (GR), que tem função de regulação hipotalâmica do estresse no eixo neuroendócrino hipotálamo-hipofisário-adrenal (HPA) via produção de cortisol<sup>25,26</sup>. No entanto, a literatura relata que, entre outros eventos ou condições, já foram descritos estressores relacionados à hipometilação na mesma região GR<sup>27</sup>. Estudos em animais avaliaram eventos de metilação diretamente no hipotálamo<sup>28,29</sup>, enquanto estudos em humanos avaliaram eventos de metilação do sangue por

sua homologia observada em diferentes tecidos com expressão equivalente<sup>30</sup>.

O gene do receptor de glicocorticóide pertence à subfamília do Receptor Nuclear 3, Grupo C, Membro 1 (NR3C1), que codifica o receptor de glicocorticóide humano e está localizado no cromossomo 5q31-32<sup>31</sup>. Este gene consiste em oito éxons codificantes numerados de 2 a 9 e nove primeiros éxons não codificantes referidos como A a J (excluindo “G”) que são considerados promotores alternativos<sup>32</sup>. Os éxons 1D, 1J, 1E, 1B, 1F, 1C e 1H estão localizados dentro de uma ilha CpG contendo 3000pb ao longo da região promotora proximal do gene NR3C1<sup>32,33</sup>.

Os éxons não codificantes na região promotora do gene NR3C1 contêm múltiplas sequências de dinucleotídeos CpG sujeitas a metilação. Na região 1F existem 47 sítios CpG que foram estudados por muitos autores relacionando efeitos de eventos estressantes como estresse pré-natal e precoce, estresse pós-traumático e depressão<sup>26,32,34-43</sup>.

Vários estudos mostraram associação entre metilação e eventos estressantes da vida ou gravidade clínica, relatando hiper ou hipometilação (ou ambos) usando diferentes métodos, incluindo pirosequenciamento em diferentes locais CpG da região 1F do gene NR3C1<sup>33</sup>. Além disso, o uso de psicofármacos para o controle de patologias induzidas pelo estresse, incluindo a depressão, foi relacionado a alterações epigenéticas e mudanças na expressão gênica. Alguns relatos mostraram que antidepressivos e estabilizadores de humor exercem seu efeito terapêutico, pelo menos em parte, por meio de mecanismos epigenéticos<sup>44-46</sup>.

Até o momento, não há dados conclusivos sobre mudanças epigenéticas em relação aos padrões de metilação do gene NR3C1 e o uso de drogas psicotrópicas. Portanto, o objetivo é avaliar a associação entre o uso de psicofármacos e a metilação do gene NR3C1 em indivíduos adultos usuários do Sistema Único de Saúde brasileiro, para avaliar o papel de cada variável e sua associação com sintomas sugestivos de depressão.

## ■ MÉTODO

### Desenho do estudo

Este é um estudo observacional do tipo transversal.

### Local do estudo e período

O estudo ocorreu entre abril e junho de 2017 no município de Alegre-ES, situado na região sudeste do Brasil no estado do Espírito Santo, na região do Caparaó Capixaba.

### População do estudo e critério de elegibilidade

A população do estudo foi composta por uma amostra aleatória de 386 indivíduos residentes nas áreas urbana e rural do município de Alegre-ES.

Os critérios de inclusão para participação no estudo foram os seguintes: ter de 20 a 59 anos, ser usuário do SUS e declarar livre consentimento para participação. Os critérios de exclusão foram estar grávida e ter condições cognitivas que interferissem na resposta aos questionários.

## Coleta de dados

Os dados foram coletados por meio de entrevista individual com base em questionário que avaliou as condições socioeconômicas, de saúde e de estilo de vida. A baixa renda foi definida por uma renda per capita/dia inferior a US\$ 5 (cinco dólares americanos)<sup>47</sup>. A escolaridade foi categorizada em menos de 8 anos de estudo, 8 a 11 anos de escolaridade e ensino superior universitário. Gênero, raça autorreferida, idade; consumo de álcool e tabaco atual e passado, atividade de lazer e atividade física (em frequência semanal); autopercepção de saúde (considerando saúde boa ou ruim), estresse e ansiedade autorreferidos; uso de medicamentos, agrupados em classes semelhantes; também foram coletados.

A depressão foi investigada por meio da aplicação do Inventário de Depressão de Beck (BDI-II). O BDI-II é um instrumento de autorrelato que avalia a presença e a gravidade de 21 sintomas depressivos (tristeza, pessimismo, fracasso passado, perda de prazer, sentimentos de culpa, sentimentos de punição, auto-aversão, autocrítica, pensamentos suicidas, choro, irritabilidade, retraimento social, indecisão, inutilidade, perda de energia, alterações no sono, fadiga, perda de apetite, perda de peso, preocupações somáticas e perda de interesse pelo sexo). Cada sintoma é avaliado em uma escala de 4 pontos variando de 0 a 3, com pontuações mais altas indicando sintomas mais graves de depressão<sup>48</sup>. Os valores obtidos foram adequados aos escores totais categorizados de acordo com o seguinte reagrupamento utilizado para população em uso de atenção primária e populações não clínicas: depressão mínima (BDI-II <10), depressão leve (BDI-II 10-17) e depressão (BDI-II ≥ 18)<sup>3,49,50</sup>.

## Análise de sangue

Para a análise de metilação do gene NR3C1, o sangue periférico de 286 pacientes foi coletado após jejum de pelo menos oito horas. O método de extração de DNA Salting-Out com precipitação salina foi realizado em leucócitos do sangue total de acordo com Salazar et al.<sup>51</sup>. A qualidade e concentração do DNA foram verificadas através do NanoDrop<sup>®</sup> no comprimento de onda  $\lambda = 260$  e 280 nm, e a razão de comprimento de onda, ou seja, 1,8 a 2,0, confirma a integridade do DNA sem contaminação.

## Ensaios de Metilação de Pirosequenciamento Quantitativo - PMA

A conversão de bissulfito de sódio de 1  $\mu$ g de DNA foi realizada usando um kit (EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit; Qiagen, Valencia, CA), seguindo as recomendações do fabricante. Os ensaios de metilação de pirosequenciamento foram realizados conforme descrito anteriormente<sup>52,53</sup>. Brevemente, a incubação do DNA alvo com bissulfito de sódio resulta na conversão de resíduos de citosina não metilados em uracila, deixando as citosinas metiladas inalteradas. Portanto, o tratamento com bissulfito dá origem a diferentes sequências de DNA para DNA metilado e não metilado. A química da desaminação da citosina pelo bissulfito de sódio envolve três etapas: (1) sulfonação; (2) desaminação e (3) dessulfonação.

A confirmação da qualidade do produto de PCR e da ausência de contaminação foi estabelecida em géis de agarose a 2% usando GelRed™ (Uniscience). O pirosequenciamento foi realizado usando o PSQ96ID Pyrosequencer (Qiagen, Valencia, CA) com o kit de reagentes PyroMark Gold Q96 (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as condições de pirosequenciamento estão disponíveis na tabela 1.

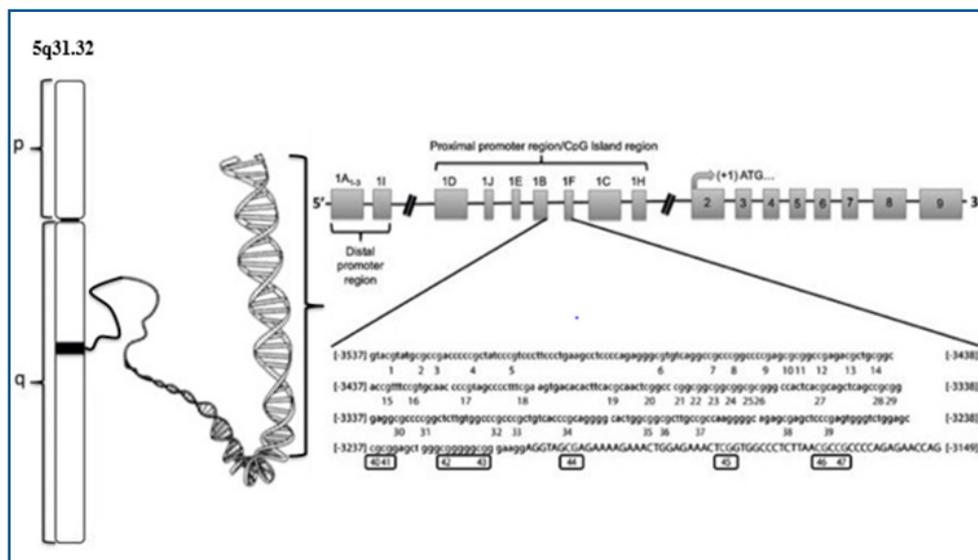
Um índice de metilação média foi calculada a partir da média das porcentagens de metilação dos sítios CpG avaliados no software Pyromark, usando as configurações

padrão do software. Neste estudo, foram considerados todos os níveis de metilação detectados no pirosequenciamento, a fim de classificar os indivíduos em não metilados (hipometilados) e metilados (hipermetilados), quando apresentavam metilação em qualquer porcentagem acima de zero.

Um esquema representativo da região amplificada de 47 CpGs e os oito CpGs específicos do local analisado usando ensaios de bissulfito-pirosequenciamento é mostrado na figura 1.

**Tabela 1:** Primers, condições de PCR e seqüências analisadas para reações de pirosequenciamento

PCR Primer		PCR conditions		
Forward	5'-TTTTTTTTTTGAAGTTTTTTTA-3'	95°C	(14'30")	45 cycles (410bp)
Reverse	5'-BIOTIN-CCCCCAACTCCCCAAAAA-3'	94°C	(30")	
		50°C	(30")	
		72°C	(30")	
		72°C	(10')	
		4°C	indefinitely	
Sequencing primers				
40 to 42 CpG	5'-AGAAAAGAAATTGGAGAAATT-3'			
43 to 47 CpG	5'-GTTTTAGAGAGATTAGGT-3'			
Analyzed sequences				
Seq 1	YGGTGGTTTTTTTAAYGTYGTTTTAATCGTGTTGATCAGTCGCTTA			
Seq 2	YGGTTTTYGYGTTGYTYGTTAGTCAGTTCAGTCGTAGTCAGTCGTA			



**Figura 1:** Região NR3C1 1F contendo 47 CpGs. Os CpGs estudados (40-47) são mostrados na caixa de texto em negrito. GenBank (NCBI - Access number: AY436590.1).

### Análise de dados

Os dados foram analisados por meio da tabela de contingência do teste Qui-Quadrado com nível de significância de 5% para caracterização da amostra. Para variáveis com mais de duas categorias, os valores de p foram corrigidos por Bonferroni<sup>54</sup>.

A análise quantitativa dos valores médios de metilação das CpGs 40-47 não seguiu a distribuição

normal, mesmo após conversão exponencial. Assim, os valores foram dicotomizados em não metilados (valores zero) e metilados (maiores que zero) para análise por regressão de Poisson com variância robusta.

Modelos de regressão de Poisson bivariada e multivariada com variância robusta foram realizados utilizando a variável uso de psicofármacos, variáveis dos sintomas sugestivos de depressão e valores médios de

metilação das CpGs 40 a 47 como variáveis dependentes.

As variáveis preditivas na análise bivariada com valor de  $p$  menor que 0,20 ( $p < 0,20$ ) foram inseridas no modelo multivariado de Regressão de Poisson com variância robusta. Foi utilizado o método backward, e as variáveis com menor significância foram retiradas uma a uma do modelo até que todas as variáveis presentes no modelo tivessem significância estatística  $p < 0,05$ . O teste de Hosmer & Lemeshow foi utilizado para verificar o ajuste do modelo final. A razão de prevalência (RP) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foi utilizada como medida de efeito.

Para verificar a associação entre uso de psicofármacos e metilação, foi definida uma nova modelagem para Regressão de Poisson com modelos construídos hierarquicamente. Foi utilizada a seguinte ordem: modelo simples (análise bruta); modelo 1: análise ajustada para variáveis socioeconômicas (sexo, escolaridade); modelo 2, ajustado para variáveis socioeconômicas e de saúde (estresse, ansiedade, insônia e saúde autorreferida); e modelo 3, ajustado para variáveis socioeconômicas, de saúde e estilo de vida (consumo de tabaco e álcool e atividades físicas ou de lazer).

Para todas as análises estatísticas, adotou-se o nível de significância de 5%, realizado com o software SPSS® (versão 13.0 para Windows) e Stata versão 11.0.

## Aspectos éticos e legais da pesquisa

Os indivíduos participantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES), sob o número 1.574.160, datado de 06/06/2016.

## RESULTADOS

### Perfil socioeconômico

Os dados obtidos por meio da aplicação dos questionários indicaram que a maioria dos participantes era do sexo feminino (311 ou 80,6%). Da população total, 62,4% relataram estar sob estresse, 66,9% relataram ansiedade e 52,8% consideraram sua saúde ruim. O perfil socioeconômico também foi traçado de acordo com o uso de drogas psicotrópicas. Os resultados mostraram maior prevalência de uso de psicofármacos entre mulheres, indivíduos de 41 a 59 anos, autorreferidos estressados e com autopercepção de saúde ruim. O uso de psicofármacos foi verificado em 70 dos 386 indivíduos (10,9%). Entre as drogas relatadas estão clonazepan, cloxazolam e alprazolam. O uso de bupropiona foi verificado em 1%, fluoxetina/venlafaxina/paroxetina foi observado em 4,7% e 1,6% utilizaram amitriptilina (tabela 2).

**Tabela 2:** Características descritivas da amostra por uso de drogas psicotrópicas e análise de regressão de Poisson univariada com variância robusta

Características	Uso de Drogas psicotrópicas						p
	total		Sim		não		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Sexo							
Masculino	75	19,4	27	36,0	48	64,0	0,001
Feminino	311	80,6	187	60,1	124	39,9	
Idade							
20 a 40 anos	170	44,0	75	44,1	95	55,9	0,001
41 a 59 anos	216	56,0	139	64,4	77	35,6	
Raça							
Branca	216	56,0	120	55,6	96	44,4	0,959
Não Branca	170	44,0	94	55,3	76	44,7	
Anos de educação							
< 8 anos	179	46,4	100	46,7	79	45,9	0,874
entre 8 a 11 anos	141	36,4	76	35,5	65	37,8	
Ensino Superior	66	17,1	38	17,8	28	16,3	
Renda							
Não baixa renda ( $\geq$ \$5.00/ dia)	115	29,8	20	28,6	95	30,1	0,805
Baixa renda ( $<$ \$5.00/ dia)	271	70,2	50	71,4	221	69,9	
Stress auto-avaliado							
Não	145	37,6	15	21,4	130	41,1	0,002
Sim	241	62,4	55	78,6	186	58,9	
Ansiedade auto-avaliada							
Não	127	32,8	39	52,0	120	38,0	0,001
Sim	259	66,9	33	44,0	196	62,0	

**Tabela 2:** Características descritivas da amostra por uso de drogas psicotrópicas e análise de regressão de Poisson univariada com variância robusta

Características	Uso de Drogas psicotrópicas						p
	total		Sim		não		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Depressão							
BDI-II < 10	202	52,2	22	33,3	180	62,1a	0,001**
BDI-II 10-17	77	19,9	24	36,4	53	18,3b	
BDI-II ≥ 18	77	19,9	20	30,3	57	19,7b	
Not available*	31	8,0					
Saúde auto-avaliada							
Boa ou muito boa	204	52,8	23	32,9	181	57,3	0,001
Regular ou pobre	182	47,2	47	67,1	135	42,7	
Consumo de tabaco							
Não	355	92,0	61	87,1	294	93,0	0,101
Sim	31	8,0	9	12,9	22	7,0	
Consumo de álcool							
Não	252	65,1	39	55,7	213	67,4	0,063
Sim	134	34,6	31	44,3	103	32,6	
Atividade física							
Sim	127	32,9	20	28,6	107	33,9	0,394
Não	259	67,1	50	71,4	209	66,1	
Atividade de lazer							
Sim	179	46,4	31	44,2	148	46,8	0,699
Não	207	53,6	39	55,8	168	53,2	
Status de Metilação							
Sim	87	22,5	9	10,3	78	89,7	0,032*
Não	299	77,5	61	20,4	238	79,6	
Total	386	100,00		100,00		100,00	

\* Não avaliado (não considerado nos cálculos estatísticos). Variáveis categóricas apresentadas em frequências relativas (%) e absolutas (n). \* valor p: qui-quadrado, com 5% significância ( $p < 0.05$ ); \*\* valor p qui-quadrado corrigido por Bonferroni. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística.

A análise de regressão bivariada de Poisson com variância robusta mostrou que o uso de drogas psicotrópicas estava associado a muitos sentimentos abordados no inventário, como pessimismo, fracasso passado, irritabilidade, retraimento social, fadigabilidade, insônia, preocupações somáticas e perda de interesse por

sexo. Além disso, verificou-se que a sensação de fracasso, autoaversão e perda de apetite estavam relacionadas à hipermetilação do NR3C1, como pode ser observado na tabela 3. A distribuição da metilação na população estudada pode ser vista na figura complementar 1 e na tabela complementar 1.

**Tabela 3:** Análise de regressão bivariada de Poisson com variância robusta para sintomas sugestivos de depressão com uso de drogas psicotrópicas e com análise de metilação

Sintomas BDI-II (N=356)	Uso Drogas Psicotrópicas (N=386)			HIPERMETILAÇÃO (N=286) (Total CpG 40 a 47)		
	PR	95% IC	p	PR	95% IC	p
Tristeza	1,20	0,99 – 1,44	0,051*	1,24	0,86-1,80	0,238
Pessimismo	1,24	1,03 – 1,49	0,019*	1,17	0,80-1,71	0,403
Fracasso Passado	1,22	1,01 – 1,47	0,031*	1,52	1,05-2,20	0,024
Perda de Prazer	1,08	0,89 – 1,30	0,412	1,24	0,85-1,79	0,254
Sentimentos de Culpa	0,96	0,76 – 1,20	0,726	1,07	0,69-1,64	0,750
Sentimentos de Punição	1,20	0,97 – 1,47	0,082*	1,17	0,76-1,80	0,453

**Continuação - Tabela 3:** Análise de regressão bivariada de Poisson com variância robusta para sintomas sugestivos de depressão com uso de drogas psicotrópicas e com análise de metilação

Sintomas BDI-II (N=356)	Uso Drogas Psicotrópicas (N=386)			HIPERMETILAÇÃO (N=286) (Total CpG 40 a 47)		
	PR	95% IC	p	PR	95% IC	p
Auto-aversão	0,99	0,81 – 1,21	0,955	1,53	1,06-2,22	0,023*
Auto-Crítica	0,96	0,79 – 1,17	0,740	1,23	0,85-1,78	0,260
Pensamentos Suicidas	1,15	0,90 – 1,41	0,236	1,29	0,80-2,10	0,289
Choro	1,19	0,99 – 1,43	0,061*	1,26	0,87-1,83	0,211
Irritabilidade	1,34	1,10 – 1,63	0,003*	1,17	0,80-1,71	0,402
Retraimento Social	1,23	1,03 – 1,49	0,022*	1,38	0,95-2,01	0,083*
Indecisão	0,96	0,79 – 1,17	0,710	0,70	0,46-1,05	0,092*
Inutilidade	1,04	0,85 – 1,26	0,686	1,29	0,88-1,88	0,182*
Perda de Energia	1,29	1,07 – 1,55	0,005*	1,07	0,73-1,56	0,697
Alterações no Sono	1,35	1,11 – 1,64	0,002*	1,35	0,88-2,07	0,156*
Fatigabilidade	1,09	0,91 – 1,32	0,329	1,37	0,94-2,00	0,096*
Perda de Appetite	0,98	0,77 – 1,24	0,869	1,56	1,05-2,31	0,027*
Perda de Peso	1,14	0,93 – 1,41	0,193*	1,39	0,93-2,09	0,104*
Preocupações Somáticas	1,29	1,07 – 1,53	0,007*	1,11	0,76-1,61	0,566
Perda de interesse em sexo	1,21	1,01 – 1,45	0,038*	1,21	0,83-1,76	0,309

Sintomas de depressão pelo Índice de Depressão de Beck (BDI-II). \*variáveis para o modelo multivariado \*Não avaliado (não considerado no cálculo estatístico). PR: prevalence ratio; 95% IC: interval de confiança; p: valor-p.

O uso de drogas psicotrópicas foi explicado pela irritabilidade, dificuldade no trabalho e insônia no modelo multivariado (tabela 4). A hipermetilação do gene NR3C1

foi associada a sintomas de fracasso e perda de apetite (tabela 5). Após ajuste de Hosmer & Lemeshow, ambos apresentaram boa aderência ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4:** Análise multivariada de regressão de Poisson com variância robusta para uso de drogas psicotrópicas com sintomas sugestivos de depressão

Sintomas	Uso de drogas psicotrópicas		
	PR	95% IC	p
Irritabilidade	1,22	1,00-1,50	0,046
Perda de Energia	1,20	1,00-1,45	0,049
Alterações no Sono	1,25	1,03-1,52	0,022

\* PR: razão de prevalência; 95% IC: intervalo de confiança; p: p-valor.

**Tabela 5:** Análise multivariada de regressão de Poisson com variância robusta para hipermetilação e hipometilação com sintomas sugestivos de depressão

Sintomas	HIPERMETILAÇÃO (Mean value CpG 40 a 47)		
	PR	95% CI	P
Fracasso Passado	1,58	1,09-2,29	0,014
Indecisão	0,63	0,41-0,96	0,032
Perda de Appetite	1,52	1,03-2,24	0,034

\* PR: razão de prevalência; 95% IC: intervalo de confiança; p: p-valor.

A análise univariada realizada por regressão de Poisson mostrou que existe associação entre o uso de drogas psicotrópicas e os padrões de metilação nos CpGs 40-47 ( $p=0,032$ ). Assim, o uso de drogas psicotrópicas reduz o risco de hipermetilação em 48% no segmento avaliado.

Um modelo foi construído com a inserção de variáveis de confusão de forma hierarquizada para análise

multivariada e, por fim, o uso de drogas psicotrópicas apresentou associação com padrões de metilação ( $p=0,009$ ). Os dados mostraram que o uso de drogas psicotrópicas está associado à redução de 50% na metilação do gene NR3C1.

O uso de drogas psicotrópicas foi associado à hipometilação quando usados os valores médios de metilação das CpGs 40 a 47, mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Associação entre uso de drogas e valores médios de metilação dos CpGs 40 a 47

Classe Drogas	Sim (n%)	Não (n%)
Uso droga psicotrópica	70 (18,1)	316 (81,8%)
<b>Regressão Univariada Poisson</b>		
<b>Análise Bruta</b>		
	<b>IRR</b>	<b>IC 95%</b>
	0,52	0,27;0,98
	<b>P</b>	0,046
<b>Regressão de Poisson Multivariada ajustada para variáveis de confusão</b>		
	<b>Modelo 1</b>	
	<b>IRR</b>	<b>IC 95%</b>
	0,48	0,26;0,91
	<b>P</b>	0,025
	<b>Modelo 2</b>	
	<b>IRR</b>	<b>IC 95%</b>
	0,43	0,22;0,83
	<b>p</b>	0,012
	<b>Modelo 3</b>	
	<b>IRR</b>	<b>IC 95%</b>
	0,50	0,26;0,95
	<b>p</b>	0,009

Amostra complexa. Regressão de Poisson univariada. Nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ). Variável dependente: Metilação(sim); Variáveis independentes: uso de drogas psicotrópicas. Análise bruta e modelos de regressão de Poisson univariada ajustados hierarquicamente para fatores de confusão: Modelo 1 - análise bruta ajustada para variáveis socioeconômicas (sexo, idade e escolaridade); Modelo 2 - análise, ajustada para variáveis socioeconômicas e de saúde (estresse, ansiedade, insônia e saúde); Modelo 3 - análise bruta, ajustada para variáveis socioeconômicas, de saúde e de estilo de vida (tabaco, álcool, atividade física e lazer). RP: razão de prevalência; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; p: valor p.

## DISCUSSÃO

Modificações na metilação do DNA de NR3C1 foram associadas a eventos estressantes de vida e patologias induzidas por estresse ou gravidade clínica<sup>33</sup>. O uso de drogas psicotrópicas para controlar a depressão e outras patologias induzidas pelo estresse foram relacionados a alterações epigenéticas<sup>44-46</sup>, mas existem poucos dados sobre a associação entre alterações epigenéticas na metilação do gene NR3C1 e uso de psicofármacos. Portanto, hipotetizamos que existe uma associação entre o uso de psicofármacos e a metilação do gene NR3C1 influenciadas por sintomas sugestivos de depressão em indivíduos adultos.

Assim, na análise multivariada, o uso de drogas psicotrópicas foi associado à redução de 50% na metilação do gene NR3C1. Além disso, sintomas depressivos, como sensação de fracasso e perda de apetite, foram relacionados à hipermetilação do DNA de NR3C1. A análise da metilação e a relação com o uso de drogas psicotrópicas foram avaliadas em nossa população de estudo por meio de análises bivariadas e multivariadas em modelos de regressão de Poisson. Nossos dados mostraram uma relação entre o uso dessas drogas e a desmetilação do DNA. Essa relação permaneceu estatisticamente significativa nos três modelos apresentados, mesmo após a adição de fatores de confusão, como variáveis socioeconômicas, de saúde e estilo de vida.

A literatura relata associação entre o uso de psicofármacos e alterações nos níveis de metilação, apontando alguns medicamentos como agentes

desmetilantes do DNA em vários genes e regiões repetitivas, demonstrando que pode haver desmetilação genômica global associada ao uso de psicotrópicos<sup>13</sup>. Cassel e colaboradores destacaram os neurônios GABAérgicos como as principais células-alvo da expressão de Mecp2 em resposta a agentes elevadores de serotonina, sugerindo que a sinalização de serotonina aumenta o silenciamento de genes em neurônios pós-mitóticos<sup>55</sup>.

A população estudada é composta por indivíduos que utilizam frequentemente o sistema público de saúde, a maioria composta por mulheres e com alta prevalência de indivíduos com sintomas de estresse, ansiedade e depressão. Em publicação anterior com a mesma casuística, verificou-se que essa população está exposta ao estresse psicossocial, apresentando alta prevalência de excesso de peso, doenças crônicas não transmissíveis, estresse e ansiedade<sup>56</sup>, insegurança alimentar<sup>57</sup> e depressão<sup>50</sup>.

A prevalência de indivíduos com sintomas de depressão, avaliados na população estudada pelo inventário BDI-II, considerando um escore  $\geq 18$ , foi de 19,9%, sendo considerado acima da média populacional em estudos populacionais gerais de população não psiquiátrica. Um estudo publicado pela Organização Mundial da Saúde em 2017 mostrou que 5,8% da população brasileira estava deprimida e dados americanos da população geral mostraram que a frequência é de 5,9%<sup>1</sup>.

Em nossa amostra, 18,1% dos indivíduos apresentaram uso contínuo de psicofármacos. Nossos dados mostraram que o uso de psicofármacos estava relacionado a vários sintomas de depressão avaliados pelo BDI-II. Na

análise multivariada, o uso de drogas psicotrópicas foi relacionado à irritabilidade, dificuldade para trabalhar e distúrbios do sono.

O modelo final de análise multivariada mostrou que os sintomas de fracasso, indecisão e perda de apetite associados às alterações da metilação permaneceram no modelo. O fracasso e a perda de apetite foram relacionados ao aumento da metilação do DNA de NR3C1, enquanto a indecisão foi relacionada à desmetilação. Curiosamente, a metilação e a depressão podem não ser um evento único do ponto de vista da regulação da expressão gênica, pois diferentes sintomas estão relacionados a eventos epigenéticos contrários.

A metilação do gene NR3C1 nas amostras dos indivíduos estudados foi relativamente baixa, corroborando com McGowan e colaboradores (2009)<sup>36</sup>. Além disso, as CpGs 16-21 e 37-38 correspondem ao sítio de ligação do fator de transcrição (NGFI-A) da região 1F do NR3C1, que corresponde ao exon 17 em ratos, cuja região genômica reguladora foi avaliada por Weaver e colaboradores<sup>26</sup>. Os autores também demonstraram que o baixo cuidado materno resultou em aumento da metilação do sítio de ligação do NGFI-A do gene NR3C1 no hipocampo da prole de ratos, levando à diminuição da sua expressão<sup>26</sup>. No entanto, Moser e colaboradores (2007) não mostraram diferenças na metilação na mesma região avaliando controles humanos saudáveis e indivíduos com Parkinson, Alzheimer ou demência<sup>58</sup>. Outro estudo com 224 sobreviventes do genocídio de Ruanda relatou menor metilação no sítio de ligação NGFI-A do gene NR3C1 1F associado ao transtorno de estresse pós-traumático<sup>59</sup>.

A literatura apresenta resultados controversos sobre padrões de metilação no gene NR3C1 em associação com a depressão, provavelmente devido a diferenças metodológicas, como a região 1F escolhida para análise, exclusão ou inclusão de indivíduos em uso de antidepressivos, tamanho da amostra, entre outros. Na e colaboradores, em seu estudo com 177 pacientes, sendo 45 pacientes com depressão sem antidepressivos, relataram hipometilação nas posições 46 e 47 da região 1F do gene NR3C1 e relacionam ao transtorno depressivo maior (MDD)<sup>38</sup>. No entanto, Melas e colaboradores, em um estudo de saúde mental de base populacional de 1668 indivíduos, sem exclusão de indivíduos usuários de drogas, avaliaram a metilação e correlacionaram com depressão e adversidade na infância, observando padrões de metilação aumentados na CpG 36 da região 1F do gene NR3C1<sup>60</sup>. Oberlander e colaboradores, em seu trabalho com gestantes com depressão e ansiedade, avaliaram em dois grupos, com e sem uso de antidepressivo e observaram hipermetilação no CpG 47<sup>39</sup>. Embora controversos, esses dados apresentam informações suficientes para supor que diferentes eventos na depressão podem alterar o perfil de metilação do DNA no gene NR3C1<sup>39</sup>.

Existem poucos estudos disponíveis na literatura que nos permitem entender exatamente como os sentimentos podem alterar especificamente o DNA promovendo hiper ou hipometilação. No entanto, já se sabe que situações específicas da vida, como as descritas no artigo de revisão de Argentieri e colaboradores, podem promover alterações em CpGs específicos tanto para hipermetilação quanto para

hipometilação, sugerindo que o mecanismo de regulação da expressão gênica em NR3C1 deve ser altamente refinado<sup>30</sup>.

Este estudo possui algumas limitações. Um estudo transversal não permite inferir causalidade e direção do efeito. A metilação do DNA do NR3C1 foi dicotomizada em abaixo ou acima de 0% para analisar a associação entre metilação e outras variáveis por regressão multivariada de Poisson. Essa categorização permite perda de sensibilidade em relação ao uso da variável quantitativa em porcentagem do perfil de metilação. Entretanto, este estudo é de suma importância considerando a alta prevalência do uso de drogas psicotrópicas em que sugere que medicamentos psiquiátricos podem estar associados a alterações epigenéticas em genes envolvidos com a resposta ao estresse. Além disso, demonstra a importância destas variáveis serem consideradas como variáveis de confusão em futuras pesquisas epigenéticas.

## ■ CONCLUSÃO

Assim, nossos dados associam o uso de drogas psicotrópicas com hipometilação no promotor do gene NR3C1, e sintomas sugestivos de depressão com hipermetilação. Nesse contexto, sugere-se modificações epigenéticas decorrentes do uso de psicofármacos e sintomas específicos depressivos. Além disso, sugere-se que estas variáveis devem ser consideradas como variáveis de confusão, principalmente em estudos populacionais com avaliação epigenética, onde esses fatores podem influenciar os achados de estudos futuros.

Esses achados corroboram para um melhor conhecimento, uma vez que grande parte da população mundial consome drogas psicotrópicas. Estudos como este, em usuários da atenção básica, mostram a necessidade de melhor atenção a esses indivíduos, uma vez que na perspectiva individual, eles têm pior qualidade de vida e saúde. Do ponto de vista coletivo, pela demanda de atendimento, acabam também onerando os serviços de saúde pela alta demanda de consultas e medicamentos.

## Declarações do autor

Conceituação: JAP, FVF, ARB. Metodologia: JAP, FVF, ARB, BPS, LMRBA, AMAS. Análises: FVF. Recursos: CLC, JKA, BPS, SOM, ABA, MMO, JGS, RAS, IAAM, DPS, WMB, JCCR, LOT, EBB, LBAR, LMRBA. Curadoria de dados: FVF, BPS. Escrita do rascunho original: JAP, FVF, ARB, AMAS. Escrita- Revisão e Edição: JAP, FVF, ARB, LMRBA, AMAS. Supervisão: AMAS. Aquisição de financiamento: AMAS.

## Agradecimentos

Aos voluntários deste estudo, aos Agentes Comunitários de Saúde e toda a equipe do Sistema Único de Saúde do Município de Alegre, ES, Brasil. À FAPES pelo financiamento através do Projeto de Pesquisa SUS (PPSUS).

## Financiamento

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), FAPES /CNPq PDCTR 11/2019 (557/2020).

#### Declaração de conflito de interesse:

Os autores desejam confirmar que não há conflito de interesse associado a esta publicação.

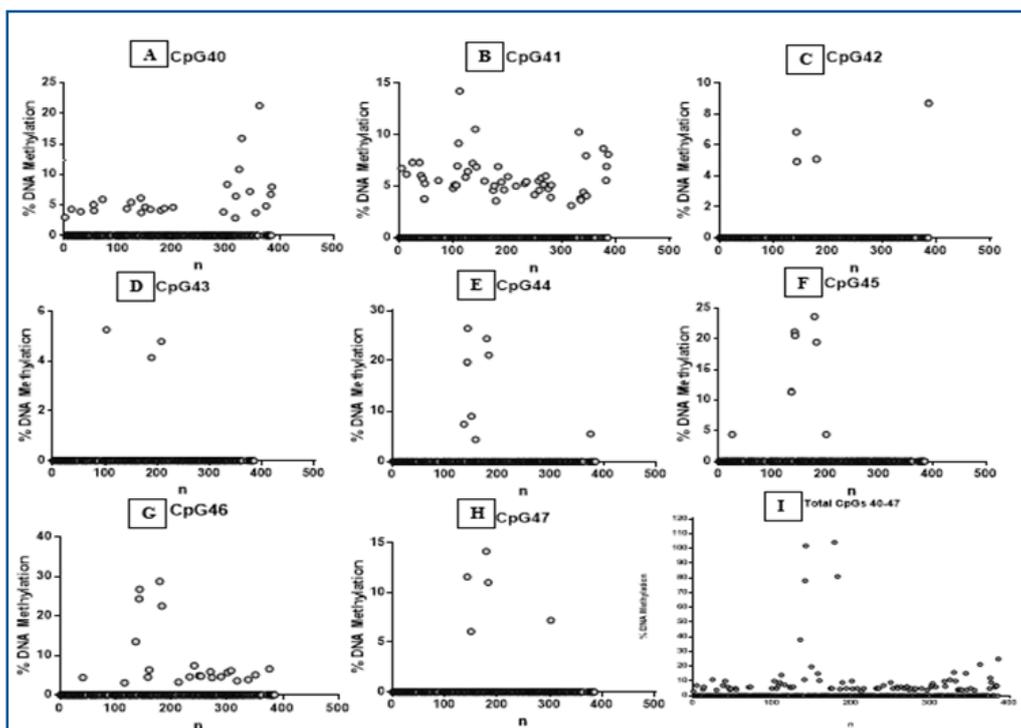
## REFERÊNCIAS

1. WHO, W.H.O. Institutes Health of National 1, 2017; 1-22.
2. Gomes TB, Fernandes Sales Junior S, Saint'Pierre TD, Correia FV, Hauser-Davis RA, Saggiro EM. Sublethal psychotropic pharmaceutical effects on the model organism *Danio rerio*: Oxidative stress and metal dishomeostasis. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019; 171: 781-789. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.041
3. Conti CL, Borçoi AR, Almança CCJ, Barbosa WM, Archanjo AB, de Assis Pinheiro J, Freitas FV, de Oliveira DR, Cardoso LD, De Paula H, Álvares-da-Silva AM. Factors Associated with Depressive Symptoms Among Rural Residents from Remote Areas. *Community Ment Health J*. 2020; 56(7): 1292-1297. DOI: 10.1007/s10597-020-00637-0
4. Kang HJ, Bae KY, Kim SW, Shin IS, Kim HR, Shin MG, Yoon JS, Kim JM. Longitudinal associations between glucocorticoid receptor methylation and late-life depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 84(Pt A): 56-62. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.02.004
5. Ribeiro WS, Mari Jde J, Quintana MI, Dewey ME, Evans-Lacko S, Vilete LM, Figueira I, Bressan RA, de Mello MF, Prince M, Ferri CP, Coutinho ES, Andreoli SB. The impact of epidemic violence on the prevalence of psychiatric disorders in Sao Paulo and Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2013 May 8; (5): e63545. DOI: 10.1371/journal.pone.0063545
6. Rodrigues PS, Francisco PMSB, Fontanella AT, Borges RB, Costa KS. Use and sources of psychotropic drugs by Brazilian adults and seniors. *Cien Saude Colet*. 2020; 25(11): 4601-4614. DOI: 10.1590/1413-812320202511.35962018
7. Boyd A, Van de Velde S, Pivette M, Ten Have M, Florescu S, O'Neill S, Caldas-de-Almeida JM, Vilagut G, Haro JM, Alonso J, Kovess-Masféty V; EU-WMH investigators. Gender differences in psychotropic use across Europe: Results from a large cross-sectional, population-based study. *Eur Psychiatry*. 2015; 30(6): 778-88. DOI: 10.1016/j.eurpsy.2015.05.001
8. Estancional Fernandes CS, de Azevedo RCS, Goldbaum M, Barros MBA. Psychotropic use patterns: Are there differences between men and women? *PLoS One*. 2018; 13(11): e0207921. DOI: 10.1371/journal.pone.0207921
9. Griffin CE 3rd, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J*. 2013; 13(2): 214-23.
10. Csoka AB, Szyf M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses*. 2009; 73(5): 770-80. DOI: 10.1016/j.mehy.2008.10.039
11. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(1): 38-51. DOI: 10.1038/nrc1779
12. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(1): 37-50. DOI: 10.1038/nrd1930
13. Lötsch J, Schneider G, Reker D, Parnham MJ, Schneider P, Geisslinger G, Doehring A. Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends Mol Med*. 2013; 19(12): 742-53. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.08.006
14. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001; 20(24): 6969-78. DOI: 10.1093/emboj/20.24.6969
15. Doehring A, Oertel BG, Sittl R, Lötsch J. Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical pain. *Pain*. 2013; 154(1): 15-23. DOI: 10.1016/j.pain.2012.06.011
16. Paradisi A, Pasquariello N, Barcaroli D, Maccarrone M. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J Biol Chem*. 2008; 283(10): 6005-12. DOI: 10.1074/jbc.M707964200
17. Ovenden ES, McGregor NW, Emsley RA, Warnich L. DNA methylation and antipsychotic treatment mechanisms in schizophrenia: Progress and future directions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 81: 38-49. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.004
18. Shankar E, Kanwal R, Candamo M, Gupta S. Dietary phytochemicals as epigenetic modifiers in cancer: Promise and challenges. *Semin Cancer Biol*. 2016; 40-41: 82-99. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.04.002

19. Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 267-80. DOI: 10.1146/annurev.med.59.061606.095816
20. Chen D, Meng L, Pei F, Zheng Y, Leng J. A review of DNA methylation in depression. *J Clin Neurosci.* 2017; 43: 39-46. DOI: 10.1016/j.jocn.2017.05.022
21. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling--potential opportunities and challenges. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7(5): 499-507. DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.05.004
22. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(1): 23-38. DOI: 10.1038/npp.2012.112
23. Keller TE, Han P, Yi SV. Evolutionary Transition of Promoter and Gene Body DNA Methylation across Invertebrate-Vertebrate Boundary. *Mol Biol Evol.* 2016; 33(4): 1019-28. DOI: 10.1093/molbev/msv345
24. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 2014; 26(4): 577-90. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.028.
25. Nantharat M, Wanitchanon T, Amesbutr M, Tammachote R, Praphanphoj V. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) promoter is hypermethylated in Thai females with major depressive disorder. *Genet Mol Res.* 2015; 14(4): 19071-9. DOI: 10.4238/2015
26. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004; 7(8): 847-54. DOI: 10.1038/nn1276
27. Tyrka AR, Parade SH, Welch ES, Ridout KK, Price LH, Marsit C, Philip NS, Carpenter LL. Methylation of the leukocyte glucocorticoid receptor gene promoter in adults: associations with early adversity and depressive, anxiety and substance-use disorders. *Transl Psychiatry.* 2016; 6(7): e848. DOI: 10.1038/tp.2016.112
28. Alt SR, Turner JD, Klok MD, Meijer OC, Lakke EA, Derijk RH, Muller CP. Differential expression of glucocorticoid receptor transcripts in major depressive disorder is not epigenetically programmed. *Psychoneuroendocrinology.* 2010; 35(4): 544-56. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.09.001
29. McGowan PO, Suderman M, Sasaki A, Huang TC, Hallett M, Meaney MJ, Szyf M. Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PLoS One.* 2011; 6(2): e14739. DOI: 10.1371/journal.pone.0014739
30. Argentieri MA, Nagarajan S, Seddighzadeh B, Baccarelli AA, Shields AE. Epigenetic Pathways in Human Disease: The Impact of DNA Methylation on Stress-Related Pathogenesis and Current Challenges in Biomarker Development. *EBioMedicine.* 2017; 18: 327-350. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.03.044
31. Turner JD, Vernocchi S, Schmitz S, Muller CP. Role of the 5'-untranslated regions in post-transcriptional regulation of the human glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1839(11): 1051-61. DOI: 10.1016/j.bbagr.2014.08.010
32. Palma-Gudiel H, Córdova-Palomera A, Leza JC, Fañanás L. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015; 55: 520-35. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.016
33. Daskalakis NP, Yehuda R. Site-specific methylation changes in the glucocorticoid receptor exon 1F promoter in relation to life adversity: systematic review of contributing factors. *Front Neurosci.* 2014; 8: 369. DOI: 10.3389/fnins.2014.00369
34. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, Scandura JM. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One.* 2011; 6(1): e14524. DOI: 10.1371/journal.pone.0014524
35. Bustamante AC, Aiello AE, Galea S, Ratanatharathorn A, Noronha C, Wildman DE, Uddin M. Glucocorticoid receptor DNA methylation, childhood maltreatment and major depression. *J Affect Disord.* 2016; 206: 181-188. DOI: 10.1016/j.jad.2016.07.038
36. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci.* 2009; 12(3): 342-8. DOI: 10.1038/nn.2270
37. Murgatroyd C, Quinn JP, Sharp HM, Pickles A, Hill J. Effects of prenatal and postnatal depression, and maternal stroking, at the glucocorticoid receptor gene. *Transl Psychiatry.* 2015; 5(5): e560. DOI: 10.1038/tp.2014.140
38. Na KS, Chang HS, Won E, Han KM, Choi S, Tae WS, Yoon HK, Kim YK, Joe SH, Jung IK, Lee MS, Ham BJ. Association between glucocorticoid receptor methylation and hippocampal subfields in major depressive disorder. *PLoS One.* 2014; 9(1): e85425. DOI: 10.1371/journal.pone.0085425

39. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*. 2008; 3(2): 97-106. DOI: 10.4161/epi.3.2.6034
40. Perroud N, Paoloni-Giacobino A, Prada P, Olié E, Salzman A, Nicastró R, Guillaume S, Mouthon D, Stouder C, Dieben K, Huguelet P, Courtet P, Malafosse A. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Transl Psychiatry*. 2011; 1(12): e59. DOI: 10.1038/tp.2011.60
41. Provençal N, Binder EB. The effects of early life stress on the epigenome: From the womb to adulthood and even before. *Exp Neurol*. 2015; 268: 10-20. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.09.001
42. Radtke KM, Ruf M, Gunter HM, Dohrmann K, Schauer M, Meyer A, Elbert T. Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Transl Psychiatry*. 2011; 1(7): e21. DOI: 10.1038/tp.2011.21
43. van der Knaap LJ, Riese H, Hudziak JJ, Verbiest MM, Verhulst FC, Oldehinkel AJ, van Oort FV. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation following stressful events between birth and adolescence. The TRAILS study. *Transl Psychiatry*. 2014; 4(4): e381. DOI: 10.1038/tp.2014.22
44. Chmielewska N, Szyndler J, Maciejak P, Płaźnik A. Epigenetic mechanisms of stress and depression. *Psychiatr Pol*. 2019; 53(6): 1413-1428. English, Polish. DOI: 10.12740/PP/94375
45. Molendijk ML, Bus BA, Spinhoven P, Penninx BW, Kenis G, Prickaerts J, Voshaar RC, Elzinga BM. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Mol Psychiatry*. 2011; 16(11): 1088-95. DOI: 10.1038/mp.2010.98
46. Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Kataoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Kokubo Y, Mimura M. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J Psychiatr Res*. 2014; 53: 47-53. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2014.02.002
47. Neri MC. *A Nova Classe Média*. ed. CPS FGV/IBRE. Editora Fundação Getúlio Vargas, Rio de Janeiro. 2008; 70.
48. Jackson-Koku G. Beck Depression Inventory. *Occup Med (Lond)*. 2016; 66(2): 174-5. DOI: 10.1093/occmed/kqv087
49. Wang YP, Gorenstein C. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory-II: a comprehensive review. *Braz J Psychiatry*. 2013; 35(4): 416-31. DOI: 10.1590/1516-4446-2012-1048
50. Borçoi AR, Mendes SO, Gasparini Dos Santos J, Mota de Oliveira M, Moreno IAA, Freitas FV, Pinheiro JA, Arpini JK, Cunha ER, Archanjo AB, Evangelista Monteiro de Assis AL, Sorroche BP, Rebolho Batista Arantes LM, Borloti E, Álvares-da-Silva AM. Risk factors for depression in adults: NR3C1 DNA methylation and lifestyle association. *J Psychiatr Res*. 2020; 121: 24-30. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.10.011
51. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem*. 1998; 44(8 Pt 1): 1748-50
52. Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques*. 2003; 35(1): 146-50. DOI: 10.2144/03351md01
53. Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques*. 2003; 35(1): 152-6. DOI: 10.2144/03351md02
54. Field A. *Descobrimos a Estatística Usando o SPSS*. Artmed. 2011; 685.
55. Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, Aunis D, Zwiller J. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol*. 2006; 70(2): 487-92. DOI: 10.1124/mol.106.022301
56. Freitas FV, Barbosa WM, Silva LAA, Garozi MJO, Pinheiro JA, Borçoi AR, Conti CL, Arpini JK, de Paula H, de Oliveira MM, Archanjo AB, de Freitas ÉAS, de Oliveira DR, Borloti EB, Louro ID, Alvares-da-Silva AM. Psychosocial stress and central adiposity: A Brazilian study with a representative sample of the public health system users. *PLoS One*. 2018; 13(7): e0197699. DOI: 10.1371/journal.pone.0197699
57. Borçoi AR, Mendes SO, Moreno IAA, Gasparini Dos Santos J, Freitas FV, Pinheiro JA, Oliveira MM, Barbosa WM, Arpini JK, Archanjo AB, Hollais AW. Food and nutritional insecurity is associated with depressive symptoms mediated by NR3C1 gene promoter 1F methylation. *Stress*. 2021 Nov; 24(6): 814-821. doi: 10.1080/10253890.2021.1923692

58. Moser D, Molitor A, Kumsta R, Tatschner T, Riederer P, Meyer J. The glucocorticoid receptor gene exon 1-F promoter is not methylated at the NGFI-A binding site in human hippocampus. *World J Biol Psychiatry*. 2007; 8(4): 262-8. DOI: 10.1080/15622970701429862
59. Vukojevic V, Kolassa IT, Fastenrath M, Gschwind L, Spalek K, Milnik A, Heck A, Vogler C, Wilker S, Demougin P, Peter F, Atucha E, Stetak A, Rozenaal B, Elbert T, Papassotiropoulos A, de Quervain DJ. Epigenetic modification of the glucocorticoid receptor gene is linked to traumatic memory and post-traumatic stress disorder risk in genocide survivors. *J Neurosci*. 2014; 34(31): 10274-84. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1526-14.2014
60. Melas PA, Wei Y, Wong CC, Sjöholm LK, Åberg E, Mill J, Schalling M, Forsell Y, Lavebratt C. Genetic and epigenetic associations of MAOA and NR3C1 with depression and childhood adversities. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16(7): 1513-28. DOI: 10.1017/S1461145713000102



**Figura Suplementar 1:** Gráficos de dispersão do perfil de metilação dos indivíduos participantes do estudo. Indivíduos hipometilados são aderidos ao eixo x (valores de metilação iguais a 0) e indivíduos com porcentagens de metilação acima de zero estão dispersos no gráfico com valores percentuais que variam de 0,4 a 29%. Os gráficos de A a H mostram as dispersões por CpGs individuais nas posições 40 a 47. E o gráfico I mostra a dispersão considerando todo o segmento avaliado. Na composição dos gráficos foram considerados indivíduos hipermetilados (n = 87) e indivíduos hipometilados (286).

**Tabela Suplementar 1:** Padrão de metilação para indivíduos com níveis de metilação acima de zero

CpG (n=286)	METILAÇÃO (CpG 40 to 47)		
	Prevalência da metilação % (n)	Porcentagem mediana da metilação	Valores: mínimo-máximo
CPG 40	9,1 (27)	4,7	2,9-21,3
CPG 41	17,2 (51)	5,5	3,0-14,0
CPG 42	1,4 (4)	6,0	5,0-9,0
CPG 43	1,0 (3)	4,8	4,0-5,0
CPG 44	2,8 (8)	14,4	4,0-26,0
CPG 45	2,4 (7)	19,4	4,0-24,0
CPG 46	8,0 (23)	5,1	3,0-29,0
CPG 47	1,7 (5)	11,3	6,0-14,0
CPG40-47	22,5 (87)	0,7	0,4-12,9

## Abstract

**Introduction:** Psychiatric disorders have become a global problem that leads millions of people to use psychotropic medications, especially benzodiazepines. The effects of these substances are widely known regarding tolerance and chemical dependence, however, from epigenetics perspective, there are still little known.

**Objective:** To evaluate the association between psychotropic drug use, NR3C1 gene methylation and its relation with symptoms suggestive of depression in adult individuals assisted in the public health system.

**Methods:** 385 adult volunteers (20-59 years) users of the Brazilian Unified Health System were recruited to evaluate socioeconomic, health, lifestyle conditions in a cross sectional study. BDI-II evaluated symptoms suggestive of depression and pyrosequencing evaluated NR3C1 DNA methylation. Bivariate and multivariate Poisson regression model with robust variance ( $p < 0.05$ ) evaluated the association between psychotropic drug use and NR3C1 gene methylation.

**Results:** Specific depressive symptoms such as irritability, insomnia and fatigability were associated with psychotropic drug use. Symptoms of past failure, indecision and loss of appetite were associated with hypermethylation patterns in CpGs 40 to 47 of NR3C1 gene. Moreover, psychotropic drug use is associated with 50% reduction in NR3C1 gene methylation, through model adjusted with socioeconomic, health and lifestyle confounding variables.

**Conclusions:** Psychotropic drug use and depressive symptoms was associated with changes in NR3C1 DNA methylation. In this context, epigenetic modification resulting from psychotropic drug use and depressive symptoms could be considered, mainly in population studies with epigenetic evaluation, where these factors may be influencing the findings of future studies.

**Key words:** Methylation, NR3C1, psychotropic drugs use, depressive symptoms.

©The authors (2023), this article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.