



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Psicologia Generale e Dipartimento di Biologia**

**Corso di laurea triennale in Scienze Psicologiche Cognitive e Psicobiologiche**

**Elaborato finale**

**Influenza del parenting sulla risposta allo stress e sullo sviluppo di disturbi correlati**

**Influence of parenting on the stress response and the development of stress-related disorders**

***Relatrice***

**Prof.ssa Gabriella Margherita Mazzotta**

***Laureanda:*** Martina Busellu

***Matricola:*** 1227576

**Anno Accademico 2021/22**

# Indice

▪ Introduzione .....	2
▪ Capitolo 1: La risposta allo stress .....	3
- 1.1. Definizione di stress .....	3
- 1.2. La risposta psicobiologica allo stress .....	4
- 1.2.1. CRH e cortisolo .....	6
- 1.3. Fattori che influenzano la risposta allo stress .....	7
▪ Capitolo 2: Parenting e sviluppo della risposta allo stress .....	9
- 2.1. Influenza del parenting sull'asse HPA .....	9
- 2.2. Meccanismi epigenetici che mediano gli effetti del parenting .....	10
- 2.3. Modificazioni epigenetiche associate alle cure materne .....	12
- 2.4. Il ruolo della serotonina .....	14
- 2.5. Evidenze sull'uomo .....	15
▪ Capitolo 3: La risposta allo stress disadattiva .....	17
- 3.1. Disturbi legati allo stress .....	17
- 3.2. Esperienze stressanti nell'infanzia .....	18
- 3.3. Vulnerabilità genetica e fattori scatenanti .....	19
▪ Conclusioni .....	23
▪ Bibliografia .....	24

## Introduzione

Il benessere psicofisico di una persona dipende dal modo in cui questa risponde agli eventi stressanti della vita. Una risposta allo stress disfunzionale è alla base di numerosi disturbi, sia psichici, come depressione e PTSD, ma anche organici, come disturbi cardiovascolari e immunitari. D'altro canto, una risposta allo stress funzionale ha un ruolo protettivo verso queste patologie. La capacità di rispondere allo stress in maniera adattiva dipende da numerosi fattori, sia genetici che ambientali e le esperienze della prima infanzia sono fondamentali per lo sviluppo di una risposta allo stress adattiva e funzionale. In questa tesi si vuole evidenziare in particolare il ruolo di una buona genitorialità come fattore protettivo contrapposto a quello di una cattiva genitorialità che, attraverso abusi e atti di negligenza verso il bambino, funge da fattore predisponente ad una risposta allo stress disfunzionale. L'intento è di analizzare l'interazione tra fattori genetici e ambientali nello sviluppo della risposta allo stress, facendo riferimento agli studi che negli anni hanno raccolto informazioni in ambito psicologico e genetico sull'argomento. In prima istanza verrà data una definizione di stress e una descrizione dei meccanismi psicobiologici e neuroendocrini sottostanti la risposta allo stress. Successivamente si tratteranno i meccanismi epigenetici che mediano gli effetti del parenting sullo sviluppo della risposta allo stress facendo riferimento principalmente agli studi sui modelli animali che verranno poi messi a confronto con le evidenze riscontrate in soggetti umani. Infine, verrà data una descrizione dei principali disturbi legati allo stress (depressione maggiore e PTSD), dei fattori genetici e ambientali che concorrono alla loro insorgenza e del modo in cui questi interagiscono.

# Capitolo 1: La risposta allo stress

## 1.1. Definizione di stress

La prima definizione di stress risale al medico austriaco Hans Selye, che nel 1936 lo identificò come una “sindrome generale di adattamento” (H. Selye, 1936). Questa definizione ben sintetizza le due caratteristiche chiave dello stress, che si configura come una condizione che coinvolge l'intero organismo ed è mirata a trovare un adattamento ad una situazione nuova, che coglie impreparato l'individuo. Nonostante la popolare connotazione negativa dello stress, questo è assolutamente fondamentale per la sopravvivenza. Selye stesso dichiarò che “la completa libertà dallo stress è la morte.”. Una riprova di ciò è la legge di Yerkes-Dodson, che rappresenta la relazione tra il livello di stress e la performance dell'individuo. Secondo questa legge esistono dei livelli ottimali di stress, entro i quali l'individuo è in grado di ottenere una buona performance, allo stesso modo esistono dei livelli troppo bassi e troppo alti di stress, in cui la scarsità o l'eccesso di attivazione, rispettivamente, determinano una bassa performance (Fig. 1).



*Figura 1: legge Yerkes-Dodson. La performance ottimale è ottenuta con un livello medio di stress. A livelli bassi di stress/attivazione corrisponde uno stato di relax, mentre a livelli troppo alti corrisponde uno stato di panico o di ansia, in entrambi i casi l'individuo non mette in atto una performance ottimale.*

Un'eccessiva esposizione allo stress può essere causa di una varietà di disturbi, sia psichici che organici. Le conseguenze dell'eccessivo stress spaziano da disturbi

depressivi e di ansia a problemi cardiovascolari, immunitari e di memoria. Inoltre, in letteratura, lo stress è stato spesso associato ad un invecchiamento precoce del cervello. È importante notare che lo stress può essere un'esperienza assolutamente soggettiva. L'agente stressante (stressor) che causa un'attivazione nell'individuo può variare da persona a persona. In generale con esperienze stressanti si intendono abusi (sessuali, fisici o psicologici), incidenti o condizioni organiche che minano all'integrità fisica dell'individuo, traumi e situazioni stressanti nell'ambiente familiare, lavorativo o sociale. Sia lo stress acuto che lo stress cronico possono avere conseguenze a lungo termine (McEwen, 1998). Tuttavia, la risposta allo stress viene messa in atto solo se l'individuo percepisce l'evento in questione come stressante, dunque la percezione soggettiva va sempre tenuta a mente quando si parla di stress. Oltre alla percezione soggettiva della situazione, esiste una certa vulnerabilità allo stress che è determinata da un'unione di fattori genetici e ambientali, tra cui esperienze di vita precoci con i caregiver.

## 1.2. La risposta psicobiologica allo stress

Oggi si parla di risposta psicobiologica allo stress, riferendosi soprattutto all'azione di due circuiti importanti, che insieme compongono il sistema dello stress (Fig. 2): la divisione simpatica del sistema nervoso autonomo (SNS) e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA).

Il SNS è noto per il suo ruolo nella risposta "fight or flight". La sua è un'azione immediata di risposta ad uno stimolo inatteso e percepito come pericoloso. Attivate dall'ipotalamo, tramite il locus coeruleus, le connessioni simpatiche rilasciano norepinefrina (NE), ormone che va ad agire su diversi organi, tra cui la parte midollare del surrene, la quale rilascia l'ormone epinefrina. L'effetto complessivo è quello di preparare l'organismo all'azione immediata. Quando il sistema nervoso simpatico è attivo, il battito cardiaco viene aumentato, mentre l'attività intestinale e immunitaria sono depresse. È una risposta estremamente rapida che serve a predisporre le energie per rispondere in modo funzionale e immediato all'evento stressante. Inoltre, il locus coeruleus è il nucleo principale del sistema modulatorio diffuso noradrenergico del cervello, la sua attivazione dipende da stimoli sensoriali inattesi, nuovi, e la sua azione comporta un aumento della reattività cerebrale e della rapidità di elaborazione delle informazioni (Bear et al., 2016).

L'asse HPA, invece, è responsabile del mantenimento della risposta prolungata allo stress, che, in condizioni non patologiche, permane fino alla scomparsa dello stressor. Quando un evento stressante viene percepito dagli organi di senso, il segnale nervoso raggiunge direttamente l'ipotalamo, il quale secreta l'ormone per il rilascio della corticotropina (CRH). Quest'ormone agisce sull'ipofisi, inducendo la secrezione di corticotropina (ACTH) nel sangue. Infine, l'ACTH raggiunge la corteccia surrenale, dove induce il rilascio di glucocorticoidi, tra cui il cortisolo.

L'attivazione dell'asse HPA è regolata dall'attività di amigdala e ippocampo. La prima è una struttura a forma di mandorla che riceve numerosi segnali soprattutto dalla neocorteccia ed è considerata fondamentale per la risposta emozionale, soprattutto per quanto riguarda la paura. In soggetti con disturbi d'ansia, depressione e disturbo post-traumatico da stress (PTSD) si è evidenziata un'eccessiva attivazione dell'amigdala, che è associata ad un maggior senso di minaccia e paura sproporzionata. In animali con lesioni a livello dell'amigdala si osserva invece una scomparsa della risposta di paura, (i.e. Blanchard e Blanchard, 1972; Kemble et al. 1984). Nella risposta allo stress il ruolo dell'amigdala è di tipo eccitatorio, essa agisce sull'ipotalamo tramite un gruppo di neuroni detto nucleo del letto della stria terminale, aumentandone l'attività. Per quanto riguarda l'ippocampo, invece, il suo ruolo principale è legato alla formazione, al consolidamento e al recupero di ricordi. In pazienti con PTSD, il ridotto volume dell'ippocampo è stato associato alla difficoltà di integrazione e organizzazione dei ricordi autobiografici, tipica di questo disturbo. L'ippocampo è ricco di recettori per i glucocorticoidi e un'eccessiva esposizione a tali ormoni può danneggiare questa struttura, intaccando la sensibilità dei recettori stessi. È quindi possibile affermare che una risposta troppo prolungata allo stress può comportare danni al sistema della memoria. Nella regolazione dell'attività dell'asse HPA l'ippocampo svolge un ruolo inibitorio, partecipando al circuito di feedback negativo operato dal cortisolo. Quest'ormone agisce sui recettori dell'ippocampo che va ad inibire l'attività dell'ipotalamo e quindi il rilascio di CRH.

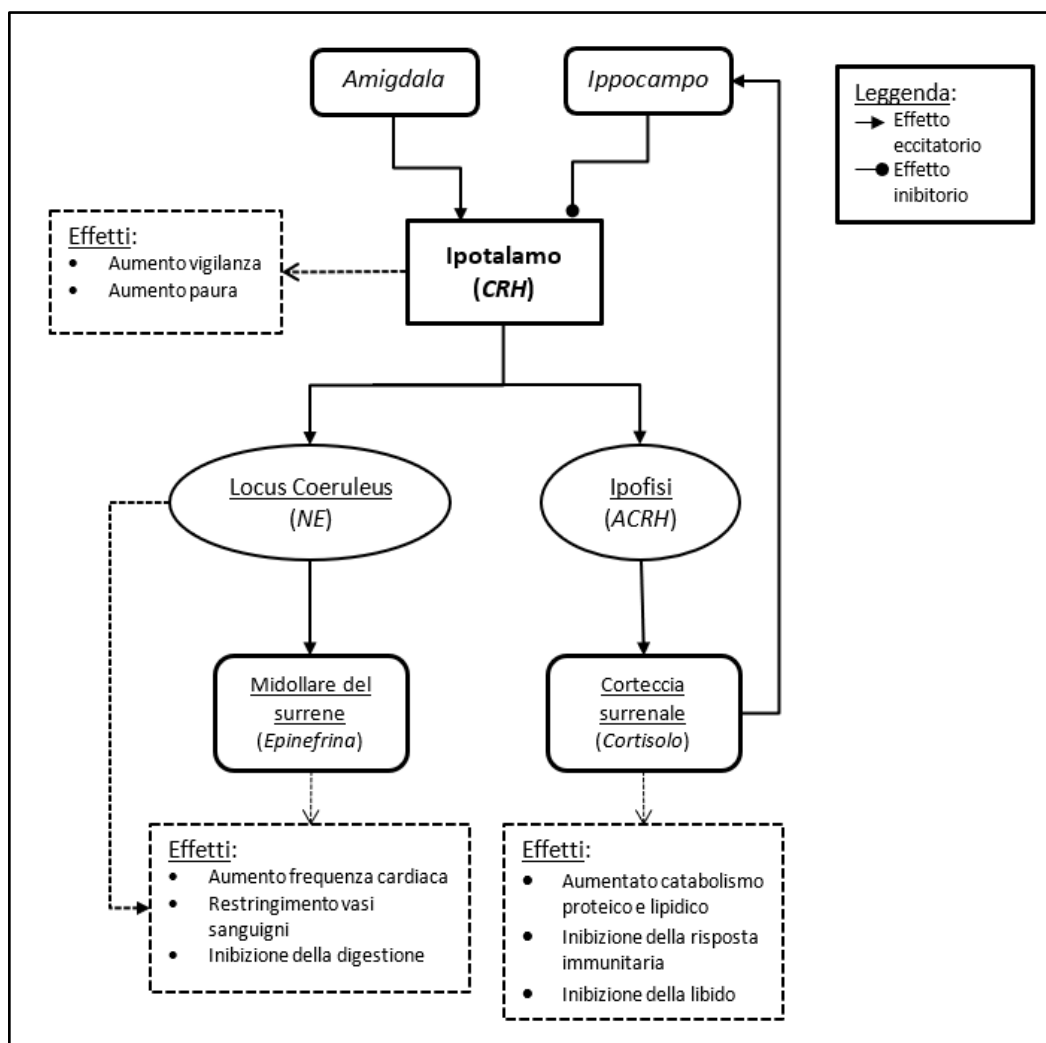


Figura 2: sistema dello stress.

### 1.2.1. CRH e cortisolo

Il CRH è il primo regolatore della risposta allo stress. Si tratta di un neuropeptide di 41 amminoacidi, espresso soprattutto a livello centrale nell'ipotalamo. Viene secreto dai neuroni del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo insieme alla vasopressina (AVP), con cui agisce in sinergia. In situazioni non stressanti, la secrezione di CRH e di AVP segue un ritmo circadiano, raggiungendo il picco nelle prime ore del mattino. Questo ritmo può essere turbato da variazioni nella luminosità, nelle abitudini alimentari o nell'attività fisica e viene interrotto da situazioni di stress (Habib et al., 2001). Quando l'organismo incontra uno stressor, il rilascio di CRH e AVP aumenta significativamente, dando inizio alla risposta allo stress. Il CRH agisce su due recettori accoppiati a proteina G: CRHR1 e CRHR2. Questi recettori sono collocati in numerose regioni del sistema nervoso centrale

(SNC), ma anche nel resto dell'organismo, ad esempio a livello del surrene e delle gonadi. Sembra che CRHR1 sia il principale recettore responsabile della risposta allo stress, mentre CRHR2 agirebbe modulando l'effetto del segnale di trasduzione di CRHR1 (Binder e Nemeroff, 2010). Gli effetti di CRH, mediati principalmente dal recettore CRHR1, riguardano elevata paura e vigilanza così come riduzione dell'appetito e della libido, tutte funzioni rilevanti nella risposta "fight-or-flight" e sregolate in pazienti con disturbi di ansia e depressione (ibid.).

Il cortisolo rappresenta invece l'ultimo prodotto della risposta allo stress. È un ormone steroideo, derivante quindi dal colesterolo, che viene prodotto a livello della ghiandola surrenale. Appartiene alla categoria dei glucocorticoidi e svolge la sua azione tramite il recettore per i glucocorticoidi (GR). Dato che la maggior parte delle cellule nel corpo presenta questi recettori, il cortisolo ha un effetto globale su tutto l'organismo. L'azione principale del cortisolo è quella di mobilitare le riserve energetiche, accentuando il catabolismo proteico e lipidico, inoltre inibisce l'attività riproduttiva e immunitaria.

Un riassunto dei geni coinvolti nella risposta allo stress è fornito nella tabella 1.

Gene codificante	Prodotto del gene	Posizione nel cromosoma
CRH	Ormone per il rilascio della corticotropina	8q13.1
CRHR1	Recettore per l'ormone per il rilascio della corticotropina 1	17q21.31
CRHR2	Recettore per l'ormone per il rilascio della corticotropina 2	7p15.1
NR3C1	Recettore per i glucocorticoidi (GR)	5q31

*Tab. 1: posizione dei geni codificanti CRH, recettori di CRH e GR nel genoma*

### 1.3. Fattori che influenzano la risposta allo stress

Come accennato all'inizio di questo capitolo, l'attivazione del sistema dello stress è soggetta a una grande variabilità individuale. Uno dei fattori principali che determina l'attuazione della risposta allo stress è sicuramente la valutazione cognitiva della situazione, descritta da Lazarus e Folkman (1984) come l'analisi personale che ogni individuo fa di una certa situazione. Le percezioni che scatenano la risposta allo stress sono quelle di minaccia più o meno diretta alla vita dell'individuo, o quelle di sfida, come ad esempio un colloquio di lavoro o una verifica di matematica; infine dobbiamo



considerare la percezione di controllo e di giudizio sociale come fattori modulanti la risposta allo stress. Le situazioni che non possiamo controllare sono quelle che causano un maggiore stress, questa percezione caratterizza molti disturbi in cui il paziente riferisce un senso di impotenza verso ciò che gli accade o i pensieri intrusivi che lo tormentano (e.g. depressione, PTSD, DOC). Il giudizio sociale è stato confermato come fattore scatenante lo stress da numerosi studi che utilizzano il paradigma del social stress test (Seddon et al. 2020). Allo stesso tempo, la presenza dell'altro spesso funge da fattore protettivo per lo stress. Gli umani sono esseri sociali e spesso ricercano in questo ambiente una forma di sicurezza emotiva, che viene fornita prima dai genitori, poi dai partner e dagli amici. Particolarmente importante è allora l'ambiente sociale che il bambino può avere durante l'infanzia: il sistema dello stress viene calibrato sulle prime esperienze e in letteratura si è osservata un'associazione tra esperienze negative durante l'infanzia e una risposta maladattiva allo stress nell'età adulta in diverse specie animali. Parte della modalità di gestione dello stress di ciascuno è dovuta a variabilità genetica, ma nell'espressione di questa variabilità l'ambiente gioca un ruolo fondamentale.

## Capitolo 2: Parenting e sviluppo della risposta allo stress

### 2.1. Influenza del parenting sull'asse HPA

Le esperienze della prima infanzia sono spesso fondamentali nel determinare quali saranno le caratteristiche dell'individuo adulto. L'ambiente familiare, e in particolare le cure fornite dai genitori o dai care-giver, costituiscono il primo contatto che il neonato ha col mondo e che utilizzerà per calibrare le sue risposte adattive che poi si porterà dietro in età adulta. Avversità in età precoce, o bassa qualità delle cure parentali, alterano lo sviluppo del sistema endocrino e nervoso in modo tale da predisporre l'individuo a disturbi di vario genere in età adulta (Meaney e Szyf, 2005). In generale si può dire che l'esposizione ripetuta ad esperienze stressanti in età infantile comporta una maggior vulnerabilità a disturbi legati allo stress in età adulta. Essendo difficile, per diverse ragioni, studiare in individui umani la varietà di effetti che le prime esperienze possono avere sul substrato biologico della risposta allo stress, la maggior parte degli studi si concentra su modelli animali geneticamente vicini all'uomo, come ratti e scimmie.

Nei ratti, la prima settimana di vita è caratterizzata da interazioni madre-prole o tra pari. Attraverso il paradigma di handling è possibile controllare la durata di queste interazioni e osservare gli effetti della separazione sulla prole. Il paradigma di handling consiste dunque nel separare la prole dalla madre per un tempo che può essere breve (i.e. 3-15 min) o lungo (i.e. 3-6 ore), gli effetti di questa separazione si protraggono fino all'età adulta dell'animale. Tali effetti includono: livelli più alti di ACTH e corticosterone, che è l'equivalente del cortisolo nei ratti, e maggior espressione di CRH (van Oers et al. 1998; Plotsky e Meaney, 1993; Ladd et al., 1996). Oltre agli effetti sui principali ormoni coinvolti nella risposta allo stress, queste esperienze precoci influenzano anche i sistemi modulatori della risposta allo stress, come ad esempio il sistema di feedback negativo, regolando l'espressione di GR: ratti separati dalla madre in età precoce mostrano livelli più bassi di questi recettori a livello di ippocampo e corteccia (Ladd et al., 2004). A questo si associano ovviamente cambiamenti a livello comportamentale: ratti separati dalla madre per lunghi periodi nei primi giorni di vita mostrano meno comportamento esplorativo e un maggior riflesso di startle in età adulta (Lippmann et al., 2007).

Pur essendo la mancanza del care-giver un evento particolarmente stressante per la prole, effetti comparabili a quelli sopraelencati sono stati osservati anche in ratti che hanno ricevuto poche cure parentali dalla madre, non perché ne fossero separati, ma perché per sua natura la madre forniva una minore quantità di cure. In diversi studi le madri vengono divise in due gruppi sulla base del loro comportamento spontaneo: le madri che spendono tanto tempo a prendersi cura della prole, leccando i cuccioli soprattutto durante l'allattamento, e le madri che ne spendono di meno. In inglese questo comportamento prende il nome di *licking and grooming* ed è correlato positivamente con la modalità di allattamento in cui la madre inarca la schiena per lasciare più spazio ai cuccioli, per cui tipicamente si utilizza l'acronimo LG-ABN (da *licking/grooming* e *arched back nursing*) e le madri che mostrano alti livelli di questo comportamento sono definite *high LG-ABN*, mentre quelle che ne mostrano meno sono definite *low LG-ABN* (Fig. 3). La prole delle madri *high LG-ABN* mostra livelli più bassi di ACTH e corticosterone quando sottoposta a stress, rispetto alla prole di madri *low LG-ABN*, i cui livelli sono invece comparabili a quelli osservati in ratti separati dalla madre durante i primi giorni di vita (Liu et al., 1997). Inoltre, la prole che riceve più cure parentali mostra un aumento dell'espressione di GR a livello ipocampale, una maggiore sensibilità al feedback negativo operato dal corticosterone e una ridotta espressione di CRH a livello ipotalamico (ibid.). Questi risultati portano alla conclusione che non è la presenza della madre a fare la differenza nello sviluppo della risposta allo stress, ma la quantità delle cure che essa fornisce.

Tenendo conto del fatto che un basso livello di cure parentali si associa spesso a una risposta allo stress più elevata non solo nella prole, ma anche nella madre, vale la pena sottolineare che la trasmissione dello stile parentale è spesso intergenerazionale, quindi il rapporto che esiste tra madre e figlia è predittivo del rapporto che la figlia avrà con la sua prole. Questo porta a



*Figura 3: esemplare di femmina di Long-Evans intenta ad allattare i cuccioli con la schiena inarcata, mentre lecca uno dei cuccioli. Fonte dell'immagine: Meaney e Szyf, 2005*

domandarsi se una risposta allo stress disadattiva non sia dovuta semplicemente a fattori genetici che vengono trasmessi dai genitori alla prole, senza intervento delle cure parentali. Per rispondere a questa domanda bisogna citare gli studi di cross-fostering (adozione incrociata), in cui la prole di madri low LG-ABN, è stata cresciuta da madri high LG-ABN e viceversa. In uno studio di Anisman et al. (1998), sono stati presi in considerazione ratti BALB/cByJ, che manifestano una risposta allo stress particolarmente elevata, e ratti C57NL/6ByJ, più resistenti agli stressor, e si è osservato che quando la prole di BALB/cByJ viene cresciuta da madri C57NL/6ByJ manifesta una risposta allo stress molto attenuata in età adulta. D'altra parte, la prole di C57NL/6ByJ cresciuta da madri BALB/cByJ, non manifesta variazioni comportamentali significative, suggerendo un contributo genetico, oltre che ambientale (Anisman et al., 1998).

## 2.2. Meccanismi epigenetici che mediano gli effetti del parenting

Seppure ogni cellula di un organismo contenga sempre la stessa sequenza di DNA, e quindi gli stessi geni, non tutti i geni sono sempre espressi in tutte le cellule. L'insieme di meccanismi che regolano l'espressione genica, senza cambiare direttamente la sequenza genica, prende il nome di meccanismi epigenetici. Questi consistono in una serie di modificazioni strutturali che possono rendere certi geni più o meno accessibili ai fattori di trascrizione, dunque più o meno esprimibili in un certo tessuto o in un certo momento della vita dell'organismo. La regolazione epigenetica avviene soprattutto durante lo sviluppo, sia prenatale che della prima infanzia, rimane più o meno stabile per tutta la vita dell'individuo ed è influenzata dagli eventi ambientali. In questo senso i meccanismi epigenetici rappresentano una sorta di interfaccia nell'interazione geni-ambiente. Le modificazioni epigenetiche, a differenza delle mutazioni genetiche, sono dinamiche e di conseguenza potenzialmente reversibili, il che apre la strada a terapie che sfruttano tale dinamicità (Szyf et al., 2007).

Per poter essere contenuto all'interno del nucleo, il DNA va incontro ad una serie di modificazioni che lo rendono più compatto e fanno sì che possa occupare uno spazio ristretto. Il primo livello di questo compattamento è il nucleosoma, per cui il filamento di DNA si avvolge attorno ad un ottamero istonico. Gli istoni sono proteine basiche, che svolgono principalmente un ruolo strutturale, e insieme al filamento di DNA

costituiscono la cromatina. La cromatina può essere più o meno compatta: quando è fortemente compattata, l'accesso al DNA da parte di proteine, che possono essere sia fattori di trascrizione, sia agenti potenzialmente dannosi, è impedito, e di conseguenza è impedita anche l'espressione genica. Il DNA è invece accessibile dalle proteine quando la cromatina non è fortemente compattata, dunque può essere trascritto. Le modificazioni epigenetiche riguardano principalmente gli istoni, ma possono riguardare anche le basi azotate, e vanno a regolare il livello di espressione dei geni presenti in quella regione.

Ci sono cinque tipi di istoni: H1, H2A, H2B, H3 e H4. Le modificazioni epigenetiche riguardano principalmente gli istoni H3 e H4 e avvengono nelle regioni N-terminali di tali proteine. Queste modificazioni possono essere metilazioni o acetilazioni, rispettivamente aggiunte di un gruppo metilico o di un gruppo acetile. L'acetilazione degli istoni è associata ad una cromatina attiva, dove quindi può avvenire l'espressione genica, ed è catalizzata dagli enzimi istone acetiltransferasi (acronimo inglese HAT). Invece, la metilazione degli istoni è associata ad una cromatina inattiva, non accessibile ai fattori di trascrizione.

Anche le basi azotate possono andare incontro a metilazione. È in particolare la citosina ad essere protagonista di queste modificazioni e, dato che la citosina si associa alla guanina, di solito si fa riferimento al dinucleotide CpG. In questo caso è il DNA ad essere metilato, ed anche qui regioni con un alto livello di metilazione sono regioni con bassi livelli di espressione genica.

### 2.3. Modificazioni epigenetiche associate alle cure materne

I principali effetti epigenetici associati alle cure materne sono stati osservati nei livelli di espressione dei recettori per i glucocorticoidi (GR). In uno studio del 2004, Weaver et al. si sono concentrati sull'esone 17 del gene codificante GR, NR3C1, che nel ratto si trova nel cromosoma 18. In questo esone è presente il sito di attacco per il fattore di trascrizione NGFI-A (nerve growth factor inducible protein A), che dà il via all'espressione di NR3C1 (Fig. 4). A partire da un campione di ipocampo prelevato da ratti allevati alcuni da madri high LG-ABN e altri da madri low LG-ABN, hanno osservato che la regione dell'esone 17 contenente il sito di attacco per NGFI-A presenta livelli più alti di metilazione nella prole allevata da madri low LG-ABN (Fig. 5

A e B). È importante notare che lo studio prevedeva un'adozione incrociata, quindi il pattern di metilazione osservato è dovuto esclusivamente a processi epigenetici e non è trasmesso geneticamente dai genitori alla prole.

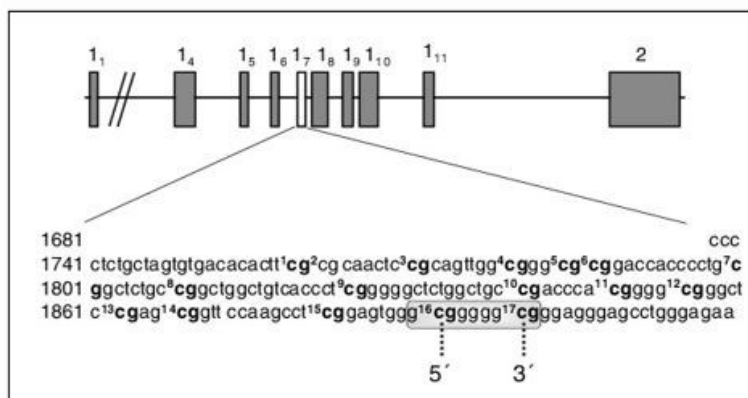


Figura 4: mappatura dell'esone 17, sono evidenziati in grassetto i 17 dinucleotidi CpG ed è cerchiato il sito di attacco per NGFI-A. (Immagine riadattata da Weaver et al., 2004.)

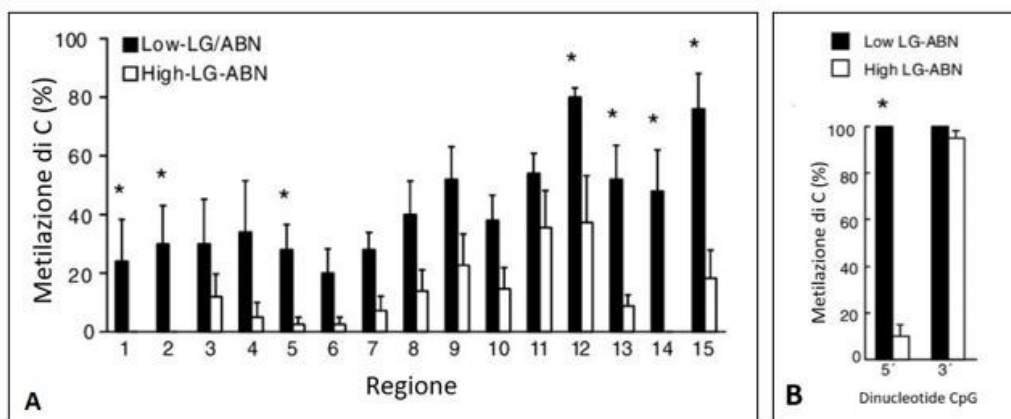


Figura 5: A) Livelli di metilazione nei primi 15 dinucleotidi CpG dell'esone 17 in prole allevata da madri low LG-ABN e madri high LG-ABN. B) Livelli di metilazione negli ultimi 2 dinucleotidi CpG, che delimitano il sito di attacco per NGFI-A. (Immagini riadattate da Weaver et al., 2004.)

Questi risultati sono stati replicati in un altro studio, effettuato da McGowan et al. nel 2011, con simile procedura. Anche in questo caso sono stati analizzati campioni di ippocampo prelevati dalla prole di madri high LG-ABN e low LG-ABN, e si è osservato il livello di metilazione del locus contenente il gene NR3C1, il livello di acetilazione nella lisina-9 degli istoni (H3K9) e il livello di espressione genica. L'acetilazione degli istoni è associata ad una maggiore espressione genica e nelle cellule ippocampali di ratti allevati da madri high LG-ABN, quindi ratti che hanno ricevuto più cure materne, sono stati rilevati livelli più alti di acetilazione in H3K9. Questo è associato ad una maggiore

espressione del gene NR3C1, a cui consegue un livello più alto di recettori GR e quindi una regolazione più efficace della risposta allo stress.

## 2.4. Il ruolo della serotonina

In una serie di studi, concentrati sempre sul ratto, Meaney e Szyf hanno osservato che le cure materne determinano un aumento dei livelli di serotonina (5-HT) a livello ippocampale e della corteccia prefrontale, regioni in cui, come descritto sopra, si osserva anche un incremento dei recettori GR. È stato rilevato, tramite osservazioni di colture di cellule ippocampali in vitro, come l'aumento dei livelli di 5-HT sia associato ad un aumento dei livelli di NGFI-A (Meaney e Szyf, 2005). La serotonina agisce legando il recettore per la serotonina 5-HT<sub>7</sub>, questo attiva cAMP, un secondo messaggero il cui effetto principale è quello di attivare PKA (protein chinasi A). Il risultato di questa prima catena di eventi è l'attivazione di diversi fattori di trascrizione, tra cui appunto NGFI-A, il quale poi va a legarsi al promotore del gene NR3C1 nell'esone 17 dando inizio alla sua espressione (Fig. 6).

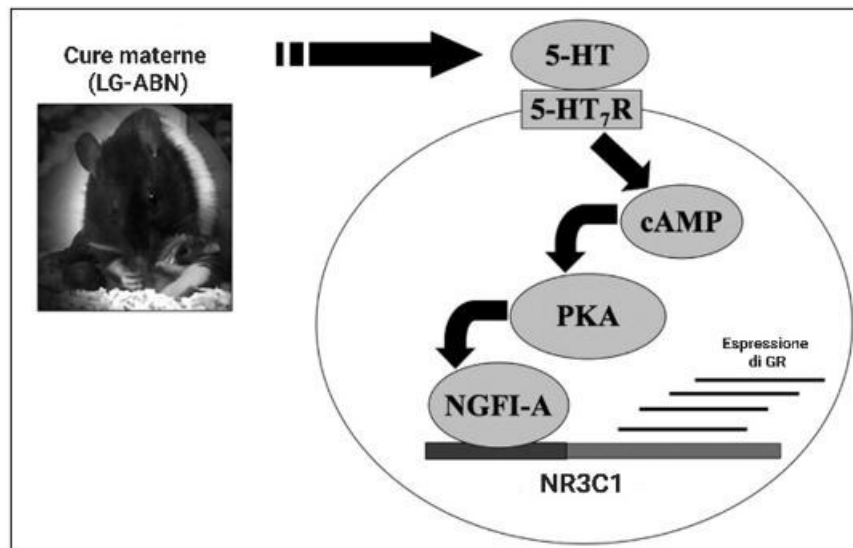


Figura 6: meccanismi che portano all'espressione di GR a partire dalle cure materne. (Immagine riadattata da Weaver, 2007)

Meaney e Szyf hanno osservato però, che nel ratto adulto, il livello di NGFI-A non è diverso tra ratti che hanno ricevuto molte cure materne e ratti che ne hanno ricevuto di meno, quindi sono andati ad indagare in che modo gli effetti scatenati dalla serotonina

fossero mantenuti sulla risposta allo stress del ratto adulto. In altre parole, sono andati ad osservare se i cambiamenti nei livelli di NGFI-A indotti dalla serotonina in età infantile, comportassero delle modificazioni epigenetiche che si mantengono in età adulta. L'attivazione di cAMP, determinata dall'aumento di 5-HT, determina quella di CBP, un fattore che regola l'espressione genica e che fa parte di una specifica classe di proteine: le istone acetiltransferasi (HAT). L'attivazione di CBP determinerebbe allora l'acetilazione degli istoni che è stata osservata a livello dell'esone 1<sub>7</sub>, con conseguente demetilazione dei dinucleotidi CpG.

Sempre Meaney e Szyf hanno osservato che le differenze nel pattern di metilazione dell'esone 1<sub>7</sub> emergono nei ratti nel corso della prima settimana di vita, e che al giorno della nascita, tutti i ratti presentano un alto livello di metilazione nell'esone 1<sub>7</sub> che va a ridursi nell'arco dei successivi sei giorni quando i ratti ricevono un alto livello di cure materne. Dunque, nella prole di madri high LG-ABN, si osserva un processo di demetilazione dell'esone 1<sub>7</sub> che è mediato dall'acetilazione degli istoni in quel locus, scatenata dall'aumento di serotonina.

Studi successivi hanno replicato questi risultati, confermando il ruolo di NGFI-A e CBP come mediatori delle modificazioni epigenetiche che sono alla base di una diversa sensibilità allo stress nei ratti (i.e. Weaver et al., 2007; Hellstrom et al., 2012)

## 2.5. Evidenze sull'uomo

Gli studi sui modelli animali offrono la possibilità di osservare meccanismi molecolari, come quelli descritti sopra, con un livello di dettaglio che attualmente non è possibile ottenere utilizzando soggetti umani. Gli studi di epigenetica negli umani si concentrano prevalentemente sull'analisi di PBC (peripheral blood cells), oppure sull'analisi dei tessuti post-mortem (Zannas e West, 2014). Entrambe le opzioni, nel caso dello studio della risposta allo stress, presentano delle limitazioni. Con l'analisi di PBC è difficile scegliere specifici tipi di cellule provenienti da tessuti di interesse, e questo è un fattore importante considerando che i meccanismi epigenetici sono tessuto-specifici. Le analisi post-mortem, invece, non permettono che l'analisi del tessuto di interesse avvenga in concomitanza temporale con l'avvenire della risposta allo stress, rendendo difficile osservare gli effetti diretti dello stress (ibid.). Ciononostante, è naturale domandarsi



quanto ciò che possiamo osservare nei modelli animali sia trasferibile alla specie umana e questi studi hanno l'obiettivo di rispondere a tale domanda.

Nell'uomo il gene NR3C1 si trova nel cromosoma 5, l'esone 1<sub>F</sub> di questo gene è l'omologo dell'esone 1<sub>7</sub> che viene studiato nel ratto, esso contiene il promotore a cui si lega il fattore di trascrizione NFI-A per dare inizio alla trascrizione del gene. Nel 2009, McGowan et al. hanno analizzato i livelli di metilazione di questo sito in campioni di cellule ipocampali prelevate post-mortem da vittime di suicidio con una storia di abusi nell'infanzia, confrontandoli con dei controlli. I controlli erano sia vittime di suicidio, senza storia di abuso infantile, sia morti per altre cause. Si ricorda che con "abuso" si intende sia abuso sessuale, sia abuso fisico, ma anche atti di negligenza verso il bambino. I risultati di questo studio mostrano un'espressione di NR3C1 significativamente ridotta nelle vittime di suicidio con storia di abuso infantile e un livello più alto di metilazione nell'esone 1<sub>F</sub>.

Perroud et al. (2011) si sono concentrati sullo stesso gene in un'analisi di PBC prelevate da pazienti con disturbo borderline di personalità (BPD) e trascorsi di abuso infantile, o disturbo depressivo maggiore (MDD) senza trascorsi di abuso infantile. Anche qui l'abuso considerato tale era di tipo sessuale, fisico, atti di negligenza e abuso emotivo. Anche in questo caso, sono stati trovati livelli di metilazione più elevati in soggetti che avevano subito abusi nell'infanzia.

Infine, in uno studio del 2013, Melas et al., hanno trovato un'associazione tra i livelli di metilazione nell'esone 1<sub>F</sub> di NR3C1 e la morte di un genitore in età infantile. Più precisamente in soggetti che riportavano di aver perso un genitore prima dell'età di 18 anni, sono stati rilevati livelli maggiori di metilazione.

## Capitolo 3: La risposta allo stress disadattiva

### 3.1. Disturbi legati allo stress

L'iperattività dell'asse HPA è un sintomo caratteristico sia in pazienti con depressione maggiore, sia in pazienti con disturbo post traumatico da stress (PTSD). La depressione è tra le psicopatologie più comuni a livello globale: secondo l'organizzazione mondiale della sanità (OMS) circa il 5% degli adulti in tutto il mondo soffrono di depressione. La depressione colpisce le donne più degli uomini, con un rapporto che è circa 2:1. Anche il PTSD colpisce prevalentemente le donne rispetto agli uomini, con un rapporto 2:1. Questi disturbi si presentano spesso in comorbidità, insieme a disturbo d'ansia generalizzato (DAG) e disturbi da uso di sostanze, in particolare consumo di alcool. È accertata in questi pazienti un'ipoattività dell'ippocampo, che dunque non è in grado di inibire l'attività dell'ipotalamo, e un'iperattività dell'amigdala, che attivando l'ipotalamo dà il via a tutta quella catena di eventi che termina con un eccessivo rilascio di cortisolo. Pazienti con depressione maggiore presentano livelli più alti di CRH e cortisolo (Nemeroff et al. 1984), allo stesso modo sono stati rilevati livelli più alti di CRH in pazienti con PTSD. Il sistema di feedback negativo è alterato in entrambi i disturbi, mantenendo attiva la risposta allo stress più a lungo del necessario.

La diagnosi di PTSD prevede la presenza di un evento traumatico nella vita del paziente, a seguito del quale si sviluppa il disturbo. Il tipo di trauma è variabile, ma il denominatore comune è sempre l'elemento di minaccia reale o percepita alla vita o alla integrità fisica dell'individuo. Di fatto, le prime diagnosi di PTSD furono fatte su veterani di guerra di ritorno dal Vietnam. Altri esempi di traumi sono violenze sessuali, incidenti stradali o attacchi terroristici. I pazienti con PTSD sperimentano flashback intrusivi in cui rivivono in maniera vivida le vicende del trauma, pensieri e umore negativi e ipervigilanza, dovuta soprattutto all'iperattività dell'amigdala, che li porta a concentrare l'attenzione su stimoli negativi che ricordano il trauma.

Il disturbo depressivo maggiore non è necessariamente associato alla presenza di un trauma nella vita dell'individuo, ma spesso nella diagnosi si identificano dei fattori predisponenti e precipitanti, che rispettivamente forniscono una vulnerabilità alla patologia e poi la innescano, e questi talvolta possono essere considerati eventi traumatici.

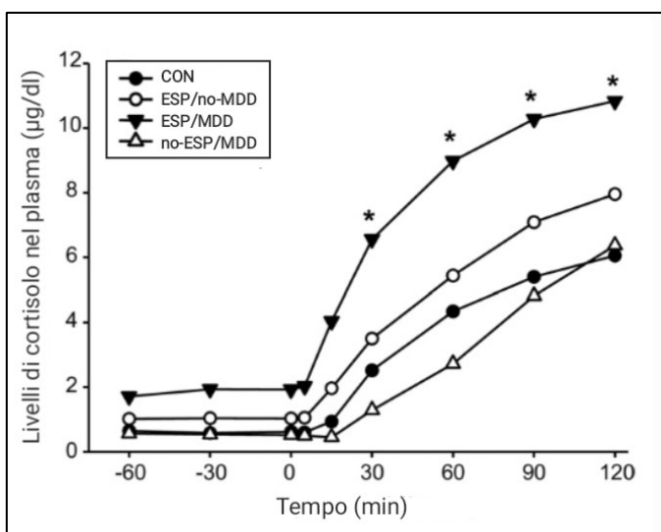
La depressione si manifesta con sintomi di umore depresso, scarsa energia, disturbi dell'appetito (scarso appetito o iperfagia), disturbi del sonno (insonnia o ipersonnia), sentimenti di disperazione, scarsa capacità di concentrazione e bassa autostima.

Spesso questi disturbi si associano a disturbi d'ansia e al disturbo di panico, anche questi presentano un'iperattività dell'amigdala, e la sintomatologia che li accomuna riguarda un senso di anticipazione, preoccupazione eccessiva e persistente, senso di inefficacia, di incapacità o impossibilità di controllare la situazione.

### 3.2. Esperienze stressanti nell'infanzia

L'esposizione ad esperienze stressanti o traumatiche prima dell'età adulta crea uno squilibrio nell'attività dell'asse HPA, che di conseguenza espone a disturbi legati allo stress. Il test di soppressione del cortisolo tramite iniezione di desametasone (un glucocorticoide che ha un'azione più potente del cortisolo) determina una maggiore soppressione di cortisolo in pazienti con PTSD rispetto a soggetti sani, mentre nella maggior parte dei soggetti depressi questa soppressione non avviene, riflettendo una scarsa sensibilità al feedback negativo dei glucocorticoidi (Morris et al., 2012). In diversi studi, è stato osservato come in realtà la differenza nella soppressione sembri essere associata non alla psicopatologia in sé, ma alla presenza di un trauma nella storia del paziente. Ad esempio, Yehuda et al. (2003), hanno effettuato il test di soppressione del cortisolo in pazienti con PTSD, depressione maggiore, entrambi, o nessuno dei due. Hanno inoltre fatto una distinzione tra chi avesse subito un trauma precedente a quello scatenante la patologia e chi no. I risultati hanno mostrato che in soggetti con PTSD si aveva una maggiore soppressione dei livelli di cortisolo, ma un effetto simile si osservava anche in pazienti con depressione che avevano subito un trauma precedente a quello scatenante la patologia, mentre in pazienti con depressione maggiore che non riportavano traumi precedenti a quello scatenante non si osservava nessuna soppressione. Inoltre, Heim et al. (2008) hanno esaminato i livelli di ACTH e cortisolo a seguito di somministrazione orale di desametasone e successiva iniezione di CRH il giorno seguente, in uomini depressi e non, con e senza esperienze stressanti nell'infanzia. Questa procedura ha normalmente l'effetto di innalzare i livelli di cortisolo nel plasma a seguito dell'iniezione di CRH, con un effetto maggiore in soggetti con depressione maggiore. I

risultati dello studio hanno mostrato una chiara influenza delle esperienze stressanti vissute in età infantile. Uomini depressi con esperienze stressanti nell'infanzia riportavano livelli più alti di cortisolo, subito dopo di loro si trovavano uomini non depressi con esperienze stressanti nell'infanzia (Fig. 7). Questi risultati suggeriscono che lo squilibrio osservato nella risposta allo stress non sia dovuto alla patologia, ma alla presenza di esperienze traumatiche o stressanti pregresse, e che costituisce allora un fattore di vulnerabilità per lo sviluppo della patologia.

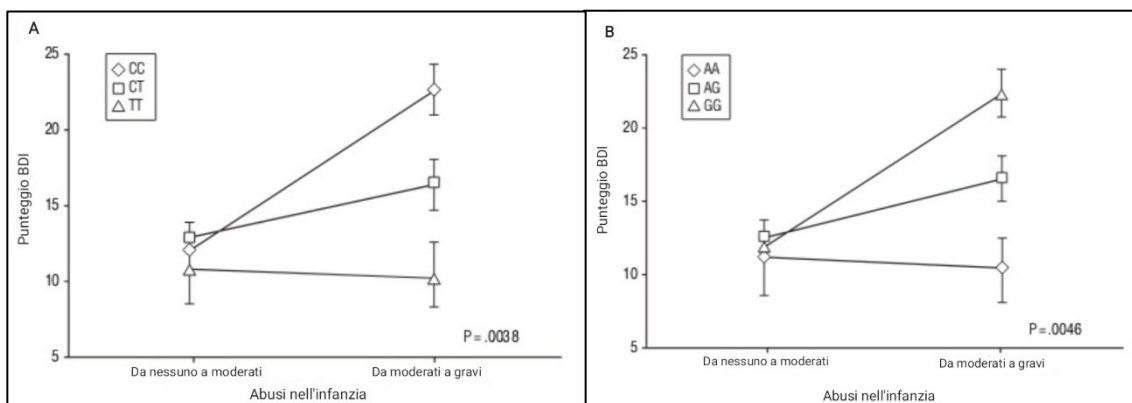


*Figura 7: livelli di cortisolo nel plasma misurati nel gruppo di controllo (CON), nel gruppo di uomini con esperienze stressanti precoci e nessuna diagnosi di depressione maggiore (ESP/no-MDD), nel gruppo di uomini con esperienze stressanti precoci e diagnosi di depressione maggiore (ESP/MDD) e nel gruppo di uomini senza esperienze stressanti precoci ma con depressione maggiore (no-ESP/MDD). (Immagine riadattata da Heim et al., 2008)*

### 3.3. Vulnerabilità genetica e fattori scatenanti

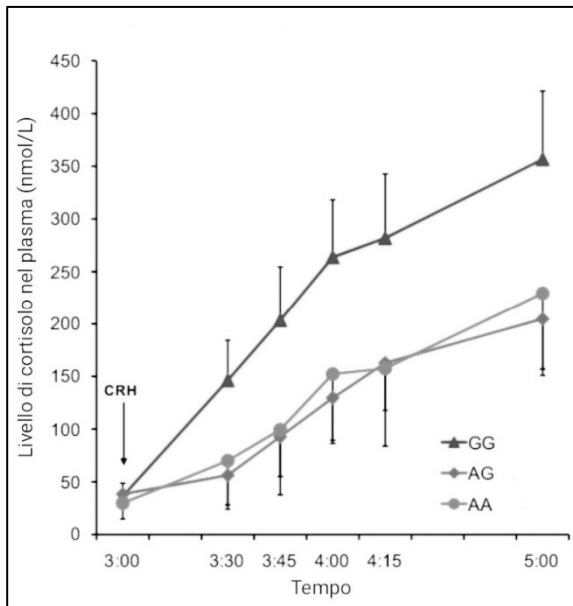
L'insorgere di disturbi psichici è spesso dato da una combinazione di vulnerabilità genetica e ambientale. Alcuni disturbi sono ereditabili geneticamente, ad esempio, la depressione ha un'ereditabilità stimata al 40%. Tuttavia, il genoma rappresenta al massimo un fattore predisponente: possedere un gene associato alla depressione comporta un maggiore rischio di sviluppare la malattia, ma l'insorgere di questa dipende dall'ambiente, che può esercitare un ruolo protettivo o scatenante. Allo stesso modo, si possono avere combinazioni di geni con effetto protettivo verso lo sviluppo di disturbi psichici, per cui anche crescendo in ambienti avversi, l'individuo è protetto, se non dalla malattia in sé, dalla possibilità di sviluppare una sintomatologia più grave. Bradley et al. (2008) hanno indagato come l'interazione tra il gene CRHR1 per i recettori di CRH di tipo 1 e l'esperienza di abusi nell'infanzia porti all'insorgere della sintomatologia depressiva. Si sono concentrati su una serie di SNP (Single Nucleotide Polymorphism),

ovvero delle mutazioni che coinvolgono singoli nucleotidi, del gene e hanno trovato un'interazione significativa con gli abusi nell'infanzia in due di questi SNP (rs110402 e rs7209436) (Tab. 2). Per entrambi gli SNP, l'allele meno comune aveva un effetto protettivo e additivo, per cui individui omozigoti per questo allele mostravano minore vulnerabilità alla depressione di individui eterozigoti, i quali a loro volta mostravano minore vulnerabilità degli individui omozigoti per l'allele più comune. Questi ultimi riportavano livelli più alti di sintomatologia depressiva misurati con BDI (Beck Depression Inventory) (Fig. 8 A e B). Questi risultati sono stati confermati da uno studio di Tyrka et al. (2009), in cui, attraverso il test del desametasone con iniezione di CRH, hanno mostrato che individui portatori dell'allele più comune di rs110402 e vittime di abusi nell'infanzia manifestano livelli di cortisolo più elevati a seguito dell'iniezione di CRH (Fig. 9). Questo studio rivela quindi che il ruolo degli SNP di CRHR1 è di modulazione della risposta allo stress, e che quindi la vulnerabilità a disturbi depressivi è data dal malfunzionamento della risposta allo stress.



**Figura 8:** interazione tra il grado di abusi nell'infanzia e gli SNP rs7209436 (A) e rs110402 (B). L'allele più comune è indicato rispettivamente con C e G, mentre quello meno comune, con effetto protettivo, è indicato rispettivamente con T e A.

(Immagini riadattate da Bradley et al., 2008)



*Figura 9: livelli di cortisolo nel plasma misurati a seguito del test di somministrazione orale di desametasone e successiva iniezione di CRH, in individui omozigoti per l'allele più comune di rs110402 (GG), eterozigoti (AG) e omozigoti per l'allele meno comune (AA). È evidenziato l'orario della somministrazione di CRH. (Immagine riadattata da Tyrka et al., 2009)*

Può comunque capitare che mutazioni in un gene vengano compensate da altri geni, quindi oltre ad un'interazione gene-ambiente, possiamo osservare un'interazione gene-gene-ambiente. Questa interazione è stata indagata con i geni CRHR1 e 5-HTTLPR da Ressler et al. (2009) in individui con storia di abusi nell'infanzia. 5-HTTLPR è un polimorfismo del gene SLC6A4 che codifica per il trasportatore della serotonina, un suo possibile ruolo nello sviluppo di depressione maggiore era già stato indagato in precedenza (Caspi et al., 2003) (Tab. 2). In questo studio, oltre ad essere riconfermato il ruolo protettivo degli SNP di CRHR1 osservato nei due studi descritti sopra, è stata osservata un'interazione tra questi SNP e 5-HTTLPR. In particolare, gli SNP di CRHR1 svolgono il loro ruolo protettivo solo in assenza dell'allele corto (S) di 5-HTTLPR nel genoma, mentre quest'ultimo interagisce con l'esperienza di abusi nell'infanzia, aggravando i sintomi depressivi, solo quando nel genoma non è presente uno degli SNP di CRHR1 con ruolo protettivo. In altre parole, la vulnerabilità a sintomatologia depressiva è data dalla combinazione di allele corto di 5-HTTLPR, assenza di SNP protettivi di CRHR1 e presenza di abusi nell'infanzia.

Per quanto riguarda l'ereditabilità del PTSD, questa è molto più difficile da indagare, in quanto si tratta di un disturbo che per definizione richiede un intervento ambientale per manifestarsi. Tuttavia, è possibile identificare un ruolo genetico nel determinare la vulnerabilità a tale disturbo, anche qui si tratta di un contributo nello sviluppo della risposta allo stress che produce un effetto negativo. Il gene FKBP5 produce una proteina

che regola la sensibilità dei recettori per i glucocorticoidi, una sovraespressione di questo gene comporta una maggiore resistenza ai glucocorticoidi con conseguente risposta prolungata allo stress. In letteratura sono stati identificati 4 SNP di questo gene che hanno tale effetto e che sono stati associati con sintomatologia depressiva e PTSD (Tab. 2). Binder et al., (2008) hanno trovato un'interazione tra questi SNP e la presenza di abusi nell'infanzia in individui con PTSD. Da sole queste varianti di FKBP5 non comportano PTSD, anche perché per quello è necessaria la presenza di un trauma, ma quando nella storia dell'individuo sono presenti abusi nell'infanzia esse hanno un effetto positivo nell'aggravare la sintomatologia del PTSD quando questa patologia insorge a seguito di un trauma.

Gene	Posizione nel cromosoma	Prodotto del gene	Mutazioni	Effetto delle mutazioni
<b>CRHR1</b>	17q21.31	Recettore per i glucocorticoidi di tipo 1	rs7209436 rs110402	L'allele più comune determina vulnerabilità a disturbo depressivo maggiore
<b>SLC6A4</b>	17q11.2	Trasportatore della serotonina (SERT)	5-HTTLPR	L'allele corto determina vulnerabilità a sintomi depressivi
<b>FKBP5</b>	6p21.31	Proteina FKBP5	rs9296158 rs3800373 rs1360780 rs9470080	Aumentano la gravità della sintomatologia di PTSD

*Tab. 2: i geni e le relative mutazioni che possono determinare vulnerabilità ai disturbi legati allo stress.*

## Conclusioni

Dalle evidenze raccolte in questa tesi emerge che il parenting ha un impatto profondo sulla prole e influenza la sua capacità di rispondere alle avversità per tutta la vita, mediando le componenti biologiche e genetiche della risposta allo stress. Dalla qualità delle cure genitoriali dipende la capacità adattiva della prole e, in parte, la sua vulnerabilità a disturbi legati allo stress. Come dimostrano gli studi sui ratti, gli effetti delle cure genitoriali agiscono a livello epigenetico, regolando la metilazione di geni coinvolti nella risposta allo stress. La dinamicità dei processi di metilazione può aprire la strada a nuovi tipi di interventi per i disturbi legati allo stress, ma soprattutto, la comprensione dettagliata di questi meccanismi, il cui funzionamento va ancora approfondito nell'uomo, permette la costruzione di programmi di prevenzione adeguati. La risposta allo stress in età adulta può, se adattiva, rappresentare uno strumento protettivo verso l'insorgenza di depressione maggiore e PTSD, altrimenti costituisce un fattore predisponente a tali disturbi. Insieme alla qualità della risposta allo stress, esistono dei fattori genetici che possono contribuire all'insorgenza di disturbi legati allo stress, ma il loro effetto è strettamente legato alle esperienze offerte dell'ambiente. Per cui una predisposizione genetica per un certo disturbo si manifesta soprattutto quando l'individuo è costretto a vivere situazioni di avversità nel corso della sua vita. Il ruolo delle esperienze precoci può essere anche in questo caso protettivo o predisponente, in particolare, quando sono presenti abusi nell'infanzia essi concorrono, insieme ad una predisposizione genetica, all'insorgenza di disturbi legati allo stress. È da evidenziare inoltre l'importanza di prendere in considerazione i trascorsi dell'individuo, soprattutto in riferimento all'età infantile, in particolare quando si valuta la gravità del disturbo depressivo maggiore, in quanto la presenza o assenza di abusi nell'infanzia è un fattore che differenzia la modalità di risposta allo stress in pazienti depressi.



## Bibliografia

Anisman, H., Zaharia, M. D., Meaney, M. J., & Merali, Z. (1998). Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors?. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *16*(3-4), 149-164.

Bear, M.F., Connors, B.W., e Paradiso, M.A. (2016). Il controllo chimico del cervello e del comportamento. In Bear, M.F., Connors, B.W., e Paradiso, M.A. (a cura di), *Neuroscienze: Esplorando il Cervello* (pp. 545-574). Milano: Edra.

Binder, E. B., & Nemeroff, C. B. (2010). The CRF system, stress, depression and anxiety—insights from human genetic studies. *Molecular psychiatry*, *15*(6), 574-588.

Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of comparative and physiological psychology*, *81*(2), 281.

Bradley, R. G., Binder, E. B., Epstein, M. P., Tang, Y., Nair, H. P., Liu, W., ... & Ressler, K. J. (2008). Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Archives of general psychiatry*, *65*(2), 190-200.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., ... & Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, *301*(5631), 386-389.

Habib, K. E., Gold, P. W., & Chrousos, G. P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, *30*(3), 695-728.

Heim, C., Mletzko, T., Purselle, D., Musselman, D. L., & Nemeroff, C. B. (2008). The dexamethasone/corticotropin-releasing factor test in men with major depression: role of childhood trauma. *Biological psychiatry*, *63*(4), 398-405.

Hellstrom, I. C., Dhir, S. K., Diorio, J. C., & Meaney, M. J. (2012). Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone–

serotonin–NGFI-A signalling cascade. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1601), 2495-2510.

Kemble, E. D., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., & Takushi, R. (1984). Taming in wild rats following medial amygdaloid lesions. *Physiology & behavior*, 32(1), 131-134.

Ladd, C. O., Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., & Plotsky, P. M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological psychiatry*, 55(4), 367-375.

Ladd, C. O., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1996). Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology*, 137(4), 1212-1218.

Lazarus, R. S., & Folkman, S. (1984). *Stress, appraisal, and coping*. Springer publishing company.

Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M., & Monteggia, L. M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *European Journal of Neuroscience*, 25(10), 3091-3098.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., ... & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332), 1659-1662.

McEwen, B. S. (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *New England journal of medicine*, 338(3), 171-179.

McGowan, P. O., Sasaki, A., D'alessio, A. C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., ... & Meaney, M. J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*, 12(3), 342-348.

McGowan, P. O., Suderman, M., Sasaki, A., Huang, T. C., Hallett, M., Meaney, M. J., & Szyf, M. (2011). Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PloS one*, 6(2), e14739.

Melas, P. A., Wei, Y., Wong, C. C., Sjöholm, L. K., Åberg, E., Mill, J., ... & Lavebratt, C. (2013). Genetic and epigenetic associations of MAOA and NR3C1 with depression and childhood adversities. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(7), 1513-1528.

Michael J. Meaney & Moshe Szyf (2005) Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome, *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *7*:2, 103-123, DOI:

Morris, M. C., Compas, B. E., & Garber, J. (2012). Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: a systematic review and meta-analysis. *Clinical psychology review*, *32*(4), 301-315.

Nemeroff, C. B., Widerlöv, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., ... & Vale, W. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*, *226*(4680), 1342-1344.

Perroud, N., Paoloni-Giacobino, A., Prada, P., Olié, E., Salzmann, A., Nicastro, R., ... & Malafosse, A. (2011). Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Translational psychiatry*, *1*(12), e59-e59.

Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular brain research*, *18*(3), 195-200.

Ressler, K. J., Bradley, B., Mercer, K. B., Deveau, T. C., Smith, A. K., Gillespie, C. F., ... & Binder, E. B. (2010). Polymorphisms in CRHR1 and the serotonin transporter loci: gene× gene× environment interactions on depressive symptoms. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *153*(3), 812-824.

Seddon, J. A., Rodriguez, V. J., Provencher, Y., Raftery-Helmer, J., Hersh, J., Labelle, P. R., & Thomassin, K. (2020). Meta-analysis of the effectiveness of the Trier Social Stress Test in eliciting physiological stress responses in children and adolescents. *Psychoneuroendocrinology*, *116*, 104582.

Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138(3479), 32-32.

Szyf, M., Weaver, I., & Meaney, M. (2007). Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior. *Reproductive toxicology*, 24(1), 9-19.

Tyrka, A. R., Price, L. H., Gelernter, J., Schepker, C., Anderson, G. M., & Carpenter, L. L. (2009). Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biological psychiatry*, 66(7), 681-685.

van Oers, H. J., de Kloet, E. R., Li, C., & Levine, S. (1998). The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. *Endocrinology*, 139(6), 2838-2846.

Weaver, I. C. (2007). Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention Nature versus nurture: let's call the whole thing off. *Epigenetics*, 2(1), 22-28.

Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., ... & Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, 7(8), 847-854.

Yehuda, R., Halligan, S. L., Golier, J. A., Grossman, R., & Bierer, L. M. (2004). Effects of trauma exposure on the cortisol response to dexamethasone administration in PTSD and major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 29(3), 389-404.

Zannas, A. S., & West, A. E. (2014). Epigenetics and the regulation of stress vulnerability and resilience. *Neuroscience*, 264, 157-170.