

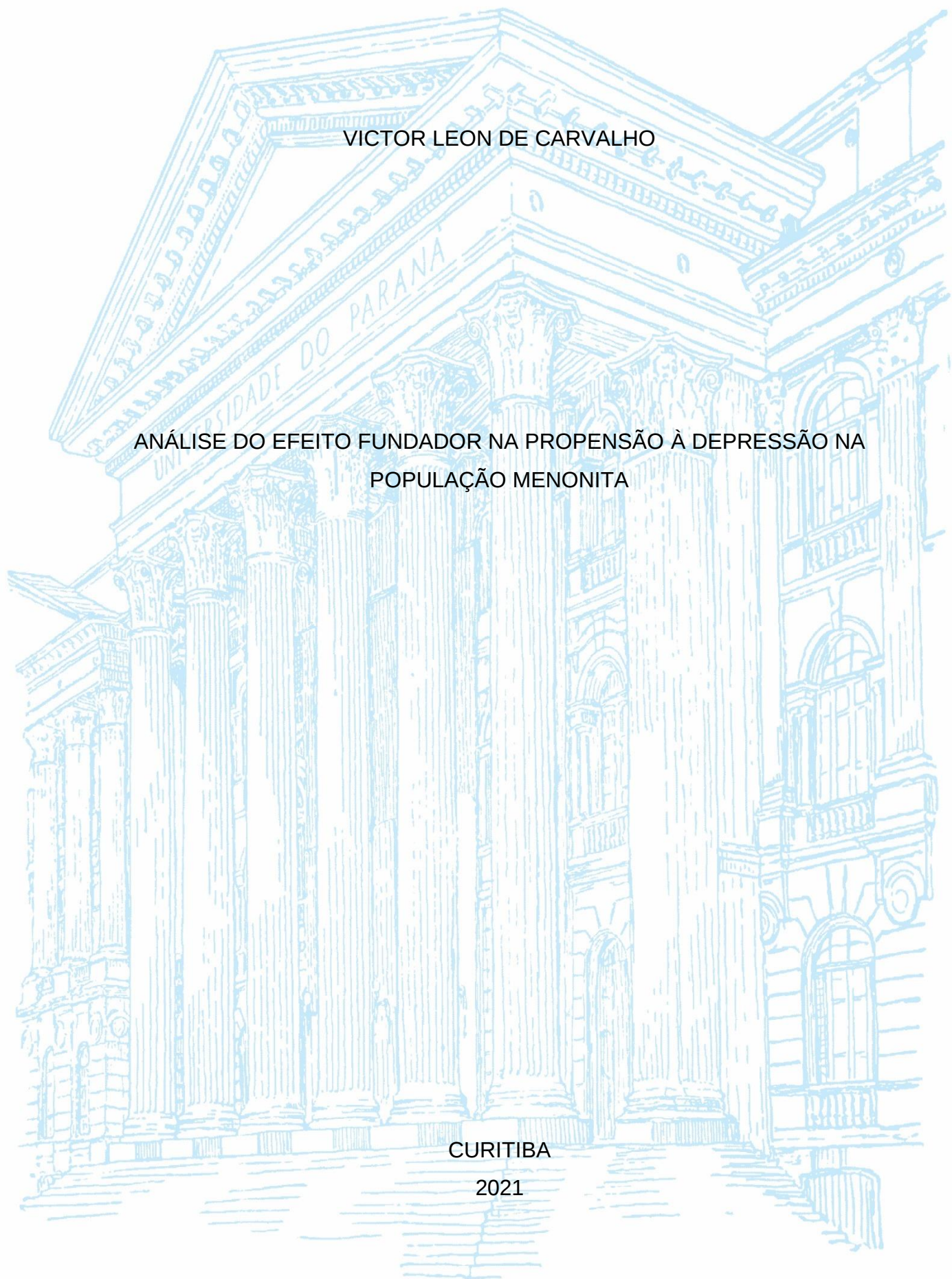
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VÍCTOR LEÓN DE CARVALHO

ANÁLISE DO EFEITO FUNDADOR NA PROPENSÃO À DEPRESSÃO NA
POPULAÇÃO MENONITA

CURITIBA

2021



VICTOR LEON DE CARVALHO

ANÁLISE DO EFEITO FUNDADOR NA PROPENSÃO À DEPRESSÃO NA
POPULAÇÃO MENONITA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Angélica Beate Winter Boldt

Coorientador (a): Dr^a Gabriela Canalli Kretschmar

CURITIBA

2021

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná por proporcionar a oportunidade de elaborar o meu projeto.

Ao Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), onde novamente despertei minha paixão pela ciência. Aos demais colegas do LGMH, pelo auxílio, apoio e convívio, principalmente em um momento tão isolado quanto a pandemia.

À professora Angélica que me orientou de longe, mas o fez parecer tão perto. Sua compreensão e paciência fez momentos de dificuldade parecerem a brisa do vento.

À minha coorientadora Gabriela, que tanto me ensinou, desde minha entrada no laboratório, e que compartilhou os momentos ruins e bons da vida de cientista.

A todos os brasileiros, e principalmente à comunidade Menonita, que, voluntariamente, doaram tanto para o projeto e, assim, propiciaram o desenvolvimento deste e de outros trabalhos.

Aos meus queridos amigos Ana Clara, Gabriel, Laura, Suellen, Milena, Natália, Natalie e Rebekah, agradeço pelo companheirismo, amizade, carinho e incentivo em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins. É maravilhoso poder contar com vocês!

Agradeço, com todo o meu coração, à minha família, pelo amor, carinho e a vida tão bela que compartilhamos. Com um carinho especial para meu primo Gabriel, com quem sempre posso confiar para me alegrar.

À minha mãe Rosemeri, ao meu pai Ivan e à minha irmã Manuela, com quem compartilho todas as mais incríveis alegrias e todas as mais profundas tristezas. Eu os amo profundamente. Todas as minhas melhores memórias e vivências incluem vocês, e a vocês, devo tudo o que sou.

A todos aqueles que olharam por mim, me guiaram e protegeram.

Muito Obrigado!

“O amor

é mestre, mas é preciso saber adquiri-lo, porque se adquire dificilmente, ao preço de um esforço prolongado. É preciso amar, de fato, não por um instante, mas até o fim.”

Fiódor Dostoiévski

RESUMO

Os menonitas são um grupo anabatista cristão originado na Europa, cuja história demográfica reduziu sua diversidade genética e aumentou a agregação de doenças em famílias, por meio de pelo menos três eventos de gargalo, ao longo de cerca de cinco séculos. Vivem em comunidades isoladas, o que, somado aos efeitos gargalos que sofreram durante suas imigrações, consanguinidade e ambiente compartilhado, destaca essa população como de interesse para estudos genético-epidemiológicos. Por meio de um levantamento realizado de 2016-2020 em menonitas da Colônia Nova (CON), Witmarsum (CWI) e Curitiba (CWB) observamos que 23,4% (113/483) dos menonitas relatam diagnóstico passado/presente de depressão. Para avaliar a predisposição genética a depressão na população de CON comparou-se as variantes de 130 exomas de menonitas. Vinte e nove exomas de menonitas com depressão diagnosticada no passado ou no presente serviram de casos, e 46 exomas sem depressão diagnosticada e sem parentes de primeiro grau afetados serviram de controles. As variantes com equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 10^{-6}$) e taxas de chamadas maiores que 99%, foram avaliadas a partir de regressões logísticas multivariadas (PLINKv1.09). Setenta e quatro variantes distribuídas em 26 genes foram associadas a um efeito dominante com depressão ($p < 0,01$). A frequência alélica de 31 das variantes diferiu significativamente das de europeus não finlandeses, consistente com um efeito fundador. Cinco variantes foram encontradas em três genes previamente associados à depressão, *OLMF4*, *GRIK2* e *MEF2C*, sendo o segundo gene também associado a habilidade matemática e ao transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), e o terceiro à epilepsia e deficiência intelectual. Dentre as 74 variantes associadas, se destaca o SNP *rs28379706* do gene *PLXNB2* (*plexina B2*), um polimorfismo que rompe um sítio CpG e está associado com a redução da expressão do gene no hipotálamo. Em conclusão, embora o tamanho amostral seja reduzido, a avaliação de variantes de exoma em uma população geneticamente isolada não só confirmou associações já conhecidas, como apontou para genes previamente não associados com a depressão. Estas associações devem ser confirmadas por ensaios funcionais e aumento da amostragem nesta população e na população miscigenada brasileira, com diagnósticos mais precisos, em futuro próximo.

Palavras-Chaves: Depressão; Menonita; Genética; *PLXNB2*; Polimorfismo

ABSTRACT

Menonites are an Anabaptist Christian group that originated in Europe. Their demographic history is directly tied to the reduction of the group's genetic diversity and rise in familial diseases, especially considering that they went through three bottlenecks in only five centuries. They live in isolated communities, and, due to the high levels of consanguinity in a shared environment, plus the already mentioned bottlenecks, are of great interest in genetic and epidemiological studies. Through a survey conducted from 2016 to 2020, in menonite communities in Colônia Nova (CON), Witmarsum (CWI) and Curitiba (CWB), we have found that 23,4% (113/483) of menonites report a past/present depression diagnosis. To assess the genetic predisposition to depression in the population of CON, we compared genetic variants in 130 exomes of menonites. Twenty-nine exomes, which had been diagnosed with depression, were used as cases, and forty-six exomes that had no diagnosis of depression and no relatives with the diagnosis were used as controls. Variants with a Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 10^{-6}$) and call rates larger than 99% were evaluated using multivariate logistic regressions (PLINKv1.09). Seventy-four variants in 26 different genes were associated with a dominant effect in depression ($p < 0,01$). The allelic frequency of 31 variants were significantly different than that of non-finnish Europeans, which is consistent with a founding effect. Five of the variants were found in three genes previously associated with depression, *OLMF4*, *GRIK2* and *MEF2C*, with the second also being associated with mathematical prowess and obsessive-compulsive disorder (OCD), and the third with epilepsy and intellectual disability. Among these 74 associated variants, the *rs28379706* SNP of the *PLXNB2* gene stands out. This polymorphism is capable of disrupting a CpG site and is associated with the gene's reduced expression in the hypothalamus. In conclusion, though the sample size was limited, the evaluation of exomes in a genetically isolated community not only confirmed previously known associations, but also linked previously unassociated genes to the diagnosis of depression. These associations must also be confirmed, in the near future, by controlled replication tests with a larger menonite population as well as in a mixed Brazilian population sampling, capable of wielding a more accurate diagnosis.

Keywords: Depression; Menonite; Genetics; *PLXNB2*; Polimorphism

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA MIGRAÇÃO DOS MENONITAS NO BRASIL.....	15
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VARIANTES ASSOCIADAS A UM EFEITO DOMINANTE PARA A DEPRESSÃO.....	32
TABELA 2 – FREQUÊNCIA DAS VARIANTES ASSOCIADOS A UM EFEITO DOMINANTE PARA DEPRESSÃO EM EUROPEUS NÃO FILANDESES, MENONITAS E BRASILEIROS.....	35
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS A EFEITO DOMINANTE COM DEPRESSÃO.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1.	POPULAÇÃO MENONITA.....	12
2.2.	DEPRESSÃO.....	18
2.2.1.	TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	20
2.2.2.	GENÉTICA E EPIGENÉTICA DA DEPRESSÃO.....	21
3	OBJETIVOS.....	27
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1.	APROVAÇÃO ÉTICA.....	28
4.2.	SEQUENCIAMENTO DO EXOMA COMPLETO.....	29
4.3.	ANÁLISES DE DADOS.....	30
5	RESULTADOS.....	32
6	DISCUSSÃO.....	40
7	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A depressão é um problema crescente, que, de acordo com Marly e colaboradores (2019) atualmente afeta mais de 4% da população mundial (300 milhões de pessoas) e cerca de 6% da população brasileira. Uma das principais causas de incapacitação no mundo, o transtorno depressivo limita o funcionamento físico, pessoal e social (MARLY et. al, 2019). A depressão, portanto, está associada a altos custos médicos e psicológicos, tanto para os indivíduos que sofrem da doença, quanto para a sociedade como um todo (LEMOULT; GOTLIB, 2019). Além disso, em um contexto de pandemia a prevalência de sentimentos depressivos aumentou em 40,4%, no Brasil, o que corrobora a necessidade de investimentos no âmbito de saúde mental (BARROS et al., 2020).

Maneiras de amenizar o problema e prevenir a evolução de casos graves são, portanto, de suma importância. Contudo, a depressão é uma doença cuja etiologia não é completamente conhecida, visto que é considerada uma desordem complexa e multifatorial que requer vastos grupos amostrais para a obtenção de resultados significativos de associação genética (BYRNE et al., 2020).

Os transtornos depressivos, cuja manifestação deriva tanto de fatores genéticos quanto ambientais, podem ter o seu desenvolvimento e o curso explicados pelas interações combinadas de gene e ambiente, em que os efeitos ambientais dependem do genótipo de uma pessoa, ou, a maneira que os genes são expressos é influenciada pelo ambiente aonde o indivíduo se encontra (PISHVA et. al, 2017). Dessa forma, os estressores, somados à uma predisposição genética do indivíduo, aumentam a chance de desenvolvimento do transtorno, quando comparados aqueles que não possuem a predisposição genética (KENDLER et al., 1995).

Além disso, sabe-se que os fenótipos complexos, tal qual o da depressão, apresentam um padrão de herança resultante da combinação do efeito poligênico, capazes de aumentar ou diminuir a suscetibilidade, juntamente com os fatores ambientais, que iniciam, aceleram, intensificam ou conferem proteção contra o seu progresso (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013). Sendo assim, é possível atribuir valores ao efeito genético aditivo em fenótipos, ou seja, valores de herdabilidade, a partir das correlações entre gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ) em um determinado período, em uma certa população (BOUCHARD; MCGUE, 1990). Nessa situação, os fatores de constituição genética, comportamentais, culturais, situação

socioeconômica, alimentação, e exposição ambiental são limitados ao âmbito familiar, e por isso, mais controlados. Consequentemente, as interações entre os genes e ambiente na família, ou até em uma comunidade fechada podem facilitar o desenvolvimento de doenças (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2008). Este mesmo componente familiar é citado como um dos fatores de risco de maior relevância para o desenvolvimento do transtorno depressivo (GOODWIN; JAMINSON, 1990).

Os menonitas são um grupo de anabatista cristão, constituindo uma população isolada que passou por três eventos de gargalo de garrafa, ao longo de sua história. As comunidades menonitas ao redor do mundo se mantiveram fechadas ao longo dos anos. Devido a isso e a alta de frequência de casamentos consanguíneos, desenvolveram certa homogeneidade genética através da perda de heterozigosidade, aumento do desequilíbrio de ligação entre variantes genéticas e alterações na distribuição das frequências genotípicas (HARTL; CLARK, 2010^a), geradas pelos gargalos de garrafa sofridos. Além disso, há um aumento ainda maior da probabilidade de homozigose, resultando em um aumento da expressão de determinados fenótipos recessivos devido ao compartilhamento de alelos, concernentes a doenças monogênicas e multifatoriais (HARTL; CLARK, 2010^b), o que pode ser observado em os menonitas norte-americanos (ALMOMANI et al. 2013, SAUNDERS-PULLMAN et al. 2012, STRAUSS e PUFFENBERGER 2009, ORTON et al. 2008). Nas comunidades menonitas brasileiras, também se observa frequências fenotípicas superiores às da população euro-brasileira, como é o caso da capacidade de digestão da lactose em idade adulta (BOSCHMAN et al., 2012) e da resistência inata à infecção pelo HIV (BOLDT, 2009). Diante disso, diversos estudos com relação à frequência de polimorfismos têm sido realizados em Menonitas, e se mostram de extremo interesse e importância para a ciência e saúde.

Através de um estudo piloto realizado no projeto Mennogen, em colaboração com a Dr. Fabiana L Lopes (NIMH), foi realizada o sequenciamento de 140 exomas de menonitas pertencentes a Colônia Nova - RS (CON), e buscou-se identificar variantes com associação à depressão. A partir destes resultados, pretende-se, futuramente, confirmar as associações selecionadas, pela sua possível relevância biológica, em toda população menonita amostrada até o momento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. POPULAÇÃO MENONITA

Grupos Anabatistas, tais quais os Amish, Hutteritas e Menonitas, representam comunidades de população pequena, derivadas por efeitos de gargalo, nos quais a população inicial maior foi reduzida e/ou dividida. Esses grupos vivem, frequentemente, isolados geograficamente e/ou culturalmente de outros, e sendo assim, boa parte deles apresenta pouca miscigenação com outras culturas, como algumas comunidades na América do Norte (Amish e Hutteritas) e na Bolívia e Paraguai (Menonitas). Dessa forma, o interesse para estudos populacionais e genéticos dessas comunidades se encontra no âmbito de doenças hereditárias, já que essas comunidades apresentam frequência de doenças com importante componente hereditário aumentada, devido a exposição à fatores ambientais particulares à região em que vivem, e homogeneidade fenotípica, que provêm de um pequeno número de fundadores que sofreram deriva genética através de um ou mais efeitos gargalos, somado às relações de consanguinidade e endogamia recorrentes (JUCOSKI, 2016). Além disso, essas comunidades geralmente dispõem de registros detalhados das famílias que as compõem, permitindo a construção de heredogramas multigeracionais de maior confiabilidade, o que facilita estudos (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002).

Os menonitas são um grupo cristão cuja origem se encontra no movimento Anabatista (que significa “batizar de novo” em Grego) da época da Reforma no século XVI (1525), na Suíça. Sua crença divergiu da católica e protestante luterana, pois os anabatistas afirmavam que apenas indivíduos com idade suficiente para ter verdadeira convicção de sua fé deveriam ser batizados, já que apenas com maior idade seriam capazes de ter o compromisso de viver segundo a palavra de Deus (PENNER *et al.*, 1984; MASKE, 1999). Um dos principais pensadores responsáveis pela formalização e propagação dos ideais Anabatistas e pacifistas, foi o padre holandês Menno Simons (1496-1561), cujo nome deu origem ao termo menonita. O termo “Menonita” se refere, portanto, ao indivíduo que pertence a um grupo cuja religião é evangélica livre, pratica o batismo adulto e renuncia ao serviço militar (THIESSEN, 2003).

Os descendentes dos Menonitas deste período compõem dois grandes grupos: os holandeses-alemães, que ao longo do tempo se deslocaram até a América

Latina e ao oeste do Canadá; e, e os suíços-alemães, que vivem principalmente no estado da Pensilvânia nos Estados Unidos e em Ontário, no Canadá. Também existe o grupo majoritário dos novos Menonitas, que atualmente são convertidos na África, formando um novo grupo sem relação de ancestralidade com os originais suíços (ORTON *et al.*, 2008).

No século XVI, o movimento Anabatista em geral, foi usado para representar a revolta popular contra o clero e a nobreza, o que motivou guerras civis. Com isso, os Menonitas, que já se abrigavam em locais mais isolados para viver uma vida de discípulos, passaram a ser perseguidos na Suíça, Alemanha e Holanda, e se refugiaram em regiões inóspitas, tanto na Prússia Oriental quanto na Ocidental, onde construíram novas colônias e cultivaram uma sólida reputação como bons trabalhadores rurais e pagantes de impostos (MASKE, 2002). São essas colônias que futuramente comporiam as comunidades Menonitas brasileiras.

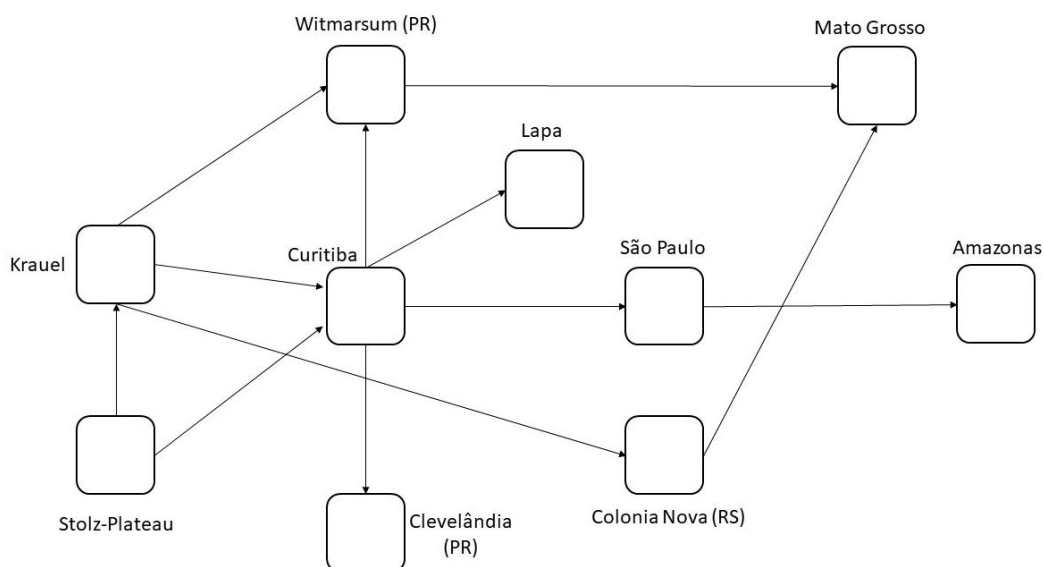
Na Polônia do século XVIII, houve estabelecimentos de medidas coercitivas, com relação aos Menonitas, obrigando-os a casamentos interconfessionais, que prejudicariam sua religião. Por isso, a comunidade procurou manter ainda mais as relações consigo mesma, levando a uma maior ocorrência de endogamia e consanguinidade (PENNER *et al.*, 1984; MASKE, 2002).

A comunidade Menonita sofreu, novamente, uma pressão ao final do século XVIII, quando o Governo de Berlin não aceitou isenções do serviço militar, o que culminou no abandono em massa da região para outros locais na Europa, principalmente a Ucrânia e Rússia, pois a Imperatriz Catarina II incentivou imigrantes a ocuparem territórios conquistados dos turcos otomanos, em uma tentativa de modernizar e desenvolver seu império (SAHR *et al.*, 2008). Por muitos anos os Menonitas da região prosperaram, até a queda do governo dos czares. Durante a Revolução Bolchevique de 1917, foram perseguidos novamente, e na década seguinte, em 1923, aproximadamente 6000 menonitas iniciaram um grande fluxo migratório direcionado ao Canadá. Foram auxiliados por grupos menonitas previamente estabelecidos lá, em 1874. Em 1928, já não havia mais comunidades Menonitas na Rússia, havendo muitos saído em massa para o Canadá, Paraguai e Brasil, embora dezenas de milhares (a maior parte) dos menonitas tenha sucumbido em campos de trabalhos forçados na Sibéria ou a fome e tifo na Ucrânia (MENKE, 2002).

Enquanto os Menonitas se retiravam da Rússia, com destino às comunidades Menonitas do Canadá, paradoxalmente, alguns grupos Canadenses migravam para o México e Paraguai, devido à algumas divergências ideológicas (PENNER, 1984). Contudo, boa parte do grupo foi impedida de adentrar o Paraguai. Apesar dos incentivos por parte do governo Paraguaio, as lideranças menonitas do *Mennonite Central Comitee* (MCC), órgão representativo máximo dos menonitas nos Estados Unidos e o *Hollandsch Doopgezinde Emigranten Bureau* (HDEB), da Holanda, não viam no Paraguai uma boa solução. Finalmente, em meados de 1929, surgiu uma nova possibilidade em território brasileiro (KLASSEN, 1998).

Os grupos de Menonitas que chegaram ao Brasil se instalaram especialmente na região Sul do país, inicialmente em Santa Catarina, como a Colônia Krauel, composta por três núcleos: Waldheim, Gnadental e Witmarsum. As famílias que chegaram por último, passaram a se instalar na Serra do Mirador, denominada Stolz-Plateau, formando o núcleo de Auhagen. Porém nos primeiros anos de estabelecimento, os colonos encontraram muitas dificuldades, principalmente em relação ao manejo da terra e problemas na colheita de batata doce, milho e mandioca (SIEMENS, 1983). Com isso buscaram novos territórios, chegando ao Rio Grande do Sul (Colônia Nova, em Aceguá), Paraná (Curitiba e Colônia Witmarsum, em Palmeira), e outros grupos menores em São Paulo, Mato Grosso, Bahia e até ao Amazonas (FIGURA 1). Nessas regiões, formaram vilas e cooperativas, passando a viver em comunidades relativamente fechadas. Apesar disso, essas comunidades se tornaram importantes contribuintes para o crescimento do país no setor econômico e de assistência social (PAULS JUNIOR, 1980) (SAHR *et al*, 2008).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA MIGRAÇÃO DOS MENONITAS NO BRASIL



FONTE: O Autor, 2021. Adaptado de PAULS JUNIOR (1980).

Em 1949, 86 famílias, principalmente da Colônia de Krauel, foram para o estado do Rio Grande do Sul, onde fundaram a Colônia Nova, em Aceguá no Rio Grande do Sul. Anos antes, em 1931, no Paraná, as famílias se estabeleceram na região de Curitiba onde atualmente estão localizados os bairros do Xaxim, Boqueirão, Vila Guaíra e Água Verde. Em 1933, já viviam na cidade cerca de seis famílias Menonitas, sendo duas vindas de Stoltz-Plateau, duas da Colônia Witmarsum-Krauel e duas do Paraguai. Posteriormente, retirantes do núcleo de Auhagen também chegaram à região. Com o passar dos anos, cada vez mais famílias foram chegando e passaram a se dedicar à produção de leite (PAULS JUNIOR, 1980). Atualmente, o maior grupo de Menonitas no Brasil está em Curitiba. Em 1951, 74 famílias Menonitas adquiriram a Fazenda Cancela no município de Palmeira, próximo a Curitiba, onde fundaram a Colônia Witmarsum, dando origem a uma cooperativa mista agropecuária (BENDER; ENS; PAULS, 2013).

O aspecto isolado das comunidades Menonitas acaba facilitando a ocorrência de casamentos consanguíneos, que, associada à sua história demográfica com pelo menos três gargalos de garrafa, define uma certa homogeneidade genética ao grupo. A deriva genética, então, pode ser atribuída como um dos elementos determinantes a essa homogeneidade, já que os genes herdados são aleatoriamente passados para a próxima geração, e não de acordo com a seleção natural.

Em 2012, Boschmann e colaboradores investigaram a frequência dos polimorfismos *LCT**-13910 C>T e *LCT**-14010 G>C, associados à persistência da lactase, nas populações Menonita e Euro-brasileira não-Menonita do Sul do Brasil. Neste estudo, indicaram que apenas 12% dos menonitas e 45% dos Euro-brasileiros apresentam o genótipo *LCT**-13910 C/C, um dos marcadores para hipolactasia primária. Dessa forma, concluíram que a persistência da lactase chega a 88% na população Menonita e somente a 55% dos Euro-brasileiros não-Menonitas.

Doherty e colaboradores identificaram, também em 2012, a variante *c.1473delG* no gene *GPSM2* em pacientes com ancestralidade Menonita. Essa variante estaria ligada ao desenvolvimento da Síndrome de Chudley-McCullough (CMS), cuja herança autossômica recessiva e é caracterizada por perda auditiva neurossensorial profunda e anomalias cerebrais. Ainda no mesmo ano, Almomani e colaboradores (2012), corroboraram os achados de Doherty ao analisarem variantes neste gene relacionadas à CMS em Menonitas Norte-americanos. Portanto, os estudos sugerem que a mutação *c.1473delG* no gene *GPSM2*, associada à CMS, parece ser uma mutação fundadora antiga, que foi trazida à América do Norte por colonos Menonitas originários da Europa Ocidental.

Em 2007, Alvarado-Esquivel e Delanghe indicaram um efeito fundador relacionado aos fenótipos de haptoglobina (Hp) numa população mexicana de Menonitas, cuja frequência do alelo *Hp**1 de 0,317, apresentou-se distinta da observada em população alemã da qual se originaram (0,460). Os autores relacionaram os resultados obtidos à migração da população Menonita pela Europa, desde sua fixação ao leste europeu, principalmente na Rússia até seu subsequente estabelecimento nas Américas.

Boldt e colaboradores (2009) analisaram a diversidade da região codificadora do gene do receptor da quimiocina CC (*CCR5*) em cinco populações da América do Sul. Nesse estudo, encontraram dois novos alelos não sinônimos em Ameríndios e uma alta frequência de *CCR5**D32 na população de Euro-brasileiros. Ademais, encontraram uma frequência duas vezes maior (14,2%) do alelo na população Menonita, quando comparada à frequência na subamostra de Euro-brasileiros não Menonitas. O estudo indica que, devido às semelhanças entre as frequências encontradas nos Menonitas brasileiros e a frequência encontrada nos norte europeus, houve a ação de um efeito fundador ou de gargalo associado à deriva genética, que teria levado ao aumento da frequência alélica de D32 nesta população.

Em Manitoba no Canadá, há relatos de diversas famílias Menonitas com câncer de cólon não-polipomatoso hereditário (HNPCC) ou Síndrome de Lynch. Observou-se a mutação *p.Trp714X* no gene *MLH1* em todas estas famílias, o que sugere um possível evento de efeito fundador, uma vez que não havia relação direta de parentesco entre elas. Além disso, o gene mutado nestas famílias apresentou uma penetrância de 40 a 60% e a idade média de diagnóstico de HNPCC foi cerca dos 40 anos (ORTON, 2008).

Outro estudo com os Menonitas de Manitoba foi feito sobre a anemia de Fanconi (AF). Essa desordem hereditária é decorrente de instabilidade cromossômica, associada à falência da medula óssea e predisposição ao câncer. Em alguns grupos étnicos, a incidência de AF é maior do que 1:130.000, o que é geralmente encontrado em populações com isolamento genético e efeito fundador presente, o que é o caso de diversas comunidades fechadas. Em 2012, Vries e colaboradores estudaram 15 indivíduos Norte-americanos portadores da mutação *c.67delG* no gene *FANCC* relacionado com AF, sendo 11 deles homozigotos, com ancestralidade holandesa e parentesco com Menonitas de Manitoba no Canadá. A partir de uma investigação genealógica, observaram que os ancestrais destes indivíduos vieram de quatro áreas da Holanda, sendo que estes apresentaram o mesmo haplótipo, indicando a possibilidade de um ancestral comum. Levando em conta também a existência de consanguinidade, os autores consideraram esta mutação como fundadora holandesa e assim sugeriram que a frequência de portadores da mutação *c.67delG* em *FANCC* na população Norte-americana Menonita é maior do que o esperado para uma doença recessiva rara como a Anemia de Fanconi.

Nakamura e colaboradores (2014) estudaram dez indivíduos Menonitas que apresentavam a mutação sem sentido *c.6200C>A* no gene *ATM*, considerada uma mutação exclusiva da população Menonita. Esses indivíduos também exibiam uma variante fenotípica de ataxia-telangiectasia (AT), e muitos deles desenvolveram câncer e em seguida, reações adversas à radioterapia e/ou quimioterapia.

Variados estudos genéticos foram realizados na população Menonita, tais quais os em relação à deficiência do fator intrínseco gástrico (FERRAND *et al.*, 2014), ao risco de esclerose múltipla (LAUER, 2006), várias doenças hereditárias (JAWORSKI *et al.*; 1989), Síndrome de Alström (COLLIN *et al.*; 2002), Síndrome de depleção mitocondrial hepatocerebral (TADIBOYINA *et al.*; 2005), entre muitos outros. Isso ressalta a importância do projeto MENNOGEN, que busca investigar a frequência de

doenças, suas relações com polimorfismos gênicos e possíveis influências de fatores externos que acompanham o modo de vida de menonitas brasileiros. Recentemente, foi identificado uma clara associação entre autopercepção de saúde e depressão independente de quaisquer outros fatores em todas as comunidades menonitas estudadas, em um extenso levantamento epidemiológico (BOLDT et al, 2020).

2.2. DEPRESSÃO

A depressão é um distúrbio mental que desencadeia um comprometimento do estado físico e psicológico de um indivíduo. É caracterizado por sintomas como tristeza persistente, ansiedade, irritabilidade, falta de energia, perda de interesse por atividades em geral, incluindo aquelas que normalmente geravam prazer, baixa autoestima, alteração do sono e do apetite, sentimento de culpa, dificuldades de concentração, indecisão, pensamentos sobre morte e suicídio, possivelmente seguidos por tentativas de suicídio (MARLY et. al, 2019). É, uma doença psiquiátrica, crônica e recorrente, sendo, também, uma das principais causas de incapacitação física, pessoal e social no mundo. Atualmente a doença afeta entre 4 a 5% da população mundial, cerca de 322 milhões de pessoas, sendo dessas, 11,5 milhões de brasileiras (cerca de 6% da população do país). (MARLY et. al, 2019; IBGE, 2013). A depressão gera altos custos de tratamentos médicos e psicológicos, afetando tanto os indivíduos que sofrem da doença, quanto a própria sociedade (LEMOULT; GOTLIB, 2019).

Transtornos depressivos podem ser diagnosticados em qualquer fase da vida, contudo uma incidência maior de casos é observada em adultos dentre 30-65 anos. Concomitantemente, vem crescendo o número de casos diagnosticados durante a adolescência e em jovens adultos. Há variação de gravidade em cada caso de depressão e os transtornos podem ser esporádicos, contudo, estudos indicam que a oscilação hormonal de mulheres, principalmente no período fértil, as torna mais vulneráveis aos estados depressivos. (GRUBITS; GUIMARÃES, 2007).

É possível obter um diagnóstico de transtorno depressivo apenas mediante a consulta por profissionais da psiquiatria, que utilizam o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM) e da Classificação Internacional de Doenças (CID), como base para o diagnóstico. O CID-10 descreve a depressão como um dos transtornos de humor, classificados entre as categorias F30 e F39. Já o DSM-

V, estabelece diferentes quadros existentes de transtornos depressivos. São eles: transtorno disruptivo da desregulação do humor, transtorno depressivo maior (incluindo episódio depressivo maior), transtorno depressivo persistente (distímia), transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno depressivo induzido por substância/medicamento, transtorno depressivo devido a outra condição médica, outro transtorno depressivo especificado e transtorno depressivo não especificado. Desses, o transtorno depressivo maior é o exemplo clássico e mais conhecido (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Existem quatro conjuntos de sintomas comuns que permitem caracterizar e diagnosticar um transtorno depressivo: sintomas emocionais (sentimento de tristeza, perda de prazer, episódios de explosão de raiva); sintomas cognitivos (baixa autoestima, desesperança, enfraquecimento da concentração e memória); sintomas motivacionais (passividade, falta de iniciativa e persistência) e sintomas físicos (mudança do apetite e sono, fadiga, aumento de dores e mal-estar nas atividades). Todos esses sintomas devem estar presentes, sem exceção, para que um paciente possa ser diagnosticado como depressivo, porém, quanto maiores a quantidade e intensidade dos sintomas, maior a certeza de que o indivíduo sofre desta patologia (SPRINKLE et al., 2002).

Entre todos os transtornos, comumente se observa tristeza e abatimento, junto a um sentimento de vazio e certa irritabilidade, acompanhado de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do indivíduo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Em geral, indivíduos depressivos se sentem sem resquícios de esperanças, infelizes, muitas vezes com crises de choro e pensamentos suicidas. Boa parte dos pacientes dizem não mais obter prazer e alegria com as atividades que os forneciam esses sentimentos anteriormente, e muitos dizem perder interesse e afeto pelas pessoas. Além disso, os sintomas cognitivos compartilhados por pacientes com os transtornos consistem, principalmente, em pensamentos negativos, baixa autoestima e sensação de culpa pelos fracassos. Os pacientes se sentem impotentes para fazer algo que melhoraria suas vidas (SPRINKLE et al., 2002). Para avaliar mais especificamente o tipo de transtorno, médicos observam os aspectos sintomáticos em sua duração, momento e etiologia presumida, em cada caso específico.

2.2.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

Como citado no DSM-V, o transtorno depressivo maior representa a condição clássica desse grupo de transtornos. A duração de cada distinto episódio desse transtorno é de pelo menos duas semanas, sendo que na maioria dos casos diagnosticados, os episódios duram um tempo consideravelmente maior. Neles são perceptíveis alterações claras nas demonstrações de afeto, na cognição e em funções neurovegetativas, assim como a presença de remissões interepisódicas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Esse tipo de transtorno também está associado com alta mortalidade, devido, principalmente ao suicídio, apesar de suas outras causas. A literatura também descreve correlações neuroanatômicas (SPRENGELMEYER et al., 2011), neuroendócrinas (TARGUM, 1982) e neurofisiológicas (McNEELY et al., 2008) do transtorno depressivo maior. Contudo, nenhum teste laboratorial produziu resultados de sensibilidade e especificidade suficientes para que essas correlações pudessem ser usadas como ferramenta diagnóstica. Até há pouco tempo, a hiperatividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal era a anormalidade mais amplamente investigada na associação com episódios depressivos maiores e parece estar associada a melancolia, características psicóticas e riscos para suicídio subsequente (BINELLI et al., 2012). Estudos moleculares também implicaram fatores periféricos, incluindo variantes genéticas em fatores neurotróficos e citocinas pró-inflamatórias (RABELO et al., 2015). Além disso, estudos de imagem de ressonância magnética funcional fornecem evidências de anormalidades em sistemas neurais específicos envolvidos no processamento das emoções, na busca por recompensa e na regulação emocional em adultos com depressão maior (SANCHEZ, 2009).

O DSM-V explicita também, inúmeros fatores de risco capazes de agravar ou causar o transtorno depressivo maior. Estes estariam divididos nas seguintes categorias: Temperamentais; Ambientais; Genéticos e Fisiológicos; Modificadores do Curso.

De forma mais detalhada, os fatores temperamentais estão relacionados principalmente com o neuroticismo, ou, afetividade negativa. Cita-se que altos níveis de neuroticismo são capazes de desencadear episódios depressivos como resposta a eventos estressantes. Já os fatores ambientais estariam relacionados principalmente às experiências vividas na infância, muito mais que os eventos

experenciados logo anteriormente a um episódio depressivo. Em relação aos fatores genéticos e fisiológicos, o Manual comenta que a familiaridade de primeiro grau aumenta o risco de desenvolvimento do transtorno depressivo de 2 a 4 vezes. Também cita que a herdabilidade do transtorno é de aproximadamente 40% e que o neuroticismo também tem propensão genética significativa. Por fim, como modificadores de curso, o Manual indica que todos os transtornos maiores não relacionados ao humor, tal qual o transtorno alimentar e os distúrbios de desenvolvimento, aumentam o risco de um indivíduo desenvolver depressão. Ademais, os episódios depressivos maiores, que se desenvolvem no contexto de outro transtorno, com frequência, seguem um curso mais refratário. O uso de substâncias, assim como a ansiedade e o transtorno da personalidade *borderline* estão entre os mais comuns agravadores de casos depressivos, e muitas vezes os diagnósticos desses podem obscurecer o diagnóstico dessas outras condições. No entanto, é indicado que a melhora clínica persistente nos sintomas depressivos pode muito bem depender do tratamento adequado desses mesmos transtornos subjacentes. Para mais, condições médicas crônicas ou incapacitantes também aumentam os riscos de episódios depressivos maiores. Da mesma maneira, doenças prevalentes como diabetes, obesidade mórbida e doença cardiovascular são muitas vezes agravadas por episódios depressivos, aumentando a probabilidade deles se tornarem crônicos.

2.2.2. GENÉTICA E EPIGENÉTICA DA DEPRESSÃO

A etiologia da depressão ainda não está completamente elucidada. Trata-se de uma desordem complexa multifatorial, que engloba as esferas biopsicossociais do homem (FEITOSA, 2014), cuja manifestação pode ser decorrente de fatores genéticos e ambientais. Ou seja, está relacionada a fatores exógenos (psicossociais) e endógenos (neurobiológicos, genéticos) (GALHARDO, 2010). Isso é corroborado pelas diversas associações observadas entre variações genéticas e depressão clínica em estudos (SULLIVAN et. al, 2000). Contudo, mesmo que fatores ambientais sejam conhecidos como fatores de risco, como por exemplo adversidades na infância, eles nem sempre causam o transtorno (HOFFMANN et al., 2017; PISHVA et. al, 2017). Desta forma, acredita-se que o desenvolvimento e o curso da depressão sejam explicados pelas interações combinadas de gene e ambiente, onde o efeito do

segundo depende do genótipo de uma pessoa, ou, o efeito do genótipo de uma pessoa é dependente do ambiente aonde ela se encontra (PISHVA et. al, 2017). Ou seja, os estressores, somados a uma predisposição genética do indivíduo, aumentam a chance de desenvolvimento do transtorno, quando comparados aqueles que não possuem a predisposição genética (KENDLER et al., 1995).

No geral, os fenótipos complexos, tal qual o da depressão, apresentam um padrão de herança resultante da combinação do efeito poligênico, capazes de aumentar ou diminuir a suscetibilidade, com os fatores ambientais, que iniciam, aceleram, intensificam ou conferem proteção contra o seu progresso (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013). O componente genético que pode ser atribuído a variantes genéticas com efeito aditivo no desenvolvimento do fenótipo (herdabilidade strictu sensu ou h^2), pode ser calculado a partir das correlações entre gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ) em um determinado período, em uma certa população (BOUCHARD; MCGUE, 1990). Nelas, membros de uma mesma família compartilham a constituição genética, comportamentos, cultura, situação socioeconômica, alimentação, e estão expostos aos mesmos fatores ambientais. Desse modo, as interações entre os genes e gene-ambiente na família, podem facilitar o desenvolvimento de doenças no ambiente familiar (NUSSBAUM; MCINNIS; WILLARD, 2008). Este mesmo componente familiar é citado como um dos fatores de risco de maior relevância para o desenvolvimento do transtorno da depressão (GOODWIN; JAMINSON, 1990).

Em 1966, Angst e Perris, realizaram, de forma independente, os primeiros estudos sistemáticos em famílias com relação a alterações de humor. Para tal, eles utilizaram a subdivisão de Leonhard (1957), segundo a qual os pacientes com transtornos primários do humor, denominados de unipolares (apresentando apenas depressão), devem ser analisados separadamente dos bipolares, que acrescentam episódios de hipomania a depressão, ou mania com ou sem depressão. A partir de seus estudos, ambos comprovaram a agregação familiar destes tipos de depressão. Demonstraram que o risco de desenvolvimento é de quase 1% para transtorno bipolar, e 5% para a depressão unipolar, em indivíduos com parentes de primeiro grau não-afetados, numa população geral. Já para indivíduos com parentes de primeiro grau afetados pela depressão unipolar, o risco aumenta em três vezes para o desenvolvimento do transtorno, enquanto para a bipolaridade, o risco se mantém igual ao da população em geral. Por fim, indicam que os parentes de primeiro grau

portadores de transtorno bipolar aumentam o risco da depressão unipolar em três vezes, e da doença bipolar em cerca de sete vezes. Ademais, tais achados foram corroborados por outros estudos futuros (MEIRA-LIMA & VALLADA, 1998).

A partir de duas grandes amostras de gêmeos da população geral, Kendler e Prescott (1999), utilizando os critérios estabelecidos na época pelo DSM-III-R, estimaram que a herdabilidade para depressão maior era de 39% para ambos os sexos. Seguindo os mesmos critérios, Bierut et al. (1999) relataram estimativas semelhantes, mas encontraram diferenças entre os sexos masculino e feminino, sendo as herdabilidades de 24% e 44%, respectivamente. Nos anos seguintes, a aplicação dos critérios do mais recente DSM-IV não alterou significativamente as estimativas de herdabilidade (JANG et al., 2004). A herdabilidade para depressão unipolar foi estimada em aproximadamente 40%, enquanto para o transtorno afetivo bipolar, estava entre 70% e 80%. Além disso, mais recentemente, a taxa de concordância em gêmeos monozigóticos para transtornos de humor foi estabelecida como de duas a três vezes maior que em dizigóticos, o que confirma a importância dos seus componentes genéticos (LIMA et al., 2014).

É importante citar que uma possível limitação dos estudos que estimam a herdabilidade do transtorno depressivo maior se encontra no próprio diagnóstico do transtorno. Esse é, basicamente, realizado a partir da soma total de um número de critérios, itens ou escalas, ou então o diagnóstico deriva de um conjunto de sintomas, que implicitamente são considerados de mesmo valor. No DSM-IV, por exemplo, o diagnóstico para o transtorno de depressão maior é realizado mediante presença de cinco ou mais sintomas citados de um manual específico. Assim, um mesmo diagnóstico pode considerar diferentes sintomas para cada indivíduo, representando um quadro heterogêneo, possivelmente com diferentes graus de herdabilidade (JANG et al., 2004).

A hipótese da herdabilidade diferencial dos sintomas depressivos recebeu suporte através da pesquisa de Lyons et al. (1998). Seus resultados indicam que a herdabilidade da depressão maior, diagnosticada através do DSM-III-R, foi de 36% em uma amostra de gêmeos veteranos do Vietnã, enquanto para a depressão maior leve ou moderada a herdabilidade foi zero. Ainda mais, para a depressão grave/psicótica, a herdabilidade foi estimada em 39%. Essas diferenças são fundamentadas tanto pela gravidade divergente dos sintomas, quanto pela divergência dos sintomas que compõe o transtorno de depressão maior. A partir disso,

a identificação específica de sintomas hereditários pode auxiliar no reconhecimento de genes envolvidos no transtorno, assim como suas funções, possibilitando terapias direcionadas e mais eficazes (JANG et al., 2004).

Estudos de associação gênica são uma alternativa de investigação que possibilita detectar genes que apresentam efeitos discretos ou moderados na determinação de uma doença, o que a torna mais adequada nas enfermidades poligênicas e multifatoriais, tal qual o transtorno depressivo.

Nesse âmbito, vários genes candidatos têm sido investigados em estudos de associação tanto no distúrbio bipolar, quanto na depressão unipolar. O primeiro gene investigado no transtorno bipolar foi o gene da tirosina hidroxilase, uma enzima que limita o ritmo de síntese das monoaminas (LAFER et al., 1999).

Vários outros estudos de associação têm sido realizados sobre a depressão. Inicialmente, não foram capazes de estabelecer resultados definitivos, sendo que a maioria dos achados não puderam ser replicados, e foram dados como falsos-positivos. Isso estaria, muito provavelmente, relacionado às estratificações populacionais ou ao acaso (LAFER et al., 1999). Atualmente os estudos de associação genômica geral, ou de *GWAS* (*genome-wide association studies*), são capazes de analisar e replicar, com confiança, os resultados obtidos. A identificação de marcadores genéticos em um número significativo de indivíduos, assim como o estabelecimento claro da sua esfera populacional (descendência, e originalidade), permitem examinar a pleiotropia e arquitetura genética complexa compartilhada entre os indivíduos estudados, possibilitando o melhor entendimento de como os genes observados afetam a doença em questão e, por consequência, a criação de estratégias de prevenção e de tratamento mais adequadas.

Estudos de associação de amplitude genômica (*GWAS*) com números amostrais muito altos, identificaram variantes associadas com a susceptibilidade a depressão que podem explicar 31 a 42% da sua herdabilidade (AMARE et al., 2019; ORMEL et al., 2019; SULLIVAN et al., 2018; WRAY et al., 2018). Dentre os genes que possuem essas variantes estão os *OLFM4* (Olfactomedin 4), *NEGR1* (Neuronal Growth Regulator 1), *RBFOX1* (RNA Binding Fox-1 Homolog 1) e *LRFN5* (Leucine Rich Repeat And Fibronectin Type III Domain Containing 5) (WRAY et al., 2018). Contudo, estas variantes frequentemente têm efeito pequeno e não permitem explicar a maior parte da herdabilidade estimada (LEVINSON et al., 2014). Além disso, a heterogeneidade de sintomas da doença dificulta a replicação dos resultados de

associação, uma vez que duas pessoas podem sofrer da doença e ter poucos sintomas em comum (ORMEL et. al, 2019).

Mais recentemente, foi divulgado o maior estudo genômico sobre depressão até o momento. Levey et al. (2021), revelaram associação significativa com a expressão de *NEGR1* no hipotálamo, de *DRD2* no núcleo accumbens, e vários outros. Além disso, os estudos foram capazes de mapear 178 loci de risco, no grupo estudado (n=1.154.267 indivíduos de ancestralidade europeia) e replicar seus achados em um grande grupo independente (n=1.342.778). A partir disso, o estudo elucidou significativamente a arquitetura genética da depressão e fornece informações para a compreensão de traços psiquiátricos.

A Epigenética é uma das áreas de pesquisa que está extremamente relacionada a genética, desenvolvimento, influência ambiental e herança, tornando-a de extrema relevância em estudos de depressão, uma vez que essa doença é multifatorial. Essa área de investigação busca informações sobre alterações herdáveis, porém reversíveis na expressão gênica, que não modificam a sequência de bases nitrogenadas do DNA (NESTLER; STATES, 2019). Os mecanismos epigenéticos são responsáveis, principalmente, pela metilação do DNA, alterações nas caudas e nos tipos de histonas, expressão de RNAs não codificantes (ncRNAs), posicionamento de nucleossomos, de proteínas reguladoras e dos próprios cromossomos dentro do nucleoplasma (PORTELA; ESTELLER, 2010).

O mecanismo epigenético mais estudado, atualmente, é a metilação. A metilação ocorre quando há uma ligação de um grupo metil ao C5 (carbono de número 5 no anel da pirimidina) de uma citosina que precede uma guanina no sentido 5' – 3' (sítio CpG), o que resulta em 5-metilcitosina nos eucariotos. A metilação está associada com o silenciamento da expressão gênica, principalmente em CpGs da região promotora. Esse processo ocorre frequentemente no corpo de genes, e muito mais dificilmente em regiões com alta concentração de CpGs, denominadas ilhas CpG. Sendo assim, essas regiões, com mais de 200 pb, de alta frequência de sítios CpG, realizam um papel de grande importância na regulação da expressão gênica (CHEN et al., 2017).

As variações nos padrões de metilação têm sido pesquisadas num período mais recente. Contudo, estudos demonstraram grande sucesso em avaliar a relação de alterações epigenéticas à propensão a depressão. Um dos genes mais citados como relacionados a depressão em pesquisas epigenéticas é o *SLC6A4* (Solute

Carrier Family 6 Member 4). Ele é capaz de regular a sinalização serotoninérgica via transporte de 5-HT (serotonina) de espaços sinápticos para neurônios pré-sinápticos (CHEN et al., 2017; NESTLER; STATES, 2019; PHILIBERT et al., 2008).

Outros genes também previamente estudados nessa área são o *BDNF*, gene codificador do fator neurotrófico derivado do cérebro, cuja metilação em região promotora apresentou correlação positiva com menor síntese de BDNF nos neurônios e depressão na população geral (FUCHIKAMI et al., 2011), e o *NR3C1* (*Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1*), um gene importante para o ajuste de níveis de GR (receptores de glicocorticoides) (TURNER et al., 2006). O GR é um fator de transcrição essencial para o funcionamento eficaz do eixo HPA (hipotalâmico–pituitário-adrenal), e anormalidades no GR foram relacionadas a esquizofrenia, transtorno bipolar e à depressão (TURNER et al., 2010). Pode-se citar também o gene *OXTR* que codifica um receptor de oxitocina, o qual teve seus níveis de metilação relacionados à depressão, em diferentes estudos (REINER et al., 2015; SMEARMAN et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar variantes genéticas associadas ao efeito dominante de susceptibilidade à depressão na região codificante do genoma (exoma) em uma subamostra da população menonita de Colônia Nova (CON) no Rio Grande do Sul.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar variantes genéticas associadas a depressão na subamostra de CON, corrigidos para variáveis associadas com este transtorno, identificadas previamente no levantamento epidemiológico conduzido na mesma população,
- b) Avaliar se as associações das variantes encontradas entre os Menonitas de CON com fenótipos de expressão gênica relacionados a depressão foram observadas em estudos prévios.
- c) Avaliar se há efeito fundador para estas variantes, ao comparar as frequências das variantes encontradas entre os Menonitas de CON analisados e a população de europeus não-finlandeses.
- d) Identificar possíveis diferenças epidemiológicas ao comparar as frequências das variantes encontradas entre os Menonitas de CON e os não menonitas de CON.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. APROVAÇÃO ÉTICA

A pesquisa contou com a participação de menonitas provenientes das colônias de Curitiba - PR (CWB), Witmarsum - PR (CWI), e Colônia Nova - RS (CON), que aderiram aos convites realizados através dos meios públicos de comunicação. A coleta de informações foi previamente autorizada mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do projeto “Levantamento Epidemiológico dos Fenótipos e Doenças Complexas Existentes nas Comunidades Menonitas” (aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná – CEP SCS-UFPR sob o protocolo 1.669.241, em 09.08.2016). O questionário para o levantamento foi adaptado do Plano Nacional de Saúde (PNS) de 2013, e do Inquérito do Suplemento Saúde da Pesquisa Nacional por Amostra de domicílios (PNAD) (2013; <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0207&id=28247790>). As informações coletadas estavam relacionadas à exposição ambiental a mutágenos, comportamento, dieta e histórico familiar de doenças complexas. Quando possível, foi realizada a confirmação dos relatos por exames e laudos. O questionário do PNS foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, sob o nº 328.159, dia 26 de junho de 2013.

Tais entrevistas foram aplicadas em conjunto com os questionários autoaplicáveis, após o consentimento do sujeito, com um amplo esclarecimento verbal acerca dos objetivos, riscos e benefícios da pesquisa. Por meio das informações genealógicas fornecidas na entrevista, os participantes foram classificados em menonitas e não-menonitas de descendência predominantemente europeia ou euro-brasileiros. As fichas das entrevistas, em conjunto com os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) e Termos de Assentimento Livre e Esclarecido (TALEs) encontram-se sob a guarda da coordenação do projeto.

As coletas de amostras biológicas foram autorizadas mediante a assinatura dos TCLEs referente ao menos um dos seguintes projetos: (1) “Transtornos mentais hereditários em adultos” (aprovado pelo CONEP em 05.09.2015 no protocolo 1.215.264, e realizado em colaboração com o National Institute of Mental Health - NIMH, Bethesda, USA), e (2) “Susceptibilidade à Doença Celíaca na População

Menonita” (aprovado pelo CEP SCS-UFPR sob o protocolo 2.204.113, em 07.08.2017). O consentimento dos participantes foi obtido para autorizar a utilização dos dados do sequenciamento realizado no projeto (1), no presente estudo (CAAE: 55297916.6.0000.0102/Emenda:2.247.952).

4.2. SEQUENCIAMENTO DO EXOMA COMPLETO

As amostras de 144 residentes da comunidade de Colônia Nova – RS foram coletadas e enviadas para sequenciamento na empresa Regeneron. Dessas, 14 foram descartadas por serem de indivíduos não Menonitas por parte de mãe e pai, totalizando um número de 130 exomas de menonitas de CON enviados para sequenciamento. O sequenciamento por síntese foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq. Nesse processo, adaptadores são adicionados nas pontas das amostras de DNA, incluindo a região de ligação de sequenciamento, índices e regiões complementares aos oligonucleotídeos. Em seguida se inicia o processo de “*clustering*”, no qual cada fragmento de molécula é isotermicamente amplificado. A hibridação é iniciada pelo primeiro tipo de oligo na superfície de uma célula de vidro, que é complementar a região de adaptadores dos fragmentos, permitindo a duplicação do fragmento. O fragmento original é desconectado, e o fragmento duplicado permanece para a clonagem. Para isso, o fragmento forma uma ponte ao se conectar com o segundo tipo de oligo, onde novamente ocorre a polimerização, resultando em uma ponte dupla. Esse processo é repetido em todos os fragmentos. Quando todos os fragmentos estão amplificados, os reversos são removidos, mantendo apenas os fragmentos diretos, que são protegidos de ligações indesejadas. Por fim, os fragmentos diretos são submetidos a ciclos de ligação de nucleotídeos. Apenas um nucleotídeo correspondente a sequência se liga a cada ciclo. Com a ligação de cada nucleotídeo, os fragmentos são submetidos a uma iluminação que permite a emissão de um sinal fluorescente dos nucleotídeos, dando origem ao processo de sequenciamento por síntese. Os ciclos de síntese foram repetidos até que toda a região codificante dos materiais genéticos fornecidos fosse sequenciada. Após a leitura das sequências diretas, ocorre o sequenciamento da sequência reversa, de modo que as análises das duas sequências possam ser pareadas criando sequências contínuas e com menos índices de erros (Illumina, Inc., 2021).

A partir dos arquivos de sequências obtidos, foi realizada uma avaliação da

qualidade dos resultados, alinhando as sequências com o genoma humano de referência através de algoritmos específicos (BWA ou Bowtie2). Em seguida foi realizada a chamada de variantes com o Genome Analysis Toolkit (GATK) dando origem a arquivos VCF (Variant Call Format). Os dados foram anotados com software ANNOVAR e as variantes filtradas e priorizadas com ferramentas bioinformáticas.

O sequenciamento foi feito em parceria com os pesquisadores Fabiana L. Lopes e Francis McMahon do National Institute of Mental Health (Estados Unidos da América). Foi mantido o sigilo em relação à identidade dos indivíduos. Os resultados foram convertidos ao formato VCF (Variant Call Format).

4.3. ANÁLISE DE DADOS

A partir dos dados de sequenciamento, a fim de avaliar a predisposição genética a depressão na população de CON, comparou-se as variantes de 29 exomas de menonitas com depressão diagnosticada no passado ou no presente e 46 sem depressão diagnosticada e sem parentes de primeiro grau afetados, como controles. A seleção das variantes para as análises utilizou os seguintes critérios de qualidade: valor de $p > 10^{-6}$ para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, taxa de genotipagem por indivíduo maior que 99% e taxa de genotipagem por variante maior que 98%. As frequências alélica e genotípica dos polimorfismos foram obtidas por contagem direta. A partir disso, as variantes com equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 10^{-6}$) e taxas de chamadas $> 99\%$, foram avaliadas a partir de regressão logística multivariada como teste de independência para a obtenção do Odds Ratio e intervalo de confiança de 95% nas análises de associação genética caso-controle no modelo dominante, que permite a avaliação de variantes com efeitos maiores, (já que basta a presença de um alelo para a expressão de um fenótipo dominante) corrigido para sexo, idade, índice de massa corporal, rota migratória da avó materna, atividade física de caminhada por pelo menos 10 minutos seguidos, problemas de coluna e constipação intestinal (elementos que surgiram associados na regressão logística multivariada). Estas análises foram realizadas no programa PLINK 1.9 (HILL et al., 2017; PURCELL; CHANG, 2019; STEISS et al., 2012).

As frequências alélicas dos SNPs associados foram comparadas entre si pelo Teste Exato de Fisher para as seguintes populações: menonita vs. europeia não-finlandesa (para identificar um possível efeito fundador na população menonita em

relação a população europeia original) e menonita vs. brasileira (para avaliar se há diferenças genético-epidemiológicas entre estes dois grupos, capazes de justificar diferenças de prevalência de doenças e a construção de estratégias eficientes de saúde pública). As frequências alélicas utilizadas para o Teste Exato de Fisher da população europeia não finlandesa (non-FIN EURO) foram obtidas a partir do site: <https://gnomad.broadinstitute.org/>, de 7,718 genomas europeus não finlandeses. As frequências alélicas usadas no Teste Exato de Fisher da população brasileira foram extraídas do site: <http://abraom.ib.usp.br>, a partir dos exomas de um grupo miscigenado de 609 idosos brasileiros.

5 RESULTADOS

Por meio de um levantamento realizado de 2016-2020 em menonitas da CON (n = 185), WIT (n = 133) e CWB (n = 165), observamos que 23,4% (113 / 483) dos Menonitas relatam diagnóstico passado / presente de depressão, o que é quase três vezes a prevalência na população neo-brasileira (7,6%) (BOLDT, 2018).

Na análise de associação genética, é importante notar que, devido ao tamanho amostral ser diminuto, o intervalo de confiança das regressões logísticas é grande. Além disso, os valores de *p* podem ser considerados altos em estudos de análise genômicas em uma população miscigenada comum. Contudo, deve-se considerar que os menonitas são uma população geneticamente isolada, e que os controles foram selecionados por não apresentarem parentes afetados pela doença, além de nunca terem sido diagnosticados para depressão. Este fato aumenta a confiança em resultados obtidos em tamanhos amostrais pequenos, como neste projeto piloto.

Nas análises dos 130 exomas de CON, foram encontradas 74 variantes em 26 genes associados a um efeito dominante com depressão ($p < 0,01$) (TABELA 1). Dessas, 53 atuam como Loci de expressão de traço quantitativo (do inglês *Expression quantitative trait loci* – eQTLs).

TABELA 1 - VARIANTES ASSOCIADOS A UM EFEITO DOMINANTE PARA A DEPRESSÃO

GENE	SNP	Alelo Associado	OR	IC95%	p
WWP2	rs3748389	A	1461	6,92 - 308.600	0,0076
NOB1	rs3811348	C	484,3	5,50 - 42.670	0,0068
PLXNB2	rs28379706	T	290,2	4,61 - 18.260	0,0073
SMIM22	rs2075465	C	267	3,89 - 18.310	0,0096
UBN1	rs12446456	T	219,5	3,89 - 12.390	0,0088
TRPM6	rs4300062	C	169,1	4,58 - 6.237	0,0053
MEP1B	rs173032	T	153,2	3,34 - 7.022	0,0099
OR51B5	rs35301588	TCA	87,5	4,25 - 1.803	0,0038
ORB51I2, OR51B5, HBG2	rs11037503	T	87,5	4,25 - 1.803	0,0038
BMP8A; PPIEL	rs2889739	G	81,75	3,22 - 2.073	0,0076
PABPC4; PABPC4-AS1	rs12127094	T	81,75	3,22 - 2.073	0,0076
MEF2C	rs601942	T	77,19	4,08 - 1.460	0,0038

Continua

Cont. TABELA 1

MEF2C	rs587490	C	77,19	4,08 - 1.460	0,0038
MEF2C	rs588282	G	77,19	4,08 - 1.460	0,0038
SEC14L1	rs9674550	T	68,86	4,15 - 1.143	0,0032
SLC9A1	rs34306208	G	50,63	3,33 - 769,6	0,0047
SNX25	rs3822302	C	49	2,91 - 826,2	0,0069
KRT6C	rs382367	T	48,04	3,15 - 733,6	0,0054
KRT6A	rs711317	A	48,04	3,15 - 733,6	0,0054
COG4	rs3762171	A	47,52	2,91 - 776	0,0067
SF3B3	rs12909	T	47,52	2,91 - 776	0,0067
TVP23C; TVP23C-CDRT4	rs20076811 2	G	42,94	2,67 - 684	0,0078
TVP23C; TVP23C-CDRT4	rs13830960 2	G	42,94	2,67 - 684	0,0078
BMP8A	rs11583829	A	42,2	3,51 - 507,5	0,0032
BMP8A	rs2230006	A	42,2	3,51 - 507,5	0,0032
KRT75	rs401926	A	42,07	2,76 - 640,8	0,0071
KRT75	rs298109	T	42,07	2,76 - 640,8	0,0071
KRT6A	rs298120	T	42,07	2,76 - 640,8	0,0071
KRT1	rs14024	C	40,32	2,85 - 570,8	0,0063
ZKSCAN1	rs67110214	C	36,9	2,95 - 461,9	0,0051
NXPE1	rs632108	C	31,66	2,69 - 372,6	0,0060
TOP1MT	rs10105378	A	31,02	2,45 - 392,8	0,0080
NXPE4; NXPE2	rs550897	G	28,51	2,43 - 334,7	0,0077
PDGFD; DDI1	rs1052313	G	27,16	2,45 - 301,6	0,0072
SYT1	rs2272500	A	26,91	2,30 - 315,1	0,0087
TOP1MT	rs13277302	T	25,85	2,59 - 258,4	0,0056
FAM71F2	rs74343948	G	22,89	2,82 - 186,1	0,0034
CHGB	rs910122	A	21,8	2,29 - 207,9	0,0074
CHGB	rs236153	G	21,8	2,29 - 207,9	0,0074
CHGB	rs6085324	A	21,24	2,14 - 211,2	0,0091
CHGB	rs742711	A	21,24	2,14 - 211,2	0,0091
MXD3	rs35195098	T	20,43	2,10 - 199	0,0094
OR2G2; LOC102724446	rs61732336	G	20,28	2,08 - 197,8	0,0096
CACNG5	rs2286678	G	20,17	2,10 - 193,6	0,0092
PRKAG1; KMT2D; DDN-AS1	rs2293446	A	18,02	2,12 - 153,5	0,0082
DDN; DDN-AS1	rs10783299	C	17,85	2,06 - 154,4	0,0088
KMT2D	rs2241726	A	17,85	2,06 - 154,4	0,0088
CALHM4	rs7762318	G	17,08	2,15 - 136	0,0073
KRT19	rs11550883	G	16,61	2,07 - 133,1	0,0081
PSG7	rs11324704 4	G	15,89	2,00 - 126,2	0,0089
HLA-DQA1; LOC107986589	rs3188543	A	13,19	1,88 - 92,42	0,0094
ADH4; LOC100507053	rs1126672	A	12,28	1,87 - 80,83	0,0090
ACTN3; ZDHHC24	rs2305534	C	0,0651	0,01 - 0,50	0,0089

Continua

Cont. TABELA 1

ZIC2	rs1433231	G	0,0641	0,01 - 0,46	0,0064
EPRS	rs1061160	T	0,06273	0,01 - 0,50	0,0095
SEZ6	rs11450637	TG	0,06238	0,01 - 0,46	0,0066
ZNF341; ZNF341-AS1	rs2626551	T	0,05778	0,01 - 0,48	0,0087
THNSL1; ENKUR	rs7086282	T	0,05361	0,01 - 0,47	0,0087
GOLGA3	rs12371815	A	0,04111	0,00 - 0,38	0,0053
CHFR	rs3816759	T	0,03783	0,00 - 0,39	0,0062
CHFR	rs2306536	T	0,03762	0,00 - 0,39	0,0061
CHFR	rs2306538	A	0,03762	0,00 - 0,39	0,0061
TRIP12	rs13018957	C	0,03721	0,00 - 0,37	0,0052
FOXD4L3	9:70918542	G	0,03629	0,00 - 0,37	0,0052
THNSL1; ENKUR	rs987274	T	0,03389	0,00 - 0,41	0,0080
OLFM4	rs2298231	T	0,03303	0,00 - 0,42	0,0090
LHFPL2	rs2241566	A	0,03022	0,00 - 0,34	0,0047
ZSCAN5B	rs527025	A	0,02634	0,00 - 0,37	0,0072
ZSCAN5B	rs11084427	A	0,02634	0,00 - 0,37	0,0072
KRT77	rs7138818	T	0,01923	0,00 - 0,34	0,0073
TNS3	rs2255744	A	0,01752	0,00 - 0,35	0,0086
TNS3	rs1534136	T	0,01752	0,00 - 0,35	0,0086
RFX5	rs2233854	C	0,0172	0,00 - 0,31	0,0061
GRIK2	rs2227283	A	0,01081	0,00 - 0,30	0,0077

FONTE: o autor (2021).

Legenda: OR – “Odds Ratio”; IC95% - Intervalo de Confiança de 95%; p – “p value”. Nomenclatura dos genes: **ACTN3** – “Actinin Alpha 3”; **ADH4** – “Alcohol Dehydrogenase 4 (Class II), Pi Polypeptide”; **BMP8A** – “Bone Morphogenetic Protein 8a”; **CACNG5** – “Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Gamma 5”; **CALHM4** – “Calcium Homeostasis Modulator Family Member 4”; **CHFR** – “Checkpoint With Forkhead And Ring Finger Domains”; **CHGB** – “Chromogranin B”; **COG4** – “Component Of Oligomeric Golgi Complex 4”; **DDI1** – “DNA Damage Inducible 1 Homolog 1”; **DDN** – “Dendrin”; **DDN-AS1** – “DDN And PRKAG1 Antisense RNA 1”; **ENKUR** – “Enkurin, TRPC Channel Interacting Protein”; **EPRS** – “Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase”; **FAM71F2** – “Family with Sequence Similarity 71 member F2”; **FOXD4L3** – “Forkhead Box D4 Like 3”; **GOLGA3** – “Golgin A3”; **GRIK2** – “Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 2”; **HGB2** – “Hemoglobin Subunit Gamma 2”; **HLA-DQA1** – “Major Histocompatibility Complex, Class II, DQ Alpha 1”; **KMT2D** – “Lysine Methyltransferase 2D”; **KRT1** – “Keratin 1”; **KRT19** – “Type I cytoskeletal 19”; **KRT6A** – “Keratin, type II cytoskeletal 6A”; **KRT75** – “Keratin 75”; **KRT6C** – “Keratin, type II cytoskeletal 6C”; **KRT77** – “Keratin 77”; **LHFPL2** – “LHFPL Tetraspan Subfamily Member 2”; **LOC100507053** – não caracterizado; **LOC102724446** – não caracterizado; **LOC107986589** – não caracterizado; **MEF2C** – “Myocyte Enhancer Factor 2C”; **MEP1B** – “Meprin A Subunit Beta”; **MXD3** – “MAX Dimerization Protein 3”; **NOB1** – “NIN1 (RPN12) Binding Protein 1 Homolog”; **NXPE1** – “Neurexophilin And PC-Esterase Domain Family Member 1”; **NXPE2** – “Neurexophilin And PC-Esterase Domain Family Member 2”; **NXPE4** – “Neurexophilin And PC-Esterase Domain Family Member 4”; **OLM4** – “Olfactomedin-4”; **OR2G2** – “Olfactory receptor 2G2”; **OR51B5** – “Olfactory Receptor Family 51 Subfamily B Member 5”; **PABPC4** – “Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 4”; **PABPC4-AS1** – “PABPC4 Antisense RNA 1”; **PDGFD** – “Platelet Derived Growth Factor D”; **PLXNB2** – “Plexin B2”; **PPIEL** – “Peptidylprolyl Isomerase E Like Pseudogene”; **PRKAG1** – “Protein Kinase AMP-Activated Non-Catalytic Subunit Gamma 1”; **PSG7** – “Pregnancy Specific Beta-1-Glycoprotein 7”; **RFX5** – “Regulatory Factor X5”; **SEC14L1** – “SEC14-like lipid-binding protein 1”; **SEZ6** – “Seizure Related 6 Homolog”; **SF3B3** – “Splicing Factor 3b Subunit 3”; **SLC9A1** – “Solute Carrier Family 9 Member A1”; **SMIM22** – “Small Integral Membrane Protein 22”; **SNX25** – “Sorting Nexin 25”; **SYT1** – “Synaptotagmin 1”; **THNSL1** – “Threonine Synthase Like 1”; **TNS3** – “Tensin 3”; **TOP1MT** – “DNA Topoisomerase I Mitochondrial”; **TRIP12** – “Thyroid Hormone Receptor Interactor 12”; **TRPM6** – “Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 6”; **TVP23C** – “Trans-Golgi Network Vesicle Protein 23 Homolog C”; **TVP23C-CDRT4** – “readthrough transcription between TVP23C homolog and CDRT4 (CMT1A duplicated region transcript 4)”; **UBN1** – “Ubiquitin 1”; **WWP2** – “WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2”; **ZDHHC24** – “Zinc Finger DHHC-Type Containing 24”; **ZIC2** – “Zic Family Member 2”; **ZKSCAN1** – “Zinc Finger With KRAB And SCAN Domains 1”; **ZKSCAN1** – “Zinc Finger With KRAB And SCAN Domains 1”; **ZNF341** – “Zinc Finger Protein 341”; **ZNF341-AS1** – “ZNF341 Antisense RNA 1”; **ZSCAN5B** – “Zinc Finger And SCAN Domain Containing 5B”.

Além disso, entre as 74 variantes, observa-se que 23 são mutações “*missense*”. Uma altera o quadro de leitura; 15 levam à interrupção de sítios CpG e 14 criam um sítio CpG (TABELA 3).

Para as comparações de frequência alélica entre os grupos de Europeus não-Finlandeses (GnomAD), menonitas e neo-brasileiros, foi efetuado o teste exato de Fisher. Importante reafirmar que os dados genéticos dos menonitas correspondem aos obtidos dos 130 exomas de menonitas de CON, obtidos previamente pelo Projeto Mennogen. Ademais, destaca-se que informação sobre a população brasileira foi obtida de uma população paulista de idosos, obtidas em um projeto de longevidade (ABraOM).

TABELA 2 - FREQUÊNCIA DAS VARIANTES ASSOCIADOS A UM EFEITO DOMINANTE PARA DEPRESSÃO EM EUROPEUS NÃO FILANDESES, MENONITAS E BRASILEIROS

SNP	Alelo Referência	Freq. ENF	Freq. Menonitas	Fisher (ENF-Menonitas)	Freq. Brasileiros	Fisher (Brasileiros-Menonitas)
rs550897	G	0,4714	0,342	0,000013	0,527094	<0.0001
rs28379706	C	0,3932	0,506	0,00008	0,411330	0,0032
rs11583829	C	0,1804	0,274	0,000084	0,130148	<0.0001
rs1052313	G	0,4624	0,552	0,002296	0,392447	1.0E-6
rs2233854	C	0,1667	0,236	0,002541	0,091954	0
rs13277302	C	0,5463	0,632	0,003486	0,127637	0
rs298109	C	0,5832	0,667	0,003886	0,657635	0,781666
rs11450637	T	0,5034	0,587	0,005303	0,595238	0,840998
rs401926	G	0,5827	0,663	0,005851	0,658456	0,890309
rs4300062	C	0,2477	0,181	0,009075	0,254516	0,009005
rs3822302	C	0,3114	0,244	0,015019	0,422003	0
rs35301588	TCA	0,379	0,440	0,03324	0,270115	<0.0001
rs11037503	T	0,3796	0,440	0,03344	0,271757	<0.0001
rs3811348	T	0,588	0,650	0,035146	0,440887	0
rs12371815	A	0,1541	0,195	0,058842	0,132184	0,008595
rs74343948	G	0,1426	0,178	0,09012	0,139573	0,114169
rs13018957	C	0,4812	0,434	0,111312	0,444992	0,742113
rs1433231	G	0,3482	0,311	0,21009	--	--
rs2241566	G	0,7589	0,727	0,213223	0,73399	0,823946
rs34306208	G	0,3577	0,321	0,216972	0,270115	0,092154
rs587490	T	0,5859	0,552	0,251966	--	--
rs588282	T	0,5856	0,552	0,252238	--	--
rs601942	C	0,5857	0,555	0,332568	--	--
rs12909	T	0,42	0,402	0,549398	0,454023	0,113142

Continua

Cont. TABELA 2

rs3762171	A	0,4211	0,402	0,550562	0,429392	0,426847
rs2306538	A	0,1892	0,199	0,648177	0,223597	0,648177
rs3816759	T	0,1915	0,199	0,707462	0,183087	0,554601
rs2306536	T	0,1922	0,201	0,70809	0,223317	0,47592
rs2889739	G	0,08013	0,184	<0.0001	0.064860	<0.0001
rs12127094	T	0.09136	0,184	<0.0001	0.078818	<0.0001
rs2255744	G	0,8226	0,701	<0.0001	0.728243	ns
rs1534136	A	0,8187	0,701	<0.0001	0.729064	ns
rs2626551	C	0.6425	0,583	<0.0001	0.735632	<0.0001
rs61732336	G	0.09783	0,157	0.00072	0.082923	0.00013
rs910122	A	0.3737	0,263	0.000118	0.371921	0.000553
rs236153	G	0.3753	0,267	0.000157	0.429392	<0.0001
rs298120	C	0.5816	0,663	0.00503	0.634647	ns
rs10105378	G	0.5501	0,629	0.00718	0.531199	0.002672
rs11550883	A	0.6296	0,725	0.000747	0.632184	0.002769
rs113247044	G	0.1642	0,232	0.001747	0.174056?	0.021373
rs173032	C	0.6477	0,730	0.003288	0.644499	0.005547
rs2272500	A	0,3554	0,277	0.005954	0.302135	ns
rs7762318	A	0.6113	0,680	0.016138	0.596880	0.008747
rs6085324	A	0.2761	0,218	0.029708	0.203612	ns
rs742711	A	0.2756	0,218	0.031131	0.201970	ns
rs9674550	T	0,3899	0,388	ns	0,257576	0,001072
rs2230006	A	0,1801	--	--	0,120264	--
rs67110214	C	0,266	0,272	ns	0,35625	0,068709
9:70918542	G	0,3747	--	--	0,348485	--
rs382367	T	0,5743	--	--	0,535304	--
rs711317	A	0,5733	--	--	0,509031	--
rs632108	C	0,4851	0,342	ns	--	--
rs14024	C	0,3104	--	--	0,26601	--
rs527025	A	0.3167	0,309	ns	0.257800	ns
rs11084427	A	0.3185	--	--	0.237274	--
rs7138818	T	0.4248	0,447	ns	0.399836	ns
rs3748389	A	0.3380	0,367	ns	0.371921	ns
rs2227283	A	0.4351	0,406	ns	0.444992	ns
rs200768112	G	0.3155	--	--	0.366426	
rs138309602	G	--	--	--	--	--
rs987274	T	0.3463	0,374	ns	0.442681	0.036313
rs2293446	A	0.3976	0,347	ns	0.341049?	ns
rs7086282	T	0.3510	0,375	ns	0.444992	0.031031
rs12446456	T	0.4135	0,461	ns	--	--
rs10783299	C	0.3840	0,377	ns	0.369458	ns
rs2241726	A	0.3800	0,375	ns	0.348112	ns
rs2305534	C	0.2383	0,253	ns	0.188944	0.014097
rs2298231	T	0.4889	0,486	ns	0.540230	ns

Continua

Cont. TABELA 2

rs1126672	A	0.2844	0,244	ns	0.214286	ns
rs2286678	G	0.4842	0,454	ns	0.536946	0.012149
rs35195098	T	0.2307	0,211	ns	--	--
rs3188543	A	0.2954	--	--	0.271757	--
rs1061160	T	0.3444	0,300	ns	0.374384	0.019505
rs2075465	C	0.4892	0,489	ns	0.576450	0.008116

FONTE: o autor (2021)

Legenda: Freq. - Frequências das variantes encontradas; ENF – Europeus Não-Finlandeses; ns – não significativo;

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS A EFEITO DOMINANTE COM DEPRESSÃO

GENE	SNP	Alteração de Aminoácidos	Alterações CpG	eQTL
SEC14L1	rs9674550	na	Sim, CpG – TpG	Sim
BMP8A	rs11583829	na	Sim, ApG – CpG	Sim
BMP8A	rs2230006	na	Sim, CpG – CpA	Sim
FAM71F2	rs74343948	p.I4M	Não	na
MEF2C	rs601942	na	Não	Sim
MEF2C	rs587490	na	Não	Sim
MEF2C	rs588282	na	Não	Sim
OR51B5	rs35301588	p.L238fs	Não	Sim
ORB51I2, OR51B5, HBG2	rs11037503	p.S293S	CpG-TpG	na
LHFPL2	rs2241566	p.N223N	Não	Sim
SLC9A1	rs34306208	p.V23V	Sim, CpA – CpG	Sim
ZKSCAN1	rs67110214	Variante transcrita não-codificadora	GpG – CpG	Sim
FOXD4L3	9:70918542	p.H225Q	Sim, CpG – GpG	Sim
TRIP12	rs13018957	p.T567T – p.T870T – p.T837T – p.T885T	Sim, TpG – CpG	Sim
GOLGA3	rs12371815	na	Não, mas perto de CpG	Sim
TRPM6	rs4300062	na	Sim, TpG – CpG	na
KRT6C	rs382367	p.A419A	Não, mas perto de CpG	na
KRT6A	rs711317	p.A161A	Não	na
TOP1MT	rs13277302	na	Não, mas perto de CpG	Sim
NXPE1	rs632108	na	Sim, TpG – CpG	na
CHFR	rs2306536	p.V488M, p.V580M, p.V579M, p.V568M, p.V539M	Sim, CpG – TpG	Sim
CHFR	rs2306538	na	CpG-CpA, perto de outro CpG:	Sim
RFX5	rs2233854	p.P409R	Sim, GpG – CpG	Sim
CHFR	rs3816759	na	Sim, CpG – TpG	Sim
KRT1	rs14024	p.K633R	Não	na
ZIC2	rs1433231	na	CpA – CpG	na
SEZ6	rs11450637	na	Não	Sim
COG4	rs3762171	p.L216L	Não, mas perto de CpG	Sim

Continua

Cont. TABELA 3

SF3B3	rs12909	p.I996I	Sim, CpG – TpG	Sim
NOB1	rs3811348	p.R231Q	Sim, CpG – TpG	Sim
SNX25	rs3822302	na	Sim, TpG – CpG	Sim
KRT75	rs401926	p.C388C	Não, mas perto de CpG	Sim
KRT75	rs298109	p.R91G	Sim, TpG – CpG	Sim
KRT6A	rs298120	na	Não	Sim
ZSCAN5B	rs527025	p.Pro187Ser;	Próximo a sítios CPG	Sim
ZSCAN5B	rs11084427	p.Pro187Ser	CpG – CpA,	Sim
PDGFD; DDI1	rs1052313	na	Não	Sim
KRT77	rs7138818	na	Não	Sim
PLXNB2	rs28379706	p.Lys318Glu	Sim, TpG – CpG	Sim
CALHM4	rs7762318	na	Não	Sim
CHGB	rs910122	p.Arg178Gln	CpG – CpA,	Sim
CHGB	rs236153	na	Não	Sim
BMP8A; PPIEL	rs2889739	na	Não	Sim
PABPC4; PABPC4-AS1	rs12127094	na	Próximo de um sítio CpG	Sim
WWP2	rs3748389	na	Não	Sim
NXPE4; NXPE2	rs550897	p.Tyr398Asp	Não	Sim
GRIK2	rs2227283	p.Glu808Asp	Não	n.a.
TVP23C; TVP23C-CDRT4	rs200768112	p.Trp202Arg	CpA – CpG,	Sim
TVP23C; TVP23C-CDRT4	rs138309602	p.Ser199Thr	CpA – CpG	n.a.
THNSL1; ENKUR	rs987274	na	CpG – TpG	Sim
TOP1MT	rs10105378	na	Não	Sim
KRT19	rs11550883	na	Não	Sim
PRKAG1; KMT2D; DDN- AS1	rs2293446	na	CpG – CpA	Sim
TNS3	rs2255744	na	Não	n.a.
TNS3	rs1534136	na	Não	n.a.
THNSL1; ENKUR	rs7086282	p.Leu556Val	Não	Sim
SYT1	rs2272500	na	Não	Sim
ZNF341; ZNF341-AS1	rs2626551	na	TpG – CpG	Sim
UBN1	rs12446456	na	CpG – TpG	Sim
DDN; DDN-AS1	rs10783299	p.Glu607Gly	Não	Sim
KMT2D	rs2241726	na	Não	Sim
PSG7	rs113247044	p.Arg98Ter	Não	n.a.
ACTN3; ZDHHC24	rs2305534	p.Gln91Arg	TpG – CpG	Sim
OLFM4	rs2298231	na	Não	Sim
ADH4; LOC100507053	rs1126672	na	Não	Sim
CHGB	rs6085324	p.Ser93Thr	Não	Sim

Continua

Cont. TABELA 3

CHGB	rs742711	p.Arg417His	CpG – CpA	Sim
CACNG5	rs2286678	na	Não	n.a.
MXD3	rs35195098	na	Não	Sim
HLA-DQA1; LOC107986589	rs3188543	na	Não	n.a.
EPRS	rs1061160	na	Não	Sim
SMIM22	rs2075465	p.Trp82Arg	Não	Sim
OR2G2; LOC102724446	rs61732336	p.Met150Val	Não	n.a.
MEP1B	rs173032	na	Não	n.a.

FONTE: o autor (2021).

Legenda: Alteração de aminoácido em branco – Sem informações disponíveis; em verde – benigna; em vermelho – prejudicial; eQTL – Sim: refere-se à genes associados a expressão quantitativa de genes em tecidos nervosos; n.a.: não disponível. Nomenclatura dos genes: **ACTN3** – “Actinin Alpha 3”; **ADH4** – “Alcohol Dehydrogenase 4 (Class II), Pi Polypeptide”; **BMP8A** – “Bone Morphogenetic Protein 8a”; **CACNG5** – “Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Gamma 5”; **CALHM4** – “Calcium Homeostasis Modulator Family Member 4”; **CHFR** – “Checkpoint With Forkhead And Ring Finger Domains”; **CHGB** – “Chromogranin B”; **COG4** – “Component Of Oligomeric Golgi Complex 4”; **DDI1** – “DNA Damage Inducible 1 Homolog 1”; **DDN** – “Dendrin”; **DDN-AS1** – “DDN And PRKAG1 Antisense RNA 1”; **ENKUR** – “Enkurin, TRPC Channel Interacting Protein”; **EPRS** – “Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase”; **FAM71F2** – “Family with Sequence Similarity 71 member F2”; **FOXD4L3** – “Forkhead Box D4 Like 3”; **GOLGA3** – “Golgin A3”; **GRIK2** – “Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 2”; **HGB2** – “Hemoglobin Subunit Gamma 2”; **HLA-DQA1** – “Major Histocompatibility Complex, Class II, DQ Alpha 1”; **KMT2D** – “Lysine Methyltransferase 2D”; **KRT1** – “Keratin 1”; **KRT19** – “Type I cytoskeletal 19”; **KRT6A** – “Keratin, type II cytoskeletal 6A”; **KRT75** – “Keratin 75”; **KRT6C** – “Keratin, type II cytoskeletal 6C”; **KRT77** – “Keratin 77”; **LHFPL2** – “LHFPL Tetraspan Subfamily Member 2”; **LOC100507053** – não caracterizado; **LOC102724446** – não caracterizado; **LOC107986589** – não caracterizado; **MEF2C** – “Myocyte Enhancer Factor 2C”; **MEP1B** – “Meprin A Subunit Beta”; **MXD3** – “MAX Dimerization Protein 3”; **NOB1** – “NIN1 (RPN12) Binding Protein 1 Homolog”; **NXPE1** – “Neurexophilin And PC-Esterase Domain Family Member 1”; **NXPE2** – “Neurexophilin And PC-Esterase Domain Family Member 2”; **NXPE4** – “Neurexophilin And PC-Esterase Domain Family Member 4”; **OLM4** – “Olfactomedin-4”; **OR2G2** – “Olfactory receptor 2G2”; **OR51B5** – “Olfactory Receptor Family 51 Subfamily B Member 5”; **PABPC4** – “Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 4”; **PABPC4-AS1** – “PABPC4 Antisense RNA 1”; **PDGFD** – “Platelet Derived Growth Factor D”; **PLXNB2** – “Plexin B2”; **PPIEL** – “Peptidylprolyl Isomerase E Like Pseudogene”; **PRKAG1** – “Protein Kinase AMP-Activated Non-Catalytic Subunit Gamma 1”; **PSG7** – “Pregnancy Specific Beta-1-Glycoprotein 7”; **RFX5** – “Regulatory Factor X5”; **SEC14L1** – “SEC14-like lipid-binding protein 1”; **SEZ6** – “Seizure Related 6 Homolog”; **SF3B3** – “Splicing Factor 3b Subunit 3”; **SLC9A1** – “Solute Carrier Family 9 Member A1”; **SMIM22** – “Small Integral Membrane Protein 22”; **SNX25** – “Sorting Nexin 25”; **SYT1** – “Synaptotagmin 1”; **THNSL1** – “Threonine Synthase Like 1”; **TNS3** – “Tensin 3”; **TOP1MT** – “DNA Topoisomerase I Mitochondrial”; **TRIP12** – “Thyroid Hormone Receptor Interactor 12”; **TRPM6** – “Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 6”; **TVP23C** – “Trans-Golgi Network Vesicle Protein 23 Homolog C”; **TVP23C-CDRT4** – “readthrough transcription between TVP23C homolog and CDRT4 (CMT1A duplicated region transcript 4)”; **UBN1** – “Ubinuclein 1”; **WWP2** – “WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2”; **ZDHHC24** – “Zinc Finger DHHC-Type Containing 24”; **ZIC2** – “Zic Family Member 2”; **ZKSCAN1** – “Zinc Finger With KRAB And SCAN Domains 1”; **ZKSCAN1** – “Zinc Finger With KRAB And SCAN Domains 1”; **ZNF341** – “Zinc Finger Protein 341”; **ZNF341-AS1** – “ZNF341 Antisense RNA 1”; **ZSCAN5B** – “Zinc Finger And SCAN Domain Containing 5B”.

Os resultados das associações indicam que a frequência alélica de 31 das 74 variantes em Menonitas diferem significativamente das frequências observadas em europeus não finlandeses, e que por isso consistem em um efeito fundador (TABELA 2). Além disso, 30 variantes ocorreram em genes associados ao desempenho cognitivo (das quais 23 são eQTLs) (TABELA 3), e cinco delas, em três genes anteriormente implicados na depressão (*OLFM4*, *GRIK2* e *MEF2C*).

6 DISCUSSÃO

Para avaliar a predisposição genética dos Menonitas de CON a depressão, foram utilizadas análises de associação genética com efeito dominante. Lesch (2004), cita que, habitualmente, o diagnóstico de depressão é acompanhado pela ocorrência em parentes de primeiro e segundo graus afetados por depressão bipolar e unipolar e, em geral, existe uma forte sobrecarga familiar depressiva. Desse modo, o modelo dominante seria capaz de fornecer os resultados mais confiáveis. Além disso, é possível inferir que os participantes dos questionários que relataram terem sido diagnosticadas com transtorno depressivo maior, pelos devidos profissionais, muito provavelmente foram avaliados por meio dos critérios estabelecidos no manual DSM-V.

A partir dos cálculos de associações efetuados, foram encontradas 74 variantes, em 26 genes distintos, relacionadas a um efeito dominante da depressão ($p < 0,01$). Cinquenta e três das variantes atuam como loci de expressão de traço quantitativo (TABELA 3). Esses loci são capazes de explicar uma parte da variação genética de uma expressão fenotípica, através da quantificação de seus mRNA transcritos ou de suas proteínas transcritas. Ademais, eQTLs são frequentemente utilizados em estudos de variação de expressão genética atribuída a diferenças populacionais (NICA & DERMITZAKIS, 2013).

Entre as 74 variantes, observou-se que 23 são mutações “*missense*”. Ou seja, 23 das mutações são pontuais com alteração de apenas um único nucleotídeo resultando em um códon codificador de um aminoácido diferente do anterior. Apenas uma das mutações altera o quadro de leitura, podendo ser causada por inserção ou deleção de nucleotídeo capaz de alterar toda a sequência de códons, resultando em um produto gênico distinto do original. Ainda dentre as 74 variantes, 15 delas levam à interrupção de sítios CpG e outras 15 criam um sítio CpG (TABELA 3). Dessa maneira são SNPs de interesse, uma vez que alteram regiões reguladoras da expressão genética através da metilação.

Ao observar a frequência alélica das variantes associadas a um efeito dominante para depressão em europeus não finlandeses, menonitas e brasileiros, verificou-se que em 31 delas as frequências em Menonitas diferem significativamente ($p < 0,05$) das frequências observadas em europeus não finlandeses, e que por isso consistem em um efeito fundador. O efeito fundador é definido como o

estabelecimento de uma nova população por meio de alguns poucos indivíduos que carregam consigo somente uma pequena fração da variação genética total da população parental (RIDLEY, 2003). Dessa maneira, um efeito fundador pode ocorrer quando uma população passa por um efeito de gargalo de garrafa, no qual somente alguns indivíduos da população propagam suas características genéticas. Sendo assim, a população que se expande a partir destes indivíduos manterá um “*pool*” genético muito mais limitado, com variações de frequências genéticas e fenotípicas possivelmente diferenciadas da população original. (Ridley, 2003).

Os resultados indicam também que 30 variantes ocorreram em genes previamente associados ao desempenho cognitivo (dos quais 23 são eQTLs) (TABELA 3). A associação da depressão com a inteligência já é abordada em vários estudos e continua a ser explorada com maior frequência (SAVAGE et al., 2018; SNIKERS et al., 2017). Há indicações de que um Quociente de inteligência (QI) baixo está ligado a um maior risco de desenvolvimento de depressão crônica e pensamentos suicidas. Além disso, o QI não aparenta estar conectado aos anos passados em escolaridade, mas sim a uma vulnerabilidade cognitiva estabelecida na infância, um período que quando em vulnerabilidade também está associado ao desenvolvimento de quadros depressivos. É possível que essa correlação ocorra devido à maior habilidade de pessoas com maiores níveis de inteligência de lidar com eventos estressantes durante a vida (HUNG et al., 2016). Ademais, a inteligência musical, apresentou associação positiva com a depressão, enquanto outros tipos de inteligência, incluindo a lógico-matemática apresentaram associação negativa (PEREIRA; TAVARES, 2001).

Cinco dos SNPs encontrados em associação com a depressão estão presentes em três genes já implicados anteriormente com o transtorno (*OLFM4*, *GRIK2* e *MEF2C*).

Dois dos SNPs do gene *GRIK2* (*Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 2*) foram associados a depressão em dois estudos distintos. O SNP rs112904378 foi associado a depressão unipolar numa população europeia (n = 92957) nos estudos de Coleman et al. (2020) e o SNP rs7758630 foi também associado a depressão unipolar em duas populações, primeiro em uma metanálise de população (n = 807,553) e em seguida na replicação do estudo com uma população distinta (n = 1,306,354) (HOWARD et al., 2019). Variantes desse mesmo gene também foram associados a habilidade matemática, em GWAS (n = 1,131,881) (LEE, 2018) e ao desenvolvimento de transtorno obsessivo-compulsivo (SAMPAIO, 2010),

o que fornece ainda mais relevância para esse gene em estudos de GWAS com transtornos e doenças neurológicas.

Na população Menonita de CON, contudo, a variante rs2227283 encontrada no gene *GRIK2* apresenta um “*Odds ratio*” (OR) de resistência a depressão (TABELA 2). Sua frequência é muito semelhante na população Menonita e na ENF (TABELA 3), e também não há alterações em sítios CpG devido à mutação da glutamina no sítio 808 para uma aspargina (TABELA 3). Dessa forma é muito improvável que o SNP encontrado em Menonitas tenha um impacto funcional no diagnóstico de depressão.

O gene *MEF2C* é codificador do “*myocyte enhancer factor 2C*”, um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento cerebral, e já foi relacionado com diagnósticos de epilepsia, deficiência intelectual e hiperquinesia (HYDE et al., 2016; LE MEUR et al., 2010; PACIORKOWSKI et al., 2013). Em Muench (2018), o SNP rs10514299 desse gene foi associado a depressão em uma população com dependência alcoólica (n = 953). Portanto, é de relativo interesse estudos mais aprofundados com esse gene, e suas variantes, relacionados a depressão.

No presente estudo, foram identificados 3 SNPs no gene *MEF2C*, são os seguintes: rs601942, rs587490 e rs588282. Todos eles atuam como eQTLs (TABELA 3) e apresentaram um valor de OR de 77.19 (TABELA 2), o que representa uma alta chance das variantes estarem associadas ao efeito dominante de depressão. É interessante notar que nenhum dos SNPs causa alterações de aminoácido ou em sítios CpG, mas mantém alta influência sobre a expressão dos fenótipos (TABELA 3). Os testes de FISHER, contudo, indicam que não há efeito fundador relacionado a estas variantes (TABELA 3) e não havia dados para realizar as comparações entre os Menonitas e a população neo-brasileira.

O gene *OLFM4*, assim como os outros genes codificadores de “*Olfactomedin domain-containing proteins*” é descrito como um mediador do desenvolvimento neuronal, facilitador de adesão celular, interações intercelulares e interações entre proteínas. Por isso, a perturbação de suas expressões pode gerar alterações de desenvolvimento e até mesmo letalidade (LI, 2019). Os estudos de GWAS foram capazes de relacionar vários SNPs de *OLFM4* a transtornos depressivos. Em um estudo de metanálise (n = 449,484), Nagel et al., (2018) associaram a variante rs8181889-A a depressão unipolar. Outra variante, a rs12552-A, foi associada a depressão unipolar também no estudo de Nagel et al. (2018), em outro estudo de metanálise com uma população distinta (n = 609,424), onde também foi associada ao

transtorno bipolar (COLEMAN & GASPAR, 2019). Essa mesma variante, rs12552-A, foi associada à propensão à depressão em indivíduos do espectro autista em um estudo de GWAS (n = 18,381 com ASD (Desordem de espectro autista; n = 27,969 controles) (GROVE et al. 2019) e também associada à inteligência, novamente em um estudo GWAS (n = 248, 482) (HILL et al., 2018).

A variante do gene *OLMF4* encontrada nos Menonitas, e avaliada para o efeito dominante sobre a depressão, rs229823-T, é uma eQTL, apresenta associação com a proteção a depressão (TABELA 2) sem alterações de aminoácido ou em sítio CpG (TABELA 3). Além disso, suas frequências são muito semelhantes nas populações Menonitas e ENF, o que indica que não haja efeito fundador. A comparação da frequência dessa variante entre Menonitas e a população neo-brasileira resultou em um valor de teste de Fischer não significativo (TABELA 3).

O polimorfismo *rs28379706*, que se encontra na região éxon 3 do gene *PLXNB2*, apresenta dois alelos, T/C, sendo que o alelo *rs28379706-T* origina da alteração de um sítio originalmente CpG em um sítio TpG (TABELA 3). Essa alteração de nucleotídeo está associada com o aumento da expressão do gene no nervo tibial (GTEx) e também acarreta a alteração de aminoácido, sendo nesse caso, de uma glutamina na posição 318 para uma lisina, que é uma alteração tolerada (TABELA 3). Este polimorfismo se destaca dos outros por alguns fatores: as avaliações de associação a depressão resultaram em valor de OR extremamente alto, de 290,2 e p = 0.0073, o que indica significância (p<0,01); é eQTL e faz alteração de aminoácido em sítios CpG, onde ocorrem metilações.

No catálogo GWAS, são encontradas associações entre polimorfismos deste gene com habilidade matemática e função cognitiva (GREENWOOD et al., 2019; SPAIN et al., 2016). Ademais, o gene demonstra alto fator de metilação em glioblastoma multiforme, glioma de baixo grau, e leucemia mieloide aguda (TGCA, 2019).

Os produtos do *PLXNB2* também estão envolvidos no desenvolvimento do cerebelo (ALDINGER et al., 2013; FRIEDEL et al., 2007; MAIER et al., 2011), inteligência extremamente alta (Spain et al, 2016; Zacher et al, 2018), proliferação e migração de neuroblastos (SAHA et al., 2012), desenvolvimento de regulação de sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas no hipocampo de mamíferos (MCDERMOTT; GOLDBLATT; PARADIS, 2018), percepção de dor inflamatória (PALDY et al., 2017), cicatrização e recuperação de ferimentos (ZHOU et al., 2020),

diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana (ZHANG et al., 2019), modulação da ramificação ureteral (JAKOBSON et al., 2011), regulação negativa da motilidade dos macrófagos (RONEY et al., 2011) e regulação dos sistemas vascular e endócrino (ZIELONKA et al., 2010).

Além disso, o gene é capaz de interagir com diversas outras proteínas (SZKLARCZYK et al., 2018; WARDE-FARLEY et al., 2017). Alguns dos polimorfismos nos genes presentes nessa rede de interação são associados a traços similares aos do *PLXNB2*, como por exemplo variantes de *PLXNB1* (Plexina-B1) e *RND1* (Rho Family GTPase 1) com anos de educação (LEE et al., 2018; WRAY et al., 2018), de *RRAS* (RAS related) com o traço anterior e habilidade matemática (LEE et al., 2018), *ARHGEF12* (Rho guanine nucleotide exchange fator), *SEMA3E* (Semaforina-3E) com habilidade cognitiva geral (DAVIES et al., 2018; DONATI; DUMONTHEIL; MEABURN, 2019), *SEMA3F* (Semaforina-3F) com inteligência e habilidade cognitiva (DAVIES et al., 2018; HILL et al., 2019; HILL, 2018; SAVAGE et al., 2019), *SEMA3C* (Semaforina-3C) com depressão e *SEMA3D* (Semaforina-3D) com suicídio na depressão (COLEMAN et al., 2020; MULLINGS et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

Tendo como alvo a população Menonita, com suas características peculiares de isolamento, que aumenta a susceptibilidade a doenças monogênicas e multifatoriais, foram avaliadas a frequência de variantes genéticas associadas ao transtorno depressivo maior nessa população. Os resultados obtidos demonstram o efeito fundador em 31 das 74 variantes associadas em padrão dominante com o diagnóstico de depressão na população menonita de CON. Quinze dentre todas as variantes interrompem sítios CpG, e 14 delas criam sítios CpG, o que indica conexão com alterações em metilações e consequentemente expressão gênica. Além disso, 30 variantes ocorreram em genes associados ao desempenho cognitivo (das quais 23 são eQTLs), e cinco delas, em três genes anteriormente implicados na depressão e outros transtornos neurológicos (*OLFM4*, *GRIK2* e *MEF2C*). Observou-se, também, a associação a depressão do polimorfismo *rs28379706-T* do gene *PLXNB2*. Esse polimorfismo está ligado ao efeito fundador e a alterações em sítios CpG, onde ocorrem metilações. A ligação desse polimorfismo a depressão é corroborada pela literatura, que avalia associações do gene ao desempenho cognitivo e interações de seus transcritos a outros genes associados ao desempenho e ao transtorno depressivo maior.

Para confirmar estes achados, ainda é necessário aumentar a amostragem e avaliar a possibilidade de replicação dos resultados em populações miscigenadas, assim como em grupos de pacientes bem caracterizados, e realizar ensaios funcionais com as variantes associadas.

REFERÊNCIAS

- ALDINGER, Kimberly A. et al. Cerebellar and posterior fossa malformations in patients with autism-associated chromosome 22q13 terminal deletion. **Am J Med Genet A.**, [S. l.], v. 0, n. 1, p. 131–136, 2013. DOI: 10.1002/ajmg.a.35700.
- ALMOMANI, R.; SUN, Y.; EMMELIEN ATEN, E.; HILHORST-HOFSTEE, Y.; PEETERS-SCHOLTE, C. M. P. C. D.; VAN HAERINGEN, A.; HENDROKS, Y. M. C.; DEN DUNNEN, J. T.; BREUNING, M. H.; KRIEK, M., SANTEN, G. W. E. *GPST2 and Chudley–McCullough Syndrome: A Dutch Founder Variant Brought to North America. American Journal of Medical Genetics Part A*, p.973-976, 2012.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; DELANGHE, J. *Analysis of Haptoglobin Phenotype Polymorphism in a Mennonite Population of Northern Mexico. Revista de Investigación Clínica*, v.59, n.6, p.491-492, 2007.
- AMARE, Azmeraw T. et al. Bivariate genome-wide association analyses of the broad depression phenotype combined with major depressive disorder, bipolar disorder or schizophrenia reveal eight novel genetic loci for depression. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], p. 1420–1429, 2019. DOI: 10.1038/s41380-018-0336-6.
- American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 146, n. 8, p. 1072–1087, 2008.
- American Psychiatric Association. (2014). Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 (5a ed.; M. I. C. Nascimento, Trad.). Porto Alegre, RS: Artmed.
- ANGST, J. Zur Ätiologie und Nozologie endogener depressiver Psychosen. In: **Monographien aus der Neurologie und Psychiatrie**. Springer-Verlag, Berlin, v. 112, n. 8, 1966.
- ARCOS-BURGOS, M., MUENKE, M. Genetics of population isolates. **Clinical Genetics**, v.61, n.4, p.233-247, 2002.
- BENDER, Harold S.; ENS, Henrique; PAULS Jr., Peter. Brazil. **Global Anabaptist Mennonite Encyclopedia Online**. Jun. 2013.
- BIERUT, Laura Jean et al. Major depressive disorder in a community-based twin sample: are there different genetic and environmental contributions for men and women?. **Archives of general psychiatry**, v. 56, n. 6, p. 557-563, 1999.
- BINELLI, C., ORTIZ, A., MUÑIZ, A., GELABERT, E., FERRAZ, L., Filho, A. S., ... Martín-Santos, R. (2012). *Social anxiety and negative early life events in university students. Revista Brasileira de Psiquiatria*, 34, S69–S80.
- BOLDT, A. B. W.; CULPI, L.; TSUNETO, L. T.; SOUZA, I. R.; KUN, J. F. J.; PETZLER, M. L. *Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindians and high CCR5*Δ32 frequency in Euro-Brazilians. Genetics and Molecular Biology*, v.32, n.1, p.12-19. 2009.

BOLDT, Angelica Beate Winter; PETZL-ERLER, Maria Luiza. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. **Human Mutation**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 296–306, 2002. DOI: 10.1002/humu.10051.

BOLDT, Michele C. Epidemiologia da Depressão na População Menonita. **Relatório de Iniciação Científica**, UFPR, 2018.

BORGES-OSÓRIO, MR; ROBINSON, WM. **Genética das doenças complexas**. In: Genética Humana. Porto Alegre : Arned, 3a Ed. p. 456-479, 2013.

BOSCHMANN, S. E. Análise genética da persistência da lactase nas populações menonita e euro-brasileirado sul do Brasil. 102 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Interna e Ciências da Saúde)** - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BOUCHARD JR, T.J.; MCGUE, M. Genetic and rearing environmental influences on adult personality: An analysis of adopted twins reared apart. **Journal of Personality**, v. 58, n. 1, p. 263- 292, 1990.

BYRNE, Enda M.; HENDERS, Anjali K.; HICKIE, Ian B.; MIDDELDORP, Christel M.; WRAY, Naomi R. Nick Martin and the Genetics of Depression: Sample Size, Sample Size, Sample Size. **Twin Research and Human Genetics**, [S. l.], n. May, p. 1–3, 2020. DOI: 10.1017/thg.2020.13.

CHEN, Dongmei; MENG, Lin; PEI, Fei; ZHENG, Yang; LENG, Jiyang. A review of DNA methylation in depression. **Journal of Clinical Neuroscience**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.jocn.2017.05.022.

COLEMAN, J. R. I., GASPARD, H. A., BRYOIS, J., & BREEN, G. The genetics of the mood disorder spectrum: genome-wide association analyses of over 185,000 cases and 439,000 controls. **Biological Psychiatry**, 2019. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.10.01

COLEMAN, J. R. I., PEYROT, W. J., PURVES, K. L., DAVIS, K. A. S., RAYNER, C., ... BREEN, G. (Genome-wide gene-environment analyses of major depressive disorder and reported lifetime traumatic experiences in UK Biobank. **Molecular Psychiatry**, 2020. doi:10.1038/s41380-019-0546-6

COLLIN, G. B.; MARSHALL, J. D.; IKEDA, A.; SO, W. V.; RUSSELL-EGGITT, I.; MAFFEI, P.; BECK, S.; BOERKOEL, C. F.; SICOLO, N.; MARTIN, M.; NISHINA, P. M.; NAGGERT, J. K. *Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensorydegeneration in Alstrom syndrome*. **Nature Genetics**, v.31, p.74–78, 2002.

DOHERTY, D.; CHUDLEY, A. E.; COGHLAN, G.; ISHAK, G. E.; INNES, A. M.; LEMIRE, E. G.; ROGERS, R. C.; MHANNI, A. A.; PHELPS, I. G.; JONES, S. J.; ZHAN, S. H.; FEJES, A. P.; SHAHIN, H.; KANAAN, M.; AKAY, H.; TEKIN, M.; CANADA FORGE CONSORTIUM, TRIGGS-RAINE, B.; ZELINSKI, T. *GPSM2 mutations cause*

the brain malformations and hearing loss in Chudley–McCullough syndrome. The American Journal of Human Genetics, v.90, p.1088–1093, 2012.

FEITOSA, F. B. A depressão pela perspectiva biopsicossocial e a função protetora das habilidades sociais. **Psicol. cienc. prof.** Brasília , v. 34, n. 2, p. 488-499, June 2014.

FERRAND, A.; SIU, V. M.; RUPAR, C. A.; NAPIER, M. P.; AL-DIRBASHI, O. Y.; CHARKRABORTY, P.; PRASAD, C. *Biochemical and Hematologic Manifestations of Gastric Intrinsic Factor (GIF) Deficiency: A Treatable Cause of B12 Deficiency in the Old Order Mennonite Population of Southwestern Ontario. Journal of Inherited Metabolic Disease*, v.18, p.69-77, 2014.

FRIEDEL, Roland H.; KERJAN, Géraldine; RAYBURN, Helen; SCHÜLLER, Ulrich; SOTELO, Constantino; TESSIER-LAVIGNE, Marc; CHÉDOTAL, Alain. Plexin-B2 controls the development of cerebellar granule cells. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 27, n. 14, p. 3921–3932, 2007. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4710-06.2007.

FUCHIKAMI, Manabu et al. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 4–10, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023881.

FUGGER, L.; MORLING, N.; RYDER, L. P.; ØDUM, N.; SVEJGAARD, A. Technical aspects of typing for HLA-DP alleles using allele-specific DNA in vitro amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. Detection of single base mismatches. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 175–185, 1990. DOI: 10.1016/0022-1759(90)90437-Z.

GALHARDO, Vitor Ângelo Carlucio; MARIOSIA, Maria Aparecida Silva; TAKATA, João Paulo Issamu. Depressão e perfis sociodemográficos e clínico de idosos institucionalizados sem déficit cognitivo. 2010.

GOODWIN, F.K.; JAMISON, K.R. Manic-Depressive Illness. **Oxford University Press**, New York, 1990.

GREENWOOD, Tiffany A. et al. Genome-wide Association of Endophenotypes for Schizophrenia From the Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS) Study. **JAMA psychiatry**, [S. l.], p. 1–11, 2019. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2019.2850.

GROVE, J., RIPKE, S., ALS, T. D., MATTHEISEN, M., WALTERS, R. K., ... ANDREASSEN, O. A. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. **Nature Genetics**, 2019. 51(3), 431–444. doi:10.1038/s41588-019-0344-8

GRUBITS, S.; GUIMARÃES, M. A. L. **Psicologia da saúde**. Especificidades e diálogo interdisciplinar. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.145-146.

GTEX PROJECT. **Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project**. 2019. Disponível em: <https://www.gtexportal.org/home/gene/PLXNB2#eQTLBlock>. Acesso em: 16 set. 2020.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. Tamanho populacional efetivo. In: **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 135–141, 2010a.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. Endocruzamento. In: **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 271–289, 2010b.

HILL, W. D., MARIONI, R. E., MAGHZIAN, O., RITCHIE, S. J., HAGENAARS, S. P., MCINTOSH, A. M., ... DEARY, I. J. A combined analysis of genetically correlated traits identifies 187 loci and a role for neurogenesis and myelination in intelligence. **Molecular Psychiatry**, 2018. doi:10.1038/s41380-017-0001-5

HOFFMANN, Anke; SPORTELLI, Vincenza; ZILLER, Michael; SPENGLER, Dietmar. Epigenomics of Major Depressive Disorders and Schizophrenia: Early Life Decides. [S. l.], p. 1–25, 2017. DOI: 10.3390/ijms18081711.

HOWARD, D. M., ADAMS, M. J., CLARKE, T.-K., HAFFERTY, J. D., ... GIBSON, J. Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. **Nature Neuroscience**, 2019. 22(3), 343–352. doi:10.1038/s41593-018-0326-7

HYDE, C. L. et al. Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. **Nature Genetics**, 2016.

IBGE. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: síntese de indicadores 2013 / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento**. [s.l.: s.n.].

JAKOBSON, Madis et al. Sema4C-Plexin B2 signalling modulates ureteric branching in developing kidney. **International Society of Differentiation**, [S. l.], v. 81, p. 81–91, 2011. DOI: 10.1016/j.diff.2010.10.001.

JANG, K. L. et al. Heritability of individual depressive symptoms. **Journal of affective disorders**, v. 80, n. 2, p. 125-133, 2004.

JAWORSKI, M. A.; SEVERINI, A.; MANSOUR, G.; HENNIG, K.; SLATER, J. D.; JESKE, R.; SCHLAUT, J.; YOON, J. W.; MACLAREN, N. K.; NEPOM, G. T. *Inherited Diseases in North American Mennonites: Focus on Old Colony (Chortitza) Mennonites*. **American Journal of Medical Genetics**, v.32, p.158-168, 1989.

JUCOSKI, T. S. Levantamento de casos e aconselhamento genético de famílias com histórico de câncer na comunidade menonita de Witmarsum (PR). **Dissertação (Mestrado em Genética)**, 2016.

KENDLER, K.S. et al. **American journal of epidemiology**, 152, 833, 1995.

KENDLER, K.S.; KARKOWSKI, L.M.; PRESCOTT, C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 6, p. 837- 841, 1999.

KICHAEV, Gleb; BHATIA, Gaurav; LOH, Po-ru; GAZAL, Steven; BURCH, Kathryn; FREUND, Malika K.; SCHOECH, Armin; PASANIUC, Bogdan; PRICE, Alkes L. Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. **The American**

Journal of Human Genetics, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 65–75, 2019. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.11.008.

KLASSEN, P. P. Dierußland deutschen Mennoniten in Brasilien: Band2– Siedlungen, Gruppenund Gemeinden in der Zerstreuung. **Bolanden-Weiherhof**: Mennonitischer Geschichtsvereine,1998.

LAFER, B., & VALLADA FILHO, H. P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 21(supl 1), 12–17, 1999.

LANDI, Maria Teresa; ET AL. Genome-wide association meta-analyses combining multiple risk phenotypes provide insights into the genetic architecture of cutaneous melanoma susceptibility. **Nature Genetics**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1038/s41588-020-0611-8.

LAUER, K. *Divergent risk of multiple sclerosis in two anabaptist communities in America*. **Medical Hypotheses**, v.67, p.969–974, 2006.

LE MEUR, N. et al. *MEF2C haploinsufficiency caused by either microdeletion of the 5q14.3 region or mutation is responsible for severe mental retardation with stereotypic movements, epilepsy and/or cerebral malformations*. **J. Med. Genet.** 47, 22–29, 2010.

LEE, J. J., WEDOW, R., OKBAY, A., KONG, E., MAGHZIAN, O., ... SIDORENKO, J. *Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals*. **Nature Genetics**, 50(8), 1112–1121, 2018. doi:10.1038/s41588-018-0147-3

LEMOULT J, GOTLIB I, H. Depression: A cognitive perspective. **Clin Psychol Rev.** 2019 Apr;69:51-66. doi: 10.1016/j.cpr.2018.06.008.

LEONHARD, K. **The Classification of Endogenous Psychoses**. Robins E. ed. New York, Irvington, 1957.

Lesch KP. Gene-environment interaction and the genetics of depression. **J Psychiatry Neurosci.** 2004;29(3):174-84.

LEVEY, D.F., STEIN, M.B., WENDT, F.R. et al. Bi-ancestral depression GWAS in the Million Veteran Program and meta-analysis in >1.2 million individuals highlight new therapeutic directions. **Nature Neuroscience** 24, 954–963, 2021.

LEVINSON, Douglas F.; MOSTAFAVI, Sara; MILANESCHI, Yuri; RIVERA, Margarita; RIPKE, Stephan; WRAY, Naomi R.; SULLIVAN, Patrick F. Genetic studies of major depressive disorder: Why are there no genome-wide association study findings and what can we do about it? **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 76, n. 7, p. 510–512, 2014. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.07.029.

LI, Q., LIU, A., GU, X., & SU, Z. Olfactomedin domain-containing proteins: evolution, functional divergence, expression patterns and damaging SNPs. **Molecular Genetics and Genomics**, 2019. doi:10.1007/s00438-019-01549-9

LIMA, I.V.M.; SOUGEY, E.B.; VALLADA FILHO, H.P. Genética dos transtornos afetivos. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo , v. 31, n. 1, p. 34-39, 2004.

LOPES F.L., HOU L., BOLDT A.B., et al. Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. **Hum Biol**, 88(2):109-120, 2016.

LYONS, Michael J. et al. A registry-based twin study of depression in men. **Archives of general psychiatry**, v. 55, n. 5, p. 468-472, 1998.

MAIER, Viola; JOLICOEUR, Christine; RAYBURN, Helen; TAKEGAHARA, Noriko; KUMANOGOH, Atsushi; KIKUTANI, Hitoshi; TESSIER-LAVIGNE, Marc; WURST, Wolfgang; FRIEDEL, Roland H. Semaphorin 4C and 4G are ligands of Plexin-B2 required in cerebellar development. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 419–431, 2011. DOI: 10.1016/j.mcn.2010.11.005.

MARLY, Luiza; CARVALHO, Freitas De; LANDIM, Santos Raposo. Depressão e disbiose. **Nutrição Brasil**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 175–181, 2019.

MASKE, W. Bíblia e Arado, Os menonitas e a construção do Seu reino. **Dissertação (Mestrado em História)**. Universidade Federal do Paraná, 1999.

MCDERMOTT, Jacqueline E.; GOLDBLATT, Dena; PARADIS, Suzanne. Class 4 Semaphorins and Plexin-B receptors regulate GABAergic and glutamatergic synapse development in the mammalian hippocampus. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 50–66, 2018. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.06.008.

MCNEELY, H. E., LAU, M. A., CHRISTENSEN, B. K., & ALAIN, C. Neurophysiological evidence of cognitive inhibition anomalies in persons with major depressive disorder. **Clinical Neurophysiology**, 119(7), 1578–1589, 2008.

MEIRA-LIMA, I.V.; VALLADA, H. Estudos Genéticos no Transtorno Afetivo Bipolar. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 25, n.4, p. 166-75, 1998.

MOGRABI, DC; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Questionário de preocupação do estado da pensilvânia (PSWQ). In: GORENSTEIN, C.; WANG, Y. P.; HUNGERBÜHLER, I. (org.). **Instrumentos de avaliação em saúde mental**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MORGAN, Michael D.; PAIRO-CASTINEIRA, Erola; RAWLIK, Konrad; SIMS, David; TENESA, Albert; JACKSON, Ian J.; CANELA-XANDRI, Oriol; REES, Jonathan. Genome-wide study of hair colour in UK Biobank explains most of the SNP heritability. **Nature Communications**, [S. l.], p. 1–10, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-07691-z.

NAGEL, M., JANSEN, P. R., STRINGER, S., WATANABE, K., DE LEEUW, C. A., ... POSTHUMA, D. Meta-analysis of genome-wide association studies for neuroticism in

449,484 individuals identifies novel genetic loci and pathways. **Nature Genetics**, 50(7), 920–927, 2018. doi:10.1038/s41588-018-0151-7

NAKAMURA, K.; FIKE, F.; HAGHAYEGH, S.; SAUNDERS-PULLAN, R.; DAWSON, A. J.; DÖRK, T.; GATTI, R. A. A-TWinnipeg: *Pathogenesis of rare ATM missense mutation c.6200C>A decreased protein expression. And downstream signaling, early-onset dystonia, cancer and life-threatening radiotoxicity*. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v.2, n.4, p.332-340, 2014.

NESTLER, Eric J.; STATES, United. Progress in Epigenetics of Depression. **Progress in molecular biology and translational science**, [S. l.], p. 1–21, 2019. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.12.011. Progress.

NICA, A. C., & DERMITZAKIS, E. T. Expression quantitative trait loci: present and future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 368(1620), 20120362–20120362, 2013. doi:10.1098/rstb.2012.0362

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Genética dos distúrbios comuns de herança complexa. In: **Thompson & Thompson Genética Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 155–180.

OLERUP, Ole; ZETTERQUIST, Henrik. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 225–235, 1992. DOI: 10.1111/j.1399-0039.1992.tb01940.x.

ORMEL, Johan; HARTMAN, Catharina A.; SNIEDER, Harold. The genetics of depression: successful genome-wide association studies introduce new challenges. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41398-019-0450-5. ORTON, N. C. et al. Unique disease heritage of the Dutch-German mennonite population.

Paciorkowski, A. R. et al. MEF2C haploinsufficiency features consistent hyperkinesis, variable epilepsy, and has a role in dorsal and ventral neuronal developmental pathways. **Neurogenetics** 14, 99–111, 2013.

PALDY, Eszter; SIMONETTI, Manuela; WORZFELD, Thomas; BALI, Kiran Kumar; VICUÑA, Lucas; OFFERMANN, Stefan; KUNER, Rohini. Semaphorin 4C Plexin-B2 signaling in peripheral sensory neurons is pronociceptive in a model of inflammatory pain. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-00341-w.

PAULS JUNIOR, P. Mennoniten in Brasilien, Witmarsum, 1980.

PENNER, H., GERLACH, H., QUIRING, H., Weierhof: Mennonitischer Geschichtsverein. **Weltweite Bruderschaft 1984**.

PERRIS, C. A study of bipolar (manic-depressive) and unipolar recurrent depressive psychoses. I. Genetic investigation. **Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum**, v. 194, p. 15-44, 1966.

PHILIBERT, Robert A.; SANDHU, Harinder; HOLLENBECK, Nancy; GUNTER, Tracy; ADAMS, William; MADAN, Anup. Rapid Publication The Relationship of 5HTT (SLC6A4) Methylation and Genotype on mRNA Expression and Liability to Major Depression and Alcohol Dependence in Subjects From the Iowa Adoption Studies. *[S. l.]*, v. 549, n. October 2007, p. 543–549, 2008. DOI: 10.1002/ajmg.b.30657.

PISHVA, Ehsan; RUTTEN, Bart P. F.; HOVE, Daniel Van den. DNA Methylation in Major Depressive Disorder. **Neuroepigenomics in Aging and Disease**, *[S. l.]*, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-53889-1.

PORTELA, Anna; ESTELLER, Manel. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, 2010. DOI: 10.1038/nbt.1685.

RABELO, Raquel de Oliveira et al. Novas hipóteses fisiopatológicas da depressão. 2015.

REINER, I.; VAN IJZENDOORN, M. H.; BAKERMANS-KRANENBURG, M. J.; 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. **Journal of Psychiatric Research**, *[S. l.]*, v. 65, p. 9–15, 2015. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2015.03.012.

RIDLEY, M. **Evolution** Oxford: Blackwell, p768, 2003.

RONEY, Kelly E. et al. Plexin-B2 Negatively Regulates Macrophage Motility, Rac, and Cdc42 Activation. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 6, n. 9, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0024795.

SAHA, Bhaskar; YPSILANTI, Athéna R.; BOUTIN, Camille; CREMER, Harold; CHÉDOTAL, Alain. Plexin-B2 regulates the proliferation and migration of neuroblasts in the postnatal and adult subventricular zone. **Journal of Neuroscience**, *[S. l.]*, v. 32, n. 47, p. 16892–16905, 2012. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0344-12.2012.

SAHR, W. D. & SAHR, C. L. L. Menonitas Brasileiros Às Margens Do Mundo Nacional: Um Estudo De Geografia Social E Cultural. **Raega - O Espaço Geográfico Em Análise**, 4, 61–84, 2008.

SAMPAIO, A. S., FAGERNESS, J., CRANE, J., LEBOYER, M., DELORME, R., PAULS, D. L., & STEWART, S. E. Association Between Polymorphisms in GRIK2 Gene and Obsessive-Compulsive Disorder: A Family-Based Study. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 17(3), 2010. 141–147. doi:10.1111/j.1755-5949.2009.00130.x

SANCHEZ, Tiago Arruda. Regulação emocional pela atenção: um estudo de neuroimagem por ressonância magnética funcional. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2009.

SAUNDERS-PULLMAN R, RAYMOND D, STOESSL AJ, HOBSON D, NAKAMURA K, PULLMANS, LEFTON D, OKUN MS, UITTI R, SACHDEV R, STANLEY K, SAN LUCIANO M, HAGENAH J, GATTI R, OZELIUS LJ, BRESSMAN SB. Variant ataxia-telangiectasia presenting as primary-appearing dystonia in Canadian Mennonites. **Neurology**. v. 78, n. 9, p. 649-657, 2012.

SIEMENS, João Udo. **Variedades lingüísticas entre os menonitas de Curitiba**. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica do Paraná, 1983.

SMEARMAN, Erica L.; ALMLI, Lynn M.; CONNEELY, Karen N.; BRODY, Gene H.; SALES, Jessica M.; BRADLEY, Bekh; RESSLER, Kerry J.; SMITH, Alicia K. Oxytocin Receptor Genetic and Epigenetic Variations: Association With Child Abuse and Adult Psychiatric Symptoms. **Child Development**, [S. l.], v. 87, n. 1, p. 122–134, 2016. DOI: 10.1111/cdev.12493.

SPAIN, S. L. et al. A genome-wide analysis of putative functional and exonic variation associated with extremely high intelligence. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 1145–1151, 2016. DOI: 10.1038/mp.2015.108.

SPRENGELMEYER R, STEELE JD, MWANGI B, KUMAR P, CHRISTMAS D, MILDERS M, MATTHEWS K. The insular cortex and the neuroanatomy of major depression. **Journal of Affective Disorders**. 133(1-2):120-7, 2011.

SPRINKLE, Stephen D. et al. Criterion validity, severity cut scores, and test-retest reliability of the Beck Depression Inventory-II in a university counseling center sample. **Journal of counseling psychology**, v. 49, n. 3, p. 381, 2002.

STRAUSS, K.A. & PUFFENBERGER E.G. Genetics, medicine, and the Plain people. **Annu Rev Genomics Hum Genet**. v.10, p. 513-536, 2009.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. **American Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 157, n. 10, p. 1552–1562, 2000. DOI: 10.1176/appi.ajp.157.10.1552.

SULLIVAN, Patrick F. et al. Psychiatric genomics: An update and an Agenda. **American Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 175, n. 1, p. 15–27, 2018. DOI: 10.1176/appi.ajp.2017.17030283.

TADIBOYINA, V. T.; RUPAR, A.; ATKISON, P.; FEIGENBAUM, A.; KRONICK, J.; WANG, J.; HEGELE, R. A. *Novel mutation in DGUOK in hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome associated with cystathioninuria*. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.135A, p.289–291, 2005.

TARGUM, S. D., SULLIVAN, A. C., & BYRNES, S. M. Neuroendocrine interrelationships in major depressive disorder. **The American Journal of Psychiatry**, 139(3), 282–286, 1982.

TGCA. **MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data**. 2019.

THIESSEN, J. Mennonite Low German Dictionary, Mennonotisch Plattdeutsches Wörterbuch. **Max Kade Institute for German-American Studies University of Wisconsin**, 2003.

TURNER, Jonathan D.; ALT, Simone R.; CAO, Lei; VERNOCCHI, Sara; TRIFONOVA, Slavena; BATTELLO, Nadia; MULLER, Claude P. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 80, n. 12, p. 1860–1868, 2010. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.06.037.

TURNER, Jonathan D.; SCHOTE, Andrea B.; MACEDO, Joana A.; PELASCINI, Laetitia P. L.; MULLER, Claude P. Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 72, n. 11, p. 1529–1537, 2006. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.07.005.

VRIES, Y.; LWIWSKI, N.; LEVITUS, M.; KUYT, B.; ISRAELS, S. J.; ARWERT, F.; ZWAAN, M.; GREENBERG, C. R.; ALTER, B. P.; JOENJE, H.; MEIJERS-HEIJBOER, H. *A dutch Fanconi Anemia FACC founder mutation in canadian Manitoba Mennonites. Anemia*, **Hindawi Publishing Corporation**, p.1-6.2012.

WRAY, Naomi R. et al. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 668–681, 2018. DOI: 10.1038/s41588-018-0090-3.

ZACHER, Meghan; NGUYEN-VIET, Tuan Anh; BOWERS, Peter; SIDORENKO, Julia; LINNÉR, Richard Karlsson. Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 50, n. 8, p. 1112–1121, 2018. DOI: 10.1038/s41588-018-0147-3.

ZHANG, Ying; SHEN, Sheng; LI, Peifeng; FAN, Yanan; ZHANG, Leilei; LI, Wuyin; LIU, Youwen. PLEXIN-B2 promotes the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via activation of the RhoA signaling pathway. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 62, n. May, p. 109343, 2019. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.06.008.

ZHOU, Xiang et al. Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 337–350, 2020. DOI: 10.1038/s41593-020-0597-7.

ZHU, Zhaozhong; GUO, Yanjun; SHI, Huwenbo; LIU, Cong-lin; HASEGAWA, Kohei; CAMARGO, Carlos A.; QI, Lu; MOFFATT, Miriam F. Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 145, n. 2, p. 537–549, 2019. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.09.035.

ZIELONKA, Matthias; XIA, Jingjing; FRIEDEL, Roland H.; OFFERMANN, Stefan; WORZFELD, Thomas. A systematic expression analysis implicates Plexin-B2 and its ligand Sema4C in the regulation of the vascular and endocrine system. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 316, n. 15, p. 2477–2486, 2010. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.05.007.