



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
“RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN PSIQUIATRÍA

PRESENTA

DRA. MARIANA MORALES MEJÍA

ASESORES:

TUTORA TEÓRICA: DRA. LUCÍA MÜNCH ANGUIANO

TUTOR METODOLÓGICO: DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

A mis padres por apoyarme, alentarme y cuidarme hasta alcanzar este sueño, sin quienes no habría podido llegar hasta aquí. A Nea, mi persona ideal y a quien admiro día a día.

A Damían, por aceptar el reto de crecer juntos el resto de nuestras vidas y quien ha sido fuente de inspiración y admiración desde el día uno.

A la Dra. Munch Anguiano y el Dr Cruz Fuentes quienes me han enseñado más que conocimientos académicos, a ser mejor persona, a dar lo mejor de mí y han sido constante fuente de admiración durante estos cuatro años, gracias por brindarme su tiempo y conocimientos. Quiero brindar un especial y enorme agradecimiento al Químico Clínico Amado Pérez Molina por su invaluable apoyo y amabilidad durante la realización de este proyecto.

Por último, quiero agradecer a las madres que nos permitieron conocer su experiencia, de quienes aprendí día a día con sus relatos.

CONTENIDO:

1. INTRODUCCIÓN
 - 1.1 Panorama epidemiológico de la salud mental
 - 1.2 Implicaciones de la salud mental perinatal
 - 1.3 Trastorno depresivo en población general
 - 1.4 Depresión perinatal
 - 1.4.1 Efectos transgeneracionales de la depresión perinatal
2. JUSTIFICACIÓN
3. OBJETIVO
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN
5. HIPÓTESIS
6. MARCO TEÓRICO
 - 6.1 Epigenética
 - 6.2 Oxitocina
 - 6.2.1 Receptor a Oxitocina (OXTR)
 - 6.2.2 Antecedentes bibliográficos relacionados con la metilación de dinucleótidos Cpg en la secuencia del gen OXTR relevantes a esta tesis
7. METODOLOGÍA
 - 7.1 Diseño del estudio
 - 7.2 Población
 - 7.3 Muestra
 - 7.3.1 Criterios de selección:
 - 7.3.1.1 Criterios de inclusión
 - 7.3.1.2 Criterios de exclusión
 - 7.3.1.3 Criterios de eliminación
 - 7.3.2 Tamaño de la muestra
 - 7.4 Variables
 - 7.4.1 Independientes
 - 7.4.2 Dependientes
 - 7.4.3 Variables confusoras
 - 7.5 Evaluaciones psicométricas empleadas en este estudio
 - 7.5.1 Escala de Depresión Post- Parto de Edimburgo
 - 7.5.2 Escala de Estrés Percibido (Perceived Stress Scale, PSS)
 - 7.5.3 Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)
8. ANÁLISIS GENÉTICO.
 - 8.1 Análisis del grado de Metilación de la secuencia candidata en la región del exón III del gen OXTR
 - 8.2 Medición de oxitocina en suero

- 8.3 Tipificación del polimorfismo tipo SNP rs 53576 en la secuencia del gen *OXTR*
- 9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO
- 10 ANÁLISIS ÉTICOS, FINANCIEROS Y DE BIOSEGURIDAD
- 11 RESULTADOS
 - 11.1 Descripción de la muestra
 - 11.2 Características sociodemográficas
 - 11.3 Características gineco obstétricas
 - 11.4 Resultados de escalas aplicadas
 - 11.5 Definición de la gravedad / severidad del trastorno psiquiátrico (severity of psychiatric disorder)
- 12 DISCUSIÓN
 - 12.1 Asociación de los niveles de metilación del gen *OXTR* con la gravedad de la psicopatología
 - 12.1.1 Oxitocina y estilo de apego
 - 12.1.2 Trastornos de la personalidad del clúster B
- 13 BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Panorama epidemiológico de la salud mental.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la salud mental como un estado de bienestar mental que permite a las personas hacer frente a los momentos de estrés de la vida, desarrollar todas sus habilidades, poder aprender y trabajar adecuadamente y contribuir a la mejora de su comunidad. La salud mental es así una parte fundamental de la salud y el bienestar, sobre la cual se sustentan las capacidades individuales y colectivas para tomar decisiones, establecer relaciones y dar forma al mundo en el que nos desarrollamos.

De acuerdo con cifras de la OMS⁴ en 2019 una de cada ocho personas en el mundo padecían un trastorno mental (lo que equivale a 970 millones de personas), siendo los trastornos más comunes la ansiedad y los trastornos depresivos. La región de América Latina y el Caribe tienen hoy en día una alta prevalencia de trastornos mentales, que se anticipa incrementará en el futuro derivado de diversos estresores como la reciente pandemia por COVID-19, generando una alta carga de enfermedad la cual se aproxima cada vez más a la alcanzada en los países más desarrollados. Cabe señalar que esta carga de las enfermedades mentales de la población refleja no solamente la prevalencia de los estados psicopatológicos, sino el resultado de un conjunto de estados y problemas de entre los cuales el comportamiento desempeña un papel preponderante.

Por otra parte, un aspecto al que no se le ha dado el reconocimiento debido es el hecho de la etapa de mayor riesgo en el debut de muchos trastornos mentales es entre los 18 y 49 años, periodo que se sobrelapa con el periodo de fertilidad de las mujeres. Esto contraviene la añeja idea de que por ejemplo durante el embarazo la mujer está “protegida” para desarrollar un problema de salud mental. Por el contrario, los datos epidemiológicos identifican al periodo perinatal como un momento del desarrollo de la mujer en el cual se está particularmente susceptible para desarrollar síntomas psiquiátricos.

1.2 Implicaciones de la salud mental perinatal

La presencia de trastornos mentales durante el embarazo está asociada con pobres desenlaces obstétricos¹⁰, tasas altas de abuso de sustancias psicoactivas, incremento de la incidencia de síntomas psiquiátricos en el postparto; ello sin mencionar las repercusiones descritas en el neurodesarrollo del producto. Paradójicamente, las tasas de diagnóstico, tratamiento y búsqueda

de atención de enfermedades mentales son menores en mujeres embarazadas que en mujeres no embarazadas. Por ejemplo, menos del 8% de las mujeres que habitan en países en vías de desarrollo con un trastorno mental diagnosticable recibe tratamiento para su padecimiento durante el periodo perinatal. Por ello, resulta de suma importancia la identificación y abordaje de dichos síntomas en el periodo perinatal.

1.3 Trastorno depresivo en población general

La etiología de la depresión es compleja ya que en ella intervienen factores psicosociales, genéticos, y biológicos. Dentro de los factores biológicos, existen evidencias de alteraciones a nivel de neurotransmisores, citoquinas y hormonas, cuyas acciones inducen modificaciones estructurales y funcionales en el sistema nervioso central, en el sistema inmunológico y en el sistema endocrino, que incrementan el riesgo de padecer la depresión mayor.

A nivel mundial, durante el 2017, aproximadamente 350 millones de personas, uno de cada diez adultos, sufre de depresión, y aproximadamente 60% de estos individuos no reciben la ayuda necesaria, a pesar de que el tratamiento disminuye los síntomas en más de 50% de los casos.

El trastorno depresivo es la segunda causa de incapacidad a nivel mundial (2013), el cual es caracterizado por ánimo depresivo (en niños se expresa como irritabilidad), pérdida de la capacidad hedónica y del interés, cualquiera de estos dos síntomas con una duración mínima de 2 semanas, además de estar acompañado de al menos 3 de los siguientes síntomas: cambios en el apetito (aumento o pérdida de peso), insomnio o hipersomnia, retardo o agitación psicomotora, fatiga o pérdida de energía, culpa y sentimientos de minusvalía excesivas e inapropiadas, alteración de la capacidad de atención y concentración y pensamientos recurrentes de muerte, ideación o intento suicida.¹ Otro trastorno depresivo es el trastorno depresivo persistente el cual es caracterizado por ánimo predominantemente triste durante al menos 2 años y al menos 2 de los siguientes síntomas: desesperanza, insomnio o hipersomnia, aumento o disminución del apetito, fatiga o disminución de la energía, bajo autoestima y alteraciones de la concentración. En niños y adolescentes el ánimo puede ser predominantemente irritable y la duración mínima es de un año. Además, tanto en niños, adolescentes y adultos, no puede haber un periodo mayor a dos meses sin sintomatología depresiva,

¹ American Psychiatric Association, 2013

un episodio de hipomanía o manía durante dicho periodo, ni cumplir criterios para un trastorno ciclotímico.

Se ha sugerido que los trastornos depresivos representan modificaciones en el sistema nervioso central en respuesta a niveles crónicos de estrés. A lo largo de los años, se ha estudiado el impacto de la exposición al estrés de forma aguda y crónica en la estructura y función del sistema nervioso central, encontrándose que la exposición al mismo en la edad temprana bajo condiciones de maltrato o abuso ocasiona una disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal durante la niñez y la adolescencia, incrementando el riesgo de desarrollar síntomas depresivos en etapa adulta. La exposición a ciertas formas de estrés excesivo induce una interacción patológica entre el sistema nervioso central, el sistema inmune innato y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que, consecuentemente puede desencadenar sintomatología depresiva. También se ha reportado que el nivel sérico de cortisol se encuentra elevado en las personas con sintomatología depresiva. Dicho fenómeno consecuente de la falta de inhibición sobre la hormona liberadora de corticotropina (CRH), provenientes de las neuronas parvocelulares en el núcleo paraventricular del hipotálamo, es la causa inmediata de las elevaciones de cortisol.

La hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal se ha asociado con diversos trastornos neuropsiquiátricos debido a sus efectos negativos sobre el sistema nervioso central, especialmente, al promover la atrofia de las proyecciones dendríticas neuronales, disminuir el proceso de neurogénesis y neuroplasticidad, así como incrementar la muerte neuronal. En consecuencia, una amplia gama de funciones cognitivas puede ser alterada por la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, al incrementarse la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y producir un exceso de glucocorticoides (GR) e hiperactivación de sus receptores.

1.4 Depresión perinatal

La depresión perinatal es aquella que ocurre durante o después del embarazo y sus síntomas pueden ir desde leves hasta graves. En casos excepcionales, los síntomas son suficientemente graves para poner en peligro la salud de la madre y del bebé.

Aproximadamente un 10 a 15% de las mujeres desarrollan una depresión postparto, siendo el trastorno psiquiátrico más común en el puerperio. En primíparas la incidencia puede ser aún mayor

(12 a 25%) y en algunos grupos de riesgo puede llegar al 35%. A pesar de que la tasa de depresión postparto no difiere significativamente de la tasa de depresión en la población adulta general, la depresión materna puede tener repercusiones tanto en la vida de la mujer como en la de su hijo, con un mayor riesgo de desarrollo de depresión en los próximos cinco años con una tasa de recurrencia de un 60% a 80% posterior al primer episodio depresivo postparto. Es por ello de vital importancia su diagnóstico oportuno y abordaje indicado.

Los estudios de prevalencia muestran que la enfermedad mental más prevalente en el embarazo es el trastorno depresivo mayor (13.2%), seguidos por trastornos de ansiedad generalizada (8.5%) y el síndrome de estrés post-traumático (3.5%). Ya en otras épocas se había anticipado que para el año 2020, la depresión sería la principal causa de años perdidos por discapacidad en mujeres en edad reproductiva (Murray et al., 200?) .

1.4.1 Efectos transgeneracionales de la depresión perinatal

Otro aspecto a destacar es que la manifestación de depresión postparto reduce la sensibilidad, aceptación y capacidad de respuesta de la madre a su hija (o), lo cual favorece el desarrollo de un apego inseguro. Además de las implicaciones físicas y del desarrollo en los hijos, se ha descrito que los hijos de madres con depresión tienen el doble de probabilidades de tener bajo peso a los 6 meses de nacido y tres veces más probabilidades de tener talla baja. Así mismo, se ha descrito que los hijos de madres con depresión durante el embarazo, que los niños, especialmente varones, cuyas madres tuvieron depresión, obtuvieron un menor puntaje en pruebas de inteligencia, mayor necesidad de educación especial y dificultades para el razonamiento matemático y el desempeño motor.

Debido a lo descrito previamente es de vital importancia la búsqueda intencionada de síntomas de enfermedad mental a través de herramientas clínicas validadas, siendo esto una práctica habitual a cargo, no solo de servicios de salud mental, si no de los servicios de ginecología y obstetricia. El uso de esta práctica podría ayudar a mejorar la calidad de vida en mujeres en edad reproductiva y embarazadas con trastornos mentales; y podría ayudar a reducir la probabilidad de desenlaces obstétricos adversos, enfermedad mental en el posparto y efectos no deseados en los recién nacidos.

2. JUSTIFICACIÓN

Este estudio pretende aportar información relevante al papel que tiene el sistema de señalización mediada por la neurohormona Oxitocina en la manifestación de la gravedad de la psicopatología perinatal. En particular este trabajo se enfoca en analizar el mecanismo epigenético de la metilación del gen *OXTR*, ya que existen reportes que lo han asociado de manera independiente tanto con alteraciones en el establecimiento de vínculo materno-infantil, como con la gravedad de sintomatología depresiva en la mujeres, así como con el antecedente de exposición al estrés temprano. El aspecto novedoso de nuestro enfoque es que trató de vincular estos y otros aspectos que consideramos relevantes como la percepción del estrés o la presencia de un trastorno comórbido de personalidad del cluster B, en la definición misma del concepto de gravedad

3. OBJETIVO

Identificar patrones de metilación del gen receptor de oxitocina (*OXTR*) y niveles de oxitocina séricos asociados a la gravedad de la psicopatología materna perinatal en pacientes femeninos de la clínica de genética y psiquiatría perinatal del INPRFM, en función de:

- a) La intensidad del estrés percibido.
- b) La severidad de sintomatología depresiva.
- c) La presencia de rasgos de personalidad del cluster B.
- d) El antecedente de trauma en la infancia.
- e) El tipo de apego materno.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La gravedad de la psicopatología materna perinatal evaluada en función de: la intensidad del estrés percibido, la severidad de sintomatología depresiva, la presencia de rasgos de personalidad del cluster B, el antecedente de trauma en la infancia y/o el tipo de apego materno se asocia a patrones de metilación distintivos en la secuencia de una región específica del gen receptor de oxitocina?

5. HIPÓTESIS

En los pacientes femeninos en etapa perinatal en las que se detecte el antecedente de exposición temprana a estrés, la sintomatología depresiva, la presencia de rasgos de personalidad del cluster B, el antecedente de estrés en la infancia y/o un apego desorganizado o ansioso materno se identificarán patrones de metilación en la secuencia del gen *OXTR* que serán distinguibles (distintos) de aquellas pacientes en las que no exista evidencia de estos antecedentes.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Epigenética.

A lo largo de la historia han existido múltiples definiciones de epigenética, por ejemplo, en 1982 Lincoln la describió como “la disciplina que evalúa lo perteneciente a la interacción de factores genéticos y los procesos de desarrollo a través de los cuales el genotipo se expresa en el fenotipo, definición que permitió involucrar de forma indirecta el término “desarrollo”, posteriormente se surgió la definición de “el estudio de los cambios en la expresión génica, que ocurre en organismos con células diferenciadas, y los patrones de expresión génica que permanecen a incluso después de la mitosis” o bien “la herencia nuclear que no se basa en las diferencias de la secuenciación de ADN”.

Actualmente la epigenética describe la interacción de la genética con los elementos citoplasmáticos que producen ciertos fenotipos y muestra especial interés en las interacciones genes-medio ambiente y en cómo los patrones de expresión persisten a pesar de la mitosis o meiosis³⁰.

Se han establecido múltiples mecanismos de regulación epigenética y sus consecuencias que se resumen brevemente en la siguiente tabla . Es claro que de todos ellos el que más se ha abordado es el referente a la metilación de secuencias específicas en el genoma.

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (OXTR) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

Funciones normales reguladas por mecanismos epigenéticos		Anormalidades causadas por errores epigenéticos	
Organización correcta de la cromatina	Controla los estados activos e inactivos de células embrionarias y somáticas	Hipermetilación del ADN	Origina condensación de la cromatina y silenciamiento de genes supresores de tumores, entre otros.
Metilación específica del ADN y modificaciones de histonas	Controla patrones epigenéticos específicos y tejidos específicos	Hipometilación del ADN	Activa oncogenes, originando inestabilidad en el cromosoma; activa transposones
Silenciamiento de elementos repetitivos	Asegura que el correcto ordenamiento de la cromatina y los patrones de expresión génicos sean mantenidos.	Mutaciones en citosinas metiladas	Origina una expresión génica inapropiada
Impronta genómica	Es esencial para el desarrollo	Defectos en la impronta	Da como resultado la pérdida de la identidad parental
Inactivación del cromosoma X	Equilibra la expresión génica entre machos y hembras		

6.2 Oxitocina.

La oxitocina (OX) es un neuropéptido y hormona relacionada con funciones sociales y emocionales en humanos, así como un factor moderador de la respuesta al estrés¹⁷. La oxitocina es sintetizada en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo para posteriormente ser transportada a través de las proyecciones axonales al lóbulo posterior de la hipófisis, en donde es almacenada en vesículas secretoras antes de ser liberada a la circulación periférica.

La liberación dendrítica de la oxitocina ocurre en el espacio extracelular. Neuronas parvocelulares en el núcleo paraventricular también producen oxitocina, la cual es liberada directamente a otras regiones cerebrales involucradas en las aptitudes sociales y emociones. Entre dichas áreas se encuentran la amígdala, el hipocampo, el estriado, el núcleo supraquiasmático y el tallo cerebral.

En mamíferos la OX tiene un papel muy importante durante el parto y en la lactancia en el postparto. Por ejemplo, el estímulo de succión ejercido por los recién nacidos, al lactar, incrementa la liberación de oxitocina en la madre y disminuye los niveles plasmáticos de ACTH y cortisol. Más aún su síntesis, liberación y transmisión de su señal biológica asociada ejerce un papel esencial para establecer un adecuado vínculo con la cría. Así se ha visto que las madres que muestran mayores concentraciones plasmáticas de oxitocina en etapas tempranas del embarazo, manifiestan una respuesta de mayor responsabilidad del cuidado al nacimiento del bebé, afecto positivo y mayor acercamiento físico con el mismo. Las observaciones anteriores han llevado a plantear implementar terapéuticas enfocadas a mejorar el vínculo entre padres e hijos y el tipo de apego en aquellos con un apego inseguro; por ejemplo, mediante la aplicación de oxitocina intranasal, lo cual se ha asociado a actividad disminuida de la amígdala, estructura que tiene un papel clave en la regulación de emociones y comportamiento social.

6.2.1 Receptor a Oxitocina (*OXTR*)

La actividad biológica de la OX a nivel celular se da en primera instancia en función de su unión y acoplamiento intracelular con una proteína receptora específica de membrana. Estos receptores de oxitocina son el producto de la expresión de un gen denominado (*OXTR*), el cual se expresa tanto en cerebro como en órganos periféricos, teniendo así, funciones tanto centrales como periféricas.

El gen ***OXTR*** se localiza en el cromosoma 3p25.3, el cual posee una longitud de 17 kilobytes y contiene 3 intrones y 4 exones. Los exones 1 y 2 corresponden a regiones no codificantes, mientras que los exones 3 y 4 representan la zona codificante de los 389 aminoácidos presentes en la secuencia del receptor. La proteína receptora de oxitocina se acopla a proteínas G transmembranales, las cuales median las respuestas a una enorme diversidad de moléculas de señalización intercelular.

Algunos polimorfismos puntuales o de nucleótido único (SNPs) de este gen se han asociado a diferentes fenotipos¹². Por ejemplo, el rs2254298 (G>A) se ha asociado a alteraciones del espectro autista, mientras que el polimorfismo rs237887 se ha asociado con habilidades de reconocimiento social. Otras variantes como el polimorfismo rs53576 (A>G) se ha relacionado con empatía reducida y menor sensibilidad parental, en tanto que el rs10422778 se ha asociado con menor sensibilidad parental.

Sin embargo, los cambios genéticos a los que se referirá principalmente esta tesis son los del proceso de metilación de DNA, que comúnmente involucra la adición de grupos metilo a algunas citocinas que forman parte de dinucleótidos “CpG”. Diferencias en la proporción y del DNA metilado resultan en cambios de transcripción del gen *OXTR* que se han asociado a modificaciones en la conducta social y emocional de mamíferos murinos y aun quizá en el caso humano.

6.2.2 Antecedentes bibliográficos relacionados con la metilación de dinucleótidos CpG en la secuencia del gen *OXTR* relevantes a esta tesis

Reiner et al.¹⁴ describió una disminución de la metilación del DNA del exón 1 fragmento A en mujeres con depresión premenopáusica en comparación con las que no la padecían. Asimismo, identificaron una asociación alélica del polimorfismo puntual rs53576 del mismo gen con una capacidad prosocial reducida y menor empatía en estas mismas mujeres. Otros como Simon Sanwald y colaboradores (2019), identificaron niveles más elevados de metilación en dos unidades CpG de la región promotora del gen *OXTR* con la severidad de la sintomatología depresiva evaluada mediante el inventario de depresión de Beck). De acuerdo con varias investigaciones previas, se ha observado que la metilación de dos sitios del CpG resulta en una reducción del 20% de la expresión del RNA metilado del gen *OXTR* y menores niveles séricos de oxitocina se asociaron a mayor metilación del *OXTR* (observado en sangre periférica), así mismo, se describió que el aumento de la metilación del *OXTR* se asocia a un proceso neurológico involucrado en la interpretación social y mayor activación de la unión temporoparietal y la corteza cingular anterior. Por el contrario, la hipometilación de la región promotora de ***OXTR***, principalmente en las islas CpG (Chr3: 8809437) se asoció significativamente con un mayor número de síntomas del trastorno de ansiedad social, así como una mayor respuesta del cortisol al test de estrés social experimentado y a una mayor actividad de la amígdala, esto bajo el fundamento bien establecido previamente de que la oxitocina atenúa la activación excesiva de la amígdala en respuesta a estímulos relevantes de miedo.

También se ha establecido asociación entre los comportamientos y cognición sociales: el alelo G del 6930G>A (rs53576) intrón 3 del gen receptor **de oxitocina** (localizado en el cromosoma 3p25.3) se le relaciona con aptitudes sociales como aumento de la empatía, optimismo y confianza, mientras que el alelo A conlleva menor empatía, menor optimismo, menor autoestima y mayores niveles de soledad y mayores niveles fisiológicos de reactividad al estrés. En síntesis parece ser que la

regulación de la expresión del gen OXTR resulta como un importante regulador de la actividad de la amígdala, asumiendo que la hipometilación del OXTR aumenta la vulnerabilidad de presentar o mantener un trastorno de ansiedad social o fobia específica al presentar hiperreactividad del sistema límbico ante señales como rechazo o humillación.

Por otra parte a La metilación del gen OXTR en la isla CpG -934 se ha relacionado con cualidades humanas como sensibilidad social, en donde, mayor metilación se correlaciona con mayor esfuerzo para aptitudes sociales y, en algunos casos, con psicopatología y dificultad para la capacidad filial. Sustentando así la hipótesis de que la disminución de la expresión del gen OXTR se relaciona con el aumento de la susceptibilidad a padecer trastornos afectivos. Además, las personas con niveles más bajos de metilación del gen OXTR mostraron una mayor capacidad de regulación de las emociones medida por la disminución de la actividad de la amígdala izquierda mientras veían estímulos faciales con expresiones negativas. Así, menor metilación del gen OXTR se asoció con mejor capacidad social, mientras que mayor metilación del OXTR, se asoció con peor capacidad social.

Ebner y colaboradores⁵ describieron que menores niveles de metilación del gen OXTR y mayores niveles plasmáticos de oxitocina se asociaron a menor reporte de apego ansioso en adultos jóvenes, no así teniendo significancia dichos resultados en adultos de mayor edad. Así mismo reportaron que una menor metilación del gen OXTR se asoció con mayor reporte de apego evitativo en adultos jóvenes, sin embargo, no fue posible correlacionar los niveles plasmáticos de oxitocina con apego evitativo tanto en adultos jóvenes como de mayor edad.

Toepfer y colaboradores¹⁹, señalaron, tras una amplia revisión que, la metilación del gen OXTR inducida por factores ambientales como el estrés experimentado en etapas tempranas afecta en la señalización de la oxitocina. En dicha revisión describe los efectos de la experiencia de estrés en etapas tempranas en las interacciones de oxitocina y el eje hipotálamo- pituitaria, comentó que el estrés vivido en etapas tempranas, está asociado a mayor reactividad de cortisol y mayores emociones negativas, así como eficiencia de la señalización de oxitocina en actividades sociales. Se han reportado estudios en animales que asocian la exposición a estrés en etapas tempranas de la vida con menor expresión del RNA mensajero del gen receptor de oxitocina en la amígdala de los mismos modelos en edad adulta, así como una disminuida capacidad para la regulación a la baja de las condiciones o parámetros basales de cortisol.

Así mismo, se identificó que sujetos que experimentaron tres o más episodios de estrés en la vida temprana manifestaban un riesgo incrementado para expresar una desregulación emocional en la etapa adulta, así como también para desarrollar un apego desorganizado. También se han descrito variaciones en otros dos SNP del gen *OXTR* (rs139832701, G/T) asociados con aumento en el riesgo para desarrollar ansiedad, estrés y depresión en aquellos sujetos con historia de exposición a eventos estresantes en etapas tempranas de la vida. Así como una mayor sensibilidad a los efectos del estrés percibido en etapas tempranas y factores "estresantes" psicosociales en sujetos con alelo G del gen *OXTR* rs 53576.

7. METODOLOGÍA

7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Según los criterios de AF Feinstein esta investigación se clasifica como un estudio descriptivo, observacional, transversal, prolectivo y homodémico.

7.2 POBLACIÓN

- Pacientes femeninos con psicopatología perinatal tratadas en la clínica de Genética y psiquiatría perinatal del INPRFM

7.3 MUESTRA

7.3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.3.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes femeninos
- Mujeres embarazadas o que se encuentren durante el primer año posterior al nacimiento.
- Con edad mayor a 18 años
- Con psicopatología perinatal

7.3.1.2 Criterios de exclusión:

- Sintomatología psicótica aguda
- Discapacidad intelectual moderada-severa

7.3.1.3 Criterios de eliminación:

- Abordaje incompleto de clinimetrías.
- Deseo abandonar el estudio.

7.3.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El muestreo se realizó por conveniencia hasta un año antes del término de la tesis.

7.4 VARIABLES

7.4.1 Independientes:

- La intensidad del estrés percibido.
- La severidad de sintomatología depresiva.

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

- La presencia de rasgos de personalidad del cluster B.
- El antecedente de trauma en la infancia.
- El tipo de apego materno.
- Variables sociodemográficas
 - Estado civil
 - Ocupación
 - Escolaridad
 - Edad
 - Religión
- Variables clínicas
 - Comorbilidad médica
 - Antecedentes heredofamiliares psiquiátricos
 - Ideación suicida, gesto suicida o intento suicida
 - Antecedentes de síntomas psicóticos
 - Antecedente de tratamiento de fertilización o tratamiento para infertilidad
 - Número de embarazo
 - Pérdidas gestacionales previas
 - Amenaza de aborto o parto prematuro
 - Complicaciones médicas durante el embarazo

7.4.2 Dependientes:

- Patrones de metilación del gen *OXTR*
- Niveles séricos de oxitocina

7.4.3 Variables confusoras:

- Uso de antidepresivos.
- Uso de benzodiacepinas.
- Uso de antipsicóticos.
- Uso de estabilizadores del ánimo.
- Uso de otro fármaco psiquiátrico.

7.5 Evaluaciones psicométricas empleadas en este estudio

7.5.1 Escala de Depresión Post-Parto de Edimburgo

Esta escala (Edinburgh Postpartum Depression Scale o EPDS por sus siglas en inglés) se creó para asistir a los profesionales de la atención primaria de salud en la detección de las madres que padecen de depresión de post-parto. Consiste de diez ítems. La madre escoge una de las cuatro posibles respuestas que más se asemeja a la manera en la que se sintió durante la semana anterior. La mayoría de las madres pueden contestar la escala sin dificultad en menos de 5 minutos. Para la calificación de esta escala, se suman todos los puntos para dar la puntuación total. Una puntuación de igual o mayor a 10, muestra la probabilidad de manifestar un episodio depresivo, pero no identifica su gravedad.

7.5.2 Escala de Estrés Percibido (Perceived Stress Scale, PSS) Este es un instrumento de autoinforme que evalúa el nivel de estrés percibido durante el último mes, consta de 14 ítems con un formato de respuesta de una escala de cinco puntos (0 = nunca, 1 = casi nunca, 2 = de vez en cuando, 3 = a menudo, 4 = muy a menudo). La puntuación total de la PSS se obtiene invirtiendo las puntuaciones de los ítems 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 13 (en el sentido siguiente: 0=4, 1=3, 2=2, 3=1 y 4=0) y sumando entonces los 14 ítems. La puntuación directa obtenida indica que a una mayor puntuación corresponde un mayor nivel de estrés percibido.

7.5.3 Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)

La CTQ contempla cinco tipos de traumas infantiles: abuso emocional, abuso físico, abuso sexual, abandono físico y abandono emocional. El CTQ consta de 70 ítems en formato tipo Likert de 5 categorías (0= “nunca”; 5=“muy a menudo”).

La consistencia interna, en estudios internacionales, es alta, tanto para la escala total (0.98), como para los diferentes factores, oscilando entre 0.79 y 0.94. Del mismo modo, la fiabilidad test-retest para toda la escala es de 0.88, mientras que para los factores individuales se situó entre 0.80 y 0,83.

8. ANÁLISIS GENÉTICO

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

De cada paciente, se tomaron 9 ml de sangre mediante venopunción, dividida en dos porciones: una de 5ml un tubo Vacutainer con EDTA como anticoagulante y otros 4 ml en tubo sin anticoagulante con el objeto de separar los elementos de formula roja y suero respectivamente.

Ambas muestras fueron enviadas de manera inmediata al laboratorio de Genética (responsable el doctor Carlos Sabas Cruz Fuentes , tutor metodológico) para ser procesadas.

La muestra en el tubo Vacutainer con EDTA se centrifugó brevemente a 500 g para obtener el denominado anillo blanco (buffy coat) constituido principalmente por células de la línea blanca. El tubo ya centrifugado se mantuvo por al menos 16 horas (overnight), para proceder al día siguiente. Se recuperó la fracción de células blancas mediante una pipeta esteril de punta fina colocándola en un tubo nuevo estéril de 3 ml. La pastilla de células se dividió en dos alícuotas idénticas, una de las cuales sirvió para extraer a la brevedad el ADN genómico, en tanto que la otra se congeló como un backup de la muestra.

El aislamiento de DNA de las células del buffy coat (aprox 200 ul) se llevó a cabo empleando el FlexiGene® Protocol: DNA Isolation kit (Qiagen) . Brevemente, esto consiste en la lisis o ruptura de la membrana celular, el aislamiento de la fracción nuclear, la precipitación proteica y la recuperación del DNA genómico.

8.1 Análisis del grado de Metilación de la secuencia candidata en la región del exón III del gen *OXTR*

Modificación de la secuencia de interés mediante su transformación con bisulfito de sodio .

El ADN purificado (500 ng) se trató posteriormente con bisulfito de sodio. Este procedimiento químico genera la conversión de las citosinas no metiladas en uracilo, en tanto que, aquellas citosinas metiladas permanecen inalteradas Para ello se empleó el Kit EZ DNA Methylation-Gold™, que incluye los reactivos químicos requeridos para proceder a los procesos de desaminación, sulfonación, y posterior desulfonación. Posteriormente el ADN se purificó **por elución** utilizando Columnas IC Zymo-Spin, para luego determinar su calidad , cantidad mediante al análisis espectrofotométrico.

Amplificación de la región del exón 3 conteniendo la secuencia de interés

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (OXTR) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ".

La región a analizar del gen candidato (i.e. región promotora del gen OXTR), se sometió a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los *primers* específicos mostrados en la tabla , los cuales fueron diseñados *ex profeso*. De esta manera se esperaba que solo la secuencias de ADN que hubiesen sido transformadas generaran un producto único de amplificación (i.e. amplicón), pero no aquellas que no hubiesen sido tratadas con el bisulfito, las cuales sirvieron por tanto como un control negativo

Características de los primers (oligos) empleados en la amplificación de la región genómica de interés

número de bases	Secuencia de nucleótidos	Temperatura fusión (oC)	Contenido GC (%)
24	L TTGGTTAAGTATTTGTAGGTGGTG	57.3	54
23	R - AATCCCCAAAATAAATAAAAAC	55.0	65

Condiciones experimentales y de Ciclado para la Amplificación del Fragmento de 251 pb del gen OXTR

Bajo las siguientes condiciones de PCR, utilizando HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN): desnaturalización a 94 ° C durante 1 minuto, recocido a 59,5 ° C durante 1 minuto y extensión a 72 ° C durante 2 minutos (40 ciclos).

Brevemente, se incubaron 450 ng de ADN tratado con bisulfito a 98 ° C durante 10 min y 53 ° C durante 4 horas en un termociclador (Termociclador Profesional, Biometra). Los productos de PCR amplificados se limpiaron de residuos de nucleótidos empleando el sistema EXO / SAP (Limpieza de exonucleasa I / fosfatasa alcalina de camarón).

En la medida de lo posible se emplearon controles de ADN completamente metilado y completamente no metilado ADN (conjunto de ADN humano metilado y no metilado, Zymo Research, HiSS Diagnostics GmbH) en todos experimentos.

Este amplicón de 251 pares de bases (bp)se extiende por la región Chr3: 8,767,620 - 8,767,815 (GRCh38/hg38.)

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

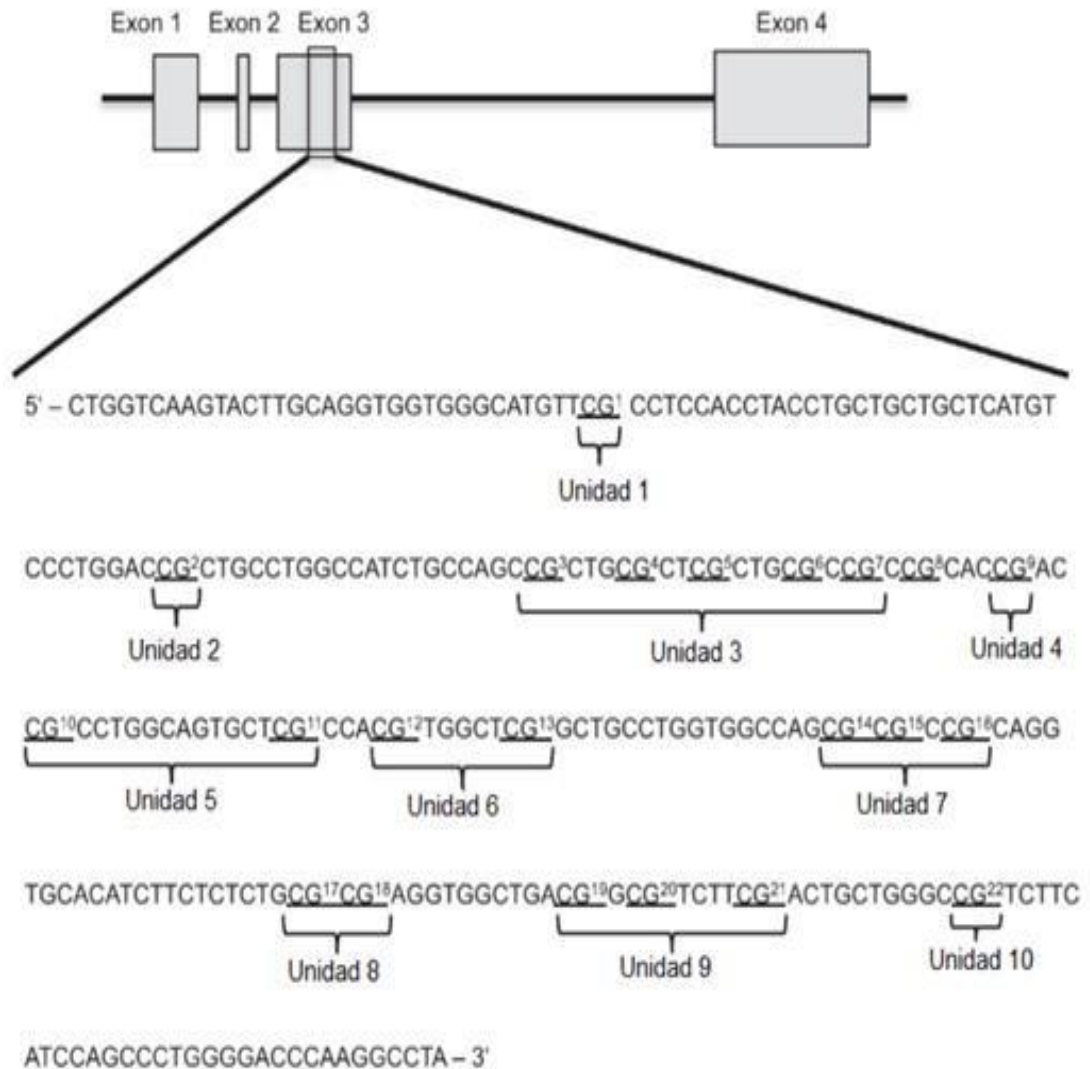


Ejemplos de la amplificación de fragmentos de 251 pb, a partir de 3 muestras distintas de ADN genómico transformado con Bisulfito de Sodio. Este amplicón incluye la región de interés del gen *OXTR* analizada en este trabajo

El ADN genómico fue extraído con el kit FlexiGene Qiagen a partir de la fracción buffy coat preparado a partir de sangre total anticoagulada con EDTA-K2. La amplificación por PCR para este fragmento se llevó a cabo de la siguiente manera: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 10 min y después, 36 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, 52, 53 y 54°C (Gradiente de temperatura) por 30 seg de alineamiento, 72° C por 1 min de extensión y una extensión final de 72°C por 10 min., todo ello en un volumen final de 25 ul que contenían 150 ng de ADN genómico previamente transformado con el kit Epiect Bisulfite de Qiagen, 1X PCR Buffer II, 0.2 µM de cada primer *OXTR* (ver tabla) , 200 M de una mezcla de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂ y 1.25 U de AmpliTaq Gold (ThermoFisher). Los productos de PCR amplificados fueron revelados mediante electroforesis en agarosa al 2%, usando tinción con bromuro de etidio.

El amplicón que cubre el exón 3 del gen *OXTR* se eligió como la secuencia objetivo dado que se ha evaluado en diversos estudios relacionados con el estrés perinatal (Untermaehr et al, 2012). Dicha región contiene 22 sitios CpG que se muestran en la siguiente figura, divididos en 10 unidades según la referencia.

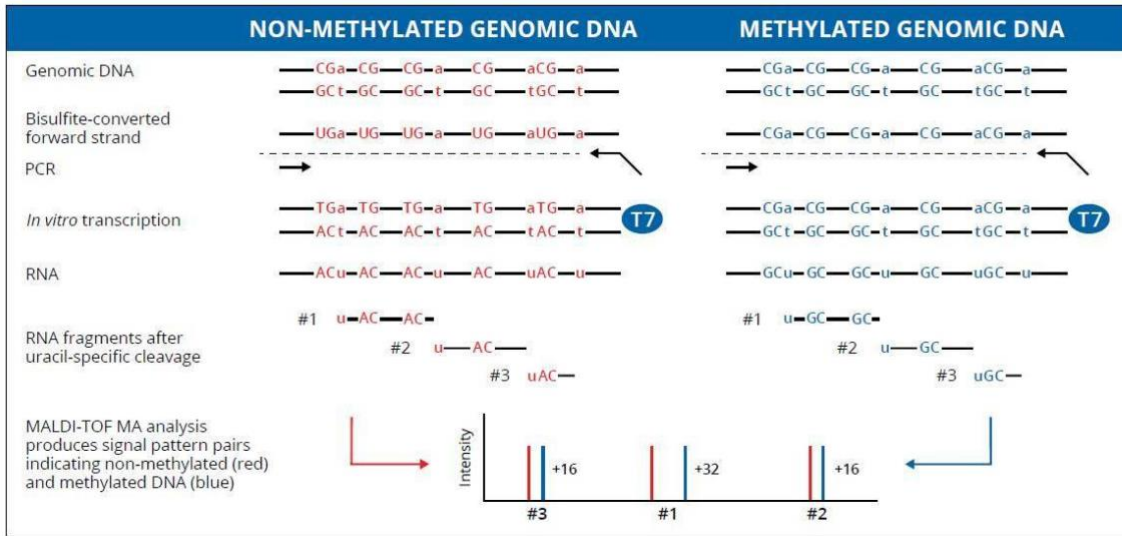
PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.



En principio se planteó que la secuencia de estos fragmentos amplificados fuera evaluada mediante el método de secuenciación directa tradicional de Sanger. No obstante, para acelerar el proceso se empleó como alternativa el empleo de un servicio de secuenciación de bisulfitos basado en la espectrometría de masas MALDI-TOF (comercialmente denominado EpiTyper; CD Genomics), método que cuenta con la virtud de generar una resolución más fina y cuantitativa de los patrones de metilación.

Los detalles de la reacción se pueden consultar en <https://www.cd-genomics.com/epityper-dna-methylation-analysis.html> y el siguiente diagrama sintetiza el proceso :

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (OXTR) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.



La resolución del fragmento por el método EpiTYPER para esta región genera 10 unidades CpG constituidas por segmentos que incluyen entre 1-5 sitios CpG individuales (ver Figura) :

Todos los valores de metilación CpG de las muestras se compararon con los valores de un control positivo totalmente metilado. Si el valor de la muestra experimental supera el valor del control positivo, se considera un error analítico y se excluye de los datos.

Fue así que cuatro de estas unidades CpG: 3, 4, 6 y 9 en la secuencia candidata del exón III de OXTR no alcanzaron los límites de detección superior e inferior de Sequenom EpiTYPER para todas las muestras, lo que dejó a solo seis unidades CpG completas para los análisis estadísticos. Todos los controles en blanco fueron negativos.

Considerando la variabilidad intrínseca experimental de cada ensayo, se probó por duplicado cada una de las 8 muestras escogidas para así generar una métrica de la metilación individual media para cada isla CpG.

8.2 Medición de oxitocina en suero

Se empleó un Kit ELISA Abcam ab242248 diseñado para la medición cuantitativa de la proteína Pre Propéptido de Oxitocina humana en plasma cit, plasma edta, plasma hepático y suero. Este método inmunoenzimático ELISA tipo sándwich posee una sensibilidad mínima de 10 pg/l. Las muestras se

corrieron por duplicado y se determinó la cantidad por muestra a partir de la extrapolación de una curva standard con un índice de correlación de 0.998

8.3 Tipificación del polimorfismo tipo SNP rs 53576 en la secuencia del gen OXTR

El polimorfismo rs53576 (<https://www.snpedia.com/index.php/Rs53576>) se basa en el cambio de una Guanina a Adenina (G/A) en el gen del receptor de oxitocina (*OXTR*). Dicho cambio no genera un cambio en la secuencia de la proteína, por lo que se considera un polimorfismo o mutación “silenciosa”.

Para su tipificación se empleó un análisis de PCR en tiempo real , empleando el ensayo ID: C-3290335_20 (ThermoFisher Scientific) que hace uso de una sonda Taqman diseñada para tal propósito. La mezcla de reacción en un volumen final de 25 ul se constituyó de: 12.5 ul del Universal Master Mix; 1.25 ul de la sonda y 8.25 ul de agua inyectable a los que se añadieron 150 ng de ADN genómico no transformado en 3 ul (50 ng/ul). .

Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: un ciclo de 50 oC por 2 minutos; 1 ciclo a 95 oC por 10 minutos, seguido de 40 repeticiones del ciclo 95 oC, 15 segundos/ 60 oC, 1 minuto.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos categóricos se analizaron empleando la prueba de χ^2 . Las diferencias de las variables continuas se evaluaron mediante la T-student y las multivariantes se corregirán mediante ANOVA. Las correlaciones entre las variables dimensionales y metilación se calcularon mediante análisis de regresión. Se empleó el ajuste de Bonferroni para la corrección de la comparación de múltiples comparaciones tomando como nivel de significancia $p < 0.05$.

10. ANÁLISIS ÉTICOS, FINANCIEROS Y DE BIOSEGURIDAD

Este anteproyecto de especialidad se apegó a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Para el presente anteproyecto solamente se incluyeron a pacientes que aceptaron de

manera voluntaria participar mediante la firma del consentimiento informado. Durante toda la investigación se mantuvo la confidencialidad de los pacientes.

11. RESULTADOS

11.1 Descripción de la muestra

Se reclutaron a 33 pacientes en el periodo comprendido entre marzo del 2022 a febrero del 2023, las cuales constituyen el grueso de los análisis que se muestran a continuación.

11.2 Características sociodemográficas de la muestra

La media de edad de las mujeres participantes de este estudio fue de 29.5 años., con un rango de 21- 40 años. Al momento de su entrevista clínica, 9 manifestaron estar casadas, 8 vivían en unión libre y 15 permanecían solteras. En cuanto a la escolaridad 16 reportaron contar con un grado escolaridad máxima de licenciatura, 11 tenían preparatoria terminada, 3 de secundaria, y una solo cursó primaria y otra había adquirido posgrado. Únicamente 36% se encontraban realizando actividad profesional formal. Un total de 58% participantes reportaron practicar la religión católica, 27% no practicaban ninguna religión, 6 % el cristianismo, 3 % el judaísmo y 6 % otra religión.

Características Clínicas

Veinticinco de las participantes reportaron antecedentes heredofamiliares psiquiátricos; en seis de ellas también se identificó una comorbilidad médica no psiquiátrica , accesoria al diagnóstico psiquiátrico primario. Del total, 24 tuvieron como diagnóstico principal un episodio depresivo y en contraste sólo cuatro reportaron antecedente de síntomas psicóticos.

Veintiocho de las 33 participantes estaban recibiendo tratamiento farmacológico con antidepresivo siendo este el grupo de psicofármacos más utilizado, 16 utilizaban antipsicótico, dos fueron tratadas con estabilizadores del ánimo y a una se le había prescrito una benzodiacepina.

La media de psicofármacos empleados por participante fue de uno, con un 58% de las participantes recibiendo uno solo, 33% dos y 9% tres psicofármacos.

11.3 Características gineco obstétricas

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ".

Quince de las participantes fueron reclutadas durante el primer año posterior a la resolución del embarazo, mientras que el resto (n=17) fueron vistas durante el transcurso del mismo (24% en el segundo trimestre, 24% en el tercer trimestre y 3.33% en el primer trimestre).

La media de embarazos a lo largo de la vida por participante fue de dos; siendo que la mayoría de las participantes (39%) se encontraba cursando su primera gesta, 30% su segundo embarazo, 18% el tercero, 10% el cuarto y 3% el quinto embarazo.

Quince de las pacientes han sufrido pérdidas gestacionales previas y, durante el actual embarazo, 6 de ellas han tenido amenaza de aborto o parto pretérmino, así como 2 de ellas, al momento de la captación, habían presentado complicaciones médicas durante el actual embarazo.

Finalmente, 17 se encontraban durante la gestación al momento de la toma de muestra biológica, mientras que 16 se encontraban en periodo de postparto.

Cabe destacar que, 14 de las pacientes de la muestra habían tenido ideación, gesto o intento suicida durante su vida y 4 de ellas tuvieron antecedente de sintomatología psicótica a lo largo de su vida. Estos datos ampliados fueron reportados en otro trabajo paralelo (tesis de Alta Especialidad de la Dra Mónica Ortega)

Es importante resaltar que se obtuvo muestra de sangre para evaluación de DNA de todas las participantes; sin embargo, dado que ocho no completaron el paquete completo de las clinimetrías autoaplicables para algunos de los propósitos de esta tesis se reportan los análisis de las 23 o 25 participantes restantes.

11.4 Resultados de las escalas aplicadas

Postpartum Bonding Questionnaire

De acuerdo a los datos proporcionados por las pacientes se determinó que solo una de las participantes parecía manifestar un trastorno del vínculo.

Childhood Trauma Questionnaire

Los resultados del CTQ arrojaron que quince de las participantes fueron víctimas de **abuso emocional** de moderado a extremo durante su infancia

ABUSO EMOCIONAL			
Nivel		Número de pacientes	% del total
Ninguno/Mínimo	1	6	18,18%
Bajo a Moderado	2	5	15,15%
Moderado a Severo	3	5	15,15%
Severo a Extremo	4	10	30,30%

Respecto a la subescala de **abuso físico** durante la infancia, se muestra el desglose de acuerdo a la severidad:

Cinco de ellas manifestaron haber sido víctimas de este tipo de violencia en un grado severo a extremo.

ABUSO FÍSICO			
Nivel		Número de pacientes	% del total
Ninguno/Mínimo	1	13	39,39%
Bajo a Moderado	2	4	12,12%
Moderado a Severo	3	4	12,12%
Severo a Extremo	4	5	15,15%

Respecto a la subescala de **abuso sexual**, 16 participantes manifestaron haber sido víctimas de este tipo de violencia en algún grado; la mayoría de ellas en un grado severo a extremo

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

ABUSO SEXUAL			
Nivel		Número de pacientes	% del total
Ninguno/Mínimo	1	10	30,30%
Bajo a Moderado	2	4	12,12%
Moderado a Severo	3	1	3,03%
Severo a Extremo	4	11	33,33%

Respecto a la subescala de **Negligencia emocional**, 11 participantes fueron víctimas de este tipo de violencia, desglosando de acuerdo a la severidad:

-

NEGLIGENCIA EMOCIONAL			
Nivel		Número de pacientes	% del total
Ninguno/Mínimo	1	6	18,18%
Bajo a Moderado	2	7	21,21%
Moderado a Severo	3	5	15,15%
Severo a Extremo	4	8	24,24%

-

Respecto a la subescala de **Negligencia física**, 16 participantes fueron víctimas de este tipo de violencia en algún grado; desglosando de acuerdo a la severidad:

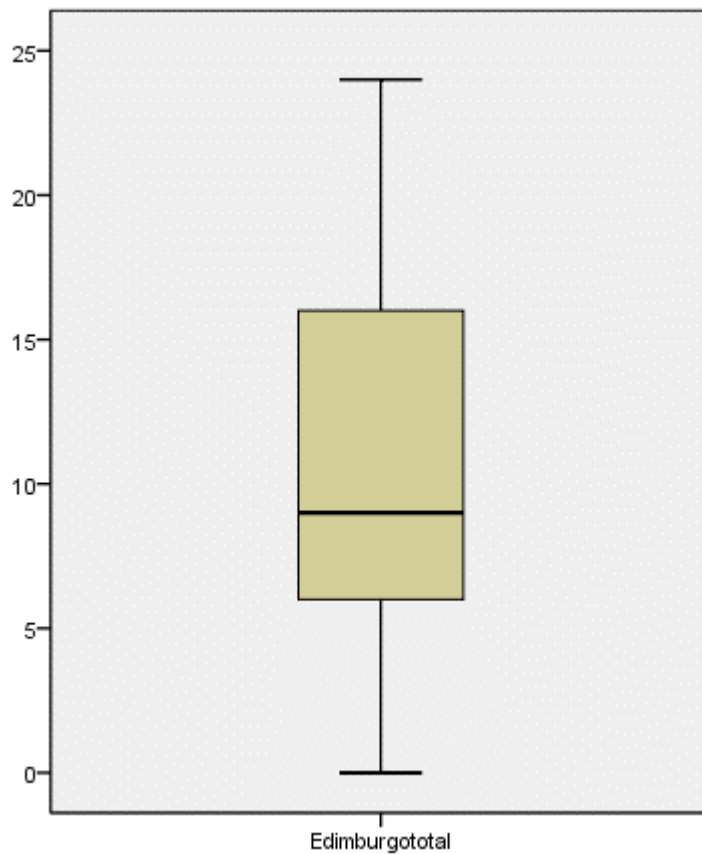
NEGLIGENCIA FÍSICA			
Nivel		Número de pacientes	% del total
Ninguno/Mínimo	1	10	30,30%
Bajo a Moderado	2	9	27,27%
Moderado a Severo	3	2	6,06%
Severo a Extremo	4	5	15,15%

SCIID- II

Tras la aplicación de esta evaluación clínica, se determinó que 15 de las 33 participantes cumplían con criterios diagnósticos para un probable trastorno límite de la personalidad, mientras que 3 de estas mismas manifestaron también rasgos antisociales de la personalidad.

Escala de depresión de Post-parto de Edimburgo

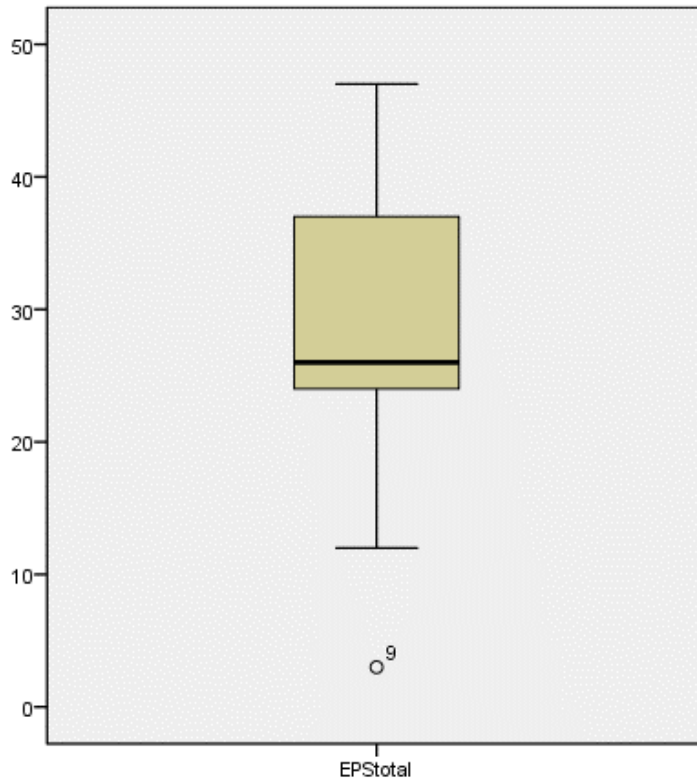
La siguiente gráfica muestra la dispersión de los puntajes generados de la aplicación de la Escala de depresión de Post-parto de Edimburgo (EPDS)



(n=25)

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ".

La siguiente gráfica muestra la dispersión de los puntajes generados de la aplicación de la Escala de Estrés Percibido (Perceived Stress Scale, PSS)

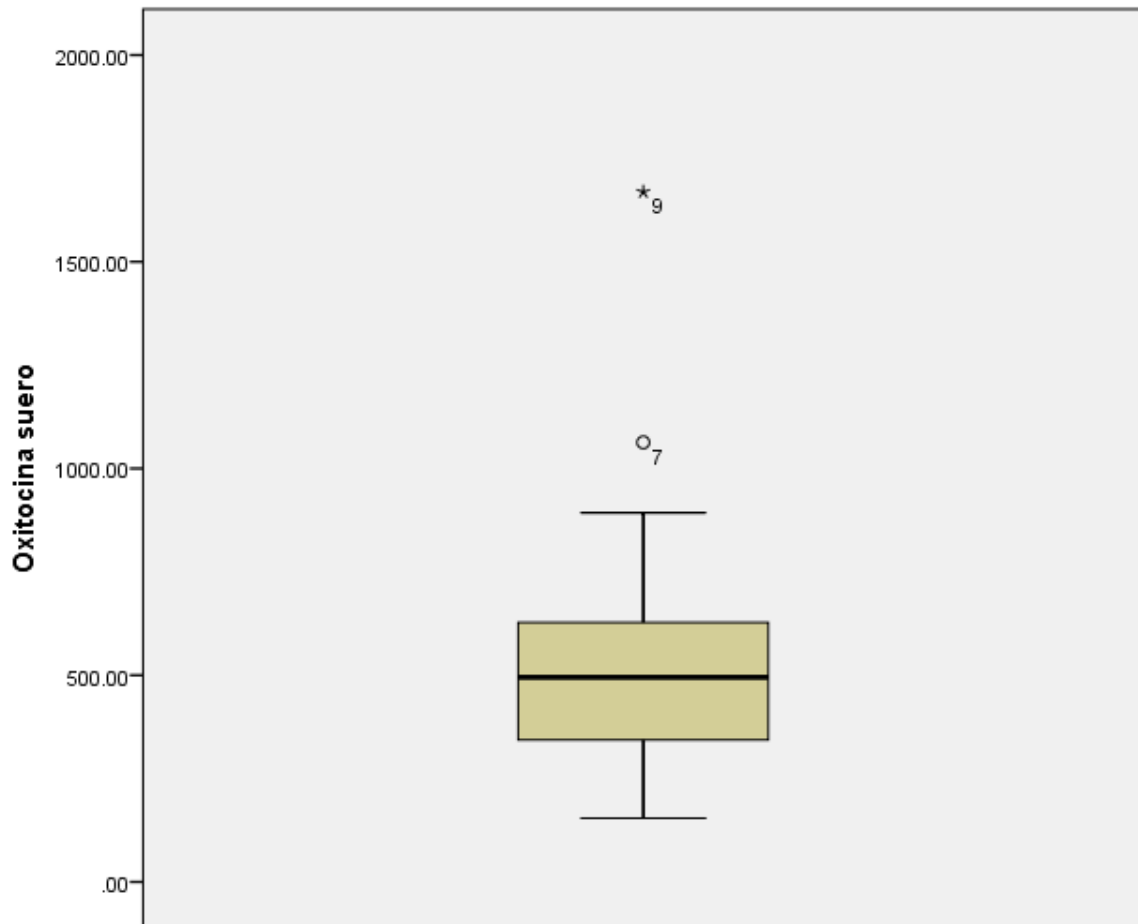


Frecuencia de alelos y genotipos del SNP rs 53576 en la secuencia del gen *OXTR* (n=33)

	Genotipos			
	GG	GA	AA	
n	11	17	6	
frecuencia	0.32	0.5	0.18	

Alelos	n	frecuencia
G	39	0.57
A	29	0.43

Niveles de Oxitocina en suero de las pacientes de la muestra (n= 23)



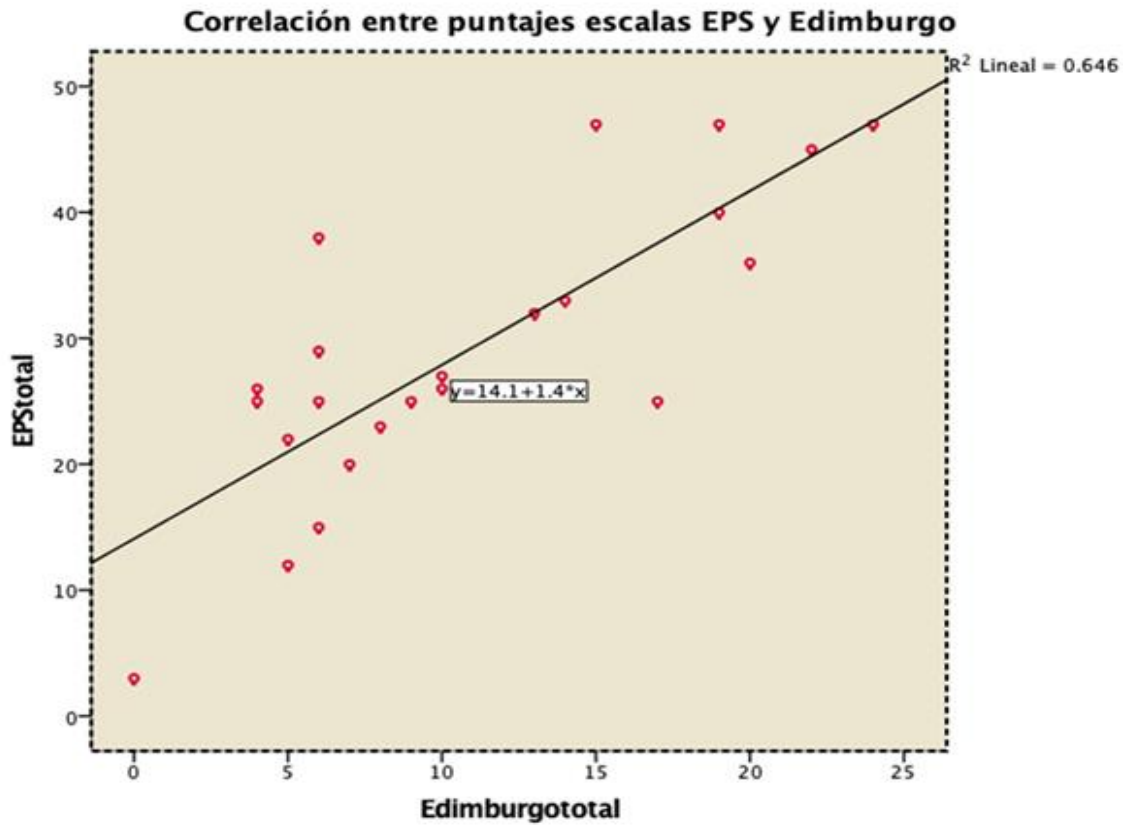
32 mujeres proporcionaron una muestra de suero en quienes pudo medirse la concentración de oxitocina. La media de la concentración de oxitocina de la muestra fue de 535.5 + 298.8 pg/ml., dato que como muestra la figura no fue significativamente diferente de las 23 mujeres en las que se realizó el análisis molecular de metilación. Cabe destacar que las concentraciones fueron diferentes en las distintas etapas perinatales : en la única de las participantes se encontraba en el primer trimestre del embarazo su concentración fue de 362.5 pg/ml, en las siete mujeres que se encontraban en el segundo trimestre la concentración media fue de 481.5 pg/ml, la concentración media en las ocho mujeres que se encontraban en el tercer trimestre del embarazo fue de 431.1ng/ml en tanto que en las 16 mujeres se encontraba en el periodo de lactancia la concentración media fue de 621.7ng/ml.

11.5 Definición de la gravedad / severidad del trastorno psiquiátrico (severity of psychiatric disorder)

Se propuso establecer mediante un análisis de regresión, una secuencia de datos que intentara reflejar los valores de severidad (gravedad) del estado emocional en el que se encontraban las pacientes en el periodo previo y cercano al momento de la entrevista.

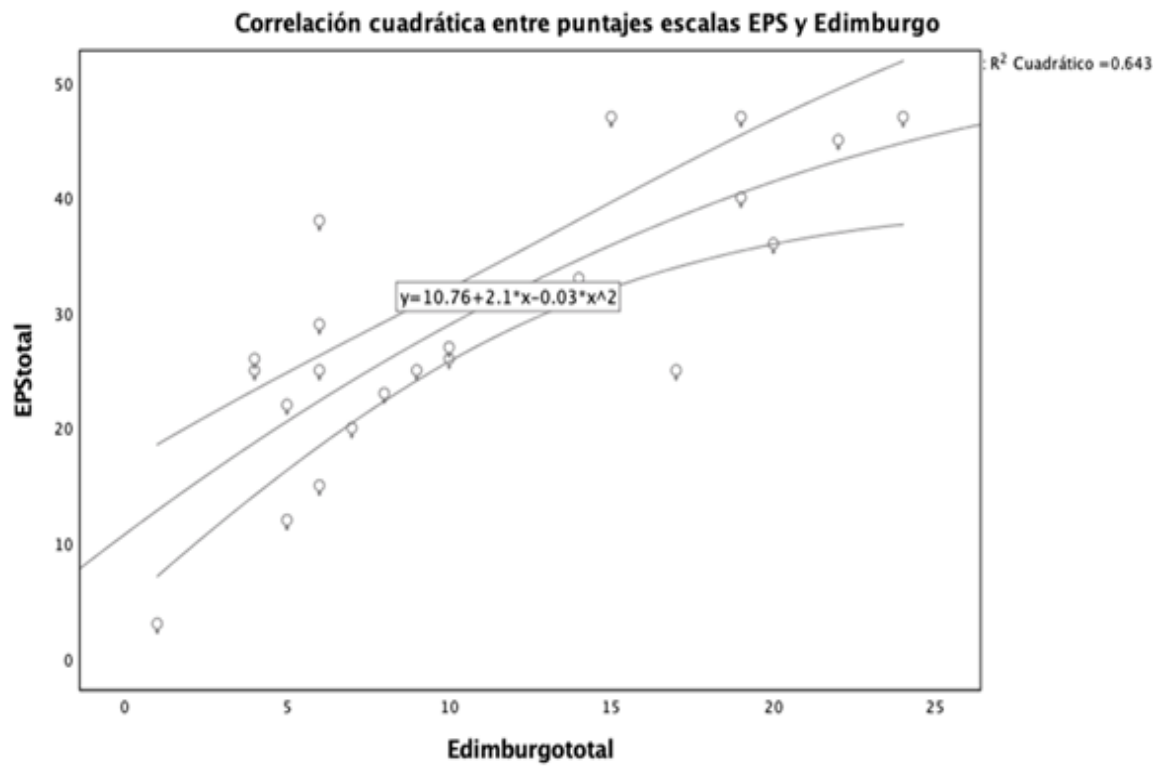
Para este propósito específico se emplearon los datos generados de las evaluaciones clínicas psicométricas de la EPDS y la EP.

El grado de correlación lineal entre los puntajes de las dos escalas se muestra en la figura:



Correlación entre los puntajes individuales de las escalas EPS y Edimburgo de las 23 pacientes, (Coeficiente de correlación Tau de Kendall de rangos fue 0.605 , $p < 0.001$ bilateral).

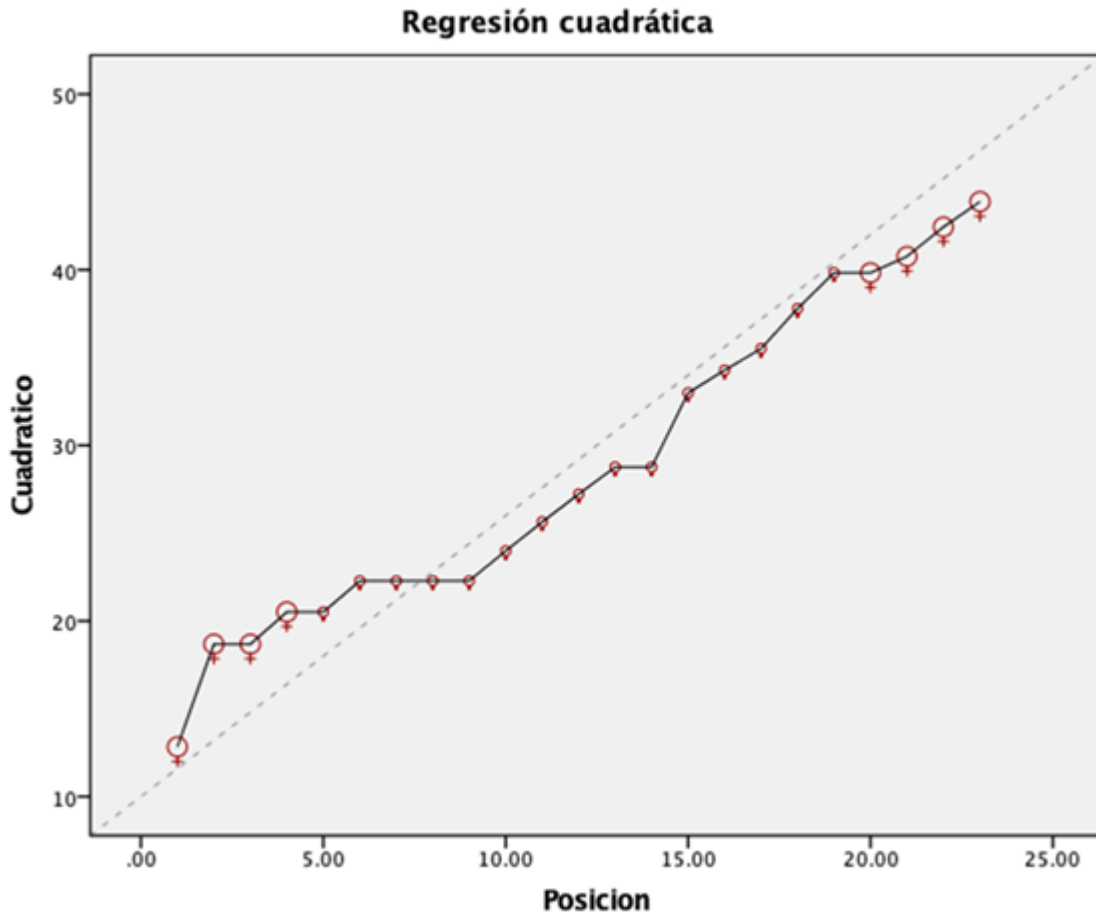
PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ".



Aun con la importante correlación de las mismas , se optó por recalcular la ecuación de la curva mediante un ajuste no lineal (cuadrático), para intentar establecer un mejor ajuste de los puntos.

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (OXTR) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ".

Finalmente, se generó la regresión cuadrática correspondiente, mediante la cual se identificó la posición individual de cada una de las pacientes.



Empleando esta gráfica se identificaron 8 muestras, 4 en cada uno de los extremos (identificados con el símbolo ♀, los cuales representan los valores de gravedad/severidad emocional más alejados entre sí y con los cuales se realizó el ejercicio del análisis de la metilación en la región del gen OXTR.

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

Tabla que muestra los porcentajes estimados de metilación (%5MeC) promediadas en todas las unidades CpG que alcanzaron los niveles de sensibilidad del método de tipificación EpiTyper:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
B	1	2	3	3	3	3	3		4	5	5	6	6	7	7	7	8	8	9	9	9	10		
1		xx								x				x	xx		x					x	8	
2	x	x								x	xx					x	x	x					xx	10
3		xx								x				xx		xx	x	xx						10
4	xx										xx					x								5
	3	5								3	4			3	2	4	3	3					3	33
C	38	63								38	50			38	25	50	38	38					38	
5		x								xx				x	x		x						x	7
6	x	xx									x				x	xx	x	x						9
7	x	x								xx	x			xx	x		xx	x					xx	13
8		xx								xx	xx			x	xx			xx					x	12
	2	6								6	4			4	5	2	4	4					4	41
D	25	75								75	50			50	63	25	50	50					50	
E																								

Línea A representa la posición 1 a 22 de las CpG incluidas en la secuencia analizada

Línea B representa el número de la unidad generada por el método de tipificación, asociado a las diferentes CpGs

Línea C representa el porcentaje promedio de metilación de cada una de las seis unidades CpG que pudieron ser analizadas * en el grupo de **baja gravedad** (muestras 1-4)

Línea D representa el porcentaje promedio de metilación de cada una de las seis unidades CpG que pudieron ser analizadas * en el grupo de ALTA gravedad (muestras 5-8)

Línea E Las zonas en rojo representa las unidades en las cuales las diferencias en el nivel de metilación promedio entre grupos fue mayor o igual al 40%

12. DISCUSIÓN

Se ha descrito en múltiples trabajos la relación de la hormona peptídica oxitocina con la manifestación de sintomatología afectiva¹², tanto depresiva como ansiosa. De la misma manera se le ha relacionado con rasgos caracterológicos cluster B² y aun con la expresión de ciertos estilos de apego en el periodo perinatal¹².

Tomando en cuenta lo anterior este trabajo de tesis se orientó a establecer la relación entre los niveles de metilación de una región candidata del gen OXTR (el cual codifica a la molécula receptora de esta hormona) con la gravedad de la psicopatología manifestada durante el periodo perinatal en un grupo de mujeres que acudieron a atención a una clínica especializada en el tratamiento de trastornos psiquiátricos del INPRFM.

Otros objetivos secundarios fueron el de determinar los niveles séricos de la proteína oxitocina, así como determinar el genotipo de un sistema polimórfico en la secuencia del mismo gen.

Los hallazgos se discuten a continuación.

12.1 Asociación de los niveles de metilación del gen OXTR con la gravedad de la psicopatología

12.1.1 Oxitocina y Estilo de apego

Existe una evidencia sustantiva que apoya la función biológica de la hormona oxitocina en el establecimiento de los lazos que se deben a lo largo de la vida para establecer relaciones humanas "exitosas", lo que se ha asociado con el concepto de la denominada *inteligencia social*.

Este concepto en particular parte de la idea de que como parte de un proceso evolutivo se debe de consolidar el vínculo madre-hijo a través del desarrollo de procesos neurobiológicos que permiten desarrollar la capacidad de formar vínculos sociales que se manifiestan en los adultos. Es en este punto es donde se destaca la importancia de la OXT al inicio de la crianza, ya que para formar dichos lazos se debe de asegurar su apropiada síntesis y liberación, eventos que parten de la propia secuencia del gen que la codifica. Se ha propuesto que en caso exitoso ello se manifiesta en el reconocimiento social, la empatía

y las conductas consoladoras derivadas de esta. Incluso, se ha propuesto que la molécula participa como una especie de “amortiguador” accesorio al sistema de regulación del estrés (i.e. eje HHA) para limitar sus efectos negativos tanto físicos como emocionales.

Fue por este motivo, que en un principio se propuso determinar la posible relación entre los estilos de apego de las madres participantes con las variables moleculares. Para tal propósito se aplicó el “Cuestionario de apego en el adulto” a cada una de ellas. Del análisis factorial de los datos se pudo establecer un modelo de 4 factores denominados: 1, de baja autoestima, necesidad de aprobación y miedo al rechazo; 2, de resolución hostil de conflictos, rencor y posesividad; 3, de expresión de sentimientos y comodidad con las relaciones y 4, de autosuficiencia emocional e incomodidad con la intimidad.

Sin embargo, no fue posible identificar de manera inequívoca a cuál de los diferentes 4 estilos de apego correspondía cada caso individual, por lo que se decidió no incluirlo en el modelo de gravedad.

12.1.2 Trastornos de la personalidad del clúster B

Un segundo elemento que consideramos podría ayudar a definir un nivel diferencial de la gravedad de la psicopatología fue la posible presencia de un diagnóstico de un trastorno de personalidad del clúster B, particularmente el denominado Trastorno límite de la personalidad (TLP), el cual según la experiencia del área clínica es frecuente encontrar en las pacientes de nuestro instituto.

En relación con las variables moleculares se puede apuntar que se han relacionado niveles más bajos de oxitocina sérica y disminución del receptor de oxitocina (*OXTR*) con el TLP, mostrando así el papel de la oxitocina y su receptor en este trastorno.

Más aún, existen reportes que colocan en mayor riesgo a desarrollar TLP en personas con algunos de los genotipos del SNP rs 53576 del *OXTR*⁷, que incluyen al alelo A (i.e. genotipos AA/AG) cuando además se identificaba la historia con eventos adversos temprano. Por el contrario, en aquellas personas con genotipo GG no se identificó esta interacción, lo que sustenta el papel del gen *OXTR* en la plasticidad neurobiológica-mental.

Como se mencionó en la sección de resultados, once de las mujeres cumplieron (según el SCID-II) los criterios diagnósticos de un probable TLP y en tres de estas mismas identificaron

rasgos antisociales de la personalidad, lo cual confirma su elevada prevalencia en las mujeres en la etapa perinatal.

Más adelante se discutirán los hallazgos en la evaluación del nivel de metilación entre los grupos de contraste.

4. Definición del modelo para definir la gravedad / severidad del trastorno psiquiátrico (severity of psychiatric disorder) en las pacientes evaluadas.

Como se mencionó este trabajo planteó asociar el concepto de la gravedad de la psicopatología perinatal con una serie de marcadores moleculares relevantes a la oxitocina.

El diccionario de la Real Academia Española (RAE) la define así: gravedad Del lat. *gravitas*, -*ātis*. **1.** f. Cualidad de grave. *Gravedad de un asunto, de una enfermedad.*

En tanto un término que se emplea de manera equivalente es el *severidad*, el cual es definido en la RAE como una cualidad de **lo severo/a** (Del lat. *sevērus*. **1.** adj. Riguroso, áspero, duro en el trato o el castigo.

Es evidente que la determinación de la gravedad o severidad de una enfermedad tiene una importante significación en la práctica clínica. Si bien la aplicación de estos términos puede depender del trastorno o enfermedad al que uno se refiera, es claro que su conceptualización afecta las decisiones tanto del médico como del paciente, ya sea al buscar las alternativas de tratamiento, al evaluar la frecuencia de aplicación de los mismos, de los resultados terapéuticos obtenidos y aun afecta la determinación de si se debe continuar o interrumpir el mismo. La gravedad también influye en las expectativas que se tiene para que el paciente pueda cumplir con sus funciones o bien puede anticipar su discapacidad.

Sin embargo, a diferencia de diversas enfermedades físicas, la manera en que se ha intentado definir la gravedad de los trastornos psiquiátricos no ha sido tarea sencilla. Dado que no existen biomarcadores específicos de su gravedad o que estén plenamente validados, se ha tenido que recurrir a evaluar ciertos epifenómenos como aproximaciones de su gravedad. Por ejemplo, en el DSM 5 (y aun en sus versiones anteriores) se ha hecho hincapié en tomar en consideración el o los rasgos centrales que definen al trastorno. En otros casos se ha considerado emplear el número de síntomas o de criterios cumplidos, la frecuencia de los síntomas o aún el nivel de afectación

PATRONES DE METILACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE OXITOCINA (*OXTR*) ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DE LA PSICOPATOLOGÍA MATERNA PERINATAL EN PACIENTES FEMENINOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”.

deterioro o malestar generado. En ningún caso se hace mención a la respuesta a la intervención, predicción de la evolución o probabilidad de mortalidad inminente o distal. La siguiente tabla tomada de la referencia de Zimmerman et al ²² sirve como ejemplo de lo anterior:

Trastorno depresivo mayor	Número de síntomas, nivel de angustia causado por la intensidad de los síntomas y deterioro del funcionamiento social y laboral	
Manía, hipomanía	Similar al caso anterior	La valoración se basa en la intensidad de los síntomas o en la angustia subjetiva debida a los síntomas.
Trastornos psicóticos	Evaluación cuantitativa en una escala de 5 puntos de la característica principal de la psicosis (delirios, alucinaciones, habla desorganizada, comportamiento psicomotor anormal y síntomas negativos).	

Ante tal escenario en este trabajo se optó por emplear como base del análisis los datos generados de las evaluaciones clínicas psicométricas referentes al estado depresivo y percepción del estrés, para con ello intentar establecer una métrica conjunta que permitiera integrar en la medida de lo posible *el constructo* de la gravedad

Luego de determinar el grado de correlación entre los puntajes de la EPDS con la EPS y generar la regresión correspondiente se pudo definir la posición que ocupaban cada una de las 23 o 25 pacientes con las que se tanto una muestra de sangre, como los datos clini-/ psicométricos) en una “escala”, mostrándose en ellas una clara diferencia en la severidad del estado emocional en el que se encontraban las pacientes en las semanas previas al momento de la entrevista (ver Figura).

Es importante mencionar que para efectos de este trabajo de tesis y en aras de cumplir en tiempo y forma con las fechas de entrega se decidió evaluar solo los datos de metilación de la región candidata entre las 4 pacientes que tuvieron los menores puntajes y compararlos respecto a las 4 con los valores más altos, para de esta manera tener un contraste entre grupos «extremos». Más aún, se pudo identificar que estos dos grupos diferían claramente en otro parámetro clínico de relevancia; así en el grupo de alta «severidad» 3 de las 4 pacientes cursaban con un diagnóstico accesorio de TLP, en tanto ninguna de las de grupo de baja «gravedad» lo manifestaron.

Como se mostró en la Figura referentes al análisis de la metilación de la región candidata del exón III del gen OXTR, se identificaron entre estos dos grupos de pacientes diferencias tanto en el porcentaje global de metilación (i.e. en el % de 5MetC), como en la cantidad de citosinas metiladas en un par de sitios específicos de la secuencia, sin embargo, dado el reducido tamaño de la muestra analizada este resultado debe ser considerado como preliminar. Se pretende incorporar a la muestra extendida en futuros análisis. Más aún, dada las dificultades técnicas asociadas al método de tipificación empleado (i.e. con EpiTyper no se pudieron determinar 4 de las 10 unidades planeadas) se le pretende complementar en el futuro aplicando la secuenciación tipo Sanger.

Hablando específicamente del gen candidato evaluado en este trabajo podemos mencionar aquellas investigaciones que han asociado a mayor número de situaciones estresantes en los 2 años previos al momento de la gestación con un incremento en la metilación del ADN de la descendencia en un área accesoria de este mismo gen OXTR. Otros como Wiley y cols en Brasil describieron que los bebés de madres con síntomas elevados de ansiedad al final del embarazo manifestaban niveles más bajos de metilación de OXTR2 CpG2 ($B = -2,17$, $p = 0,03$) y cortisol salival vespertino más alto ($B = 0,41$, $p = 0,03$). Además, la metilación de OXTR2 se asoció inversamente con el cortisol vespertino ($B = -0,14$, valor de $p \leq 0,001$), lo que lleva a suponer que la metilación diferencial del gen al receptor de oxitocina pudiera contribuir a la regulación de HPA durante la infancia.

En todo caso este trabajo forma parte de un grupo de estudios en curso por parte del área de la clínica de Psiquiatría Perinatal y Genética orientado a evaluar elementos de naturaleza molecular que pueden dar información relevante sobre los distintos mecanismos adaptativos que se dan a lo largo del periodo perinatal y cuyas consecuencias bien pudieran extenderse a la misma descendencia.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Bennett HA, Einarson A, Taddio A, Koren G, Einarson TR. Prevalence of Depression During Pregnancy: Systematic Review. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2019 Jul 6];103(4):698–709. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051562>
2. Brüne, M. (2015). On the role of oxytocin in borderline personality disorder. *British Journal of Clinical Psychology*, 55(3), 287-304. <https://doi.org/10.1111/bjc.12100>
3. Cao-Lei, L., Laplante, D. P., & King, S. (2016). Prenatal Maternal Stress and Epigenetics: Review of the Human Research. *Current Molecular Biology Reports*, 2(1), 16-25. <https://doi.org/10.1007/s40610-016-0030-x>
4. Charlson, F., van Ommeren, M., Flaxman, A., Cornett, J., Whiteford, H. y Saxena, S. New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2019;394,240–248.
5. Ebner, N. C., Lin, T., Muradoglu, M., Weir, D. H., Plasencia, G. M., Lillard, T. S., Pournajafi-Nazarloo, H., Cohen, R. A., Sue Carter, C., & Connelly, J. J. (2019). Associations between oxytocin receptor gene (OXTR) methylation, plasma oxytocin, and attachment across adulthood. *International Journal of Psychophysiology*, 136, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2018.01.008>
6. Ein-Dor, T., Verbeke, W. J. M. I., Mokry, M., & Vrtička, P. (2018). Epigenetic modification of the oxytocin and glucocorticoid receptor genes is linked to attachment avoidance in young adults. *Attachment & Human Development*, 20(4), 439-454. <https://doi.org/10.1080/14616734.2018.1446451>
7. Gescher, D. M., Kahl, K. G., Hillemacher, T., Frieling, H., Kuhn, J., & Frodl, T. (2018). Epigenetics in Personality Disorders: Today's Insights. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00579>
8. Gottschalk, M. G., & Domschke, K. (2016). Novel developments in genetic and epigenetic mechanisms of anxiety. *Current Opinion in Psychiatry*, 29(1), 32-38. <https://doi.org/10.1097/ycp.0000000000000219>
9. Iyengar, U., Rajhans, P., Fonagy, P., Strathearn, L., & Kim, S. (2019). Unresolved Trauma and Reorganization in Mothers: Attachment and Neuroscience Perspectives. *Frontiers in Psychology*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00110>
10. Jordaan E, Niehaus D, Koen L, Leppanen J. Risk factors for unplanned pregnancy in women with mental illness living in a developing country. *Arch Womens Ment Health* [Internet]. 2018 Jun 9 [cited 2019 Jul 6];21(3):323–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29124444>

11. Kenkel, W. M., Perkeybile, A.-M., Yee, J. R., Pournajafi-Nazarloo, H., Lillard, T. S., Ferguson, E. F., Wroblewski, K. L., Ferris, C. F., Carter, C. S., & Connelly, J. J. (2019). Behavioral and epigenetic consequences of oxytocin treatment at birth. *Science Advances*, 5(5), eaav2244. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2244>
12. Maud, C., Ryan, J., McIntosh, J. E., & Olsson, C. A. (2018). The role of oxytocin receptor gene (OXTR) DNA methylation (DNAm) in human social and emotional functioning: a systematic narrative review. *BMC Psychiatry*, 18(1), 2-13. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1740-9>
13. Monk, C., Feng, T., Lee, S., Krupska, I., Champagne, F. A., & Tycko, B. (2016). Distress During Pregnancy: Epigenetic Regulation of Placenta Glucocorticoid-Related Genes and Fetal Neurobehavior. *American Journal of Psychiatry*, 173(7), 705-713. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.15091171>
14. Reiner, I., Van IJendoorn, M., Bakermans-Kranenburg, M. J., Bleich, S., Beutel, M. E., & Frieling, H. (2015). Methylation of the oxytocin receptor gene in clinically depressed patients compared to controls: The role of OXTR rs53576 genotype. *Journal of Psychiatric Research*, 65, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.03.012>
15. Robakis, T. K., Zhang, S., Rasgon, N. L., Li, T., Wang, T., Roth, M. C., Humphreys, K. L., Gotlib, I. H., Ho, M., Khechaduri, A., Watson, K., Roat-Shumway, S., Budhan, V. V., Davis, K. N., Crowe, S. D., Ellie Williams, K., & Urban, A. E. (2020). Epigenetic signatures of attachment insecurity and childhood adversity provide evidence for role transition in the pathogenesis of perinatal depression. *Translational Psychiatry*, 10(1), 2-14. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0703-3>
16. Rochat TJ, Tomlinson M, Bärnighausen T, Newell M-L, Stein A. The prevalence and clinical presentation of antenatal depression in rural South Africa. *J Affect Disord* [Internet]. 2011 Dec [cited 2019 Jul 6];135(1–3):362–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880372>
17. Sanwald, S., Gahr, M., Widenhorn-Müller, K., Schönfeldt-Lecuona, C., Richter, K., Connemann, B. J., Kammer, T., Montag, C., & Kiefer, M. (2019). Relation of Promoter Methylation of the Oxytocin Gene to Stressful Life Events and Depression Severity. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(2), 201-211. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01446-1>
18. The epigenetics of perinatal stress. (2019). *Epigenetics*, 21(4), 369-378. <https://doi.org/10.31887/dcns.2019.21.4/mszyf>
19. Toepfer, P., Heim, C., Entringer, S., Binder, E., Wadhwa, P., & Buss, C. (2017). Oxytocin pathways in the intergenerational transmission of maternal early life stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 73, 293-308. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.026>
20. Van den Bergh, B. R. H., van den Heuvel, M. I., Lahti, M., Braeken, M., de Rooij, S. R., Entringer, S., Hoyer, D., Roseboom, T., Räikkönen, K., King, S., & Schwab, M. (2020). Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal

- stress in pregnancy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 117, 26-64. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.003>
21. Ziegler, C., Dannlowski, U., Bräuer, D., Stevens, S., Laeger, I., Wittmann, H., Kugel, H., Döbel, C., Hürlemann, R., Reif, A., Lesch, K.-P., Heindel, W., Kirschbaum, C., Arolt, V., Gerlach, A. L., Hoyer, J., Deckert, J., Zwanzger, P., & Domschke, K. (2015). Oxytocin Receptor Gene Methylation: Converging Multilevel Evidence for a Role in Social Anxiety. *Neuropsychopharmacology*, 40(6), 1528-1538. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.2>
22. Zimmerman, M., Morgan, T. A., & Stanton, K. (2018). The severity of psychiatric disorders. *World Psychiatry*, 17(3), 258-275. <https://doi.org/10.1002/wps.20569>
23. Yamamoto, Y., Liang, M., Munesue, S., Deguchi, K., Harashima, A., Furuhashi, K., Yuhi, T., Zhong, J., Akther, S., Goto, H., Eguchi, Y., Kitao, Y., Hori, O., Shiraishi, Y., Ozaki, N., Shimizu, Y., Kamide, T., Yoshikawa, A., Hayashi, Y., . . . Higashida, H. (2019). Vascular RAGE transports oxytocin into the brain to elicit its maternal bonding behaviour in mice. *Communications biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0325-6>
24. Ross, L. E., & McLean, L. (2006). Anxiety Disorders During Pregnancy and the Postpartum Period. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 67(08), 1285-1298. <https://doi.org/10.4088/jcp.v67n0818>
25. Accortt, E. E., & Wong, M. H. (2017). It Is Time for Routine Screening for Perinatal Mood and Anxiety Disorders in Obstetrics and Gynecology Settings. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 72(9), 553-568. <https://doi.org/10.1097/ogx.0000000000000477>
-