Thaís Virgínia Moura Machado Costa

Construção do perfil de metilação de indivíduos portadores do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) utilizando as técnicas de *array* e MLPA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Patologia
Orientadora: Profª. Drª. Leslie Domenici Kulikowski

São Paulo
2019

Thaís Virgínia Moura Machado Costa

Construção do perfil de metilação de indivíduos portadores do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) utilizando as técnicas de *array* e MLPA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Patologia
Orientadora: Profª. Drª. Leslie Domenici Kulikowski

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Thaís Virgínia Moura Machado
Construção do perfil de metilação de indivíduos portadores do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) utilizando as técnicas de array e MLPA / Thaís Virgínia Moura Machado Costa. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1.Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade 2.Metilação de DNA 3.Epigenômica 4.Expressão gênica 5.Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos 6.Polimorfismo de nucleotídeo único

USP/FM/DBD-384/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico ao meu amado avô, José Matos Machado,

que, finalmente, terá uma “neta doutora”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela força para seguir em frente e concluir este trabalho mesmo com tantas dificuldades.

À minha mãe, pelo amor, dedicação, ensinamentos, orações e pelo exemplo de caráter que é para mim.

Ao meu amado avô, José Machado, sempre tão carinhoso e orgulhoso pelas minhas conquistas. E à minha vó, Nelzimar Moura, pelo seu exemplo de coragem e pela ajuda em muitos momentos durante essa jornada.

Ao meu "primo-amigo", Márcio Arthur, pela amizade, pela empatia, pelo exemplo que é para mim, por me ensinar tanto e, principalmente, pelo seu incentivo constante. E como se não fosse o bastante, agradeço também pela ajuda na ortografia.

À minhas tias, por todo o suporte, orações e carinho durante toda a minha vida. E, especialmente à minha tia Márcia, sempre disposta a ajudar a todos.

À amiga de todas as horas, Fabrícia Madia, pela imensurável ajuda em tudo! E tudo é TUDO mesmo! Sua escuta e seu cuidado foram e são um alento para a alma diante de tantas adversidades. Sua ajuda prática na etapa laboratorial, nas análises dos dados e na confecção da tese foram fundamentais para a realização deste trabalho. Faltam palavras para agradecê-la por sua Amizade e por tudo o que já fez e faz por mim... Um verdadeiro anjo na minha vida!

À minha tão querida orientadora, Drª. Leslie Domenici Kulikowski, (ou simplesmente, "Lé"), por ter confiado em mim desde o início. Pela sua alegria e otimismo contagiantes. Pela sua disposição em ouvir. Pelos conselhos. Pelo incentivo constante. Por, em vários momentos, acreditar em mim mais do que eu mesma. E, especialmente, pela paciência comigo na etapa final. Muito obrigada!

À minha amiga Cintia Milani, por todo o cuidado, carinho e apoio. Por dividir comigo, tão intensamente, muitos momentos – dos melhores aos mais difíceis dessa caminhada. Por fazer parte da minha vida e por fazê-la melhor.

Às amigas Mari Rocha e Lilian Damasceno, pela amizade, pelo apoio, pela compreensão e, claro, pelos cafés! Com vocês a vida em São Paulo era mais doce e alegre.

À amiga Gabriela Pintar, que tanto já havia feito por mim no mestrado e na vida, que ainda me deu uma luz no início deste trabalho e uma enorme ajuda na reta final.

Aos queridos Fábio Marchi e Jullian Damasceno, por toda a ajuda, não somente com as análises bioinformáticas, mas por toda paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas – que não foram poucas!

Às queridas e aos queridos citogenômicos: Roberta, Évelin, Samar, Amanda, Marília, Yanca, Gil, Amom e Alexandre. A ajuda de vocês tornou o trabalho melhor e os dias no laboratório mais divertidos. Vocês são tops!

Ao Dr. Mauro Muszkat, à Drª. Viviane Schuch e ao Núcleo de Atendimento Neuropsicológico Infantil Interdisciplinar (NANI), pela colaboração e por tornarem este trabalho possível.

Ao Dr. Chin Jia Lin, pela disposição em ajudar sempre, desde o meu mestrado.

Ao Departamento de Patologia da FMUSP pela oportunidade e suporte. E, especialmente ao Thiago Rezende pela ajuda e atenção durante esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto (2014/02565-8), pela bolsa de estudos a mim concedida (2015/05350-5) e pelas incríveis oportunidades que a mim foram proporcionadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos nos dois anos iniciais.

Por fim, agradeço a todos os que contribuíram, de alguma maneira, para a realização deste trabalho.

"*E até lá, vamos viver. Temos muito ainda por fazer. Não olhe pra trás. Apenas começamos. O mundo começa agora. Apenas começamos*".

Renato Russo

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Sumário

RESUMO
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 02
2. OBJETIVOS 07
2.1. Geral 07
2.2. Específicos 07
3. MÉTODOS 08
3.1. Casuística 08
3.2. Seleção amostral 10
3.3. Extração e quantificação de DNA genômico 11
3.4. *Arrays* de metilação 12
3.5. Análises dos *arrays* de metilação 13
3.6. *Arrays* de SNPs 16
3.7. MLPAs 16
3.8. Marcadores de microssatélites 17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 18
4.1. *Arrays* de metilação 18
4.1.1. TDAH x Controle (independentemente do sexo) 19
4.1.2. Meninos x Meninas (independentemente do transtorno) 24
4.1.3. Análises dos *arrays* de metilação dos gêmeos 29
4.2. *Arrays* de SNPs 34
4.3. MLPAs 36
5. CONCLUSÕES 37
6. ANEXO 38
7. REFERÊNCIAS 41

RESUMO

Costa TVMM. *Construção do perfil de metilação de indivíduos portadores do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) utilizando as técnicas de array e MLPA* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma síndrome comportamental comum que se inicia na infância e afeta aproximadamente 5,3% de crianças em todo o mundo. Devido à sua complexidade etiológica, até o momento não foram encontrados marcadores biológicos consistentes para o TDAH. Entretanto, a alta herdabilidade que o transtorno apresenta indica uma forte influência de fatores genéticos. Estudos recentes têm apontado para o envolvimento de processos epigenéticos na etiologia do TDAH. Um dos principais mecanismos epigenéticos é a metilação do DNA, que geralmente está relacionada ao silenciamento transcricional de genes em ilhas CpGs, as quais podem estar associadas aos promotores gênicos, aos corpos dos genes e às regiões 5' e 3' UTRs (*untranslated regions*). Desta forma, investigamos se as alterações genéticas do TDAH podem estar relacionadas à metilação do DNA através da construção de perfis de metilação de DNA do sangue periférico. Neste trabalho, recrutamos indivíduos (n=29) entre 06 e 14 anos de idade com diagnóstico clínico de TDAH para participar do estudo. O recrutamento foi realizado no Núcleo de Atendimento Neuropsicológico Infantil Interdisciplinar (NANI), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Crianças de 06 a 11 anos (n=11) com diagnóstico clínico negativo para o TDAH também foram selecionados para o estudo como controles. Amostras de sangue periférico de indivíduos com e sem TDAH foram coletadas para a extração de DNA linfocitário e posterior realização das técnicas de *array* de metilação, *array* de SNPs e MLPA de metilação. Os dados obtidos dos *arrays* de metilação foram tratados e analisados utilizando-se pacotes específicos no *R*. Os *arrays* de SNPs foram analisados no *BlueFuse*. Já os dados dos MLPAs de metilação foram analisados no *GeneMarker*. Dentre os resultados, podemos destacar a via "***Dopaminergic synapse***" como um achado importante obtido pelo enriquecimento realizado com base nas análises comparativas dos *arrays* de metilação entre os grupos TDAH e Controle. Tal achado corrobora com outros estudos cujas evidências indicam forte associação genética entre vias dopaminérgicas e o TDAH. Desta maneira, torna-se fundamental a realização de novos estudos epigenéticos para nos permitir uma melhor compreensão do papel da metilação do DNA na etiologia do TDAH.

Descritores: Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade; Metilação de DNA; Epigenômica; Expressão gênica; Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos; Polimorfismo de nucleotídeo único.

ABSTRACT

Costa TVMM. *DNA methylation profile of individuals with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) performed by array and MLPA techniques* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common childhood behavioral syndrome that affects approximately 5.3% of children worldwide. Due to its etiological complexity, no consistent biological markers for ADHD have been found so far. However, its high heritability indicates a strong influence of genetic factors. Recent studies have pointed to the involvement of epigenetic processes in ADHD etiology. DNA methylation is one of the major epigenetic mechanisms and is generally related to transcriptional silencing of genes in CpGs islands, which may be associated with gene promoters, gene bodies and untranslated regions (5' and 3' UTRs). Thus, we investigated whether ADHD genetic alterations may be related to DNA methylation by performing peripheral blood DNA methylation profiles. In this study, we recruited individuals (n = 29) between 06 and 14 years old with clinical diagnosis of ADHD to participate in the study. The recruitment was performed at "Núcleo de Atendimento Neuropsicológico Infantil Interdisciplinar" (NANI), "Universidade Federal de São Paulo" (UNIFESP). Children (n = 11) aged 6 to 11 years with negative clinical diagnosis for ADHD were selected for the study as controls. Peripheral blood samples from individuals with and without ADHD were collected for lymphocyte DNA extraction and subsequent realization of methylation array, SNP array and methylation MLPA techniques. Methylation arrays data were processed and analyzed using specific R packages. SNP arrays were analyzed using BlueFuse. MLPAs methylation data were analyzed in GeneMarker. Regarding the results, we can highlight "Dopaminergic synapse" pathway as an important finding obtained by the enrichment based on comparative analysis of methylation arrays between ADHD and Control groups. Such a finding corroborates other studies whose evidence indicates a strong genetic association between the dopaminergic pathways and ADHD. Thus, further epigenetic studies are essential to better understand the role of DNA methylation in ADHD etiology.

Descriptors: Attention deficit disorder with hyperactivity; DNA methylation; Epigenomics; Gene expression; Oligonucleotide array sequence analysis; Polymorphism, single nucleotide.

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é classificado pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition*) como um transtorno do neurodesenvolvimento que se inicia na infância. É caracterizado por um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade de modo a interferir no funcionamento e no desenvolvimento, prejudicando, assim, o desempenho social, acadêmico e/ou ocupacional do indivíduo (American Psychiatric Association - APA, 2014; Asherson et al., 2016; Thapar e Cooper, 2016).

De acordo com uma metanálise que incluiu 41 estudos realizados em 27 países de todas as regiões do mundo, a prevalência estimada do TDAH em crianças na população geral é de 3,4% (95% IC = 2,6-4,5%). Na maioria dos casos (50-80%) o transtorno persiste durante a adolescência e na vida adulta. A prevalência mundial estimada em adultos, também obtida a partir de estudo um metanalítico, é de 2,5% (95% IC = 2,1-3,1%) (Fayyad et al., 2007; Simon et al., 2009; Polanczyk et al., 2015; Asherson et al., 2016; Thapar e Cooper, 2016).

Estudos populacionais comparativos mostram que a prevalência do TDAH não varia significativamente de acordo com a localização geográfica, mas é influenciada pela heterogeneidade dos métodos de avaliação e das convenções diagnósticas (Polanczyk et al., 2015; Thapar e Cooper, 2016).

O diagnóstico do TDAH é fundamentalmente clínico. E o transtorno é mais frequentemente diagnosticado em meninos do que em meninas, com uma razão aproximada de 3-4:1, respectivamente. Essa diferença pode ser atribuída a vieses relacionados ao diagnóstico em meninas, cujo número de casos pode estar sendo subestimado; ou pode estar, de fato, refletindo a predominância de meninos apresentando o TDAH, assim como ocorre em outros transtornos do neurodesenvolvimento (Biederman et al., 2005; Atkinson e Hollis, 2010; Thapar et al., 2016).

Indivíduos com TDAH apresentam uma acentuada variação em seus perfis sintomáticos, em suas dificuldades, em seus fatores complicadores, em suas limitações neuropsicológicas, dentre outros. Desta forma, a “tipificação” dessa heterogeneidade clínica continua sendo alvo de muitas pesquisas com o objetivo de aprimorar as abordagens diagnósticas existentes e de fornecer tratamentos. Assim, no intuito de

atender a esse objetivo, a 5ª edição do DSM reconhece três apresentações clínicas: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo e combinado. Estas apresentações não são mais consideradas "subtipos", como em versões anteriores, pois elas podem apresentar flutuações ao longo do tempo (Nigg et al., 2010; American Psychiatric Association, 2014; Faraone et al., 2015)

Exames de imagem por ressonância magnética (IRM) têm mostrado que os mecanismos envolvidos na desregulação das vias que controlam a atenção, a resposta à recompensa, o controle inibitório e o comportamento motor estão relacionados ao comprometimento do funcionamento, principalmente, do córtex pré-frontal. As IRMs mostram ainda que o TDAH está associado à hiperativação de sistemas somatomotores e visuais, o que possivelmente parece compensar o comprometimento do funcionamento do córtex pré-frontal (Cortese et al., 2012; Faraone et al., 2015).

A etiologia do TDAH, assim como de outros transtornos psiquiátricos, é multifatorial. Não há dúvida de que o TDAH é causado por inúmeros fatores neurobiológicos e ambientais que interagem entre si de maneira altamente complexa. Influências genéticas, pré-natais e, posteriormente, ambientais parecem aumentar a suscetibilidade ao transtorno. (Thapar et al., 2007; Steinhausen, 2009; Hawi et al., 2015; Schuch et al., 2015).

Nos últimas décadas, inúmeros estudos moleculares têm sido realizados com o objetivo de explorar a suscetibilidade genética do TDAH. Em busca de marcadores genéticos para o transtorno foram realizados estudos de ligação, de associação de genes candidatos, de associação genômica ampla (GWAS – do inglês, *Genome-wide Association Studies*), de CNVs (do inglês, *Copy Number Variations*), de sequenciamento de exoma, dentre outros. Desta forma, inúmeras regiões e centenas de genes candidatos foram propostos como fatores genéticos associados ao TDAH. E, consequentemente, dezenas de genes têm sido identificados como candidatos a marcadores genéticos em pesquisas futuras. Contudo, até o presente momento, não foi identificado nenhum fator de risco genético que seja indiscutivelmente necessário ou suficiente para causar o transtorno (Zhou et al., 2008; Gizer et al., 2009; Neale et al., 2010; Williams et al., 2010; Lyon et al., 2011; Li et al., 2014; Schuch et al., 2015).

A despeito da escassez de achados realmente significativos envolvendo genes na etiologia do TDAH, sabe-se que fatores genéticos influenciam enormemente o desenvolvimento do transtorno. Isso foi observado em estudos com famílias envolvendo

adoções de crianças e gêmeos, cujos resultados apontam uma alta herdabilidade (de aproximadamente 76%) para o TDAH (Faraone et al., 2005; Thapar et al., 2007; Franke et al., 2009; Sharp et al., 2009; Hawi et al., 2015; Schuch et al., 2015).

Tendo em vista a alta complexidade/heterogeneidade etiológica do TDAH e a baixa consistência dos achados em estudos genéticos até o presente momento, considera-se que a arquitetura genética do transtorno permanece obscura. Desta forma, já foi sugerido que mecanismos epigenéticos podem estar relacionados à etiologia do TDAH (Thapar et al., 2007; Franke et al., 2009; Schuch et al., 2015; Zayats et al., 2015; Xu et al., 2015).

Notavelmente, os mecanismos epigenéticos constituem processos intracelulares dinâmicos que traduzem os estímulos ambientais em modificações na expressão gênica. Tais mecanismos são críticos para processos celulares básicos como a plasticidade sináptica na aprendizagem e na consolidação da memória (Graff e Mansuy, 2008; Graff e Mansuy, 2009).

A palavra "epigenética" deriva do prefixo grego "*epi*" e, literalmente, significa "acima ou além da genética". No âmbito molecular, mecanismos epigenéticos são modificações bioquímicas do DNA e das proteínas histonas – os principais constituintes da cromatina. Mecanismos adicionais envolvendo RNA de interferência e proteínas priônicas também contribuem para a regulação epigenética (Graff e Mansuy, 2008).

De modo mais geral, o termo epigenética refere-se a qualquer modificação potencialmente hereditária que altera a expressão do gene sem alterar diretamente a sequência de nucleotídeos do DNA. Inclui alterações transitórias e modificáveis dentro de uma célula, bem como mecanismos estáveis responsáveis pela identidade fenotípica de um tipo celular (Levenson e Sweatt, 2005; Guan et al., 2009; He e Todd, 2011; Marques et al., 2011; Nelson e Monteggia, 2011).

As modificações da cromatina são inúmeras e complexas. Compreendem a metilação do DNA em dinucleotídeos citosina-guanina e as modificações pós-traducionais de histonas, que incluem acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação. Em virtude de suas propriedades químicas, estas modificações influenciam a condensação da cromatina, e, assim, modulam a acessibilidade do DNA à maquinaria transcricional (Levenson e Sweatt, 2005; Graff e Mansuy, 2008).

A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil ao carbono 5 (cinco) do anel de pirimidina do nucleotídeo citosina. A transferência de grupos metil é catalisada por uma classe de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs). Estas realizam a transferência de grupos metil através de ligação covalente, o que confere à metilação a condição de marca epigenética mais estável (Levenson e Sweatt, 2005; Graff e Mansuy, 2008).

As DNMTs podem produzir pelo menos 3 (três) *status* diferentes para cada CpG em questão: metilação completa, quando ambas as fitas de DNA são metiladas; hemimetilação, quanto há metilação em apenas um dos filamentos do DNA; e sem metilação, quando ambas as fitas do DNA estão demetiladas. Portanto, o potencial de complexidade combinatória de um código de metilação do DNA é imensurável (Day e Sweatt, 2011).

Metilações do DNA ocorrem ao longo de todo o genoma, inclusive em genes, mas parecem ser funcionalmente mais relevantes quando presentes em sequências ricas em dinucleotídeos CpGs (sequências de citosina-guanina), as denominadas ‘ilhas CpGs’, que são frequentemente encontradas em regiões promotoras de genes ativos. Portanto, a metilação do DNA tem um importante papel na regulação da transcrição gênica (Graff e Mansuy, 2008; Day e Sweatt, 2011).

Em 2010, Wong e colaboradores realizaram um estudo longitudinal com o objetivo de quantificar a metilação do DNA em regiões promotoras de três genes: o gene do receptor de dopamina 4 (*DRD4*), o gene do transportador de serotonina (*SLC6A4/SERT*) e o gene da monoamina oxidase A (*MAOA*). Eles analisaram amostras de DNA de 46 pares de gêmeos monozigóticos (MZ) e 45 pares de gêmeos dizigóticos (DZ), totalizando 182 crianças com idades entre 5 e 10 anos. Os dados sugerem que as diferenças de metilação do DNA já são aparentes na primeira infância, até mesmo entre indivíduos geneticamente idênticos; e que diferenças individuais na metilação não são estáveis ao longo do tempo. Tal estudo sugeriu ainda que as influências ambientais são fatores importantes e que são responsáveis pelas diferenças interindividuais de metilação do DNA em todo o genoma (Archer et al., 2011).

Um estudo mais recente examinou associações entre marcadores epigenéticos e o TDAH em crianças chinesas com o objetivo de estabelecer um modelo de predição para o transtorno a partir da perspectiva epigenética. Este trabalho determinou os níveis de expressão dos genes *DAT1*, *DRD4* e *DRD5*; e a metilação de

seus promotores. Além disso, identificou os perfis de expressão de alguns genes modificadores de histonas: *p300*, *MYST4*, *HDAC1* e *MeCP2*. Todos os sete genes testados no estudo foram identificados como fatores de risco para o TDAH (Xu et al., 2015).

Deste modo, considerando o fato de não haver marcadores biológicos consistentes para o TDAH e, ainda, que há a possibilidade de que as alterações genéticas relacionadas ao transtorno não estejam limitadas apenas à sequência do DNA; propusemos investigar neste trabalho se existem alterações que podem estar relacionadas à ativação ou inativação de genes por processos extrínsecos a eles, como a metilação do DNA.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Construir o perfil de metilação de DNA de indivíduos com o Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH).

2.2. Específicos

→ Identificar o *status* de metilação de milhares de regiões genômicas de indivíduos com e sem TDAH através da técnica de *BeadArray* (*Illumina technology*) de metilação a partir de DNA genômico de sangue periférico;

→ Investigar a presença ou não de inserções e/ou deleções em regiões genômicas dos indivíduos com TDAH por meio da técnica de *BeadArray* (*Illumina technology*) de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) utilizando DNA extraído de sangue periférico;

→ Determinar o *status* de metilação de algumas regiões genômicas de indivíduos com e sem TDAH utilizando-se a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*) de metilação (*MRC-Holland*) a partir de DNA genômico de sangue periférico.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Para este estudo foram coletadas amostras de sangue periférico de 29 indivíduos (22 meninos e 07 meninas) com TDAH. Suas idades, no momento da coleta, variaram entre 06 e 14 anos. A média das idades foi de 10,14 anos, com desvio padrão de 1,83. Todos os 29 indivíduos foram clinicamente diagnosticados com TDAH e classificados (segundo o modo de apresentação clínica predominante na avaliação neuropsicológica) em hiperativo/impulsivo, desatento ou combinado (Tabela 1). Quando possível, amostras de sangue de mães e pais biológicos também foram coletadas.

Durante a execução do estudo, foi sugerida a inclusão de amostras de indivíduos sem TDAH (controles). E, desde então, recrutamos e coletamos amostras de sangue periférico de 11 de crianças sem o transtorno (Tabela 2). As idades dos indivíduos controles, no momento da coleta do sague, variaram entre 06 e 11 anos. A média das idades dos controles foi de 9,27 anos e desvio padrão de 1,74.

Foram coletadas ainda amostras de sangue periférico de 02 indivíduos, os quais são irmãos gêmeos (supostamente monozigóticos), de 02 crianças com TDAH deste estudo. Essas amostras foram analisadas separadamente, quanto aos seus perfis de metilação e foram parte de um estudo particular englobando os casos específicos de TDAH em gêmeos. Todas as amostras do estudo foram coletadas em um período de aproximadamente 03 anos (entre outubro de 2013 e agosto de 2016).

Os responsáveis foram informados sobre a realização da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo), aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP (CAPPESQ: 294.309/2013).

Tabela 1 – Lista dos 29 indivíduos com TDAH e suas respectivas apresentações clínicas predominantes:

Identificação	Sexo	Idade	Apresentação Clínica
TDAH-01	Masculino	08	Combinado
TDAH-02	Masculino	10	Combinado
TDAH-03	Masculino	07	Hiperativo/Impulsivo

TDAH-04	Masculino	08	Combinado
TDAH-05	Masculino	14	Combinado
TDAH-06	Masculino	10	Desatento
TDAH-07	Masculino	12	Hiperativo/Impulsivo
TDAH-08	Feminino	13	Desatento
TDAH-09	Masculino	12	Desatento
TDAH-10	Masculino	08	Hiperativo/Impulsivo
TDAH-11	Feminino	06	Combinado
TDAH-12	Feminino	10	Desatento
TDAH-13	Feminino	10	Desatento
TDAH-14	Masculino	10	Combinado
TDAH-15	Masculino	11	Combinado
TDAH-16	Feminino	09	Desatento
TDAH-17	Masculino	11	Combinado
TDAH-18	Masculino	12	Combinado
TDAH-19	Masculino	10	Combinado
TDAH-20	Masculino	10	Desatento
TDAH-21	Feminino	08	Combinado
TDAH-22	Masculino	10	Desatento
TDAH-23	Feminino	12	Combinado
TDAH-24	Masculino	09	Combinado
TDAH-25	Masculino	13	Desatento
TDAH-26	Masculino	11	Combinado
TDAH-27	Masculino	11	Desatento
TDAH-28	Masculino	11	Combinado
TDAH-29	Masculino	10	Desatento

Tabela 2 – Lista dos 11 indivíduos sem TDAH que participaram do estudo como controles:

Identificação	**Sexo**	**Idade**
C-01	Masculino	10
C-02	Masculino	10
C-03	Masculino	09
C-04	Feminino	11
C-05	Feminino	07
C-06	Masculino	08
C-07	Feminino	09
C-08	Masculino	10

C-09	Masculino	12
C-10	Masculino	06
C-11	Feminino	10

3.2. Seleção amostral

As triagens e avaliações dos indivíduos com e sem TDAH foram realizadas por uma equipe multiprofissional formada por médicos, neuropsicólogos e outros profissionais para fins de diagnóstico. Além disso, foram realizadas anamneses com os familiares dos pacientes para coletar informações como: dados pessoais, história clínica evolutiva e história familiar.

Os indivíduos foram recrutados no Núcleo de Atendimento Neuropsicológico Infantil Interdisciplinar (NANI) do Centro Paulista de Neuropsicologia (CPN) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), através de protocolo específico composto por avaliação multidisciplinar, que incluiu avaliação psiquiátrica e neuropsicológica (Rizzutti et al., 2008). Portanto, seguem os aspectos avaliados e os instrumentos utilizados em cada avaliação:

• Nível intelectual: QI estimado com o uso da *Escala Wechsler de Inteligência para crianças* (WISC-III);

• Avaliação da atenção: CCPT - *Conners' Continuous Performance Test* (Miranda et al., 2008); Cancelamento de Símbolos e Atenção Auditiva, avaliada através da bateria NEPSY II (Argollo, 2010);

• Memória operacional: avaliada através da bateria AWMA reduzida e composta pelos subtestes: *Digit Recall*, *Listening Recall*, *Block Recall*, *Spatial Recall*, *Couting Span* (Alloway, 2007), Blocos de Corsi (recordação direta e inversa) e Lista de Palavras - Interferência: bateria NEPSY II (Argollo, 2010);

• Memória episódica e função vísuo-construtiva: Cópia e recordação da Figura Complexa de Rey;

• Funções Executivas: Fluência em Desenhos, Inibindo Respostas: bateria NEPSY II (Argollo, 2010);

• *Behavior Rating Inventory of Executive Functions* (BRIEF): questionário respondido pelos pais ou professores acerca da frequência de determinados comportamentos associados à função executiva: regulação do comportamento, metacognição e função executiva global (Carim et al., 2012);

• Percepção Social - Teoria da Mente (tarefa contextual): avaliada através da bateria NEPSY II (Argollo, 2010);

• Comportamento: CBCL - *Child Behaviour Checklist*: detecção de possíveis comorbidades psiquiátricas, considerando o ponto de corte acima de 70 na classificação do transtorno segundo o DSM-IV-TR (Texto Revisado);

• Escala EACI-P - respondida pelo professor, avalia cinco áreas principais do comportamento infantil: presença de Hiperatividade/Problemas de Conduta (EACP-I), Funcionamento Independente (EACIP-II), Desatenção (EACIP-III), Neuroticismo/Ansiedade (EACIP-IV) e Socialização (EACIP-V) (Brito, 2006);

• Avaliação neurológica e avaliação psiquiátrica: avaliação clínica, critérios diagnósticos do DSM-IV-TR aplicados através de questionário respondido pelos pais/responsáveis.

Os critérios do DSM-IV-TR foram utilizados para a classificação das crianças quanto à apresentação clínica predominante em cada um dos casos de TDAH: desatento, hiperativo/impulsivo e combinado.

3.3. Extração e quantificação de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico foram utilizados cerca de 5 mL de sangue periférico de cada paciente (coletados em tubos com o anticoagulante EDTA). Em seguida, o material genético foi extraído das células brancas do sangue pelo método "*Salting Out*" modificado (Miller et al., 1988).

Todas as amostras de sangue coletadas tiveram seus DNAs extraídos. Tais amostras incluíram: 29 amostras de indivíduos com TDAH, 11 amostras de indivíduos controles, 01 amostra de cada irmão gêmeo de 02 indivíduos com TDAH e todas as amostras de mães e pais de indivíduos com TDAH que foram coletadas.

Após a extração, todas as amostras de DNA foram armazenadas em *freezer* a -20 ºC. E, antes dos experimentos realizados, as amostras foram quantificadas utilizando-se o fluorômetro *Qubit 2.0* (*Thermo Fisher Scientific*) para verificar se eram elegíveis para serem incluídas nos experimentos.

O critério utilizado na seleção das amostras foi a concentração do DNA ter sido maior ou igual a 50 ng/µL. Todas as amostras foram consideradas aptas a serem incluídas nos experimentos seguintes.

3.4. *Arrays* de metilação

Os *arrays* de metilação foram realizados utilizando-se o *BeadChip HumanMethylation450* (*Illumina technology*), que oferece uma combinação única que engloba aproximadamente 450.000 sítios de metilação para uma triagem epigenética de alta resolução. Esta tecnologia é capaz de determinar o *status* de metilação (metilado, hemimetilado e não metilado) de cada um dos milhares de sítios verificados.

No caso específico das amostras de DNA dos gêmeos, foram utilizados 02 (dois) tipos de chips de metilação: o *BeadChip HumanMethylation450* (*Illumina technology*) e o *MethylationEPIC BeadChip*, que é capaz de analisar cerca de 850.000 sítios de metilação, o que garante uma cobertura de altíssima resolução.

À medida que as amostras eram coletadas, as mesmas eram reunidas em números múltiplos de 12 (número de amostras por chip) para a realização dos *arrays* de metilação. Por esse motivo, tais experimentos foram realizados em momentos diferentes no decorrer da execução deste trabalho.

Antes do início de cada experimento de *array* de metilação, todas as amostras foram tratadas com bissulfito de sódio utilizando-se o *EZ DNA Methylation Kit* (*Zymo Research*). Para iniciar o tratamento com bissulfito de sódio, eram necessários 500 ng de DNA. Tal tratamento consiste na conversão das bases citosinas não metiladas do DNA em bases uracilas. Em seguida, iniciava-se, de fato, o *array* de metilação seguindo-se a instruções do fabricante. As etapas dos *arrays* de metilação estão descritas a seguir de modo resumido:

As amostras tratadas com bissulfito eram transferidas para uma placa específica para que o DNA pudesse ser desnaturado e em seguida neutralizado por reagentes específicos fornecidos no kit. Após a neutralização, o DNA era amplificado – etapa em que as amostras permaneciam incubadas a 37 °C por um período de 20 a 24 horas. No dia seguinte, o DNA era fragmentado por ação enzimática e, em seguida, precipitado. O DNA precipitado era, então, ressuspendido e aplicado nos *BeadChips*. Estes, por sua vez, eram incubados a 48 °C por aproximadamente 20 horas para que houvesse a hibridação do DNA nas sondas. A seguir, as moléculas de DNA não hibridadas eram removidas e os nucleotídeos marcados com fluorocromos específicos eram adicionados. Por fim, os *BeadChips* eram escaneados utilizando-se o sistema *iScan* (*Illumina technology*) de acordo com as instruções do fabricante. As intensidades

dos sinais eram quantificadas e armazenadas em um computador específico do equipamento para futura análise dos dados.

Os experimentos de *array* de metilação foram realizados em dois locais. O primeiro foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP (Piracicaba, SP) para o aprendizado prático da técnica. Todos os demais experimentos foram realizados no Laboratório de Citogenômica (Departamento de Patologia da FMUSP) – pertencente ao Programa Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMiUM) do Hospital das Clínicas da FMUSP (São Paulo, SP).

3.5. Análises dos *arrays* de metilação

Os dados brutos obtidos a partir dos *arrays* de metilação das 40 amostras (29 indivíduos com TDAH e 11 indivíduos controles) foram submetidos às seguintes etapas de análises: avaliação de controle de qualidade, normalização, exploração dos dados, filtragens, análises de metilação diferencial e testes de ontologia genética.

Nos experimentos de *array*, todas sondas foram anotadas de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante (*Illumina technology*), usando o "*hg19*" como genoma de referência.

As análises foram realizadas principalmente no ambiente *R*, versão 3.6.0 (*R Core Team*, 2014), utilizando-se os seguintes pacotes contidos na versão 3.9 do *Bioconductor*: *knitr*, *limma*, *minfi*, *IlluminaHumanMethylation450kanno.ilmn12.hg19*, *RColorBrewer*, *missMethyl*, *minfiData*, *IlluminaHumanMethylation450kmanifest*, *Gviz*, *DMRcate* e *stringr*. Tais pacotes desempenharam funções específicas no *pipeline* utilizado neste trabalho. Os principais estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 – Lista dos principais pacotes utilizados nas análises e suas respectivas utilizações:

Pacote	Função	Referência
DMRcate	Empregado na filtragem das sondas de SNPs e sondas com hibridação cruzada (*Bioconductor*).	Peters et al., 2015.
Gviz	Usado na visualização integrada de informações genômicas conhecidas e novos dados experimentais (*Bioconductor*).	Hahne e Ivanek, 2016.
IlluminaHumanMethylation450kmanifest	Utilizado no carregamento de anotação para cada sonda contemplada no *array* de	Hansen e Aryee, 2012.

	metilação de 450k da *Illumina* (*Bioconductor*).	
limma	Utilizado nos testes de metilação diferencial (*Bioconductor*).	Ritchie et al., 2015.
minfi	Usado no pré-processamento de dados e avaliações de controle de qualidade (*Bioconductor*).	Aryee et al., 2014.
minfiData	Contém ferramentas usadas para analisar e visualizar *arrays* de metilação *Illumina Infinium* (*Bioconductor*).	Hansen et al., 2018.
missMethyl	Usado na normalização, no teste de variabilidade diferencial e na metilação diferencial para dados do *array Infinium HumanMethylation450* (*Bioconductor*).	Maksimovic et al., 2012.

Portanto, seguem, de maneira geral, as etapas da análise aplicada aos dados obtidos neste trabalho:

Primeiramente, foi realizada a avaliação de controle de qualidade dos dados. Nesta etapa, os valores de *p* foram calculados para cada CpG em cada amostra. Tais valores indicam a qualidade do sinal. Valores de *p* muito pequenos são indicativos de um sinal confiável, enquanto que valores de *p* grandes (por exemplo, > 0,01), geralmente, indicam um sinal de menor qualidade. Os valores médios de *p* de cada amostra nos permitiu medir a qualidade geral das amostras em relação à confiabilidade geral do sinal.

Em seguida, e com objetivo de minimizar as variações indesejadas dentro e entre as amostras, a normalização foi aplicada aos dados. Esta foi realizada utilizando-se o método *preprocessQuantile* (que é o mais adequado para conjuntos de dados de um único tecido), e é baseada nos valores de beta (β). Os valores de β são considerados medidas dos níveis de metilação de cada sítio e podem variar de zero (0) a um (1). Valores mais próximos de 0 representam sítios não metilados, enquanto que valores mais próximos de 1 indicam sítios totalmente metilados. Já os valores intermediários (como 0,5, por exemplo) apontam sítios hemimetilados.

Logo depois, alguns gráficos multidimensionais (*Multi-dimensional Scaling* - MDS) foram produzidos. Estes gráficos são baseados na análise de componentes principais e constituem um método para observar as semelhanças e diferenças entre as amostras. Os gráficos MDSs são considerados excelentes ferramentas na visualização de dados. E, devido à sua importância, foram utilizados na exploração dos dados.

Na sequência, as seguintes filtragens foram realizadas: das sondas de baixo desempenho; das sondas que falharam em uma ou mais amostras (com base no valor de

p); das sondas dos cromossomos X e Y; e das sondas conhecidas por terem sondas de SNPs no mesmo sítio CpG. Além destas, também foram filtradas as sondas com reação cruzada; ou seja, sondas que demonstraram mapear vários sítios no genoma. A lista de sondas com reação cruzada foi originalmente publicada por Chen e colaboradores (2013).

A etapa seguinte foi focada nas análises de metilação diferencial entre os grupos amostrais, cujo objetivo era descobrir as sondas que se apresentaram diferencialmente metiladas em cada comparação. As comparações realizadas foram as seguintes: TDAH x Controle (independentemente do sexo) e Meninos x Meninas (independentemente do transtorno). Em ambas as comparações os testes foram realizados de acordo com os valores de *p*, os quais foram considerados estatisticamente significantes quando seus valores foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

Finalmente, foram feitos alguns testes de enriquecimento de vias baseados nas listas completas de sondas diferencialmente metiladas obtidas nas análises comparativas realizadas. Tais testes nos auxiliaram na identificação e na checagem de vias enriquecidas com o intuito de verificar possíveis significados biológicos, considerando o papel das metilações na ativação e inativação de genes no contexto do TDAH. Os testes supracitados foram realizados utilizando-se o banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), que inclui informações genômicas e funcionais (KEGG, 2019).

É importante ressaltar que para realizarmos as análises iniciais dos *arrays* de metilação foi necessário construirmos um *pipeline* personalizado (*in house*), que fosse mais adequado aos nossos dados. Essa necessidade surgiu devido ao fato de os *pipelines* existentes para as análises do *BeadChip HumanMethylation450* (*Illumina technology*), até então, não terem se mostrado suficientes para analisar, de forma particular, os dados deste estudo (Morris e Beck, 2014; Morris et al., 2014).

Ressalta-se ainda, que as análises referentes aos 02 (dois) pares de gêmeos foram realizadas de forma independente das demais, seguindo o mesmo *pipeline* utilizado nas análises das demais amostras e aplicando-se as especificidades do *Infinium MethylationEPIC BeadChip* (*Illumina technology*), o chip que foi utilizado para este estudo particular dos gêmeos.

3.6. *Arrays* de SNPs

Os experimentos de *array* de SNPs foram realizados utilizando-se o *Infinium CytoSNP-850K BeadChip*. Esse *BeadChip* é capaz de verificar cerca de 850.000 SNPs distribuídos ao longo de todo o genoma, fornecendo uma verificação global de inserções e deleções do mesmo.

Cada experimento de *array* de SNPs foi realizado com um número amostral múltiplo de 08 (número de amostras por chip) à medida que as amostras dos 29 indivíduos com TDAH foram coletadas e conforme a breve descrição a seguir:

Após a quantificação das amostras, 200 ng de DNA eram transferidos para uma placa específica. O DNA era desnaturado e depois neutralizado por reagentes específicos do kit. Depois de neutralizado, o DNA era amplificado a 37 °C por um período de 20 a 24 horas. Na etapa seguinte, o DNA era fragmentado e precipitado, respectivamente. O DNA precipitado era, então, ressuspendido e aplicado nos *BeadChips*. Estes, por sua vez, eram incubados a 48 °C por um período de 16 a 20 horas para a hibridação do DNA nas sondas. Após a hibridação, os chips eram lavados e preparados para o processo de coloração. Nesta etapa, as moléculas de DNA não hibridadas eram removidas e os nucleotídeos eram marcados com fluorocromos específicos. Finalmente, as amostras eram escaneadas pelo *iScan* (*Illumina technology*) e as intensidades dos sinais eram captadas e armazenadas no computador do equipamento.

Todos os experimentos de *array* de SNPs foram realizados no Laboratório de Citogenômica (Departamento de Patologia da FMUSP), da rede PREMiUM do HC (São Paulo, SP).

As análises dos *arrays* de SNPs foram realizadas utilizando-se o *KaryoStudio Software* (*Illumina technology*). Entretanto, como este foi substituído por um novo *software*, o *BlueFuse Multi Analysis Software* (*Illumina technology*), todos os dados foram reanalisados no *BlueFuse* e confirmados através do banco de dados genéticos *UCSC Genome Browser* (Kent et al., 2002).

3.7. MLPAs

Com o objetivo de realizar verificação adicional do *status* de metilação em cerca de 50 sítios CpGs dos indivíduos com e sem TDAH, a técnica de MLPA de metilação foi realizada utilizando-se o kit comercial ME042 CIMP (*MRC-Holland*).

Para a detecção do *status* de metilação, a técnica de MLPA padrão é combinada com a digestão enzimática das amostras de DNA hibridadas às sondas pela enzima de restrição *HhaI*, que é sensível à metilação. Além de detectar alterações na metilação, as sondas também fornecem informações sobre as alterações do número de cópias das amostras analisadas. É importante destacar que existem algumas sondas de referência presentes no kit que não são afetadas pela digestão da *HhaI*.

O protocolo da MLPA de metilação é semelhante ao método da MLPA padrão. Tal experimento é dividido em cinco etapas: 1- Desnaturação do DNA e hibridação das sondas da MLPA; 2- Ligação e digestão; 3- PCR; 4- Separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar; 5- Análise dos dados. Contudo, após a hibridação, a reação é dividida em dois tubos: um tubo é incubado com a enzima *HhaI* (metilação) e o outro é processado como uma reação de MLPA padrão.

Na quarta etapa da MLPA (Separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar) utilizamos o sequenciador automático ABI 3500 (*Life Technologies*), pertencente ao Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (INCOR), o qual faz parte do Programa Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMiUM) do HC-FMUSP (São Paulo, SP).

As análises dos resultados das reações de MLPA de metilação foram realizadas utilizando-se o programa *GeneMarker*, versão 2.2.6 (*SoftGenetics*).

3.8. Marcadores de microssatélites

Para determinar se os 02 pares de gêmeos do estudo eram, de fato, monozigóticos, utilizou-se a técnica de marcadores de microssatélites.

A técnica foi realizada utilizando-se o kit de amplificação *AmpFℓSTR MiniFiler PCR* (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo o protocolo do fabricante. A corrida dos fragmentos foi realizada no analisador de fragmentos *ABI 3130 Genetic Analyzer* (*Thermo Fisher Scientific*). Os fragmentos gerados foram analisados utilizando-se o *GeneMapper Software*, versão 3.2 (*Applied Biosystems*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o recrutamento e a coleta de sangue periférico dos indivíduos que participaram do estudo, obtivemos uma razão próxima de 3:1 entre meninos e meninas, respectivamente. Esta razão corrobora com a literatura mundial para o transtorno, que é comumente diagnosticado três vezes mais em meninos do que em meninas (Stefanatos e Baron, 2007; Kratochvil et al., 2009; Atkinson e Hollis, 2010).

4.1. *Arrays* de metilação

Na avaliação do controle de qualidade dos dados os valores médios de *p* para cada amostra foram calculados. E, como podemos observar no gráfico abaixo (Figura 1), todas as médias dos valores de *p* ficaram bem abaixo de 0,05 – o que nos indica que todas as amostras apresentaram um padrão de qualidade de dados mais que satisfatório.

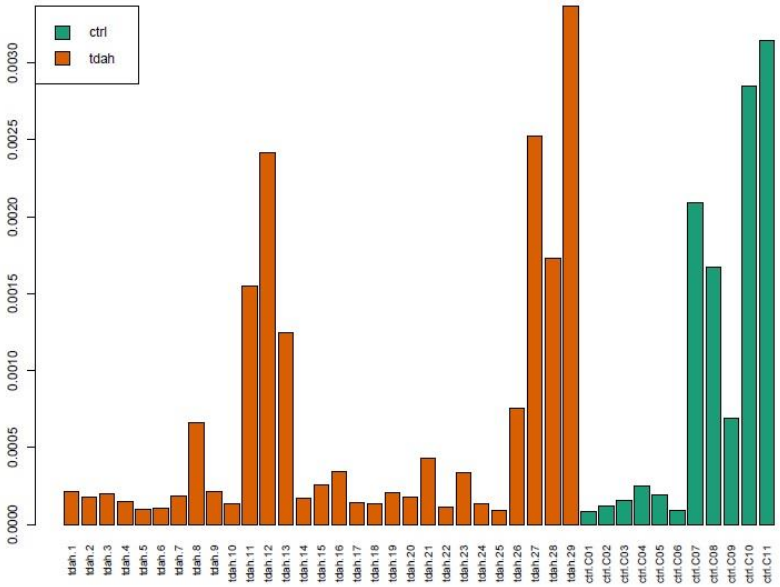

Figura 1. Gráfico de barras apresentando as médias dos valores de *p* dos 40 indivíduos do estudo. O eixo x representa os 29 indivíduos com TDAH (em laranja) e os 11 indivíduos sem TDAH (em verde). E o eixo y representa as médias dos valores de *p*.

Após a avaliação do controle de qualidade, todas as amostras do estudo foram normalizadas, como mostra o gráfico a seguir (Figura 2):

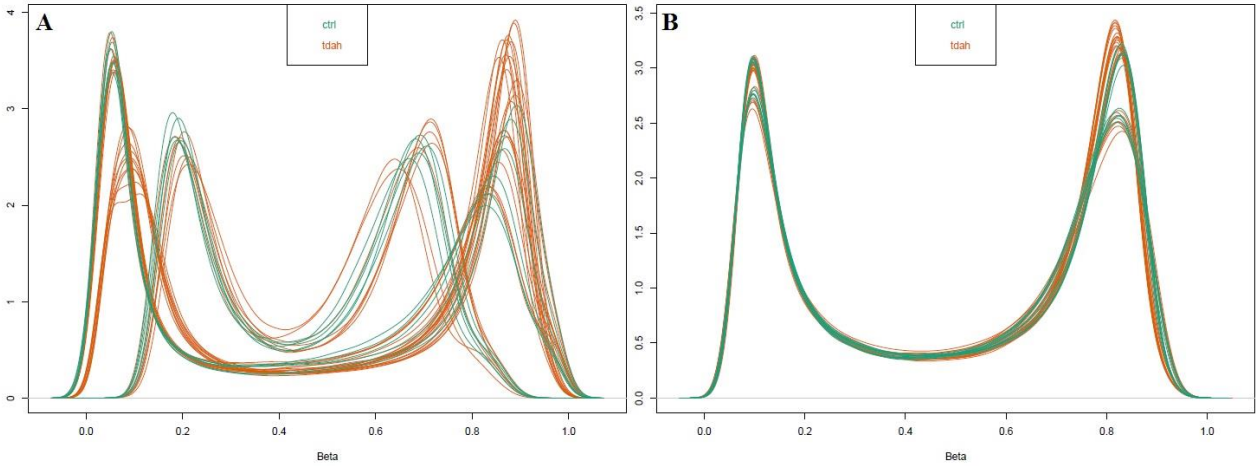

Figura 2. Gráficos de densidade mostrando a distribuição dos valores de β dos 29 indivíduos do grupo TDAH (laranja) e dos 11 indivíduos do grupo Controle (verde). O eixo x representa os valores de β (beta) e o eixo y representa a densidade de sondas. A: antes da normalização. B: após a normalização dos dados.

Com relação aos gráficos multidimensionais produzidos neste trabalho, observamos que estes não foram suficientemente precisos na identificação dos grupos amostrais. Isso pode ser explicado pelo fato de as alterações que podem estar envolvidas no TDAH não gerarem respostas biológicas tão marcantes como podemos perceber em amostras de câncer, por exemplo (Maksimovic et al., 2012).

Para uma melhor compreensão dos resultados das análises de metilação diferencial entre os grupos amostrais, estes foram apresentados nos subtópicos a seguir:

4.1.1. TDAH x Controle (independentemente do sexo)

Ao compararmos os dados obtidos dos *arrays* de metilação do grupo TDAH (n=29) com o grupo Controle (n=11), considerando o critério de seleção $p < 0,05$, obtivemos uma lista de sondas diferencialmente metiladas. As 50 sondas mais relevantes estão apresentadas a seguir (Tabela 4):

Tabela 4 – Lista das 50 sondas mais diferencialmente metiladas (“Top 50”) após a comparação entre os grupos TDAH e Controle, de acordo com o valor de *p*, em ordem crescente:

Sonda	Gene	Cromossomo	*P* valor
cg20361427	*MIOS*	7	1,52E+07
cg04193083	*NBR1*	17	1,59E+07
cg25203092	*TNKS2*	10	2,92E+07
cg02769477		1	3,39E+07
cg19097648	*ATG12*	5	1,05E+07
cg18523979	*IQSEC1*	3	1,05E+08
cg07989796	*SHKBP1*	19	1,31E+08

cg15555956	*PCDHB18*	5	1,55E+08
cg19664549	*CHEK2*	22	1,64E+08
cg12720152	*TTC7B*	14	2,08E+08
cg00234855		16	2,20E+08
cg00316520		3	2,35E+08
cg07016356	*CXCR1*	2	2,64E+08
cg01988500	*PKMYT1*	16	3,10E+08
cg18696805	*GNB2L1*	5	3,14E+08
cg07227728	*MKLN1*	7	3,17E+08
cg20036365	*GML*	8	3,44E+08
cg27316224	*AP2A2*	11	3,45E+08
cg02718464	*SUGT1L1*	13	3,54E+08
cg14617041	*TMEM171*	5	3,68E+08
cg11466935	*VENTX*	10	4,01E+08
cg03985727	*MEOX2*	7	4,19E+08
cg00120998	*CENPT*	16	4,71E+08
cg12224834		1	4,77E+08
cg22842510	*CCDC159*	19	5,21E+08
cg06548512		1	5,33E+08
cg16026922	*UCHL1*	4	6,02E+08
cg22251877	*TATDN1*	8	6,16E+08
cg05785298	*LRRN2*	1	6,36E+08
cg01849260	*TBCA*	5	6,46E+08
cg17694069	*KIAA0913*	10	7,50E+08
cg25980689		7	7,66E+08
cg10665123	*FGF12*	3	7,90E+08
cg13808325	*C4orf52*	4	8,07E+08
cg07516076		7	8,58E+08
cg10534658	*SGCB*	4	8,62E+08
cg09797837	*RCC2*	1	8,87E+08
cg13979277	*LMX1B*	9	8,90E+08
cg11752152	*NCK2*	2	9,31E+08
cg14380045		9	9,62E+08
cg03648690	*SLC15A1*	13	9,75E+08
cg26836125		6	1,19E+09
cg05280698	*HKR1*	19	1,22E+09
cg04288241	*AGAP1*	2	1,26E+08
cg26109401		2	1,29E+08
cg16102240		10	1,39E+08
cg25547937		5	1,43E+09
cg26339992	*RPA2*	1	1,56E+09
cg22918356	*INPP5A*	10	1,57E+09
cg01488674	*XPNPEP3*	22	1,63E+09

A checagem dos genes correspondentes às “Top 50” sondas revelou ausência de uma relação direta entre tais genes e o TDAH. Contudo, é importante ressaltar que os genes *UCHL1* e *FGF12* são expressos principalmente no sistema nervoso. O primeiro codifica uma protease de ubiquitina e já foi relacionado com a doença de Parkinson, que é caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos (Liu et al., 2002). E o

segundo codifica uma proteína envolvida na atividade dos canais de sódio e tem ação no neurodesenvolvimento.

Para termos uma compreensão mais visual dos perfis de metilação das crianças com e sem TDAH, construímos um *heatmap* considerando as 1.000 (mil) sondas mais diferencialmente metiladas entre os grupos (Figura 3).

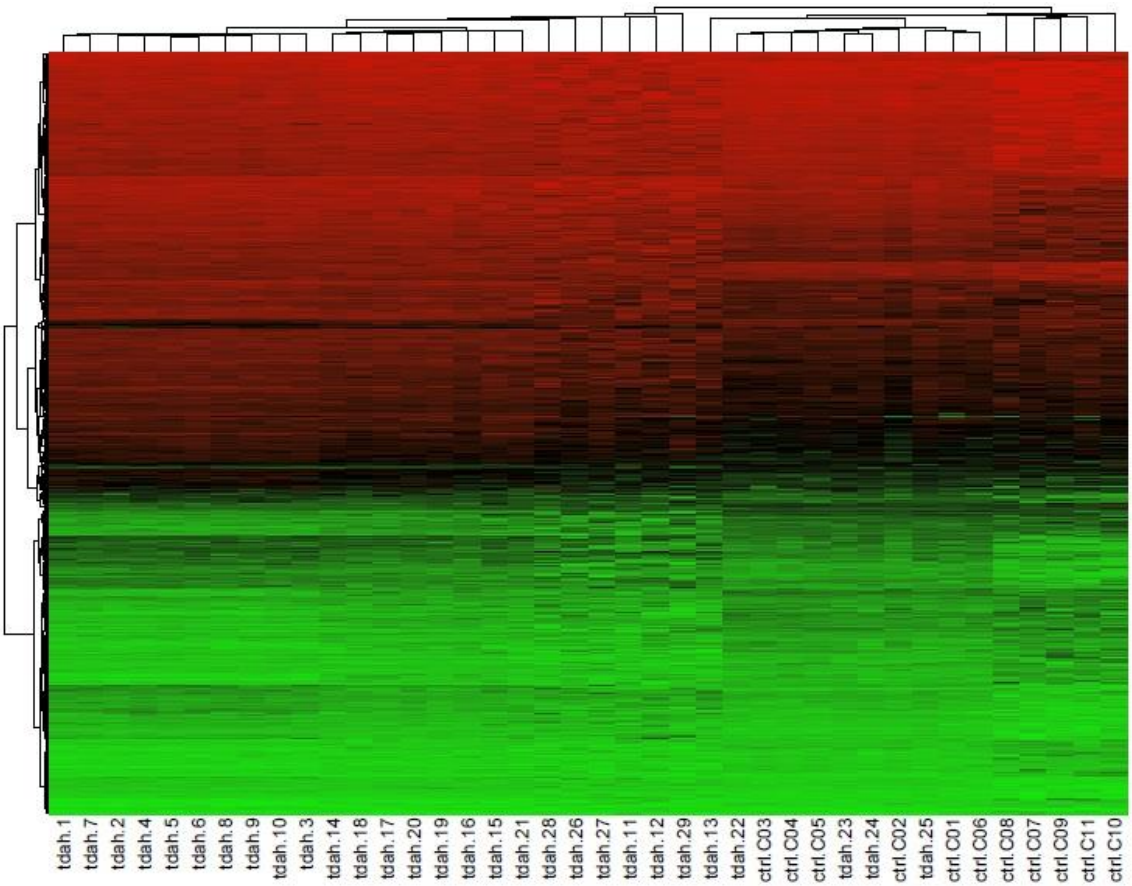

Figura 3. *Heatmap* apresentando o *cluster* formado a partir das Top 1.000 sondas após a comparação entre os grupos TDAH e Controle. As colunas representam cada uma das 40 crianças (identificadas pelo grupo ao qual pertencem) de acordo com a presença ou ausência do TDAH; e as linhas mostram cada uma das 1.000 sondas. As cores representam os valores de β para cada sonda: verde para os menores valores de β (sonda não metilada) e vermelha para os maiores valores de β (sonda metilada).

Ao analisarmos mais "visualmente" o *heatmap*, pudemos notar que o primeiro grande agrupamento de indivíduos ("tdah.1" ao "tdah.13") é composto apenas de crianças do grupo TDAH. O segundo bloco de indivíduos ("tdah.22" ao "ctrl.C06") é formado por crianças de ambos os grupos, comportando-se como uma "região de transição". Já o terceiro agrupamento ("ctrl.C01" ao "ctrl.C10") é constituído apenas por indivíduos do grupo Controle. Tais achados podem sugerir que crianças com TDAH

podem ter, até certo ponto, perfis de metilação diferentes de crianças sem o transtorno. Entretanto, mostra que existe uma “região de sobreposição” entre os perfis.

Isso pode ser explicado pelo fato de as alterações isoladas, que podem estar envolvidas no TDAH, não gerarem respostas biológicas tão marcantes como podemos perceber em no câncer, por exemplo (Maksimovic et al., 2012).

Para finalizar as análises comparativas entre o grupos TDAH e Controle, realizamos os testes de ontologia genética (enriquecimento das vias biológicas) com base na lista completa das sondas diferencialmente metiladas obtida na comparação entre os grupos. Desta forma, obtivemos como resultado uma lista de dezenas de vias, dentre as quais seguem as 20 mais relevantes na Tabela 5 (KEGG, 2019):

Tabela 5 – Lista das 20 vias biológicas mais relevantes (“Top 20”) obtidas na análise de enriquecimento realizada a partir da comparação entre os grupos TDAH e Controle, de acordo com o valor de *p* em ordem crescente:

Nome da via	Nº de genes dif. metilados	*P* valor
Spliceosome	53,83	0,009576828
Notch signaling pathway	27	0,022951158
Calcium signaling pathway	82,5	0,029241003
Inflammatory mediator reg. of TRP channels	45	0,035437132
p53 signaling pathway	32	0,05013309
Cholinergic synapse	51	0,050311167
Selenocompound metabolism	9,5	0,050901539
Thyroid cancer	19,33	0,055344132
Glioma	35	0,056770626
Oocyte meiosis	49,5	0,058463401
Cell cycle	49	0,059293081
Transcriptional misregulation in cancer	75,83	0,060152666
Fluid shear stress and atherosclerosis	54	0,07191024
Phosphatidylinositol signaling system	42,5	0,07492825
Dopaminergic synapse	55,5	0,084768693
Long-term potentiation	30	0,08937264
Cushing syndrome	66	0,093057809
Glycosaminoglycan degradation	10	0,100177393
Amphetamine addiction	30	0,100605776
Non-small cell lung cancer	31,5	0,103478856

Após a checagem detalhada das 20 vias apresentadas na Tabela 5, pôde-se verificar que pelo menos metade delas estão, de alguma maneira, relacionadas ao sistema nervoso central e/ou periférico. Tais relações puderam ser constatadas ao verificarmos o envolvimento dessas vias no aparecimento de várias doenças do neurodesenvolvimento, neurodegenerativas e/ou neuromusculares, com ou sem comprometimento cognitivo (KEGG, 2019).

Ainda com relação às vias, podemos enfatizar, especialmente, duas delas: "*Dopaminergic synapse*" e "*Amphetamine addiction*" (destacadas na Tabela 5).

A via ***Dopaminergic synapse*** está relacionada à atividade da dopamina, dos seus receptores e transportadores. Todos estes desempenham papéis fundamentais no metabolismo dopaminérgico. A dopamina é um importante neurotransmissor excitatório presente no cérebro dos mamíferos e que controla uma variedade de funções, incluindo atenção, memória, aprendizado, sistema de motivação e recompensa, humor, comportamento e plasticidade sináptica. Portanto, como resultado da participação da dopamina em diversas atividades cognitivas implicadas no TDAH, era possível que encontrássemos uma ou mais vias dopaminérgicas enriquecidas em decorrência das diferenças na metilação do DNA de crianças com e sem o transtorno. Esse resultado corrobora com vários estudos que têm evidenciado a existência de associação genética entre as vias dopaminérgicas e o desenvolvimento do TDAH (Hong et al., 2018). E, para além de uma associação genética, este estudo também indica que marcadores epigenéticos (como a metilação dos genes relacionados ao metabolismo dopaminérgico) podem, futuramente, nos ajudar a entender os mecanismos de interação e a participação dos diversos atores envolvidos no desenvolvimento neurotípico e na etiologia do TDAH (Wiers et al., 2018; KEGG, 2019).

No que diz respeito à via ***Amphetamine addiction***, não é difícil pensarmos que o enriquecimento desta via tenha sido algo natural, pois ela está diretamente relacionada aos efeito das anfetaminas no sistema nervoso central. As anfetaminas são um grupo de drogas psicoestimulantes persistentes que podem causar dependência e incluem o metilfenidato – principal medicamento utilizado no tratamento do TDAH. O metilfenidato tem ação no sistema dopaminérgico, especialmente no transportador de dopamina, bloqueando-o; o que resulta na diminuição da recaptação pré-sináptica da dopamina e o consequente aumento de sua concentração na fenda sináptica. Portanto, as diferenças de metilação encontradas entre os grupos (TDAH x Controle) se justificam pelo fato de que algumas das crianças com TDAH estavam fazendo o uso do metilfenidato como tratamento medicamentoso no momento da coleta de sangue periférico realizada no início deste estudo. Além disso, este achado corrobora com evidências iniciais do envolvimento de alterações epigenéticas do transportador da dopamina na modulação da resposta ao tratamento do TDAH com metilfenidato (Ding et al., 2017; Wenthur, 2016; KEGG, 2019).

4.1.2. Meninos x Meninas (independentemente do transtorno)

Ao realizarmos análises de metilação diferencial em fases anteriores do trabalho, percebemos a formação natural de dois agrupamentos: um entre amostras somente de meninos e outro entre amostras somente de meninas. Tais agrupamentos ocorreram mesmo com a exclusão das sondas mapeadas nos cromossomos sexuais, formando, interessantemente, dois grupos, de acordo com o sexo e independentemente da presença do TDAH. Diante disso, decidimos incluir essa abordagem em nossas análises finais, comparando os dados obtidos das amostras de meninos (n=29) com os dados amostrais de meninas (n=11). Para isso, consideramos o mesmo critério para a seleção das sondas diferencialmente metiladas ($p < 0,05$). Cinquenta destas sondas estão apresentadas na Tabela 6:

Tabela 6 – Lista das 50 sondas mais diferencialmente metiladas ("Top 50") após a comparação entre Meninos e Meninas, de acordo com o valor de *p*, em ordem crescente:

Sonda	Gene	Cromossomo	*P* valor
cg11955727		2	3,25E-20
cg04462931		7	3,94E-20
cg18382982	*DKFZP434L187*	15	1,20E-17
cg12949927		7	6,37E-14
cg00399683		7	3,66E-13
cg20926353	*TLE1*	9	1,36E-09
cg11643285	*RFTN1*	3	5,03E-09
cg12691488		1	5,85E-09
cg08656326	*TLE1*	9	5,16E-08
cg00167275	*FAM35A*	10	5,27E-08
cg17765025		2	4,72E-06
cg03911306	*DAZL*	3	8,61E-06
cg14095100	*TLE1*	9	2,15E-05
cg00804338	*TFDP1*	13	2,43E-05
cg00774458	*TUBB*	6	1,01E-04
cg00500229		1	1,60E-03
cg08037478		12	2,96E-03
cg16218221	*CCNYL1*	2	2,20E-01
cg19097082		11	2,30E+00
cg27540865		1	2,67E+00
cg17307919	*CSMD1*	8	4,20E+00
cg10631453	*UBE2QP1*	15	6,91E+00
cg06358300	*TLE1*	9	1,33E+00
cg04455759	*TIMM8B*	11	2,43E+01
cg17238319	*RFTN1*	3	3,35E+01
cg06710937		13	1,00E+02
cg02325951	*FOXN3*	14	1,47E+02
cg04946709	*LOC644649 / APOOP5*	16	4,60E+02
cg02556954	*ETF1*	5	9,84E+02

cg02987832	*PSMA6*	14	2,18E+03
cg13150977	*UBE2QP1*	15	3,39E+03
cg15756407	*TIMM8B*	11	3,97E+03
cg17886715		1	4,45E+03
cg26324366	*POU3F2*	6	5,02E+02
cg10242476	*LRRC2*	3	7,97E+03
cg20299935		17	9,12E+03
cg07381872		1	1,62E+04
cg02015053	*EIF3J*	15	3,42E+04
cg15817705		1	6,66E+04
cg25304146	*WBP11P1*	18	7,66E+04
cg23778841	*TFDP1*	13	2,01E+05
cg19292611	*TFDP1*	13	4,45E+05
cg08981669		7	4,47E+05
cg26067569		2	5,92E+04
cg03691818	*KRT77*	12	6,61E+05
cg15011775	*RARB*	3	7,02E+05
cg04190002	*SHANK3*	22	1,03E+06
cg22609331	*TUBB8*	10	1,27E+06
cg25452172	*METTL1*	12	1,41E+06
cg03704667	*CHTF8*	16	1,50E+06

Depois da obtenção das “Top 50” sondas mais diferencialmente metiladas na comparação entre meninos e meninas (Tabela 6), encontramos cinco estudos que investigaram diferenças entre os sexos na metilação do DNA. Três desses estudos avaliaram tais diferenças em indivíduos sem doença relatada e em diferentes faixas etárias. Os outros dois trabalhos incluíram indivíduos e/ou células sob a influência de transtornos psiquiátricos, que incluem comportamentos como o uso de álcool, drogas, medicamentos psiquiátricos e tabagismo. Estes dois últimos estudaram indivíduos adultos e células sanguíneas do cordão umbilical de recém nascidos (Sun et al., 2014; Xu et al., 2014; Inoshita et al., 2015; Yousefi et al., 2015; Maschietto et al., 2016).

Em seguida, verificamos se os genes apresentados na lista das “Top 50” sondas deste trabalho também estavam presentes nas listas de sondas diferencialmente metiladas dos estudos supracitados. E, de fato, 14 (catorze) genes achados em nossas análises já tinham sido encontrados em pelo menos um desses cinco estudos citados. Os genes em comum são os seguintes: *TLE1*, *RFTN1*, *FAM35A*, *TFDP1*, *CCNYL1*, *CSMD1*, *UBE2QP1*, *FOXN3*, *LOC644649*, *ETF1*, *PSMA6*, *WBP11P1*, *KRT77* e *SHANK3*. Dentre estes 14 genes, 08 (oito) foram coincidentes com genes encontrados nos três estudos que incluíram indivíduos sem doença relatada: *TLE1*, *RFTN1*, *TFDP1*, *FOXN3*, *LOC644649*, *WBP11P1*, *KRT77* e *SHANK3*. E, com exceção do *FOXN3*, 13 (treze) genes deste trabalho coincidiram com genes achados em pelo menos um dos dois

estudos que consideraram indivíduos e/ou células sob a influência de transtornos psiquiátricos (Sun et al., 2014; Xu et al., 2014; Inoshita et al., 2015; Yousefi et al., 2015; Maschietto et al., 2016).

Neste trabalho, foram encontrados cerca de 06 (seis) a 07 (sete) genes em comum com os já obtidos em cada um dos estudos citados; exceto no estudo realizado por Sun e colaboradores (2014), cujos genes em comum encontrados foram apenas 02 (dois), o *TFDP1* e o *SHANK3*. Isso pode ter ocorrido em decorrência de características populacionais específicas do grupo amostral do referido estudo, o qual era composto exclusivamente por indivíduos de origem chinesa, diferentemente dos demais (Xu et al., 2014; Inoshita et al., 2015; Yousefi et al., 2015; Maschietto et al., 2016).

Adicionalmente, é importante ressaltar que, entre os 14 genes encontrados em comum com os dos estudos anteriores, 07 (sete) têm funções relacionadas à regulação da expressão gênica, ao reparo do DNA e à regulação sináptica no sistema nervoso central: *TLE1*, *FAM35A*, *TFDP1*, *CSMD1*, *FOXN3*, *ETF1* e *SHANK3*. E, particularmente, erros nos genes *TFTN1* e *SHANK3* já haviam sido relatados em pacientes com fenótipo clínico de TDAH (Sun et al., 2014; Xu et al., 2014; Inoshita et al., 2015; Yousefi et al., 2015; Maschietto et al., 2016).

O fato de termos encontrado alguns genes que corroboram com os achados de outros estudos semelhantes, por si só, já nos sugere alguns possíveis marcadores epigenéticos que têm apresentado, com certa consistência, diferenças importantes na metilação do DNA quando consideramos a comparação entre os sexos, independentemente da presença de qualquer condição patológica. Isso fica claro quando observamos que embora o presente trabalho e os cinco estudos supracitados sejam semelhantes entre si quanto à técnica e à abordagem comparativa utilizadas, eles possuem características distintas, para além das particularidades populacionais, tais como: as idades dos indivíduos de cada grupo amostral no momento da coleta do material biológico, o tipo de tecido analisado e a presença ou não de transtornos psiquiátricos. Assim, considerando que essas e outras variáveis podem, potencialmente, influenciar as metilações do DNA em cada sítio CpG, seria aceitável se não houvessem sondas diferencialmente metiladas em comum entre os seis estudos. Contudo, observamos justamente o oposto, sugerindo que o sexo biológico tem influência na metilação do DNA; e que, dependendo da circunstância, tal influência pode se sobrepor às influências decorrentes de outras variáveis, incluindo a presença ou não de transtorno

psiquiátrico, como o TDAH (Sun et al., 2014; Xu et al., 2014; Inoshita et al., 2015; Yousefi et al., 2015; Maschietto et al., 2016).

Para visualizarmos melhor os perfis de metilação do DNA obtidos na comparação entre meninos e meninas, construímos um *heatmap* considerando as 1.000 (mil) sondas mais diferencialmente metiladas entre os grupos (Figura 4).

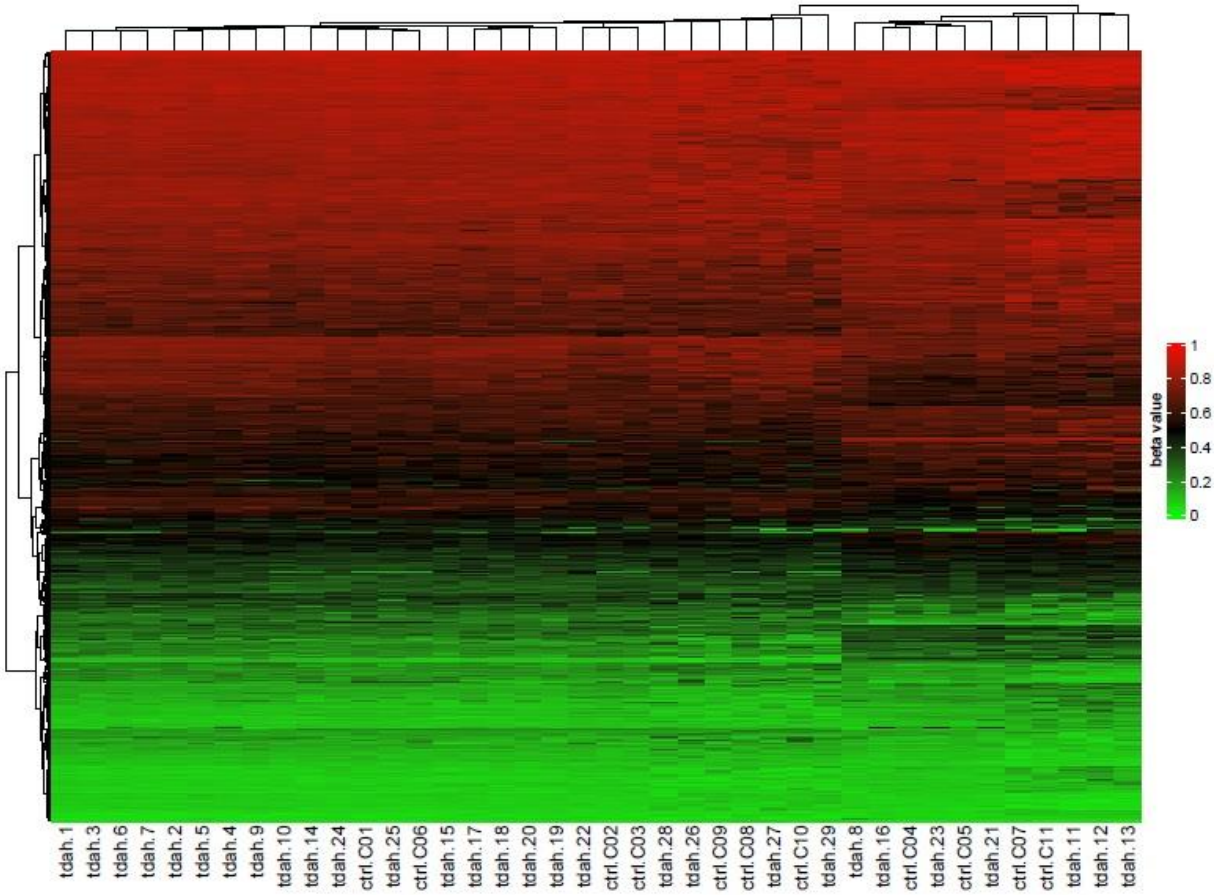

Figura 4. *Heatmap* apresentando o *cluster* construído a partir das Top 1.000 sondas obtidas na comparação entre os grupos Meninos x Meninas. As colunas representam cada uma das 40 crianças identificadas pela presença ou não do TDAH; e as linhas mostram cada uma das 1.000 sondas. As cores representam os valores de β para cada sonda: verde para os menores valores de β (sonda não metilada) e vermelha para os maiores valores de β (sonda metilada).

Após analisarmos o *heatmap* apresentado (Figura 4) considerando o sexo biológico de cada uma das amostras, notamos a formação de dois grupos, conforme já havia ocorrido em momentos anteriores deste trabalho. O primeiro e grande grupo de indivíduos (“tdah.1” ao “tdah.29”) compõe-se apenas de crianças do sexo masculino. E o segundo grupo de indivíduos (“tdah.8” ao “tdah.13”) é constituído somente por crianças do sexo feminino. Tais achados confirmam a influência do sexo biológico

sobre a metilação do DNA, a qual foi capaz de agrupar crianças com e sem TDAH em um mesmo grupo, em função do sexo, sugerindo a existência de "perfis" de metilação de DNA diferentes para cada sexo, o que corrobora achados de estudos anteriores (Sun et al., 2014; Xu et al., 2014; Inoshita et al., 2015; Yousefi et al., 2015; Maschietto et al., 2016).

De toda forma, é imprescindível salientar que o fato de termos observado, neste trabalho, a influência do sexo sobre a metilação do DNA, não anula ou desqualifica, de nenhuma maneira, a influência de transtornos psiquiátricos (incluindo o TDAH) na metilação do DNA. Isso pode ser ratificado pela quantidade de genes (13) encontrados neste trabalho e que coincidiram com genes achados em pelo menos um dos dois estudos que também consideraram a influência de transtornos psiquiátricos (Sun et al., 2014; Xu et al., 2014; Inoshita et al., 2015; Yousefi et al., 2015; Maschietto et al., 2016).

Ao final das análises comparativas entre o grupos de Meninos e Meninas, realizamos testes de ontologia genética baseados na lista completa de sondas diferencialmente metiladas resultante da comparação entre os dois grupos. Portanto, apresentam-se a seguir (Tabela 7) as 20 mais vias relevantes obtidas nos referidos testes (KEGG, 2019):

Tabela 7 – Lista das 20 vias biológicas mais relevantes ("Top 20") obtidas na análise de enriquecimento realizada a partir da comparação entre os grupos Meninos e Meninas, de acordo com o valor de *p* em ordem crescente:

Nome da via	**Nº de genes dif. metilados**	***P* valor**
Gap junction	3	0,007494771
Phagosome	3	0,022435348
Pathogenic Escherichia coli infection	3	0,049156795
Oxidative phosphorylation	2,5	0,071004176
Parkinson disease	2,5	0,084978412
Cell cycle	2	0,093726912
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	2	0,110481889
Citrate cycle (TCA cycle)	1	0,111087661
Prion diseases	1	0,117134339
RNA transport	2	0,117939003
Primary immunodeficiency	1	0,128622913
Alzheimer disease	2,5	0,140729183
Proteasome	1	0,159464063
Huntington disease	2,5	0,167310099
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1	0,173733798
Thermogenesis	2,5	0,220337036
Lysine degradation	1	0,22967939
Antigen processing and presentation	1	0,262357476
Salmonella infection	1	0,264938317
Non-small cell lung cancer	1	0,276445345

Com relação à checagem das 20 vias contidas na Tabela 7, verificou-se que sete delas se relacionam com sistema nervoso central e/ou periférico. E, dentre essas sete, a via "***RNA transport***" foi considerada aqui como a mais relevante, pois esta engloba um grande número de moléculas (principalmente proteínas) que desempenham funções relacionadas ao transporte de diversos tipos de RNAs e, consequentemente, têm importante participação nos processos de transcrição, *splicing* e tradução. Esse grande número de moléculas contempladas na via "***RNA transport***" inclui genes que codificam algumas das proteínas de transporte de RNAs que são essenciais no desenvolvimento das conexões entre neurônios e na maturação das sinapses. Esse é o caso do gene *FRM1*, que é a principal causa da Síndrome do X-frágil (SXF), cuja herança é ligada ao cromossomo X. Logo, a transmissão é diretamente influenciada pelo sexo e também pode sofrer influência da metilação de DNA, que por sua vez, é o principal mecanismo de inativação do cromossomo X (KEGG, 2019).

Tudo isso nos leva a pensar que diferenças na metilação do DNA podem influenciar o neurodesenvolvimento de maneiras diferentes em ambos os sexos; e ainda, que tais diferenças corroboram com a existência de diferenças morfofuncionais no cérebro em razão do sexo (Xu et al., 2014; Yousefi et al., 2015).

Sendo assim, é necessário que sejam realizados novos estudos envolvendo a metilação do DNA em vários tipos de tecidos (saudáveis ou não) e em diversas idades, para que tenhamos uma maior compreensão do papel dessas metilações no desenvolvimento considerado neurotípico e em condições patológicas.

4.1.3. Análises dos *arrays* de metilação dos gêmeos

Antes de partirmos diretamente para as análises da metilação do DNA realizadas com amostras de gêmeos, é importante esclarecer os seguintes pontos:

Primeiramente, é importante apontar quais foram as amostras contempladas, de forma particular, neste estudo. Portanto, seguem: "TDAH-07" (sexo masculino, 12 anos de idade, apresentação clínica classificada como do "tipo" hiperativo/impulsivo), "TDAH-07-IG" (irmão gêmeo do "TDAH-07", com desenvolvimento neurotípico), "TDAH-24" (sexo masculino, 09 anos de idade, apresentação clínica do "tipo" combinado) e "TDAH-24-IG" (irmão gêmeo do "TDAH-24", com desenvolvimento neurotípico).

Em segundo lugar, é essencial destacar que as coletas de sangue periférico de cada par de gêmeos (para utilização específica nesta abordagem) foram realizadas na mesma ocasião. Dessa forma, possíveis vieses nas diferenças na metilação do DNA decorrentes de modificações temporais puderam ser desconsiderados.

Em terceiro lugar, é fundamental mencionar que, a partir da análise dos eletroferogramas obtidos após o teste molecular de marcadores de microssatélites, foi possível confirmar que os dois pares de gêmeos são, de fato, monozigóticos.

E, por último, mas não menos importante, é preciso dizer que nessa abordagem específica, o experimento de *array* de metilação do DNA dos gêmeos foi realizado utilizando-se o *Infinium MethylationEPIC BeadChip*, o qual verifica os *status* de metilação do genoma com uma cobertura altíssima – cerca de 850 mil tipos de sondas.

Portanto, sem mais pontos a esclarecer, seguem os principais resultados das análises comparativas entre os 02 (dois) gêmeos com TDAH ("TDAH-07" e "TDAH-24") e os 02 gêmeos sem TDAH ("TDAH-07-IG" e "TDAH-24-IG"):

Inicialmente, foi realizada uma seleção das sondas diferencialmente metiladas baseada no critério padrão ($p < 0,05$). Depois, obtivemos uma lista com as 1.000 (mil) sondas mais diferencialmente metiladas resultantes desta comparação. Em seguida, foi realizada uma checagem dos genes contemplados entre as 20 sondas mais diferencialmente metiladas. Tal checagem revelou a ausência de genes em comum com as outras listas de "Top 50" sondas obtidas nas duas comparações anteriores deste trabalho. Entretanto, inconsistências semelhantes foram observadas por van Dongen e colaboradores (2019), ao encontrarem várias sondas diferencialmente metiladas específicas para cada uma das três coortes utilizadas em sua metanálise, com um total de 4.689 indivíduos adultos, incluindo amostras de gêmeos.

O passo seguinte foi a construção de um *heatmap* (Figura 5) utilizando a lista completa das sondas diferencialmente metiladas obtidas da comparação entre os gêmeos com e sem TDAH:

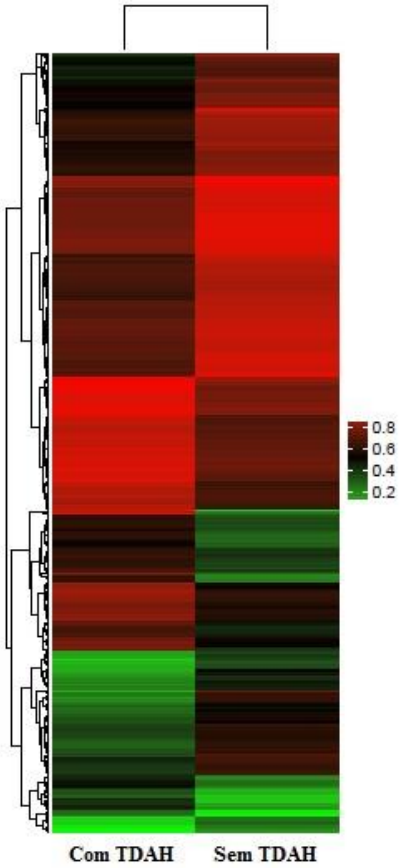

Figura 5. *Heatmap* construído utilizando-se as 1.000 (mil) sondas mais diferencialmente metiladas na comparação entre os gêmeos com TDAH (coluna da esquerda) e os gêmeos sem TDAH (coluna da direita). As linhas representam cada uma das 1.000 sondas. A cor verde indica os menores valores de β (sonda não metilada) e a cor vermelha indica os maiores valores de β (sonda metilada).

Considerando uma análise mais "visual" do *heatmap* acima, pode-se perceber que o perfil de metilação dos gêmeos com TDAH apresenta-se hipermetilado quando comparado ao perfil dos gêmeos sem TDAH. Contudo, ao considerarmos o número absoluto de sondas com os maiores valores β, tem-se que: os gêmeos com TDAH apresentam juntos 823.637 mil sondas com $\beta > 0,7$; e os gêmeos sem TDAH possuem juntos 822.889 mil sondas com $\beta > 0,7$. Isso revela que os gêmeos com TDAH apresentam apenas 748 sondas a mais com $\beta > 0,7$ que os gêmeos sem TDAH, indicando que o perfil de metilação dos gêmeos com TDAH é levemente hipermetilado em relação ao perfil dos gêmeos sem TDAH. Este achado, porém, não pôde ser confirmado, pois os artigos similares recentes mencionam a hipermetilação considerando apenas sondas, genes e/ou regiões específicas (Wilmot et al., 2015; Walton et al., 2016; Chen et al., 2017; van Dongen et al., 2019).

Após os testes de ontologia genética, foi obtida uma lista de 100 (cem) vias enriquecidas. E, dentre as 20 vias mais relevantes da lista ("Top 20"), 03 (três) estavam presentes em pelo menos 01 (uma) das listas "Top 20" obtidas nas comparações entre os grupos "TDAH" *versus* "Controle" e "Meninos" *versus* "Meninas". As 03 referidas vias são as seguintes: "*Non-small cell lung cancer*", "*p53 signaling pathway*" e "*Cell cycle*".

É difícil imaginar uma relação direta entre as duas primeiras vias e o TDAH. Contudo, as 03 vias possuem em comum o fato de estarem envolvidas, de alguma forma, com a atividade da proteína p53 – que é supressora de tumor – e cuja ativação é induzida por vários sinais de estresse celular, incluindo danos ao DNA, estresse oxidativo e oncogenes ativados. A p53 regula a expressão gênica, induzindo a parada do ciclo celular, a apoptose, o reparo do DNA ou alterações no metabolismo. Sendo assim, não é difícil pensar que existe uma possibilidade, mesmo que distante, de as metilações do DNA estarem envolvidas nos processos regulatórios do gene *p53*, e, por consequência, estarem contribuindo, juntamente com outros fatores, para o aparecimento do TDAH. Essa ideia parece mais razoável quando se observa que muitas das doenças relacionadas a essas vias têm seus fenótipos manifestados no sistema nervoso e, frequentemente, afetam a cognição (KEGG, 2019).

Para finalizar as análises dos gêmeos deste trabalho, lançamos mão do circos para sintetizar, de maneira mais visual, os dados das metilações dos gêmeos com e sem TDAH (Figura 6):

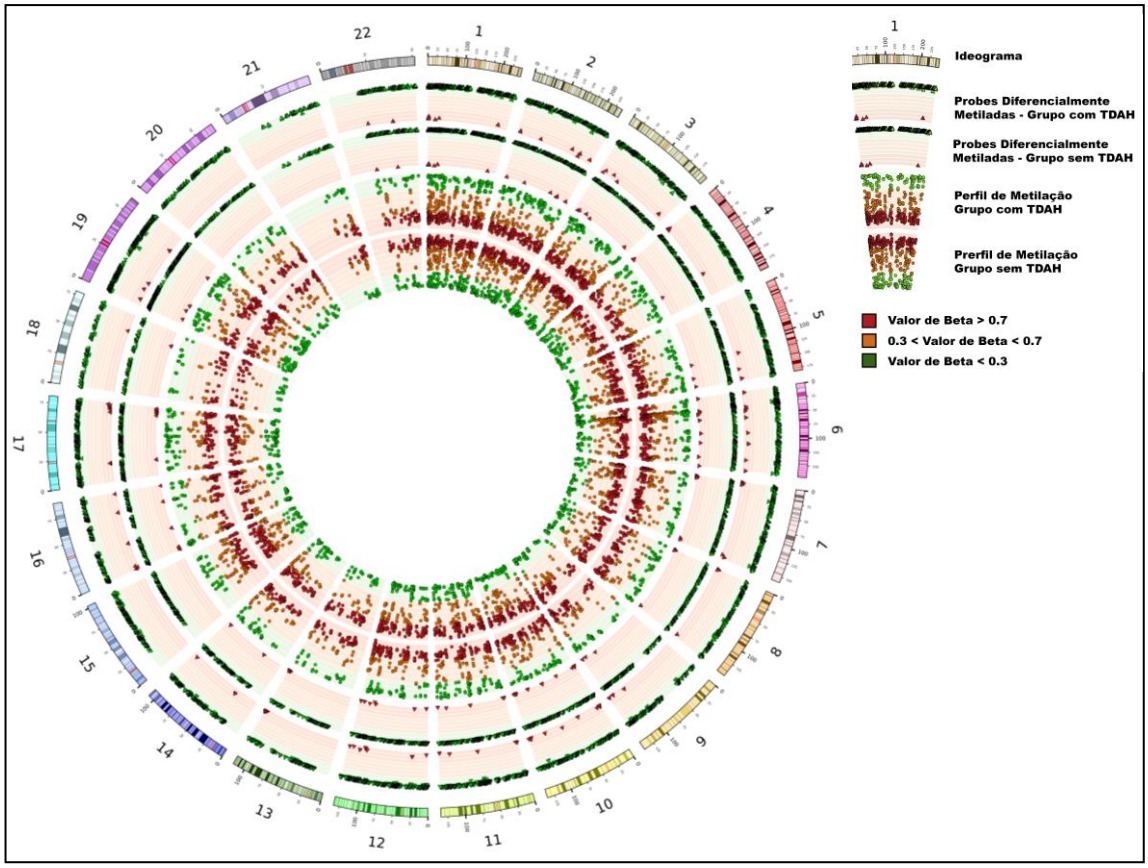

Figura 6. *Circos plot* apresentando o perfil de metilação dos gêmeos com e sem TDAH. As duas faixas externas representam as sondas mais diferencialmente metiladas entre os gêmeos com TDAH e os gêmeos sem TDAH. As faixas internas mostram o comportamento de uma amostra aleatória de sondas (n = 10.000) dos gêmeos com TDAH e dos gêmeos sem TDAH comparando-os. O significado de cada um dos elementos do circos está apresentado na própria figura.

Em uma primeira visualização do *circos*, pode-se concluir que não existem diferenças entre os perfis de metilação do DNA dos gêmeos com e sem TDAH. Entretanto, ao observá-lo mais minuciosamente, percebe-se que existem sim diferenças entre os perfis de metilação, embora tais diferenças sejam sutis. Tal sutileza pode estar refletindo a realidade, apontando para um papel pequeno da metilação do DNA no desenvolvimento do TDAH. Contudo, é importante lembrar que o perfil de metilação do DNA de células do sangue pode não refletir o perfil de metilação de células neuronais, já que os marcadores epigenéticos são tecido-específicos. Sendo assim, existe possibilidade do perfil de metilação de células nervosas ser mais informativo quanto ao papel da metilação na etiologia do TDAH (van Dongen et al., 2019).

4.2. *Arrays* de SNPs

Após a realização dos experimentos de *array* de SNPs, que incluíram amostras dos 29 indivíduos com TDAH, os dados obtidos foram processados pelo *BlueFuse Software*. Após o referido processamento, amostras de 02 (dois) pacientes foram excluídas devido à baixa qualidade e confiabilidade de seus resultados. E as análises das alterações encontradas prosseguiram com 27 amostras e foram realizadas com base nos bancos de dados genéticos *DECIPHER* e *UCSC Genome Browser*.

Com as análises foi possível observar pequenas alterações (deleções e duplicações) em algumas regiões do genoma desses pacientes. Muitas delas foram desconsideradas por serem classificadas como não patogênicas e outras por estarem localizadas em regiões de heterocromatina, conhecidas pela presença predominante de genes inativos e de DNA não gênico. A lista das alterações dos pacientes com TDAH está apresentada no **Quadro 1**:

Quadro 1 – Lista dos indivíduos com TDAH e suas respectivas regiões com CNVs mostrando o cromossomo e os genes presentes na região alterada.

Amostra	Alteração	Cromossomo	*Start*	*End*	Gene	Função do gene
TDAH-2	Dup	21	45608685	45674095	*ICOSLG*	Proliferação de células T e secreção de citocinas. Atuação na resposta inflamatória.
	Del	22	51171693	51195728	*ACR*	Presente no acrossomo do espermatozoide.
	Del	8	72205113	72217690	*EYA1*	Desenvolvimento dos rins, arcos branquiais, olhos e orelhas.
TDAH-3	Del	2	55518903	55687618	*CCDC88A*	Remodelação do citoesqueleto e migração celular.
	Del	6	45308446	45318963	*SUPT3H*	Provável ativador transcricional.
	Del	6	45308446	45318963	*RUNX2*	Essencial para a diferenciação osteoblástica, na morfogênese do esqueleto e regulação de fatores envolvidos com o esqueleto.
TDAH-4	Del	1	103343583	103549861	*COL11A1*	Atua na fibrogênese, controlando o crescimento do colágeno II.
	Del	8	103343583	103549861	*UBR5*	Regulação da proliferação e diferenciação celular. Funciona como ubiquitina-proteína ligase.
	Del	7	83171681	83278022	*SEMA3E*	Proteínas associadas à membrana.
	Del	2	55507386	55591167	*CCDC88A*	Remodelação do citoesqueleto e migração celular.
	Del	12	81031055	81102177	*PTPRQ*	Regula a fosfatidilinositol. Apresenta um papel importante na adipogênese.
	Del	5	36982029	37014950	*NIPBL*	Coesão da cromatina, condensação cromossômica e reparo do DNA.
	Del	17	29540427	29557764	*NF1*	Autismo, leucemia mieloide, *splicing* alterado.
	Del	6	45298649	45306533	*SUPT3H*	Provável ativador transcricional.
	Del	6	45298649	45306533	*RUNX2*	Essencial na diferenciação osteoblástica, na morfogênese do esqueleto e na regulação de fatores

						envolvidos com o esqueleto.
	Del	8	72204236	72209267	*EYA1*	Desenvolvimento dos rins, arcos branquiais, olhos e orelhas.
	Del	8	61665623	61670476	*CHD7*	Codifica proteínas da família da helicase.
TDAH-5	Del	2	181829296	181952420	*UBE2E3*	Atua no transporte de sódio no epitélio renal, na doença celíaca e no coração.
TDAH-6	Del	5	112045132	112125419	*APC*	Atua na supressão de tumor.
TDAH-13	Dup	21	44825536	44837359	*GLB1L3*	Família da galactosidase.
TDAH-17	Dup	1	9321241	9400868	*H6PD*	Oxidação da glicose e da 6-glutose fosfatase.
	Del	2	170806481	170966684	*UBR3*	Catálise da transferência de ubiquitina entre proteínas.
	Del	5	36935537	36996027	*NIPBL*	Coesão da cromatina, condensação cromossômica e reparo do DNA.

Após análise detalhada, encontramos 18 genes diferentes relacionados às regiões duplicadas e deletadas. Alguns deles foram encontrados mais de uma vez em pacientes diferentes pacientes: *EYA1* (“TDAH-2” e “TDAH-4”), *CCDC88A* (“TDAH-3” e “TDAH-4”), *SUPT3H* (“TDAH-3” e “TDAH-4”), *RUNX2* (“TDAH-3” e “TDAH-4”) e *NIPBL* (“TDAH-4” e “TDAH-17”).

Entretanto, apesar de cada um desses 05 (cinco) genes terem sido encontrados em 02 (dois) pacientes deste trabalho, apenas 01 (um) deles já foi relacionado ao TDAH em outro estudo que também o encontrou no autismo e na esquizofrenia: o ***NIPBL***. Além deste, o gene ***CHD7*** também foi encontrado no TDAH, no autismo e na esquizofrenia pelo mesmo estudo (Williams et al., 2012).

Um terceiro gene, o ***NF1***, além de também já ter sido relatado no estudo de Williams e colaboradores (2012), foi recentemente encontrado em um estudo de CNVs em transtornos do neurodesenvolvimento (Zarrei et al., 2019).

É importante destacar que além da busca por genes em comum com os deste trabalho nos estudos supracitados, foram também realizadas pesquisas em outros dois estudos. Contudo, não foram encontrados, nesses estudos, genes em comum com os encontrados aqui (Elia et al., 2011; Lima et al., 2016).

Ressalta-se ainda, que embora não tenhamos encontrado genes em comum com os nossos em outros estudos, é importante que esses genes, assim como as CNVs achadas aqui, sejam mais profundamente estudados quanto aos seus possíveis papéis na etiologia do TDAH.

4.3. MLPAs

A verificação adicional do *status* de metilação em cerca de 50 sítios CpGs dos indivíduos com e sem TDAH foi realizada utilizando-se a técnica de MLPA de metilação. As reações, analisadas no *GeneMarker* (*SoftGenetics*), revelaram que a a técnica de MLPA não se mostrou eficaz para analisarmos a metilação no TDAH.

Isso ficou claro por dois motivos. O primeiro se deu pelo fato de que muitas amostras não puderam ser analisadas devido a problemas nas reações de algumas delas; possivelmente causados por resquícios de sal provenientes da extração de DNA. O segundo motivo foi decorrente dos resultados obtidos das amostras passíveis de análise de ambos os grupos (TDAH" e Controle), em que todas as amostras foram consideradas normais, inclusive as amostras de crianças com TDAH.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se, a partir dos resultados obtidos, que foi possível identificarmos o *status* de metilação de milhares de sítios do DNA genômico de sangue periférico de crianças com e sem TDAH utilizando-se a técnica *BeadArray* (*Illumina technology*).

Foi possível também investigarmos a presença de variações no número de cópias genômicas (duplicações e deleções) no DNA de sangue periférico nos indivíduos com TDAH através da técnica de *BeadArray* (*Illumina technology*) de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

Contudo, apesar de termos aplicado a técnica de MLPA (*MRC-Holland*) em todas as amostras deste trabalho, observamos que a determinação do *status* de metilação das regiões genômicas analisadas pela técnica não foi suficiente para apontar diferenças na metilação do DNA entre as crianças com e sem o transtorno.

Portanto, ressalta-se que o principal objetivo deste trabalho foi alcançado: o de construir o perfil de metilação do DNA de sangue periférico de indivíduos com TDAH. Perfil este que se mostra como um espectro de variações que reflete o espectro clínico que o transtorno apresenta.

Por fim, nossos achados apontam para a necessidade da realização de mais estudos epigenéticos no contexto do TDAH, para que se possa avaliar melhor, e mais especificamente, a influência da metilação do DNA na etiologia do transtorno.

6. ANEXO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

"Construção do perfil de metilação de indivíduos portadores do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) utilizando as técnicas de *array* e MLPA"

PESQUISADORA: **Drª. Leslie Domenici Kulikowski**

CARGO/FUNÇÃO: **Pesquisadora e responsável pelo Laboratório de Citogenômica (LIM 03), Departamento de Patologia**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **CRB 56833**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Laboratório de Citogenômica (LIM 03), Depto. de Patologia.**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: **48 meses**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma se inicia na infância e afeta aproximadamente 5,3% das crianças do mundo inteiro. Sua manifestação pode estar relacionada a fatores genéticos e ambientais simultaneamente. Assim, o objetivo deste estudo é construir um perfil de alterações no material genético (DNA) de pacientes com diagnóstico clínico de TDAH.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Será realizada uma entrevista com os pais e/ou familiares responsáveis para se coletar os dados do paciente e da família; um exame físico para verificar a saúde física do seu filho; diversos exames (bateria de testes neuropsicológicos) com a criança para verificar a presença ou ausência de hiperatividade e/ou falta de atenção (presença do TDAH); e coletada uma amostra de sangue periférico de 5 mL por uma punção venosa ("tirar sangue") da criança e dos pais para analisar alterações do material genético (DNA).

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: A coleta de sangue periférico será realizada por punção venosa do antebraço do paciente e dos pais.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Ao participar do estudo, seu filho (a) e os familiares correrão um risco praticamente desprezível e um leve desconforto apenas pelo procedimento de coleta de sangue por punção venosa. O local pode ficar um pouco dolorido após a coleta. Também pode ocorrer a formação de um pequeno hematoma ("roxo") que pode persistir por alguns dias; porém o mesmo se desfaz sem a necessidade de medicamentos.

5 – Benefícios para o participante: Todos os exames realizados beneficiará o paciente fornecendo um diagnóstico clínico definitivo de TDAH para o filho(a), já que o único diagnóstico possível é o clínico. Além disso, o estudo pode identificar possíveis causas genéticas para a doença no seu filho(a).

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não existem outros exames alternativos disponíveis no SUS para a pesquisa das pequenas alterações no material genético relacionados aos problemas do seu filho.

7 – Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal pesquisadora é a Drª. Leslie Domenici Kulikowski que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 – Prédio dos Ambulatórios - 2º andar – Telefone: 2661-9506. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26. E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – **Direito de confidencialidade:** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – A pesquisadora (Drª. Leslie Domenici Kulikowski) se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Construção do perfil de metilação de indivíduos portadores do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) utilizando as técnicas de array e MLPA**".

Eu discuti com a Drª. Leslie Domenici Kulikowski sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

7. REFERÊNCIAS

Alloway TP. Automated Working Memory Assessment: Manual. London: *Pearson*; 2007.

APA. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM 5 — 5th edn. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, 2013.

Archer T, Oscar-Berman M, Blum K. Epigenetics in Developmental Disorder: ADHD and Endophenotypes. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2011; 2(104).

Argollo N. NEPSY II: avaliação neuropsicológica do desenvolvimento. In: Malloy-Diniz LF, Fuentes D, Mattos P, Abreu N. Avaliação Neuropsicológica. Porto Alegre: *Artmed*; 2010.

Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD and Irizarry RA. Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA Methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014; 30(10),1363–1369.

Asherson P., Buitelaar J., Faraone S.V., Rohde L.A. Adult attention-deficit hyperactivity disorder: Key conceptual issues. *Lancet Psychiatry*. 2016; 3:568–578.

Atkinson M, Hollis C. NICE guideline: attention deficit hyperactivity disorder. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2010; 95(1):24-7.

Biederman J, Kwon A, Aleardi M, Chouinard VA, Marino T, Cole H, et al. Absence of gender effects on attention deficit hyperactivity disorder: findings in nonreferred subjects. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(6):1083–1089.

Brito GNO. Escala de Avaliação do Comportamento Infantil Para o Professor. São Paulo: *Vetor*; 2006.

Carim DB, Miranda MC, Bueno, OFA. Tradução e adaptação transcultural para o português do instrumento “Behavior Rating Inventory of Executive Function". *Psicologia: Reflexão e Crítica* (UFRGS. Impresso), v.25.; 2012; 400-409.

Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*. 2013; 8(2):203-9.

Chen, Y. C., Sudre, G., Sharp, W., Donovan, F., Chandrasekharappa, S. C., et al. Neuroanatomic, epigenetic and genetic differences in monozygotic twins discordant for attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry*. 2018; 23, 683-690.

Cortese, S. et al. Toward systems neuroscience of ADHD: a meta-analysis of 55 fMRI studies. *Am. J. Psychiatry*. 2012; 169:1038–1055.

Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*. 2011; 70(5):813-29.

Ding K., Yang J., Reynolds G.P., Chen B., Shao J., Liu R., Yang R., Wen J., Kang C. DAT1 methylation is associated with methylphenidate response on oppositional and hyperactive-impulsive symptoms in children and adolescents with ADHD. *World J. Biol. Psychiatry*. 2017; 18:291–299.

Elia, J., Glessner, J. T., Wang, K., Takahashi, N., Shtir, C. J., Hadley, D., et al. Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat. Genet*. 2011; 44, 78-84.

Faraone S V., Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005; 57: 1313–1323.

Faraone SV, Asherson P, Banaschewski T, Biederman J, Buitelaar JK, Ramos-Quiroga JA, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1:15020.

Fayyad J, et al. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry*. 2007; 190:402–409.

Franke B, Neale BM, Faraone SV. Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet*. 2009; 126(1):13-50.

Gizer, I.R., Ficks, C., Waldman, I.D. Candidate gene studies of ADHD: a meta- analytic review. *Human Genetics*. 2009; 126,51–90.

Graff J, Mansuy IM. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res*. 2008; 192: 70–87.

Graff J, Mansuy IM. Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur. J. Neurosci*. 2009; 30:1–8.

Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009; 459(7243):55-60.

Hahne F, Ivanek R. Statistical Genomics: Methods and Protocols. In Mathé E, Davis S (eds.), chapter “Visualizing Genomic Data Using Gviz and Bioconductor”, 2016; 335-351. *Springer New York*, New York, NY. ISBN 978-1-4939-3578-9.

Hansen KD, Aryee M, Timp W. minfiData: Example data for the Illumina Methylation 450k array. 2018; *R package version 0.29.0*.

Hansen KD, Aryee M. IlluminaHumanMethylation450kmanifest: Annotation for Illumina's 450k methylation arrays. 2012; *R package version 0.4.0*.

Hawi Z., Cummins T. D. R., Tong J., et al. The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry*. 2015; 20(3):289–297.

He F, Todd PK. Epigenetics in nucleotide repeat expansion disorders. *Semin Neurol*. 2011; 31(5):470-83.

Hong JH, Hwang IW, Lim MH, Kwon HJ, Jin HJ. Genetic associations between ADHD and dopaminergic genes (DAT1 and DRD4) VNTRs in Korean children. Genes Genom. 2018; 40(12):1309–1317.

Inoshita M, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Umehara H, Yamamori H, et al. Sex differences of leukocytes DNA methylation adjusted for estimated cellular proportions. *Biol Sex Differ*. 2015; 6:11.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*. 2002; 12(6):996–1006.

Kratochvil CJ, Vaughan BS, Barker A, Corr L, Wheeler A, Madaan V. Review of pediatric attention deficit/hyperactivity disorder for the general psychiatrist. *Psychiatr Clin North Am*. 2009;32(1):39-56.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG. 2019. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg/.

Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6: 108–118.

Li Z., Chang S.H., Zhang L.Y., Gao L., Wang J. Molecular genetic studies of adhd and its candidate genes: A review. *Psychiatry Res*. 2014; 219:10–24.

Lima L de A, Feio-dos-Santos AC, Belangero SI, et al. An integrative approach to investigate the respective roles of single-nucleotide variants and copy-number variants in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Sci. Rep*. 2016; 6,22851.

Liu Y., Fallon L., Lashuel H.A., Liu Z., Lansbury P.T., Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 2002; 111:209–218.

Lyon GJ, Jiang T, Van Wijk R, Wang W, Bodily PM, Xing J. et al. Exom sequencing and unrelated findings in the context of complex disease research: ethical and clinical implications. *Discov Med*. 2011; 12: 41–55.

Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biology*. 2012; 13(6), R44.

Marques SC, Oliveira CR, Pereira CM, Outeiro TF. Epigenetics in neurodegeneration: a new layer of complexity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35(2):348-55.

Maschietto M, Bastos LC, Tahira AC, Bastos EP, Euclydes VL, Brentani A, Fink G, de Baumont A, Felipe-Silva A, Francisco RP, et al. Sex differences in DNA methylation of the cord blood are related to sex-bias psychiatric diseases. *Sci Rep.* 2017; 7:44547.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16(3):1215.

Miranda MC, Sinnes EG, Pompeia S, Francisco Amodeo Bueno O. A comparative study of performance in the Conners' Continuous Performance Test between Brazilian and North American children. *J Atten Disord*. 2008; 11(5):588-98.

Morris TJ, Beck S. Analysis pipelines and packages for Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k) data. *Methods*. 2015;72:3–8.

Morris TJ, et al. Champ: 450k chip analysis methylation pipeline. *Bioinformatics*. 2014; 30:428–430.

Neale B.M., Medland S.E., Ripke S., Asherson P., Franke B., Lesch K.P. Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*. 2010; 49(9):884–897.

Nelson ED, Monteggia LM. Epigenetics in the mature mammalian brain: effects on behavior and synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem*. 2011; 96(1):53-60.

Nigg JT, Tannock R, Rohde LA. What is to be the fate of ADHD subtypes? An introduction to the special section on research on the ADHD subtypes and implications for the DSMG-V. *J Clin Child Adolesc Psychol*. 2010; 39:723–725.

Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, Lord RV, Clark SJ, Molloy PL. “De novo identification of differentially methylated regions in the human genome”. *Epigenetics & Chromatin*. 2015; 8,6.

Polanczyk G.V., Salum G.A., Sugaya L.S., Caye A., Rohde L.A. Annual Research Review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *J. Child. Psychol. Psychiatry*. 2015; 56:345–365.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2014; Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Ritchie ME, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.

Rizzutti S, Sinnes EG, Scaramuzza LF, Freitas L, Pinheiro D, Palma SM, et al. Clinical and neuropsychological profile in a sample of children with attention deficit hyperactivity disorders. *Arq Neuropsiquiatr*. 2008; 66(4):821-7.

Schuch V., Utsumi D.A., Costa T.V.M.M., Kulikowski L.D., Muszkat M. Attention deficit hyperactivity disorder in the light of the epigenetic paradigm. *Front. Psychiatry*. 2015; 6:126.

Sharp SI, McQuillin A, Gurling HM. Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropharmacology*. 2009;57(7-8):590-600.

Simon V, Czobor P, Balint S, Meszaros A, Bitter I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br. J. Psychiatry*. 2009; 194:204–211.

Stefanatos G. A., Baron I. S. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a neuropsychological perspective towards DSM-V. *Neuropsychology Review*. 2007; 17(1):5–38.

Steinhausen HC. The heterogeneity of causes and courses of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 2009; 120(5):392-9.

Sun L, Lin J, Du H, Hu C, Huang Z, Lv Z, et al. Gender-specific DNA methylome analysis of a Han Chinese longevity population. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:1–9.

Thapar A., Langley K., Owen M.J., O'Donovan M.C. Advances in genetic findings on attention deficit hyperactivity disorder. *Psychol. Med*. 2007; 37:1681–1692.

Thapar A, Cooper M. Attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. 2016; 387:1240-1250.

Thapar A., Cooper M., Rutter M. Neurodevelopmental disorders. *Lancet Psychiatry*. 2017; 4:339–346.

van Dongen, J., Zilhão, N.R., Sugden, K., BIOS Consortium, Hannon, E.J., Mill, J. et al, Epigenome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in adults. *Biol Psychiatry*. 2019; 86:599–607

Walton E, Pingault J-B, Cecil CAM, Gaunt TR, Relton CL, Mill J, Barker ED. Epigenetic profiling of ADHD symptoms trajectories: a prospective, methylome-wide study. *Mol Psychiatry*. 2017; 22: 250–256.

Wenthur, C.J., Classics in chemical neuroscience: methylphenidate, *ACS Chem. Neurosci*. 2016; 1030–1040.

Wiers CE, Lohoff FW, Lee J, Muench C, Freeman C, Zehra A, Marenco S, Lipska BK, et al. Methylation of the dopamine transporter gene in blood is associated with striatal dopamine transporter availability in ADHD: a preliminary study. *Eur J Neurosci*. 2018; 48(3):1884–1895.

Williams N.M., Zaharieva I., Martin A., Langley K., Mantripragada K., Fossdal R., et al. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: A genome-wide analysis. *Lancet*. 2010; 376:1401–1408.

Williams NM, Franke B, Mick E, Anney RJ, Freitag CM, Gill M, et al. Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13.3. *Am J Psychiatry*. 2012; 169(2):195–204.

Wilmot B, Fry R, Smeester L, Musser ED, Mill J, Nigg T, et al. Methylomic analysis of salivary DNA in childhood ADHD identifes altered DNA methylation in VIPR2. *J Child Psychol Psychiatry*. 2016; 57, 152–160.

Wong CC, Caspi A, Williams B, Craig IW, Houts R, Ambler A, et al. A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics*. 2010; 5(6):516-26.

Xu H, Wang F, Liu Y, Yu Y, Gelernter J, Zhang H. Sex-biased methylome and transcriptome in human prefrontal cortex. *Hum Mol Genet*. 2014; 23:1260–70.

Xu Y, Chen XT, Luo, M et al. Multiple epigenetic factors predict the attention deficit/hyperactivity disorder among the Chinese Han children. *Journal of Psychiatric Research*. 2015; 40-50.

Yousefi P, Huen K, Davé V, Barcellos L, Eskenazi B, Holland N. Sex differences in DNA methylation assessed by 450 K BeadChip in newborns. *BMC Genomics*. 2015; 16:911.

Zarrei M, Burton CL, Engchuan W, et al. A large data resource of genomic copy number variation across neurodevelopmental disorders. *NPJ Genom Med*. 2019;4:26.

Zayats T, Athanasiu L, Sonderby I, Djurovic S, Weslyet LT, Tamnes CK, et al. Genome-wide analysis of attention deficit hyperactivity disorder in Norway. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0122501.

Zhou K, Dempfle A, Arcos-Burgos M, Bakker SC, Banaschewski T, Biederman J, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008; 147B(8):1392-8.