

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

## **Metilação Global do DNA em Adultos com Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade**

**Diana Müller**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

**Orientador: Dr. Claiton Henrique Dotto Bau**

**Co-orientador: Dr. Diego Luiz Rovaris**

**Porto Alegre, março de 2021**

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

---

A presente Tese de doutorado foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade Feevale.

Com relação às fontes financiadoras da presente Tese:

- A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- As instituições governamentais que fomentaram a execução do projeto da presente Tese de Doutorado foram: CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) e Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS).

“Quem costuma vir de onde eu sou  
Às vezes não tem motivos pra seguir  
Então levanta e anda, vai, levanta e anda  
Vai, levanta e anda  
Mas eu sei que vai, que o sonho te traz  
Coisas que te faz prosseguir  
Vai, levanta e anda, vai, levanta e anda

Irmão, você não percebeu  
Que você é o único representante  
Do seu sonho na face da terra  
Se isso não fizer você correr, chapa  
Eu não sei o que vai

...

Então serra os punho, sorria  
E jamais volte pra sua quebrada de mão e mente vazias”  
Emicida.

## Agradecimentos

---

Nunca serei capaz de agradecer a tudo e a todos que viabilizaram esse trabalho, afinal:

*“Tudo o que você toca*

*Você muda.*

*Tudo o que você muda*

*Muda você.*

*A única verdade que persiste*

*É a mudança” - Octavia E. Butler*

Mas, brevemente, agradeço a algumas pessoas e eventos que influenciaram de forma direta na elaboração e execução desse trabalho. Agradeço ao professor **Claiton** por ter me recebido no seu grupo de pesquisa e ter sido um grande orientador. Ao **Diego**, por ter me coorientado nesse projeto. À **Bruna, Cibele, Renata, Djenifer e Jaqueline**, pelo apoio e dicas em trabalhos desde meus primeiros momentos no grupo, cresci muito como pesquisadora e como pessoa ao conviver com vocês. Sou grata pelo convívio com pessoas que entraram no grupo depois de mim: **Duda, Júnior, Natasha, Pâmela, Robson e Eduarda**. Agradeço aos demais integrantes do ProDAH adultos e aos pacientes e controles que aceitaram participar desse estudo.

Não posso deixar de agradecer pelas políticas de inclusão de governos anteriores, **Lula** e **Dilma**, que viabilizaram minha permanência em uma universidade. Isso foi uma “janela de oportunidade” na qual vi muitas pessoas, de uma realidade parecida ou ainda menos privilegiada que a minha, usufruir e honrar.

No âmbito pessoal tenho muito a agradecer ao **Lucas** por ter sido meu apoio e fonte inesgotável de afeto, jamais teria chegado a qualquer lugar sem ele. Agradeço também à minha **mãe**.

## Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO I - Introdução</b> .....	<b>11</b>
1.1. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH): Aspectos gerais .....	12
1.2. A etiologia do TDAH .....	15
1.2.1. Fatores genéticos no TDAH .....	15
1.2.2. Fatores ambientais no TDAH .....	19
1.3. Epigenética .....	22
1.3.1. Técnicas que avaliam a metilação do DNA em sítios específicos: abrangência restrita ou ampla .....	26
1.3.2. Técnicas que avaliam a metilação do DNA de forma global .....	27
1.3.3. Outras considerações importantes quanto às técnicas que avaliam a metilação do DNA .....	29
1.4. Metilação global na psiquiatria .....	30
1.5. Metilação global e sexo .....	40
1.6. TDAH à luz da epigenética .....	41
<b>CAPÍTULO II – Justificativa e Objetivos</b> .....	<b>51</b>
2.1. Justificativa .....	52
2.2. Objetivos .....	54
2.2.1. Objetivo geral .....	54
2.2.2. Objetivos específicos .....	54
<b>CAPÍTULO III - The neuroendocrine modulation of global DNA methylation in neuropsychiatric disorders</b> .....	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO IV - Global DNA methylation changes in adults with ADHD and its comorbidity with bipolar disorder</b> .....	<b>60</b>
Introduction .....	63
Methods .....	64
Results .....	67
Discussion .....	68
References .....	70
Supplementary Material .....	85
<b>CAPÍTULO V – Discussão Geral</b> .....	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>95</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>118</b>
Anexo I – Critérios diagnósticos do DSM-5 para o TDAH .....	119
Anexo II – Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética em saúde.....	121
Anexo III– Artigo colaborativo de otimização de protocolo de técnica de HPLC .....	122
Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes) .....	123
Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Controles) .....	125

## Lista de Abreviaturas

---

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais

Mb – Megabase

*DAT1* - Transportador de dopamina

*DRD4* - Receptor de dopamina do tipo D4

*DRD5* - Receptor de dopamina do tipo D5

*5-HTT* - Transportador de serotonina

*SNAP-25* - *Synaptosomal-associated protein 25*

GWAS - *Genome-wide association studies* (Estudo de associação por varredura genômica)

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de nucleotídeo único)

IMpACT - *International Multi-centre persistent ADHD CollaboraTion*

ProDAH-A - Divisão de adultos do Programa de Déficit de Atenção-Hiperatividade

PGC - *Psychiatric Genomics Consortium* (Consórcio de genômica psiquiátrica)

PRS - *Poligenic Risk Score* (Escore de risco poligênico)

SAM - *S-adenosyl methionine* (S-adenosilmetionina)

*5-HTTLPR* - *Serotonin-transporter-linked polymorphic region* (região polimórfica do transportador de serotonina)

DNMTs – *DNA methyltransferases* (DNA metiltransferases)

*5-mC* - *5-methylcytosine* (5-metilcitosina)

*5-hmC* - *5-hydroxymethylcytosine* (5-hidroximetilcitosina)

*DNMT1* - *DNA Methyltransferase 1* (DNA metiltransferase 1)

*DNMT3A* - *DNA Methyltransferase 3 Alpha*

*DNMT3B* - *DNA Methyltransferase 3 Beta*

*TET* - *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*

ncRNAs - *Non-coding RNAs* (RNAs não codificantes)

*HATs* - *Histone acetyltransferases* (histona acetiltransferases/acetiltransferases de histona)

*HDACs - Histone deacetylases* (deacetilases de histona/histona deacetilases)

*KMTs - Histone lysine methyltransferases*

*KDMs - Histone lysine demethylases*

miRNAs - microRNAs

lncRNAs – RNAs não codificantes longos

mRNAs - RNAs mensageiros

DMP – Posições diferencialmente metiladas

DMR - Regiões diferencialmente metiladas

EWAS - *Epigenome wide association studies* (estudo de associação por varredura epigenômica)

RRBS - *Reduced-representation bisulphite sequencing*

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

LINES - *Short interspersed retrotransposable elements*

SINES - *Long interspersed retrotransposable elements*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

*BDNF* - Fator neurotrófico derivado do cérebro

*HTR2C* - *5-hydroxytryptamine receptor 2C*

*HTR1B* - Receptor de serotonina 1B

*MTHFR* - *Methylenetetrahydrofolate reductase*

*NR3C1* - *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1* (receptor de glicocorticóide)

*IGF2* - *Insulin-like growth factor 2*

5-HT3AR – Receptor de serotonina 3A

*COMT* - *Catechol-O-Methyltransferase*

*ANKK1* - *Ankyrin repeat and kinase domain containing 1*

*NGFR* - *Nerve growth factor receptor*

*VIPR2* - *Vasoactive intestinal peptide receptor 2*

*EPX* - *Eosinophil peroxidase*

*ST3GAL3* - *ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 3*

*PEX2* - *Peroxisomal biogenesis factor 2*

*ELF3 - E74 Like ETS Transcription Factor 3*

*ZNF454 - Zinc finger protein 454*

*ZNF544 - Zinc finger protein 544*

*CREB1 - CAMP Responsive Element Binding Protein 1*

*ZBTB38 - Zinc finger and BTB domain containing 38*

*PPIL1 - Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1*

*TRERF1 - Transcriptional regulating factor 1*

*ERC2 - ELKS/RAB6-Interacting/CAST family member 2*

*APOB - Apolipoprotein B*

*LPAR5 - Lysophosphatidic acid receptor 5*

*AGAP1 - ArfGAP with GTPase domain, Ankyrin repeat and PH domain 1*

*PCNXL3 - Pecanex 3*



## Lista de Figuras e Tabelas

---

**Tabela 1:** Sintomas de TDAH de acordo com a quinta versão do DSM (DSM-5).

**Tabela 2:** Estudos que avaliaram níveis de metilação global do DNA em pacientes com os principais transtornos psiquiátricos: esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão e ansiedade (excluindo-se transtorno do espectro autista, devido a sua extrema heterogeneidade clínica e etiológica).

**Tabela 3:** Estudos de alcance epigenômico conduzidos com relação ao TDAH até 30 de dezembro de 2020.

**Figura 1:** Representação dos três mecanismos epigenéticos descritos até o momento.

## Resumo

---

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é uma condição altamente prevalente e que frequentemente coocorre com outros transtornos psiquiátricos. Embora a herdabilidade total do TDAH seja estimada em torno de 80%, a proporção da variabilidade fenotípica explicada por variantes genéticas comuns é de  $\approx 20\%$ . Isso indica que muito da contribuição genética ao TDAH se deve a outros tipos de efeitos potencialmente herdáveis, entre eles os mecanismos epigenéticos, os quais atuam na intersecção entre o contexto genômico e ambiental dos indivíduos, alterando o perfil de expressão gênica e então influenciando no status de saúde-doença. Nesse sentido, a presente Tese busca compreender a influência da metilação do DNA, a marca epigenética mais amplamente estudada no TDAH de adultos e em suas comorbidades. Em colaboração com a Feevale, a Tese viabilizou a otimização de protocolos de avaliação de níveis globais de metilação do DNA (GMe) através da técnica de HPLC. Com base em evidências de que a GMe pode refletir influências fisiológicas pervasivas, propomos a regulação neuroendócrina da GMe como um mecanismo pelo qual o estresse ambiental poderia influenciar de forma duradoura e sistêmica os fenótipos psiquiátricos. Apresentamos também o primeiro trabalho a explorar níveis de GMe no TDAH contando com uma amostra de 394 casos adultos (idade média = 34 anos) e 390 controles (idade média = 29 anos). Ainda avaliamos como escores de risco poligênico poderiam influenciar em tal medida. Dessa maneira, pela avaliação de GMe, observou-se que pacientes com TDAH apresentam um estado global de hipometilação, especialmente em mulheres. Já quando em comorbidade com transtorno bipolar (representando um estado de maior gravidade) se relacionou com um estado de GMe aumentado. Com relação aos PRS baseados em GWAS de TDAH, o grupo de alto PRS para TDAH mostrou-se associado a níveis mais baixos de GMe quando a análise foi controlada para BD. O PRS de BD também foi no sentido dos achados clínicos, com os pacientes com TDAH com maiores PRS de BD sendo associados com maiores níveis de GMe. Considerando a alta complexidade do fenótipo TDAH, a presente Tese é parte do início dos esforços científicos no sentido de uma avaliação das bases epigenéticas do transtorno.

## Abstract

---

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a highly prevalent condition that frequently co-occurs with other psychiatric disorders. Although the total ADHD heritability is  $\approx 80\%$ , the proportion of the phenotypic variance explained by common genetic variants is only  $\approx 20\%$ . It indicates that much genetic influence on ADHD is due to other heritable effects, including epigenetics, which act in the intersection between the subject's genetic and environmental context, changing the gene expression profile and influencing health-disease status. In this sense, the present Thesis sought to understand the influence of DNA methylation, the most studied epigenetic mark, in adulthood ADHD and its comorbidities. In collaboration with Feevale, the Thesis make possible the optimization of global DNA methylation (GMe) evaluation protocols through HPLC technique. Considering evidences that GMe could reflect pervasive physiologic influences, we propose the neuroendocrine regulation of GMe as a mechanism by which environmental stress could influence psychiatric phenotypes in a lasting and systemic way. We also present the first study to explore GMe levels in ADHD with a sample of 394 cases (mean age = 34 years old) and 390 controls (mean age = 29 years old). In addition, we evaluated how polygenic risk scores could influence this measure. Thus, by assessing GMe, it was observed that patients with ADHD have a global state of hypomethylation, especially in women. When in comorbidity with bipolar disorder (representing a state of greater severity) it was related to an increased GMe state. Regarding GWAS-based PRS for ADHD, the high PRS group for ADHD was associated with lower levels of GMe when the analysis was controlled for BD. BD PRS was also in the sense of the clinical findings, with ADHD patients with higher BD PRS being associated with higher levels of GMe. Considering the high complexity of the ADHD phenotype, this Thesis is part of the beginning of scientific efforts towards an evaluation of the epigenetic bases of the disorder.

# Capítulo I

## Introdução

---

## 1.1. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH): Aspectos gerais

---

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns tanto na infância quanto na vida adulta em todo o mundo (Kessler et al., 2006). Estima-se que a prevalência do TDAH em crianças em idade escolar esteja em torno de 5,9 – 7,1%, persistindo durante a adolescência e vida adulta na maioria dos casos (50 – 80%) (Kessler et al., 2006; Polanczyk and Rohde, 2007) e contribuindo para que cerca de 2,5 – 5% dos indivíduos adultos sejam afetados (Fayyad et al., 2017; Simon et al., 2009; Vitola et al., 2017). De acordo com a quinta versão do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-5), trata-se de um transtorno do neurodesenvolvimento (American Psychiatric Association, 2013), porém dados recentes de nosso grupo (Breda et al., 2020) têm corroborado achados anteriores (Caye et al., 2016; Moffitt et al., 2015) de que o TDAH pode, na verdade, surgir também na vida adulta, ou seja, sem manifestação anterior na infância. Conforme o modelo utilizado, Breda et al. (2020) demonstraram que na coorte de Pelotas, acessando 4676 indivíduos nascidos a partir de 1993, a maioria (67-78%) dos indivíduos acessados aos 22 anos tinham uma trajetória neurodesenvolvimental, enquanto os demais apresentaram uma trajetória crescente de sintomas que se iniciava após a puberdade. Esse trabalho também demonstrou que uma trajetória persistente é mais comum no sexo masculino, ao passo que o início tardio (após puberdade) foi associado com o sexo feminino.

Essa variação nas trajetórias conforme o sexo do indivíduo evidencia outra característica distintiva entre o TDAH na infância e na vida adulta: a prevalência diferencial entre meninos e meninas *versus* entre homens e mulheres. A literatura das últimas duas décadas acumulou evidências de que a proporção de TDAH com relação ao sexo está na faixa de 1 menina afetada para cada 2 - 10 meninos afetados (Arnett et al., 2015; Biederman et al., 2002; Magnin and Maurs, 2017; Mowlem et al., 2019; Nøvik et al., 2006; Willcutt, 2012). Essa disparidade de prevalência de acordo com o sexo reduz abruptamente em adultos, com uma proporção estimada de 1 mulher para cada 1.6 homens com TDAH (Willcutt, 2012). Assim, sugeriu-se que essas diferenças ao longo do desenvolvimento poderiam ser

justificadas pela persistência diferencial (Biederman et al., 2010a, 2010b; Hinshaw et al., 2012) ou mesmo pela diferença de tipo de apresentação do TDAH, em que mulheres mais comumente demonstram a apresentação de desatenção (menos perceptível aos pais e professores, que são os indivíduos que costumam relatar os sintomas no período da infância), enquanto homens a de hiperatividade/impulsividade (muito mais perceptível no ambiente externo e, conseqüentemente, mais precocemente reportados) (Li et al., 2019; Willcutt, 2012).

Então o TDAH é caracterizado por sintomas de déficits de atenção, organização, e/ou hiperatividade-impulsividade inapropriados para a idade daquele indivíduo (American Psychiatric Association, 2013). O diagnóstico de TDAH é tipicamente determinado por um psiquiatra com base no número, gravidade e duração dos sintomas observados. Sendo assim, é necessária a presença de ao menos seis (no caso de crianças e adolescentes) ou 5 (no caso de adultos) sintomas (**Tabela 1**) em pelo menos um dos dois domínios (desatenção ou hiperatividade/impulsividade), além de que tais sintomas devem estar presentes nos últimos 6 meses e devem representar prejuízo em no mínimo dois diferentes contextos da vida, tais como desempenho ocupacional e/ou acadêmico, qualidade das relações familiares e até mesmo situações de lazer (American Psychiatric Association, 2013).

Também é muito comum que pacientes com TDAH apresentem algum outro transtorno psiquiátrico ao longo da vida quando comparados com a população em geral (66,2 – 77,1% vs. 45,7%) (Luo et al., 2019; Piñeiro-Diequez et al., 2016; Sobanski et al., 2007). Dentre as condições comórbidas mais comuns podemos citar os transtornos por uso de substâncias (39,2%), os transtornos de ansiedade (23%) e os transtornos de humor (18,1%) (Garcia et al., 2012; Kessler et al., 2006; Piñeiro-Diequez et al., 2016). Essas condições psiquiátricas, além de outras, podem dificultar tanto o diagnóstico como o tratamento do TDAH.

Portanto, tendo em vista a diversidade de combinações de sintomas do próprio TDAH, bem como a série de possíveis transtornos que podem se apresentar em comorbidade com ele, além da influência do sexo do indivíduo na apresentação geral, pode-se afirmar que o TDAH é caracterizado por uma grande heterogeneidade clínica (Franke et al., 2011; Luo et al., 2019; Steinhausen, 2009).

**Tabela 1.** Sintomas de TDAH de acordo com a quinta versão do DSM (DSM-5).

<b>1. Desatenção</b>	
<b>a.</b>	Frequentemente não presta atenção em detalhes ou comete erros por descuido em tarefas escolares, no trabalho ou durante outras atividades (e.g. é negligente ou deixa passar detalhes, o trabalho é impreciso).
<b>b.</b>	Frequentemente tem dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas (e.g. dificuldade de manter o foco durante aulas, conversas ou leituras prolongadas).
<b>c.</b>	Frequentemente parece não escutar quando alguém lhe dirige a palavra diretamente (e.g. parece estar com a cabeça longe, mesmo na ausência de qualquer distração óbvia).
<b>d.</b>	Frequentemente não segue instruções até o fim e não consegue terminar trabalhos escolares, tarefas ou deveres no local de trabalho (e.g. começa as tarefas, mas rapidamente perde o foco e facilmente perde o rumo).
<b>e.</b>	Frequentemente tem dificuldade para organizar tarefas e atividades (e.g. dificuldade em gerenciar tarefas sequenciais; dificuldade em manter materiais e objetos pessoais em ordem; trabalho desorganizado e desleixado; mau gerenciamento do tempo; dificuldade em cumprir prazos).
<b>f.</b>	Frequentemente evita, não gosta ou reluta em se envolver em tarefas que exijam esforço mental prolongado (e.g. trabalhos escolares ou lições de casa, preparo de relatórios, preenchimento de formulários, revisão de trabalhos longos).
<b>g.</b>	Frequentemente perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (e.g. materiais escolares, lápis, livros, instrumentos, carteiras, chaves, documentos, óculos, celular).
<b>h.</b>	Com frequência é facilmente distraído por estímulos externos ou pensamentos não relacionados.
<b>i.</b>	Com frequência é esquecido em relação a atividades cotidianas (e.g. realizar tarefas, obrigações, retornar ligações, pagar contas, manter horários agendados).
<b>2. Hiperatividade e Impulsividade</b>	
<b>a.</b>	Frequentemente remexe ou batuca as mãos ou os pés ou se contorce na cadeira.
<b>b.</b>	Frequentemente se levanta da cadeira em situações em que se espera que permaneça sentado (e.g. sai do seu lugar em sala de aula, no escritório ou em outro local de trabalho ou em outras situações que exijam que se permaneça em um mesmo lugar).
<b>c.</b>	Frequentemente corre ou sobe nas coisas em situações em que isso é inapropriado (ou, em adolescentes ou adultos, sensações de inquietude).
<b>d.</b>	Com frequência é incapaz de brincar ou se envolver em atividades de lazer calmamente.
<b>e.</b>	Com frequência “não para”, agindo como se estivesse “com o motor ligado” (e.g. não consegue ou se sente desconfortável em ficar parado por muito tempo, como em restaurantes, reuniões; outros podem ver o indivíduo como inquieto ou difícil de acompanhar).
<b>f.</b>	Frequentemente fala demais.
<b>g.</b>	Frequentemente deixa escapar uma resposta antes que a pergunta tenha sido concluída (e.g. termina frases dos outros, não consegue aguardar sua vez de falar).
<b>h.</b>	Frequentemente tem dificuldade para esperar a sua vez (e.g. aguardar em uma fila).
<b>i.</b>	Frequentemente interrompe ou se intromete (e.g. mete-se nas conversas, jogos ou atividades; pode começar a usar as coisas de outras pessoas sem pedir ou receber permissão; intromete-se ou assume o controle sobre o que outros estão fazendo).

## **1.2. A etiologia do TDAH**

A ampla variedade fenotípica do TDAH é reflexo da quantidade de componentes que podem influenciar a manifestação final do transtorno. O panorama que se apresenta é semelhante ao de outros transtornos psiquiátricos, nos quais sua manifestação é resultado de uma imbricada combinação de fatores genéticos e ambientais que alteram o desenvolvimento cerebral e culminam em alterações tanto de ordem estrutural quanto funcional (Faraone and Larsson, 2019; Hawi et al., 2015).

### **1.2.1. Fatores genéticos no TDAH**

Historicamente, estudos conduzidos em famílias têm destacado a agregação familiar como um atributo do TDAH (Chen et al., 2017, 2008). Apesar dessa característica ser um bom indicativo de contribuição genética ao transtorno, ela não possibilita que se isole o quanto dessa coincidência se originou em função do compartilhamento genético entre irmãos ou em virtude de exposições ambientais em comum. A confirmação de que o aspecto familiar do TDAH se dá pela participação genética na etiologia do transtorno foi possível em função da realização de estudos com gêmeos e pessoas adotadas (Faraone and Larsson, 2019). Os estudos com adotados permitiram observar que a condição é mais frequente entre pais biológicos de crianças com TDAH do que entre os pais adotivos, sendo o risco dos pais adotivos similar aos de pais biológicos de crianças controle (Sprich et al., 2000). Já as evidências obtidas por intermédio de estudos de gêmeos, além de reiterarem a participação genética no transtorno, ainda possibilitam uma estimativa do quanto a susceptibilidade do transtorno se deve a este componente. Essa parcela, chamada de herdabilidade, é considerada alta no TDAH, situando-se entre 70% e 80% tanto em crianças quanto em adultos de diferentes localidades (Chang et al., 2013; Faraone et al., 2005; Faraone and Larsson, 2019; Merwood et al., 2013). Sendo assim, os fatores genéticos podem ser considerados como os principais componentes de risco ao TDAH e muitos



trabalhos com diferentes abordagens têm sido conduzidos na tentativa de revelar variantes genéticas potencialmente envolvidas na manifestação desse transtorno.

As primeiras linhas de investigação tiveram sua maior relevância como geradoras de hipóteses durante a fase anterior às tecnologias genômicas. Um dos primeiros métodos utilizados foi o de estudo de ligação genética, o qual testa se a transmissão de determinado segmento do DNA coincide com a passagem do transtorno dentro de famílias. Os diferentes trabalhos conduzidos a partir dessa perspectiva encontraram pouca sobreposição de achados. Isso pode ser evidenciado por intermédio de uma meta-análise que encontrou apenas uma ligação significativa ao nível genômico, compreendendo uma região do cromossomo 16 entre 16 e 64 Mb (Zhou et al., 2008). Apesar desse achado isolado, após correção genômica, também foram destacadas outras nove regiões com sugestão nominal de ligação. Tanto os resultados de meta-análises quanto de estudos independentes foram uma importante fonte geradora de hipóteses sobre quais as variantes genéticas que poderiam estar influenciando na manifestação final do TDAH.

Outro estoque de pressuposições foi obtido ao se considerar genes com potencial participação na etiologia do transtorno com base nas funções cerebrais prejudicadas em pacientes. De posse deste arcabouço conjectural, os estudos do tipo gene candidato ganharam espaço. Porém mesmo nesta modalidade de pesquisa, com uma base de evidências prévias forte, foi, e continua sendo, comum encontrar tanto achados positivos quanto negativos para os mesmos polimorfismos. Novamente, meta-análises se fizeram muito importantes na tentativa de criar um panorama mais sólido da contribuição de cada variante analisada em trabalhos independentes. Uma das meta-análises mais importantes detectou diversos achados positivos para uma série de genes da via dopaminérgica, como por exemplo o transportador de dopamina (*DAT1*) e os receptores de dopamina do tipo D4 (*DRD4*) e do tipo D5 (*DRD5*), além de genes componentes de outras vias como o transportador de serotonina (*5-HTT*) da via serotoninérgica e o gene da proteína associada ao sinaptossomo 25 (*SNAP-25*), um dos responsáveis pela transmissão sináptica (Gizer et al., 2009).

Aos poucos, os estudos de associação envolvendo genes candidatos passaram a dividir espaço com abordagens de amplitude genômica. Os estudos de associação por varredura genômica (*genome wide association study* - GWAS) têm sido as abordagens mais priorizadas pelos grandes consórcios da atualidade. Isso porque possibilitam a análise concomitante de milhares de variantes comuns ao longo do genoma. Este tipo de estudo conta com a vantagem de não levar em consideração hipóteses prévias, tendo o potencial de identificar qualquer variante associada ao transtorno. Contudo essa vantagem esbarra na mais forte limitação desta técnica: a dificuldade em se alcançar tamanhos amostrais que permitam detectar o pequeno efeito dos SNPs individuais (Rietveld et al., 2014) e que as associações permaneçam significativas após a correção para o enorme número de SNPs testados – atualmente na ordem de milhões (valor de  $P = 5 \times 10^{-8}$ ). Visto que grupos de pesquisa individuais provavelmente não alcançariam um tamanho amostral viável, é comum que diferentes centros, muitas vezes espalhados pelo mundo, se unam em consórcios na tentativa de contornar tal dificuldade. Um exemplo de tal iniciativa é o IMpACT – *International Multi-centre persistent ADHD CollaboraTion*, do qual nosso grupo, o ProDAH (Programa de Transtornos de Déficit de Atenção/Hiperatividade), faz parte. O último artigo publicado sobre GWAS em amostras de TDAH foi uma meta-análise que envolveu 20.183 pacientes e 35.191 indivíduos controle, e assim se detectaram os primeiros 12 loci associados com o transtorno (Demontis et al., 2019). Esse estudo é de autoria do *Psychiatric Genomics Consortium* (PGC), do qual o IMpACT, e, conseqüentemente, o PRODAH, fazem parte. Até então, estudos prévios com tamanho amostral inferior não haviam encontrado qualquer associação significativa (Franke et al., 2009; Neale et al., 2010). Vale destacar que, de posse dos resultados identificados em GWAS, de certa forma voltamos a avaliar tais achados como “genes candidatos”, uma vez que a associação em si pouco informa sobre os mecanismos moleculares envolvidos ou mesmo sobre quais variantes teriam efeito funcional. Além disso, para avaliar esses achados detalhadamente em amostras específicas (ex. farmacogenômica ou neuroimagem), que apresentam tamanho amostral reduzido, e manter poder estatístico, é necessário trabalhar com grupos mais homogêneos

e, dessa forma, reduzir uma porção da alta heterogeneidade fenotípica comum aos transtornos psiquiátricos.

Os GWAS realizados por diferentes grupos viabilizam outros tipos de análises por intermédio do compartilhamento de dados chamados estatísticas sumárias. Essas informações são disponibilizadas em plataformas como o GWASATLAS (disponível no domínio: <https://atlas.ctglab.nl/>). Um exemplo de investigação que pode ser realizada com esses dados é o cálculo de escore de risco poligênico (PRS) (Wray et al., 2014). Essa análise permite que se estime o escore de risco poligênico que os indivíduos de um GWAS chamado alvo/teste (*target*) possuem para apresentar determinada característica com base nas estatísticas sumárias (como *odds ratio*, p-valor de cada SNP) de um GWAS de descoberta (*discovery*). No método clássico de PRS, o escore de risco poligênico é calculado na amostra *target* pela soma dos alelos de risco do indivíduo para cada SNP, levando em consideração o peso da contribuição daquele SNP para o fenótipo com base no GWAS *discovery* (Choi et al., 2020). Essa forma de análise permite testar a etiologia compartilhada entre diferentes fenótipos e o valor preditivo de dados genéticos sobre desfechos clínicos, além de ser uma maneira de se obter os riscos genéticos relativos para cada indivíduo da amostra (Choi et al., 2020). Essa abordagem demonstrou sobreposições genéticas entre diversos transtornos (The Brainstorm Consortium, 2018; Wendt et al., 2020) e com relação ao TDAH se observou que seu risco se sobrepunha ao de apresentar maior índice de massa corporal, neuroticismo, transtornos de ansiedade e de depressão, uso de nicotina, se expor a situações arriscadas (Rietz et al., 2018), esquizofrenia, transtorno bipolar, transtorno do estresse pós-traumático e Síndrome de Tourette, entre outros (The Brainstorm Consortium, 2018). Isso reforça a característica de heterogeneidade clínica e de poligenicidade dos transtornos (Wendt et al., 2020).

Embora os atuais estudos genômicos no campo da genética psiquiátrica estejam se direcionando às varreduras genômicas, a fração da herdabilidade dos transtornos explicada por essa abordagem é baixa. No caso do TDAH, a chamada herdabilidade de SNPs, que representa o quanto da variabilidade fenotípica pode ser explicada por variantes genéticas comuns do tipo nucleotídeo único, é de cerca de 22% (Demontis et al., 2019). Esse valor é bem menor do que a herdabilidade do

TDAH obtida por estudos de gêmeos, os quais levam em consideração todos os fatores herdáveis independentemente de sua origem. Dessa forma, para além do aumento do tamanho amostral, esse dado sugere a participação de outros tipos de variantes genéticas, diferentes tipos de interação entre elas (que podem resultar em efeitos aditivos ou multiplicativos), além da contribuição de variantes não genéticas também herdáveis (herança epigenética) (Faraone and Larsson, 2019; Guintivano and Kaminsky, 2016; Hawi et al., 2015). Esses fatores de risco à patologia psiquiátrica entram em contato com fatores de risco ambiental, resultando nas inúmeras combinações possíveis que contribuem para os diferentes graus de comprometimento dos vários desfechos psiquiátricos observados. Tal proposição é consistente com a característica não mendeliana dos transtornos psiquiátricos (Kaminsky et al., 2006; Petronis, 2010, 2001) e de discordância entre gêmeos monozigóticos (Kaminsky et al., 2009).

### **1.2.2. Fatores ambientais no TDAH**

Além das evidências de associação genética com o TDAH, há um crescente acúmulo de evidências sobre componentes ambientais que podem modificar o risco em relação a esse transtorno. Apesar da abundância de esforços de pesquisa no sentido de investigar os potenciais fatores ambientais de risco ou proteção ao TDAH, e de haver diversas evidências de associação por estudos individuais, a consistência e magnitude dos diferentes componentes ambientais permanece pouco clara. A revisão mais abrangente sobre o tema, até o momento da escrita deste texto, abarcou a análise de 35 artigos (apenas revisões sistemáticas que forneciam meta-análises de estudos observacionais que testavam associações de fatores de risco/proteção ambiental ou biomarcadores periféricos foram incluídos) (Kim et al., 2020). Os trabalhos selecionados renderam 63 meta-análises, compreendendo 40 fatores de risco ou proteção ambiental e 23 marcadores periféricos. Esse grande trabalho hierarquizou os fatores de acordo com sua força de evidência, baseando-se nos valores de p do modelo de efeitos randômicos além de outros critérios meta-analíticos, em 5 classes: I) convincente, II) altamente sugestivo, III) sugestivo, IV) fraco e V) não significativo. Apenas 9 associações

foram consideradas nas classes de alta evidência de credibilidade (I e II), sendo que uma forte evidência de associação (classe I) entre o TDAH e os seguintes fatores ambientais foi destacada: obesidade materna anterior à gravidez, transtornos de hipertensão da mãe, uso materno do paracetamol durante a gravidez, pré-eclâmpsia e eczema infantil. Outros fatores foram altamente sugestivos de associação (fumo materno durante a gravidez, asma na infância, sobrepeso materno anterior à gravidez e baixa concentração de vitamina D no soro).

Mesmo que o trabalho de Kim e colaboradores tenha sido um grande esforço no sentido de verificar de forma mais robusta associações entre fatores ambientais (sujeitos a diversos confundidores) e um transtorno multifatorial com alta heterogeneidade clínica, diversas limitações podem ter suprimido a identificação de fatores que são genuinamente associados ao TDAH. Por exemplo, indivíduos que usam álcool apresentam chance aumentada de uso de tabaco (Kessler et al., 1997; Roche et al., 2019). Dessa forma, o efeito não significativo encontrado para uso de álcool durante a gestação na revisão de Kim (2020) poderia na realidade existir e ter sido mascarado pelo efeito do tabaco materno. Assim, além de considerar a força das evidências em si, é importante considerar o potencial que as exposições têm de desajustar vias biológicas essenciais ao funcionamento cerebral. Vamos continuar com o exemplo do tabaco e do álcool, que são substâncias de uso relativamente comum e que já tiveram mecanismos de atuação relacionados ao TDAH propostos. Enquanto a exposição ao tabaco durante o período gestacional leva à dessensibilização dos receptores nicotínicos no cérebro fetal com alteração da liberação de dopamina, acetilcolina, norepinefrina, serotonina, glutamato e de GABA (Brunzell et al., 2016; Pauly and Slotkin, 2008; Silva et al., 2010), o álcool desencadeia uma redução neuronal com consequente diminuição na síntese dopaminérgica, menos sítios de captação e sítios de ligação a receptores em áreas mesolímbicas/corticais (Froehlich et al., 2011; Goodlett et al., 2001; Wang et al., 2006). De forma geral, a exposição pré-natal a ambas as substâncias foi associada com risco ao TDAH (Banerjee et al., 2007; Motlagh et al., 2010; Nomura et al., 2011) e tem mecanismos de envolvimento plausíveis na sua etiologia.

Além do tabaco e do álcool, também foram realizados estudos com uma série de outras drogas como cocaína, anfetaminas e heroína, evidenciando um provável papel delas na etiologia do transtorno (Eriksson and Steneroth, 2000; Linares et al., 2006; Ornoy et al., 1996; Williams and Ross, 2007). Outras exposições, como ao chumbo (Cho et al., 2010; Nicolescu et al., 2010; Nigg et al., 2011), manganês (Farias et al., 2010), organofosfatos (Bouchard et al., 2010; Marks et al., 2010), níveis baixos de folato no sangue materno (Schlotz et al., 2010), estresse materno durante a gestação (Li et al., 2011; Martini et al., 2010), e uso de contraceptivos hormonais durante ou mesmo antes da gestação (Hemmingsen et al., 2020), entre outros fatores, também se mostraram como prováveis contribuintes à manifestação do TDAH. Da lista acima vale citar que hormônios sexuais e do sistema de estresse são importantes reguladores da expressão gênica (Khramtsova et al., 2019; Krontira et al., 2020) e que há uma evidente prevalência diferencial de comorbidades psiquiátricas com o TDAH relacionadas com o sexo do indivíduo (Ottosen et al., 2019). Quanto à deficiência de folato, também é interessante destacar que esta vitamina está associada com a síntese dos neurotransmissores serotonina e dopamina pela produção do co-fator tetrahidrobiopterina (Wagner, 2001), e é a precursora da S-adenosilmetionina (SAM), o principal doador de grupamentos metila no processo de metilação do DNA (Cridler et al., 2018, 2012). Assim, o papel do folato no TDAH pode se dar tanto pelo seu papel na neurotransmissão como também por fatores epigenéticos a ser mencionados a seguir (Faraone and Larsson, 2019).

É importante destacar que nem sempre se faz possível desvencilhar a participação das exposições em si dos efeitos genéticos e dos confundidores psicossociais (Froehlich et al., 2011; Guney et al., 2015). De fato, há grande dificuldade de se conectar fatores ambientais a fenótipos de maneira geral, uma vez que o contexto genético é capaz de tamponar ou ampliar o risco associado a determinada exposição. Para além disso, o efeito entre genes e exposições ambientais é simultâneo. Há tanto a resposta da variação genotípica do indivíduo com relação ao ambiente (interação) quanto a resposta do ambiente, que o próprio sujeito “seleciona/molda/manipula” em função de suas características genéticas (correlação) (Plomin, 2014). Um exemplo clássico de interação foi verificado por

Caspi e colaboradores. Em um estudo de coorte verificou-se que experiências estressantes eram capazes de levar alguns indivíduos, mas não todos, ao fenótipo de depressão. Os autores testaram então a hipótese de interação gene-ambiente entre um polimorfismo da região promotora do transportador de serotonina (o 5-HTTLPR) e maus tratos na infância (Caspi et al., 2003). O modelo de interação demonstrou que a exposição aos maus tratos foi capaz de prever depressão naqueles indivíduos que portavam o alelo curto (S e SS), mas sem apresentar influência sobre os que eram homozigotos para o alelo longo (LL). Dessa forma, fica evidente a necessidade de utilizar métodos capazes de congrega os diferentes efeitos de interação gene-gene e gene-ambiente na tentativa de se aproximar da real arquitetura de susceptibilidade aos transtornos psiquiátricos.

### 1.3. Epigenética

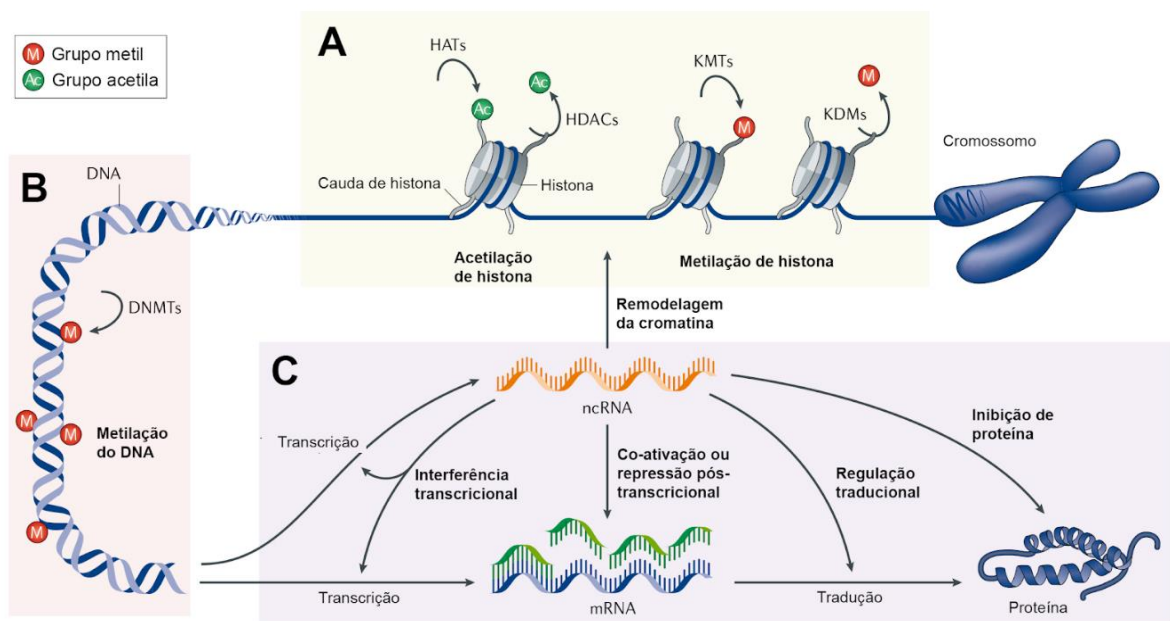
Há uma série de sistemas que são capazes de converter influências ambientais em um padrão diferencial de expressão gênica, os quais são chamados de modificações epigenéticas. Este termo foi primeiramente utilizado por Conrad Waddington como sendo um “ramo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus produtos que trazem o fenótipo ao ser” (Waddington, 1942) e envolvia a existência de mecanismos de herança para além da genética padrão (Bard, 2009). Após diversas revisões, a definição de epigenética permanece sob debate, mas, para fins alusivos, pode-se dizer que são alterações genéticas herdáveis que não envolvem alterações na sequência de nucleotídeos do DNA (Wu and Morris, 2001).

Até o momento são três os principais sistemas epigenéticos propostos: o de metilação do DNA, os diferentes tipos de modificações de proteínas histônicas e os RNAs não codificantes (Egger et al., 2004; Lacal and Ventura, 2018; Al Aboud et al. 2020) **Figura 1**. Dentre estes, a metilação do DNA é a modificação epigenética mais amplamente estudada (Lee and Herceg, 2017). Isso provavelmente se deve ao seu envolvimento em diversos papéis biológicos como *imprinting* genômico (Barlow, 2011), silenciamento de elementos transponíveis (Yoder et al., 1997), diferenciação celular (Meissner et al., 2008), desenvolvimento embrionário (Reik,

2007) e inflamação (Notley et al., 2017). Em vertebrados, é mais comum que a metilação ocorra na base citosina no contexto de sequência 5' CpG 3' (Li and Zhang, 2014). Essa alteração consiste em um processo químico não espontâneo no qual uma enzima da família das DNA metiltransferases (DNMTs) adiciona um grupo metil do substrato S-adenosilmetionina (SAM) ao quinto carbono de um resíduo de citosina, a qual passa a se chamar 5-metilcitosina (5-mC) (Crider et al., 2018; Greenberg and Bourc'his, 2019). A configuração de dinucleotídeo CpG viabiliza a simetria de metilação em ambas as fitas do DNA e sua manutenção após a replicação do DNA. A preservação dessa marca ocorre por intermédio da ação da enzima DNMT1 – conhecida como DNA metilase de manutenção. Ela tem a capacidade de reconhecer o estado hemi-metilado das fitas de DNA que recém passaram por replicação e então reproduzir o estado de metilação da fita “mãe” na fita “filha” recém sintetizada (Bestor, 2000). Dessa forma, a metilação do DNA pode ser considerada uma marca estável. Ainda, existem outras DNMTs, como a DNMT3a e DNMT3b, que são capazes de estabelecer a adição de marcas de metilação em sítios CpG que até então não eram metilados, sendo chamadas de DNA metilases *de novo* (Moore et al., 2013). Por outro lado, há pelo menos uma família de enzimas responsáveis pela demetilação ativa das 5-mC as TET (*ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*) (Wu and Zhang, 2014) que faz a conversão de 5-mC no seu intermediário de demetilação 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (Tahiliani et al., 2009).

Dada a existência desse delicado balanço entre estabilidade e plasticidade e sua participação em diversos processos biológicos, não é de se surpreender que alterações na metilação do DNA estejam envolvidas em uma variedade de doenças humanas (Robertson, 2005; Suzuki and Bird, 2008). De fato, alterações na metilação do DNA foram reportadas para câncer (Baylin and Jones, 2011) e diversas outras doenças (Feinberg, 2007), incluindo as psiquiátricas (Guintivano and Kaminsky, 2016; Liu et al., 2018; Ptak and Petronis, 2010). Além disso, o padrão de metilação do DNA tem sido considerado como um registro das exposições ambientais ao longo da vida dos indivíduos e um possível biomarcador a ser avaliado no diagnóstico de doenças (Leenen et al., 2016; Martin and Fry, 2018).





**Figura 1.** Figura adaptada de Joosten et al. (2018) onde os três mecanismos epigenéticos descritos até o momento estão representados. **A)** Modificações pós-traducionais de resíduos em caudas de histonas. **B)** Metilação do DNA por enzimas DNA metilases (DNMTs). **C)** RNAs não codificantes (ncRNAs). **A** e **B** atuam em conjunto na regulação da expressão gênica por controlarem o estado de condensação/relaxamento da cromatina e, conseqüentemente, modificarem a acessibilidade dos fatores de transcrição e outros reguladores ao DNA. A acetilação de caudas de histonas pelas acetiltransferases de histona (HATs) levam à conformação de cromatina aberta. Este estado possibilita que a transcrição ocorra uma vez que a maquinaria transcricional tem acesso a seus sítios de ligação no DNA. A adição covalente de grupamentos metila em promotores gênicos leva ao recrutamento de desacetilases de histona (HDACs), as quais removem os grupamentos acetila das caudas de histonas. Isso resulta na compactação da cromatina e dificulta o acesso do DNA à maquinaria transcricional. Outras marcas nas caudas histônicas podem levar tanto à ativação ou repressão transcricional. No caso representado, metilação de caudas de histona, o processo é realizado por lisina metiltransferases (KMTs) e histona-lisina demetilases (KDMs). **C)** Os ncRNAs compreendem os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência, e ncRNAs longos (lncRNAs). O pareamento de miRNAs com as seqüências complementares em RNAs mensageiros (mRNAs) alvo é capaz de inibir a tradução. Os níveis de expressão de certos miRNAs podem ser regulados pela metilação do DNA de seus promotores. ncRNAs regulam a expressão gênica por: remodelagem da cromatina, co-ativação ou repressão transcricional, modificações pós-transcricionais (inibindo a tradução e ação de proteínas). Todos os mecanismos epigenéticos interagem entre si e regulam uns aos outros, formando uma rede imbricada que tem como resultado a regulação da expressão gênica.

As diferenças de metilação do DNA, causadoras ou decorrentes de estados patológicos, podem ocorrer tanto de forma direcionada a sítios específicos ou ao longo do genoma. Até o momento, se sabe muito pouco sobre os mecanismos moleculares envolvidos na metilação sítio específica, porém mecanismos biológicos mais gerais, envolvidos na metilação global, como o metabolismo de um carbono (Cridler et al., 2018), DNMTs e TETs (Lyko, 2018; Wu and Zhang, 2014), são um pouco mais compreendidos. Além disso, há evidência de uma forte influência do perfil de metilação em um sítio CpG sobre os CpGs vizinhos, provavelmente em função do recrutamento de enzimas relacionadas à metilação/demetilação naquela região (Lövkvist et al., 2016). Isso resulta em grupos de sítios CpG hiper ou hipometilados, raramente havendo um estado intermediário (Lövkvist et al., 2016). Uma interpretação plausível dessa evidência é que avaliar a metilação global do DNA é uma maneira de capturar um efeito geral derivado das influências genéticas, metabólicas e ambientais sobre desfechos de saúde-doença. No caso do câncer, foi verificada uma tendência geral de hipometilação global (Pérez et al., 2018) a qual está relacionada com retrocesso no processo de diferenciação celular e de instabilidade genômica (Pfeifer, 2018).

O número de estudos avaliando a metilação do DNA tem aumentado cada vez mais e existe uma infinidade de metodologias disponíveis, cada uma com seus prós e contras (Gouil and Keniry, 2019; Kurdyukov and Bullock, 2016). Uma vez que a disponibilidade de técnicas para avaliar metilação do DNA é realmente muito vasta, não pretendemos esgotar o tema aqui. Porém, para melhor compreensão da Tese, faremos uma organização das principais técnicas de avaliação de metilação. Isso se faz bastante importante em função do alto grau de confusão existente na própria literatura com relação a alguns conceitos e tipo de informação que pode ser obtida com cada técnica e tipo de medida de metilação (média, porcentagem, valores beta, etc.). Faremos uma breve descrição sobre esses itens e outras informações relevantes separando algumas das principais metodologias disponíveis dentro de dois grandes grupos com relação às informações que podem ser extraídas: dados de regiões específicas ou dados globais.

### 1.3.1. Técnicas que avaliam a metilação do DNA em sítios específicos: abrangência restrita ou ampla

As metodologias que acessam o status de metilação em regiões específicas remontam os estudos do tipo gene candidato e foram muito abundantes no início da exploração de informações epigenéticas. Uma grande vantagem desse grupo de técnicas é que elas partem de uma hipótese prévia sobre o potencial patogênico da perturbação de expressão de algum gene sobre a condição em estudo. Sendo apenas um ou poucos sítios CpG avaliados, e se verificando presença ou ausência de metilação no sítio de interesse, o número de testes é relativamente baixo, contribuindo para que achados de associação não sejam descartados pelo critério estatístico mesmo em estudos com tamanho amostral reduzido. Essa avaliação artesanal, de cada região gênica de interesse de forma individual, foi sendo substituída pelas técnicas de *arrays* conforme esses foram tendo seus custos reduzidos e o número de regiões avaliadas sendo ampliadas.

Na última década, os chips comerciais abriram a possibilidade de avaliar a metilação do DNA de forma abrangente, e, por intermédio de sua versão mais utilizada, o Illumina Infinium array — atualmente na versão MethylationEPIC —, cerca de 850 mil sítios CpG (com foco em regiões promotoras e de *enhancers*) podem ser acessadas por amostra. Outra vantagem dos *arrays* de metilação é a possibilidade de relacionar os dados por eles obtidos com aqueles fornecidos por *arrays* de genotipagem (Bock et al., 2016). Valores beta são criados para cada um dos sítios CpG incluídos no *array* e assim posições (DMP) ou regiões (DMR) diferencialmente metiladas podem ser relacionadas com genes/vias, respectivamente, e associadas com a condição em estudo. Porém uma desvantagem desse método é a impossibilidade de diferenciar entre 5-mC e seu intermediário de demetilação 5-hmC (Bock et al., 2016). Mesmo não sendo uma avaliação global do epigenoma (na realidade são acessados apenas 3% de todos os sítios CpG na versão EPIC) é comum que achados desses estudos, por intermédio de uma média dos valores beta, sejam reportados como valores de metilação global. Os estudos que usam *arrays* são chamados de *epigenome wide association studies* (EWAS), fazendo referência aos estudos de varredura

genômica (GWAS), os quais também não abarcam a totalidade de variantes do genoma. Porém a expressão “metilação global” é comumente usada na literatura, em diversos contextos, sem maiores explicações. Isso acaba gerando alguma confusão mesmo para aqueles com conhecimento acumulado sobre estudos epigenéticos, uma vez que é comum que pesquisadores se especializem em certas abordagens e acabem pressupondo que certos termos sejam usados com o mesmo sentido no âmbito de outras técnicas. Pretendemos deixar claro na próxima subseção em que contexto o termo metilação global seria adequadamente empregado.

Ainda dentro da categoria de técnicas que fornecem dados de metilação para os sítios individuais, devemos citar as técnicas de sequenciamento após tratamento por bissulfito. Elas têm a grande vantagem de retornar informação sobre o status de metilação para cada um dos sítios CpG do genoma de forma individual, mas isso vem com um custo financeiro e computacional muito elevado, ainda mais considerando que na área de pesquisa é necessário um tamanho amostral considerável para que as análises apresentem poder estatístico suficiente para fatores com tamanho de efeito pequeno. Além disso, também não é possível discriminar entre 5-mC e 5-hmC (Booth et al., 2012; Huang et al., 2010). Para reduzir o custo associado ao sequenciamento completo, é possível recorrer à combinação de algumas técnicas de enriquecimento. Esse é o caso do *reduced-representation bisulphite sequencing* (RRBS) que utiliza diferentes enzimas de restrição para gerar fragmentos de sequência específica para posterior tratamento com bissulfito e sequenciamento (Gu et al., 2011). Fica claro que esse tipo de derivação, apesar de usar a técnica de sequenciamento, acaba se encaixando no grupo de avaliação sítio específica.

### **1.3.2. Técnicas que avaliam a metilação do DNA de forma global**

Na categoria de técnicas que de fato avaliam a metilação do DNA de maneira global, podemos citar a dosagem de 5-mC por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou por espectrometria de massas. Outras técnicas são usadas no contexto de *proxies* dos níveis de metilação global, como ELISA e LUMA.

Os resultados obtidos por HPLC e espectrometria são adequadamente chamados de metilação global porque fornecem informação sobre a quantidade de citosinas que se encontram metiladas no âmbito de todas as citosinas do DNA. Assim, é fornecido um único valor que pode representar uma tendência de metilação do DNA e relacioná-la com algum traço fenotípico (maior nível de metilação em um grupo de indivíduos com determinada característica com relação a um grupo sem tal traço demonstraria que há associação de um genoma hipermetilado com aquela característica, ou hipometilação em uma situação inversa).

O protocolo para obtenção desse tipo de dados compreende o tratamento enzimático do DNA para remoção de RNA remanescente e fragmentação do DNA em seus nucleotídeos para posterior aferição de suas quantidades por HPLC ou espectrometria (Ramsahoye, 2002; Rozhon et al., 2008). Dessa forma, o nível de metilação utilizado é expresso na forma de porcentagem pela seguinte equação: razão entre a quantidade de citosinas metiladas (5-mC) pelas citosinas totais (5-mC+ C) multiplicadas por 100 ( $\%5\text{-mC} = (5\text{-mC}/5\text{-mC} + \text{C}) \times 100$ ). Uma desvantagem dessa técnica é a quantidade de DNA necessária para a sua realização. Mas como um dos esforços da presente Tese, em colaboração com a Universidade Feevale, foi possível otimizar esse aspecto e, assim, um trabalho utilizando um novo protocolo, com a utilização de apenas 2 microgramas de DNA, foi publicado (Barbosa et al., 2019).

Embora alguns elementos altamente repetitivos do DNA, como LINES e SINES, pareçam ser bons *proxies* da metilação global por, de forma conjunta, compreenderem cerca de 30% do DNA genômico humano (Cordaux and Batzer, 2009), eles podem falhar em espelhar o perfil global. Isso foi demonstrado para o envelhecimento, por exemplo (Lisanti et al., 2013). Já técnicas de luminescência (LUMA) e colorimétricas (ELISA), as quais se valem de anticorpos específicos, parecem reproduzir de forma menos fiel o real status de metilação global (Bock et al., 2016), apresentando alta variação dos níveis de metilação entre as replicatas da mesma amostra (Kurdyukov and Bullock, 2016).

### **1.3.3. Outras considerações importantes quanto às técnicas que avaliam a metilação do DNA**

Um problema de pesquisa que envolva a avaliação de metilação do DNA pode ser melhor solucionado por um tipo ou grupo de técnicas. É evidente que o processo de escolha da metodologia mais adequada envolve o tipo de dados que cada uma pode fornecer, mas, além disso, é importante considerar a “qualidade” e a reprodutibilidade de cada método. Vários métodos envolvem o tratamento prévio das amostras com bissulfito (PCR, EWAS, sequenciamento). Ele realiza a conversão de citosinas não metiladas em uracilas, enquanto as que se encontram metiladas permanecem como citosinas, podendo então serem diferenciadas por PCR e sequenciamento (Grunau et al., 2001). Olova et al. (2018) demonstrou que essa etapa é a principal responsável pela inclusão de diversos vieses nos protocolos de sequenciamento. A degradação do DNA é inerente ao tratamento com bissulfito e afeta a composição de sequência em regiões ricas em citosina não metilada (Olova et al., 2018). Apesar da degradação do DNA ser presente em qualquer protocolo que utilize bissulfito, a montagem de bibliotecas de sequenciamento passa por uma etapa adicional de fragmentação, quando fragmentos ricos em citosina não metilada são excluídos do *pool* de bibliotecas antes de passar por amplificação, assim introduzindo um viés adicional (Olova et al., 2018). Outras questões decorrem disso, como problemas na etapa de amplificação. Em função das limitações presentes na metodologia de sequenciamento, fica mais compreensível o achado de Heiss et al. (2020), em que, ao comparar EWAS e sequenciamento, verificaram que o EWAS foi mais preciso na quantificação de metilação do DNA.

Quanto aos níveis globais de metilação do DNA, a única maneira de realmente se obter os níveis totais de 5-mC é pela técnica de HPLC (Vryer and Saffery, 2017). Mesmo não sendo possível determinar as posições em que as citosinas metiladas e não metiladas se encontram, esse método pode ser particularmente interessante no contexto dos transtornos multifatoriais, uma vez que a contribuição dos diferentes fatores ambientais e genéticos, além de suas interações na etiologia, é muitas vezes imprecisa. Essa metodologia seria, então,

um importante *proxy* do exposoma, agindo sobre o contexto genômico dos indivíduos, ainda mais se seus níveis forem relacionados com alteração de algum outro “comunicador biológico”, como foi demonstrado ocorrer com hormônios do estresse (Müller et al., 2020).

#### 1.4. Metilação global na psiquiatria

Com relação ao perfil de metilação global do DNA, inúmeros trabalhos foram conduzidos em condições como câncer (Casalino and Verde, 2020), mas esse método permanece subutilizado no entendimento de diferentes condições psiquiátricas. É possível que isso se deva, em parte, a uma importante preocupação que surge ao se trabalhar com epigenética como um todo, que é o tipo de tecido do qual o DNA é isolado para avaliar o perfil de metilação, uma vez que se sabe que diferentes tipos celulares apresentam um repertório transcricional diferenciado. Logo, um fator limitante que se enfrenta em estudos epigenéticos na psiquiatria diz respeito à dificuldade de se obter amostras de DNA a partir do cérebro de pacientes. Importante destacar que, mesmo obtendo material do tecido de interesse, amostras coletadas a partir de diferentes regiões cerebrais diferem entre si quanto ao perfil de metilação (Davies et al., 2012). Dessa forma, a maioria dos estudos, principalmente em humanos, têm utilizado amostras de tecidos periféricos como sangue, tecido bucal ou amostras de saliva na tentativa de buscar biomarcadores, uma vez que foi verificada uma certa correlação entre tais tecidos e tecido cerebral (Clive et al., 2016; Guintivano et al., 2014).

Alguns transtornos, como esquizofrenia e transtorno bipolar, foram um pouco mais estudados com relação aos níveis globais de metilação. Por outro lado, condições até mais frequentes do que elas, como depressão e ansiedade, foram bem menos acessadas (**Tabela 2**). É interessante notar a variedade de técnicas que os diferentes grupos de pesquisa utilizaram para acessar a informação sobre os níveis de metilação global em sua amostra. Essa falta de homogeneidade técnica, além de dificultar a comparação dos resultados obtidos pelos diferentes estudos, evidencia a falta de clareza que havia, pelo menos até 2016 (Bock et al., 2016; Kurdyukov and Bullock, 2016; Vryer and Saffery, 2017), sobre qual das

**Tabela 2:** Estudos que avaliaram níveis de metilação global do DNA em pacientes com os principais transtornos psiquiátricos: esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão e ansiedade (excluindo-se transtorno do espectro autista, devido a sua extrema heterogeneidade clínica e etiológica).

<b>Autoria</b>	<b>Transtorno e composição amostral</b>	<b>Tecido; técnica</b>	<b>Principais achados</b>
Shimabukuro et al., 2007	SCZ – 210 casos (124 homens e 86 mulheres) com uso crônico de tratamento farmacológico antipsicótico e 237 controles (108 homens e 129 mulheres).	Leucócitos; HPLC.	Homens mais metilados que mulheres; Em homens: tendência de menor metilação em casos que controles ( $P=0,075$ ), com um efeito significativo da idade ( $\beta=-0,212$ , $p<0,001$ ); Em mulheres: sem efeito.
Bromberg et al., 2008	SCZ – 28 casos vs. 26 controles pareados.	Leucócitos; método de extensão de citosinas (endonucleases de restrição MspI e HpaII).	Sem associação quanto aos níveis de metilação. Níveis de homocisteína maiores em pacientes.
Bönsh et al., 2012	Pares de gêmeos: 27 pares com SCZ, 15 discordantes para SCZ ou transtornos do espectro esquizofrênico (CID-10). 34 pares de gêmeos controles saudáveis recrutados por anúncio em jornal e 38 gêmeos controles psiquiátricos.	Leucócitos; método de extensão de citosinas (endonucleases de restrição MspI e HpaII).	Metilação global reduzida em gêmeos com esquizofrenia (redução na metilação foi significativa apenas em homens). A metilação do DNA foi significativamente menor em nove pacientes com SCZ não medicados comparados aos pacientes com medicação, os quais alcançaram os níveis de metilação aproximados de controles.
Melas et al., 2012	SCZ = 177 pacientes (87 homens; 90 mulheres). Controles = 171 doadores de sangue anônimos.	Leucócitos; LUMA.	Hipometilação em pacientes; regressão linear com pacientes gerou um modelo em que tratamento antipsicótico e início da doença explicou 11% da variância de metilação global. Haloperidol foi associado com maior metilação, e início precoce foi associado com maior metilação.



Nishioka et al., 2013	SCZ = 18 pacientes com primeiro episódio de psicose (11 homens e 7 mulheres). Controles = 15 (10 homens e 5 mulheres).	Células mononucleares de sangue periférico; <i>Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip array</i> (uso de uma medida global pela média dos valores beta de todos os sítios CpG inclusos no <i>array</i> ).	Menor metilação “global” em pacientes.
Misiak et al., 2015	Primeiro episódio de SCZ divididos em dois grupos (com histórico de trauma na infância e sem). 48 Controles pareados para idade, sexo, IMC, níveis de homocisteína, B12 e folato.	Leucócitos; LINE-1 (COBRA)	Metilação significativamente reduzida em pacientes esquizofrênicos com histórico de trauma na infância.
Alelú-paz et al., 2016	SCZ e controles obtidos pelo <i>Atlas human brain</i> .	Regiões cerebrais (Córtex pré-frontal dorso-lateral, hipocampo e córtex cingulado anterior) de pacientes e controles mortos. <i>450K methylation array</i> , mas fornecendo uma medida global (média dos valores beta).	Metilação do DNA depende da área cerebral analisada. Usando amostras cerebrais ao invés de leucócitos encontrou um padrão “global” de hipermetilação nas três estruturas analisadas.
Jiang et al., 2017	SCZ = 264, Controles = 221	Leucócitos; 5-mC por anticorpos.	5-mC correlação positiva dependente de sexo com idade.

Viana et al., 2017	SCZ = 41, Controles = 47	262 amostras cerebrais <i>postmortem</i> (córtex pré-frontal, estriato, hipocampo e cerebelo); 450K <i>methylation array</i> , mas fornecendo uma medida global (média dos valores beta).	Sem diferença.
Fachim et al., 2018	SCZ = 15, Controles = 16. Pareados para idade.	Córtex pré-frontal e hipocampo; PyroMark Q24 CpG = pirosequenciamento baseado em sequências LINE-1 foi usado para quantificar metilação em 4 sítios CpG nas posições 331 a 318 de LINE-1.	Marcador de LINE-1 foi mais metilado em tecidos cerebrais de pacientes.
Li et al., 2018	SCZ = 92, BD = 99, Controles = 92	Células mononucleares de sangue periférico; LINE-1 – método <i>bisulfite conversion-specific one-label extension</i> (BS-OLE) para detectar metilação em três sítios CpG (S1, S2 e S3).	SCZ = Hipometilação em S1. BD = Hipometilação em S2. SCZ e BD = Hipometilação em S3.
Li et al., 2019	SCZ = 92, BD = 99, Controles = 92	Sangue periférico; Subfamília de elementos (AluY).	BD = Hipermetilação de AluY A1 e A2. SCZ e BD = Hipometilação do sítio A3.
Murata et al., 2020	SCZ = 24 vs. Controles = 42 -----	Sangue; pirosequenciamento de LINE-1.	Hipometilação em pacientes com primeiro episódio de SCZ.

	SCZ = 388, BD = 414, Controles = 430		Pacientes com SCZ e BD do tipo 1 (mas não do tipo 2) apresentaram hipometilação e diminuição dos níveis de betaína.
Bromberg et al., 2009	BD = 49 pacientes eutímicos, Controles = 27	Leucócitos; método de extensão de citosinas.	Sem diferença.
Rao et al., 2012	BD = 10, Doença de Alzheimer = 10 Controles pareado para idade = 10 por grupo	Córtex frontal <i>post-mortem</i> ; Imprint Methylated DNA Quantification Kit (Sigma Aldrich).	Metilação global aumentada em BD e AD.
Soeiro-de-Souza et al., 2013	BD I = 50 Controles = 50	Sangue; ELISA.	Sem diferença.
Huzayyin et al., 2014	BD com excelente resposta à monoterapia com lítio = 14, Parentes não afetados de pacientes = 16, Parentes afetados por BD ou MDD = 14, Controles = 16.	Linfoblastos transformados em cultura na presença ou ausência de lítio; ELISA.	Diminuição de 5-mC em BD e seus parentes comparados a controles e permaneceu assim após o tratamento com lítio em pacientes com BD, mas não em seus parentes.
Backlund et al., 2015	BD = 29 (monoterapia), BD = 32 (terapias combinadas), Controles = 26.	Leucócitos; ELISA.	Hipometilação em pacientes em monoterapia com lítio. Lítio + valproato = hipermetilação. Sem associação entre metilação e resposta ao lítio.
Ceylan et al., 2018	BD I = 37 eutímicos, 18 em mania, 20 depressivos, Controles = 60.	Sangue; ELISA.	Sem efeito significativo das diferentes medicações sobre 5-mC.

Burghardt et al., 2019	BD = 28 (75% tipo 1; 18% tipo 2; 7% sem outra especificação). Controles = 13.	Biópsias musculares (importância do tecido muscular na captação e armazenagem de glicose estimulada por insulina); LINE-1.	Hipermetilação nas biópsias de pacientes com BD. 5-mC foi maior no grupo usando antipsicóticos atípicos comparado com o grupo que usava estabilizadores de humor.
Byrne et al., 2013	MDD - 12 pares de gêmeos MZT discordantes para MDD, 24 pares concordantes para ausência de MDD e com baixo neuroticismo.	Sangue; 450K (com média dos valores beta).	Sem diferença entre casos e seus irmãos não afetados, mas no grupo de mulheres casos foram menos metilados do que controles (a tendência em homens foi oposta).
Tseng et al., 2014	MDD = 49 e Ctrl = 25	Leucócitos; kit de quantificação de 5-mC MethylFlash™ (teste colorimétrico).	Tendência de menores níveis de 5-mC em casos graves comparados a controles, foi significativo no grupo mais velho e não significativo no grupo mais jovem. Relação inversa com a gravidade da doença.
Murphy et al., 2015	ANX = 25 e Ctrl = 22	Células mononucleares de sangue periférico; kit de quantificação de 5-mC MethylFlash™ (teste colorimétrico).	Pacientes ansiosos tinham níveis maiores de metilação global.

SCZ- esquizofrenia, BD - transtorno bipolar, MDD - depressão, ANX - ansiedade.

metodologias disponíveis era a mais adequada para verificar níveis de metilação global.

É surpreendente que, apesar dessa variabilidade, um certo padrão possa ser verificado quanto aos níveis de metilação global obtidos a partir de sangue periférico em algumas condições. Nesse sentido, pacientes com esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão apresentaram, de forma geral, genomas hipometilados com relação aos controles (Backlund et al., 2015; Bönsch et al., 2012; Byrne et al., 2013; Huzayyin et al., 2014; M. Li et al., 2019; Li et al., 2018; Melas et al., 2012; Misiak et al., 2015; Murata et al., 2020; Nishioka et al., 2013; Shimabukuro et al., 2007; Tseng et al., 2014).

Evidentemente que nesse contexto de variação na condução dos estudos alguns achados divergentes tenham sido reportados (**Tabela 2**). Mas, além disso, esses achados ressaltaram o quanto uma diversidade de fatores como gravidade do transtorno (Tseng et al., 2014), tratamento farmacológico (Backlund et al., 2015; Burghardt et al., 2020; Huzayyin et al., 2014; Melas et al., 2012), trauma na infância (Misiak et al., 2015), sexo (Bönsch et al., 2012; Byrne et al., 2013; Jiang et al., 2017; Shimabukuro et al., 2007) e idade dos indivíduos, entre outros, é capaz de alterar o efeito dentro de grupos mais homogêneos. Como exemplo, Soeiro-de-Souza e colaboradores (2013) não verificaram alteração nos níveis de 5-mC ao agrupar todos os pacientes com transtorno bipolar em um único grupo, sem a criação de grupos homogêneos. Tal procedimento é indispensável, uma vez que há evidência de que alguns medicamentos psiquiátricos influenciam nos padrões de metilação do DNA, sendo importantes confundidores a serem controlados (Houtepen et al., 2016). Apesar dessa falha metodológica não ter se repetido em trabalho posterior, um grande fracionamento da amostra (5 grupos – sendo que um se subdividia em outros três) resultou em grupos muito pequenos e, conseqüentemente, com pouco poder para detectar alguma diferença (Ceylan et al., 2018). Bromberg e colaboradores (2009) tiveram o mesmo problema (poucos indivíduos em cada grupo). Porém diferenças nos níveis de 5-mC entre pacientes com transtorno bipolar e controles foram verificadas quando o medicamento considerado foi o mesmo – não sendo necessário fracionar a amostra (Huzayyin et al., 2014) – ou com grupos submetidos a diferentes tratamentos, porém com tamanho amostral

maior (Backlund et al., 2015). De fato, o tamanho amostral muito pequeno parece ser uma característica desse tipo de estudo na psiquiatria. A maioria deles contou com menos de 100 indivíduos, somando-se casos e controles (**Tabela 2**). Uma grande exceção a essa afirmação foi o artigo de Murata et al. (2020), que contou com 388 pacientes com esquizofrenia, 414 com transtorno bipolar e 430 controles saudáveis. Esse trabalho replicou o achado de hipometilação em pacientes com essas condições.

Quanto aos transtornos com menos estudos sobre nível de metilação global do DNA em humanos, é particularmente importante verificar dados disponíveis a partir de estudos com animais. Em pacientes mais velhos com depressão, os níveis de 5-mC foram inversamente relacionados com a gravidade do transtorno (Tseng et al., 2014). Ainda em humanos, outro estudo apresentou evidência de metilação reduzida em mulheres com depressão com relação a mulheres controles, mas a tendência no grupo de homens foi no sentido contrário (Byrne et al., 2013). Com relação ao transtorno de ansiedade, apenas um trabalho foi realizado, e relatou níveis aumentados em pacientes (Murphy et al., 2015). Por outro lado, estudos realizados em outros organismos demonstraram que tanto o comportamento de ansiedade como o de depressão coincidiram com níveis reduzidos de metilação do DNA na amígdala de ratos (McCoy et al., 2017). Além disso, tal estudo também sugeriu que o tratamento com agentes promotores de metilação seria capaz de melhorar os sintomas depressivos e de ansiedade. Também em ratos, a exposição a estresse foi utilizada para criar comportamentos *depressive-like*, o que resultou em hipometilação (Shen et al., 2019). Em outra análise, infusão local de 5-aza-2'-deoxicitidina, um inibidor de metilação, no grupo de ratos não expostos a estresse, também foi capaz de induzir comportamentos característicos de depressão por intermédio de hipometilação (Shen et al., 2019). Em um estudo com camundongos, a exposição ao estresse crônico aumentou os comportamentos *anxiety-like*, os quais foram acompanhados de diminuição na metilação do DNA (Elliott et al., 2016). Um dado muito interessante quanto a esses transtornos é que eles parecem ser transtornos relacionados a altos níveis de cortisol, um hormônio do sistema de estresse, e esse tem sido inversamente relacionado com os níveis de metilação global (Müller et al., 2020). Essa associação tem o potencial de

conectar uma marca estável, caso da metilação, a uma regulação biológica mais dinâmica, como a regulação hormonal. Entender como uma pode influenciar a outra é um importante desafio.

Como previamente citado neste texto, tanto o uso de álcool quanto tabaco foram sugeridos como fatores ambientais de susceptibilidade ao TDAH, mas, além disso, dependendo de seu padrão de consumo, podem ser considerados como transtornos por si só e também têm sido avaliados quanto ao seu potencial de alteração epigenética. O etanol é amplamente conhecido por alterar a metilação global durante o desenvolvimento neural (Chen et al., 2013; Zhou et al., 2011). Em células tronco isoladas de cérebros de camundongos, uma única administração de etanol durante o início do desenvolvimento do sistema nervoso central não foi capaz de alterar os níveis de 5-mC, enquanto que uma exposição contínua aumentou seus níveis significativamente (Liyanage et al., 2015). Também há achados demonstrando que pacientes com hepatite alcoólica apresentam hipermetilação com relação a indivíduos controles (Shen et al., 2015). Ao se avaliar os efeitos da administração aguda de etanol em camundongas grávidas do nono ao décimo primeiro dia de gestação, observou-se que o DNA fetal estava hipometilado (Garro et al., 1991). Uma vez que as evidências de alteração nos níveis de metilação global em função do consumo de álcool são divergentes ao se avaliar diferentes estágios do desenvolvimento, destacamos a importância de se avaliar os possíveis efeitos do consumo de álcool durante o desenvolvimento e também quando este já está completo. O álcool, através de seu metabolismo, é capaz de alterar a doação de grupamentos metila e acetila, o que afeta diretamente os mecanismos epigenéticos de metilação do DNA e de metilação e acetilação de histonas (Resendiz et al., 2014). Tais mecanismos podem ser diferentes ao longo do desenvolvimento, mesmo sem o uso de álcool. Um exemplo disso pode ser obtido em um trabalho que avaliou em qual extensão a metilação global das mães podia ser afetada em função do consumo de doadores de grupamento metil durante a gestação. Os maiores níveis de metilação foram observados antes da gravidez e durante as semanas 18-22 de gestação, com o ácido fólico demonstrando ser positivamente relacionado com os níveis globais de metilação. Quanto ao consumo de metionina antes da gravidez e durante o primeiro trimestre, verificaram-se

menores taxas de metilação nas semanas 18-22. O consumo de doadores metil durante o segundo e terceiro trimestre foi associado com maior metilação durante o terceiro trimestre. Dessa forma, parece haver uma tendência de alteração nos níveis de metilação do DNA no último trimestre de gravidez e não em fases anteriores (Pauwels et al., 2016). Considerando os níveis globais de 5-mC com o desfecho tabagismo, encontramos apenas um trabalho. Nele, Hillemecher e colaboradores não encontraram efeito direto do fumo nos níveis de metilação global (Hillemecher et al., 2008). Porém, Semmler e colaboradores observaram maior metilação global em pacientes internados para desintoxicação em função de álcool, sendo que grande parte desses também apresentavam abuso de nicotina (Semmler et al. 2015).

Temos, então, que algumas condições foram mais frequentemente relacionadas com estados de hipometilação, ao passo que outras com uma tendência à hipermetilação. Dessa forma, fica evidente que a regulação global da metilação é importante e que desvios no sentido de maior ou menor metilação podem conduzir a desfechos psiquiátricos. É surpreendente notar o grande hiato que existe sobre os níveis de 5-mC em transtornos psiquiátricos, principalmente se levarmos em consideração o número de trabalhos realizados sobre metilação em genes específicos (Smigielski et al., 2020). Isso reflete o quanto dos esforços de pesquisa ainda têm sido realizados pela perspectiva dos genes candidatos em detrimento de uma busca global. Evidentemente que os estudos realizados são de grande importância, porém uma distribuição maior de investimento para as diferentes estratégias seria promissora, já que é sabido que a susceptibilidade aos transtornos multifatoriais não se deve a poucos fatores.

Uma perspectiva emergente de uma avaliação epigenética mais ampla no contexto da psiquiatria é a de relógio epigenético, ou “epigenetic clock” (Horvath and Raj, 2018). Esses estudos partem de uma avaliação abrangente de metilação diferencial a partir de EWAS, elaborando escores relacionados com o envelhecimento, ou seja, fornecem estimativas de “idade epigenética” com base em metilação de DNA (DNAm age) (Fransquet et al., 2019; Horvath and Raj, 2018). Vários estudos têm relacionado desvios da idade biológica com relação a idade epigenética e transtornos psiquiátricos (Fries et al., 2020; Okazaki et al., 2019; Wolf



et al., 2020). Essas associações podem estar relacionadas com o aceleração da instabilidade genômica, encurtamento de telômeros, entre outros fatores vinculados ao envelhecimento (López-Otín et al., 2013). Dessa maneira, análises mais abrangentes podem fornecer informações não disponibilizadas em estudos focados somente na metilação diferencial propriamente dita. Seria interessante, então, que uma maior proporção dos EWAS disponíveis na psiquiatria proporcionassem esse tipo de análise além da estimativa de medida global aos moldes de Glad e colaboradores, que utilizaram uma média dos valores beta de todos os sítios CpG, proporcionando uma visão geral sobre todos os sítios CpG verificados no array (Glad et al., 2017). Essas abordagens não são uma avaliação global no sentido estrito do termo, que aqui reservamos ao HPLC, mas contribuíram com uma estimativa geral de variação de metilação relacionada a estados patológicos e saudáveis.

### **1.5. Metilação global e sexo**

Assim como ocorre em muitas condições clínicas, vários transtornos psiquiátricos também apresentam uma prevalência diferencial com relação ao sexo dos indivíduos afetados. Por mais que o efeito do sexo na manifestação de fenótipos psiquiátricos tenha sido classicamente considerado como potencial fator de confusão em análises, pouco se sabe sobre as causas da prevalência diferencial.

Recentemente efeitos epigenéticos também foram adicionados nessa já complexa equação (Kramtsova et al. 2018). É bastante interessante notar que apesar de mulheres terem um cromossomo inteiro sendo inativado pelo mecanismo de metilação (no processo de compensação de dose do cromossomo X) elas têm apresentado um consistente padrão de hipometilação geral (Suderman et al. 2017; McCarthy et al. 2014). Alguns aspectos que subjazem as diferenças sexuais têm sido propostos, tal como por exemplo a diferença de concentrações de hormônios sexuais. Dentre os poucos dados disponíveis temos o já bem estabelecido papel da testosterona como indutor da masculinização das estruturas e funcionamento cerebral que ocorre durante períodos precoces do desenvolvimento (Forger et al.

2018). Também há evidências de que o aumento de estrógeno é acompanhado por uma diminuição nos níveis de GMe (Ulrich et al., 2012).

Sendo assim, temos uma série de observações de efeito do sexo sobre fenótipos psiquiátricos que ainda não foram plenamente dissecados. Mesmo tendo sido apenas recentemente adicionada ao conjunto de hipóteses que podem explicar as diferenças observadas entre os sexos, a metilação do DNA já desponta como um dos principais mecanismos por onde a atuação dos hormônios sexuais podem exercer seus efeitos de alcance sistêmico (Müller et al. 2020).

## 1.6. TDAH à luz da epigenética

Dada a arquitetura altamente poligênica do TDAH e o pequeno tamanho de efeito quanto aos fatores de risco ambiental associados ao transtorno, tem surgido forte interesse em se avaliar mecanismos epigenéticos nessa condição. Esses atuam justamente na intersecção dos diferentes contribuintes aos fenótipos. Assim, a avaliação de micro-RNAs (miRNA), modificações de histonas e metilação do DNA podem fornecer meios de integrar os riscos genéticos e ambientais, além de auxiliar na compreensão da alta variabilidade fenotípica descrita para o TDAH.

Os miRNAs pertencem à classe de RNAs não codificantes, sendo reguladores epigenéticos de atuação pós-transcricional. São importantes moléculas a serem avaliadas em condições psiquiátricas, uma vez que desempenham papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso central, por influenciar na proliferação e diferenciação celular, e na sinaptogênese (O'Brien et al., 2018). Além disso, 70% dos miRNAs conhecidos são expressos no sistema nervoso central (Fineberg et al., 2009). Em uma revisão de 2018, foi demonstrada a substancial contribuição de miRNAs no TDAH tanto em crianças quanto em adultos (Srivastav et al., 2018). Verificou-se que os miRNAs inclusos na revisão modulam a expressão de diversos genes que foram relacionados à etiologia do TDAH (*BDNF*, *DAT1*, *HTR2C*, *HTR1B*, *SNAP-25*). O padrão de alteração de expressão de diversos miRNAs (*miR-let-7d*, *miR-18a-5p*, *miR-22-3p*, *miR24-3p*, *miR-106b-5p*, *miR-107*, *26b-5p*, *miR-185-5p*, *miR-191-5p* e *miR-155-5p*) em

indivíduos com TDAH se demonstrou estável em células mononucleares de sangue, destacando esses como potenciais biomarcadores periféricos a serem explorados (Paul et al., 2020; Sánchez-Mora et al., 2019). Polimorfismos genéticos na região codificante de miRNAs, como o SNP rs4916723 no *MIR9-2*, também foram associados com risco aumentado de transtornos psiquiátricos, incluindo TDAH (Tovo-Rodrigues et al., 2019). Ainda restam muitos miRNAs a serem explorados com relação a sua influência no TDAH, mas a explicação das associações encontradas permanece atrelada a seu papel na regulação de genes previamente associados ao transtorno.

Quanto às modificações de histona, elas foram primeiramente demonstradas no hipocampo de ratos expostos a várias concentrações de chumbo (fator de risco ao TDAH), com conseqüente aumento da atividade comportamental (compatível com os sintomas da apresentação hiperativa do TDAH) (Luo et al., 2014). A acetilação de histonas aumentou significativamente nos ratos tratados de forma crônica. Essa marca específica é comumente relacionada com relaxamento da cromatina e, conseqüentemente, um estado de maior expressão gênica (Lawrence et al., 2016). Infelizmente, apesar de se saber como as modificações de histonas podem impactar na expressão gênica por intermédio de modificações no estado de relaxamento/condensação da cromatina (Lawrence et al., 2016), essas não têm sido avaliadas em pacientes com TDAH (Dall'Aglio et al., 2018; Mirkovic et al., 2020).

Por outro lado, há relativa abundância de estudos cujo foco foi avaliar alterações na metilação do DNA com relação aos sintomas e diagnóstico do TDAH. Mas, apesar de existir mais conhecimento sobre os mecanismos que atuam em alterações globais na metilação, como variantes nas DNMTs, TETs, e no gene *MTHFR* (que metaboliza o elemento doador de grupamento metila SAM a partir de folato), a maior parte dos esforços até o momento foi no sentido de procurar por modificações em sítios específicos (Adriani et al., 2018; Dadds et al., 2016; Ding et al., 2017; Heinrich et al., 2017; Park et al., 2015; Perroud et al., 2016; van Mil et al., 2014; Xu et al., 2015). Diversos genes foram avaliados (*DRD4*, *DRD5*, *5-HTT*, *NR3C1*, *MTHFR*, *IGF2*, *H19*, *KCNQ10T1*, *DAT1*, *5-HT3AR*, *COMT*, *ANKK1*, *BDNF*, *NGFR*, etc.), porém com pouca sobreposição entre eles em diferentes estudos.

Assim, não foi possível identificar uma tendência geral de metilação para nenhum daqueles genes. Mesmo para o *DRD4* e *DAT1*, os genes mais avaliados ao longo dos trabalhos, não é possível fazer uma afirmação sobre a tendência de metilação em casos com relação a controles, uma vez que os achados foram conflitantes ou as posições gênicas averiguadas diferiram entre os estudos. Considerando que o último trabalho com essa metodologia foi publicado em 2017 e que há uma absoluta mudança no sentido de avaliações em nível mais amplo (genômico e global), esses achados provavelmente permanecerão sem replicação até serem verificados por sequenciamento completo.

No sentido dessa troca sistemática das metodologias gene-específico pelas de abrangência genômica, de 2016 até 2020 nove estudos sobre sintomas e diagnóstico do TDAH foram conduzidos por EWAS, sendo que cinco desses trabalhos são do ano de 2020 (**Tabela 3**). Considerando a etiologia multifatorial do transtorno, essa mudança representa um grande passo em direção a uma compreensão mais ampla dessa condição. O primeiro estudo a utilizar EWAS no TDAH foi conduzido a partir do DNA de saliva de meninos e apontou para hipometilação do gene *VIPR2* (Wilmot et al., 2016). Alguns trabalhos posteriores incluíram em suas análises uma tentativa de replicar essa associação. Assim, em um estudo avaliando diferenças de metilação entre gêmeos discordantes quanto ao diagnóstico de TDAH, *probes* nesse gene foram hipermetiladas em 3 dos 14 irmãos discordantes (Chen et al., 2018). Em outro estudo, diferenças foram verificadas em uma subamostra composta apenas por meninos (Mooney et al., 2020). Essa subamostra apresentava grande sobreposição com a amostra de Wilmot et al. (2016), mas a hipometilação nesse gene se manteve após retirar os indivíduos coincidentes. De qualquer forma, esse achado destaca o efeito que o sexo tem sobre alterações epigenéticas.

Estudos prospectivos também foram realizados. Diferenças de metilação em 13 *probes* (anotadas nos genes *SKI*, *EPX*, *ST3GAL3*, *PEX2*, *PBXW5*, *ELF3*, *ZNF454* e *ZNF544*), acessadas em sangue de cordão umbilical no nascimento, foram capazes de prever trajetória de alto risco ao TDAH aos 7-15 anos de idade (Walton et al. 2017). Uma meta-análise que abrangeu diversas coortes identificou que hipometilação em 9 sítios CpG de DNA de cordão umbilical (*CREB*, *ZBTB38*,

*PPIL1*, *TRERF1*, *ERC2* e intergênicos) foram associados com mais sintomas em idade escolar, enquanto nenhuma diferença na metilação de DNA obtido em sangue periférico no momento da análise se associou com TDAH (Neumann et al., 2020). Esse último trabalho não replicou os achados de Walton et al. (2017), tampouco de Wilmot et al. (2016). Isso nos indica que desregulações epigenéticas precoces podem ter efeitos a longo prazo, além de que essas alterações podem diferir entre as populações.

Um achado interessante foi observado no estudo de Goodman et al. (2020). Mesmo não encontrando nenhuma associação significativa após as correções necessárias em função das múltiplas testagens, eles verificaram que mais sítios CpG variaram os níveis de metilação no subgrupo de pacientes com mais sintomas *versus* controles (299 sítios) do que a amostra total de pacientes *versus* controles (188). Essa é uma estratégia interessante, pois tenta reduzir um pouco a heterogeneidade clínica ao criar um subgrupo mais semelhante. Infelizmente esse foi um trabalho com tamanho amostral muito pequeno (N da amostra de TDAH total = 22), o que reduziu de forma brutal o poder de encontrar CpGs diferencialmente metilados.

Dados clínicos, obtidos em estudos longitudinais, têm demonstrado que sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir da infância à adolescência, enquanto os de desatenção são mais estáveis (Lahey & Willcutt, 2010). Essa alteração relacionada à idade foi sugerida como sendo devida a fatores epigenéticos alterando a expressão de genes envolvidos na manifestação desses sintomas (Elia et al., 2012). Além disso, ainda há uma discussão em aberto sobre se o TDAH manifestado na infância e na vida adulta se tratam de uma mesma condição (Breda et al., 2020; Karam et al., 2015; Moffitt et al., 2015). Essas informações evidenciam a importância de que estudos sejam realizados nos diferentes momentos do curso da vida. Porém notamos uma grande carência de trabalhos em amostras de adultos (Rovira et al., 2020). Meijer et al. (2020) avaliaram se alguma alteração na metilação se relacionava com a persistência ou remissão do transtorno e encontraram que hipermetilação em regiões diferencialmente metiladas em *APOB* e *LPAR5* foram associadas com a persistência do TDAH. Outro EWAS com amostras de adultos acessou, na verdade,

sintomas de TDAH em três coortes populacionais (van Dongen et al., 2019). Na meta-análise dessas amostras, verificaram-se associações nominais entre sintomatologia de TDAH e metilação diferencial nos genes *OPA1* e *AGAP1*. Quanto a amostras clínicas, Rovira et al. (2020) reportou hipermetilação no sítio CpG anterior ao gene *PCNXL3* em pacientes. Porém essa associação foi no sentido contrário quando se consideraram pacientes expostos a abuso sexual em comparação aos não expostos. Isso reforça que os níveis de metilação do DNA podem interagir com outros fatores.

É interessante notar que apesar de nenhum trabalho ter avaliado de fato os níveis de metilação global no TDAH, dois trabalhos utilizaram a média dos valores beta da metilação de todos os sítios inclusos no *array*, como um marcador de metilação global. Enquanto Mooney et al. (2020) não detectaram diferença entre essa média entre casos e controles, Meijer et al. (2020) observaram uma sutil diferença “global” com o grupo de TDAH persistente apresentando níveis de metilação maiores do que o grupo de remitentes. Essas duas tentativas vão no sentido de tentar entender o papel mais abrangente das marcas epigenéticas, porém os chips apresentam uma representatividade genômica muito baixa e enviesada para regiões codificantes. Inclusive, um dos principais alvos de metilação do DNA, os retrotransposons, não são acessados por *arrays* (Yoder et al., 1997).

Temos, então, que mesmo com alguns esforços no sentido de compreender melhor o papel de fatores epigenéticos no TDAH, fatores como idade, sexo, exposições prévias e provavelmente comorbidades podem influenciar nas associações encontradas. Considerando esse panorama altamente complexo, há absoluta falta de conhecimento sobre a metilação global, justamente uma medida que pode auxiliar a entender o efeito do exposoma sobre o perfil genético dos indivíduos. A presente Tese foi desenvolvida no sentido de começar a preencher essa lacuna.

**Tabela 3:** Estudos de alcance epigenômico conduzidos com relação ao TDAH até 30 de dezembro de 2020.

<b>Autor</b>	<b>Dados sobre a amostra</b>	<b>Tecido; Chip utilizado</b>	<b>Principais achados</b>	<b>Achados secundários</b>
° Wilmot et al., 2016	Crianças (7-12 anos), somente meninos. Amostra geradora de hipótese (46 casos e	Saliva; 450K	<b>Etapa de priorização:</b> selecionou genes com múltiplas <i>probes</i>	<b>Etapa de enriquecimento de vias:</b> separou <i>sets</i> com > de 50% dos genes hipometilados e outro com

	46 controles pareados por idade). Amostra de confirmação (10 vs. 10).		nominalmente significativas = <i>VIPR2</i> e <i>MYT1L</i> .  <b>Etapa de confirmação:</b> ↓ <i>VIPR2</i> na amostra de TDAH.	>50% dos genes hipermetilados na amostra de TDAH.  <u><i>GO Biological Process:</i></u>  Set hipometilado = atividade antioxidante.  Top dois sets hipermetilados: envolveram a atividade de receptores nicotínicos, processos inflamatórios e de modulação da neurotransmissão monoaminérgica e colinérgica.  <u><i>ConsensusPathDB:</i></u>  Hipometilados = todos relacionadas a processos inflamatórios. Homocisteína, cisteína, glutatona, oxidação de ácidos graxos.  Hipermetiladas = degradação da glutamina e sinalização via proteína G.
° Walton et al., 2017	Estudo prospectivo de trajetória de sintomas (7-15 anos).  Nascimento = 817 (49% meninos)  7 anos = 892 (50% meninos)  Sobreposição = 783	Nascimento = sangue de cordão umbilical, 7 anos = sangue periférico; 450k	13 probes no nascimento foram diferencialmente metiladas quanto a trajetória de TDAH após FDR:  <i>High trajectory</i> =  ↓ <i>SKI</i> – relacionado à supressão do fator de crescimento beta e ao desenvolvimento do tubo neural.  ↓ <i>EPX</i> – da família peroxidase.  ↓ <i>ST3GAL3</i> – previamente associado a retardo mental.  ↑ <i>PEX2</i> – proteína da membrana peroxissomal (envolvida na formação de mielina e metabolismo de ácidos graxos).  ↑ <i>PBXW5</i> – sinalização de interleucina-1B.  ↑ <i>ELF3</i> – desenvolvimento pré-implantacional.  ↑ <i>ZNF454</i> – regulação da transcrição; previamente associado com TDAH.	Análises de vias dos genes que foram associados = Via mais enriquecida foi associada à processos peroxissomais (relacionados à oxidação de ácidos graxos).

			↑ <b>ZNF544</b> – regulação da transcrição; previamente associado com TDAH.	
° Chen et al., 2018	14 pares de gêmeos monozigóticos discordantes para TDAH (12 pares homens); idade média = 9,7(+/- 1,9)	Sangue; 450K	Lista de 453 probes com maiores diferenças entre os irmãos. Sem muito detalhamento no artigo sobre a diferença de metilação entre os gêmeos, pois a abordagem principal tentou associar diferenças de metilação de <i>sets</i> com achados de neuroimagem.	Tentando verificar associações prévias = ↑ <b>VIPR2</b> em 3 gêmeos afetados
* Van Dongen et al., 2019	<p>Usou 3 coortes de adultos (amostra populacional) para verificar associação entre sintomas de TDAH e metilação do DNA.</p> <p><u>Netherlands Twin Register (NTR):</u></p> <p>N = 2258, média de idade = 37 anos.</p> <p><u>Dunedin Multidisciplinary Health and Development Study:</u></p> <p>N = 800, média de idade = 38 anos.</p> <p><u>Environmental Risk Longitudinal Twin Study (E-Risk):</u></p> <p>N = 1631, média de idade = 18 anos.</p> <p>Meta-análise: N = 4689</p>	Sangue; 450K	<p><u>Probes diferencialmente metiladas:</u></p> <p>1 (↓<b>cg26197679</b> no cromossomo 8 – região intergênica) no estudo da coorte de Dunedin (Nova Zelândia).</p> <p>2 nominais na meta-análise =</p> <p>↓<b>OPA1</b> - relação negativa com sintomas de TDAH.</p> <p>↑<b>AGAP1</b> - relação positiva com sintomas de TDAH.</p> <p><u>Regiões diferencialmente metiladas:</u></p> <p>NTR = 6. Genes mapeados na janela dessas regiões (<b>ACY3, AIF1, B3GALT4, COL7A11</b>)</p> <p>Dunedin = 19. Genes mapeados na janela dessas regiões (<b>TNXB, LRRC14B, INSL3, C20orf54, PPP1R2P1, CYP1A1, PDCL2, HCCA2, LOC402778, LOC402778, SORBS2, SEMA4B, AMZ1, ANK1, IFLTD1, BDKRB2, MYOM2</b>).</p> <p>E-Risk = 0</p> <p>Meta-análise = 0</p>	<p>Das DMRs, 92% foram associados com mQTLs.</p> <p>Nenhuma DMR se sobrepôs entre os estudos.</p>
° Mooney et al., 2020	TDAH = 391; controles = 213. De 7 à 13 anos.	Saliva; EPIC array.	<p>Nenhuma probe foi diferencialmente metilada de forma significativa, mas 7 sugestivas:</p> <p>↑cg17478313 – promotor <b>SLC7A8</b></p> <p>↑cg21609804 – 3'UTR do <b>MARK2, PDLIM5, VPS28,</b></p>	<p>1) Por intermédio dos <u>valores beta</u> testaram uma medida de <u>metilação "global"</u>, mas não encontraram diferença significativa.</p> <p>2) <u>PRS</u></p> <p>↓cg15472673 (ilha CpG promotor bivarado entre</p>



			<p><b>ZNF28, ZNF706 e FAM59A.</b></p>	<p><b>GART e SON)</b> associado com ↑PRS (p = 6,71E-8).</p> <p>Outras 12 foram nominais (p &lt; 1.0e-5 com ↑PRS):</p> <p>↑cg05348870 – <b>TNFSF14</b></p> <p>↑cg03391479 – <b>ARSJ</b></p> <p>↑cg03838680 – intergênico</p> <p>↑cg00428296 - <b>PGBD5</b></p> <p>↑cg17233422 - <b>LRIG1</b></p> <p>↑cg13011002 - <b>PLB1</b></p> <p>↑cg04453792 - <b>USP31</b></p> <p>↑cg12237140 – <b>KPTN</b></p> <p>↓cg16536664 - <b>DNAJB11, TBCCD1</b></p> <p>↓cg11425280 - <b>CHST11</b></p> <p>↑cg26223996 - <b>CLK3</b></p> <p>↑cg25332391 – <b>DROSHA</b></p> <p>3)Em função de achado anterior do mesmo grupo (sobreposição de 73 indivíduos entre as amostras) em meninos (Wilmot et al. 2016) também testaram <u>interação sexo-diagnóstico</u> com as <i>probes</i> dos genes <i>VIPR2</i> e <i>MYT1L</i> (239 <i>probes</i>):</p> <p>Meninos = ↓ <b>VIPR2</b> no grupo de TDAH (cg26975193 e cg20998127)</p> <p>Meninas = ↑ <b>VIPR2</b> no grupo de TDAH (cg26975193).</p> <p>Efeito permaneceu ao retirar amostra sobreposta entre os estudos.</p> <p>Para <i>MYT1L</i> não foi significativo, mas tendência de ↓cg02870147.</p>
*Meijer et al., 2020	TDAH persistente N = 35  TDAH remitante N = 19  Controles = 19	Sangue; EPIC array.	<p><u>DMP</u></p> <p>Não detectou diferenças significativas em sítios CpG individuais com a persistência do TDAH</p> <p>7 sugestivos entre <u>casos vs. controles</u>:</p> <p>↓cg19190762 – <b>SMIM2-AS1</b> (5'UTR)</p>	<p>Sem diferença “global” (<u>proporção média</u>) na metilação entre TDAH persistente e controles.</p> <p>Remitentes (média = 0,615(0,004)) vs. Persistentes (média = 0,616(0,0009) p = 0.00115).</p>

			<p>↓cg02448002 – <b>JAK2</b> (intergênico)</p> <p>↑cg18005896 – <b>SMOC2</b> (intron 6)</p> <p>↓cg10136166 – <b>BREA2</b> (TSS1500)</p> <p>↑cg10811195 – <b>ANLN</b> (intron 1)</p> <p>↑cg19992207 – <b>ACOXL</b> (TSS1500)</p> <p>↓cg24142353 – <b>AGMO</b> (intron 12)</p> <p>5 sugestivos <u>persistentes</u> vs. <u>remitentes</u>:</p> <p>↑cg03350299 – <b>APOB</b> (TSS200)</p> <p>↑cg03438637 – <b>NCKAP5</b> (intron 2)</p> <p>↑cg24309555 – <b>APOB</b> (TSS200)</p> <p>↑cg01033642 – <b>RP11-525K10.1</b> (não codificante)</p> <p>↑cg16723488 - <b>APOB</b> (TSS200)</p> <p><u>DMR</u></p> <p>↑<b>APOB</b> e <b>LPAR5</b> (envolvidos na sinalização do colesterol) associados com persistência vs. remissão do TDAH</p> <p>↓<b>PPT2</b> em TDAH persistente vs. controles</p>	
*Rovira et al., 2020	TDAH = 103  Controles = 100, pareados para sexo e etnia	Sangue; EPIC array.	<p><u>DMP</u></p> <p>↑Cg07143296 – 77 pares de base <i>upstream</i> do gene <b>PCNXL3</b> – gene relacionado a doenças autoimunes</p> <p><u>DMR</u></p> <p><b>DENND2D</b> – relacionado à câncer e função pulmonar</p> <p><b>PWWP2B</b> – neuroticismo e regulação da dinâmica de acetilação de histonas</p> <p><b>LOC102724265 / AK094674</b></p>	<p>PRS de TDAH foi significativamente maior em casos.</p> <p>Após adicionar o PRS como covariável ao modelo ajustado para o EWAS o sítio cg07143296 e 3 regiões genômicas permaneceram significativas.</p>

			<b>UBASH3A</b> – regulação da sinalização imunológica	
° Neumann et al., 2020	Meta-análise com amostra do  Pregnancy And Childhood Epigenetics (PACE) Consórcio.  Verificou associação de metilação em DNA de cordão umbilical no nascimento com sintomas de TDAH acessados dos 4 aos 15 anos em N = 2477 crianças de 5 coortes (ALSPAC, GENR, INMA, NEST black, NEST White, PREDO) e metilação do DNA na idade escolar com sintomas de TDAH (7 aos 11 anos) em N = 2374 crianças de 9 coortes (ALSPAC, GENR, GLAKU, HELIX European, HELIX Pakistani).	Nascimento = sangue de cordão umbilical; idade escolar = sangue; 450K	<u>Metilação no nascimento:</u> 9 sítios predisseram sintomas de TDAH posteriormente.  ↓cg25520701 - <b>CREB5</b> ↓cg24838839 - Intergênico ↓cg22997238 - Intergênico ↓cg21600027 - Intergênico ↓cg17876201 - <b>ZBTB38</b> ↓cg11251614 - <b>PPIL1</b> ↓cg09762907 - <b>TRERF1</b> ↓cg09158638 - Intergênico ↓cg01271805 - <b>ERC2</b>  Idade escolar: nenhum sítio foi associado com TDAH.	Estresse pré-natal foi associado com mais sintomas de TDAH, mas não se associou com nenhum sítio CpG individual. Tentaram, mas não conseguiram replicar os achados de Walton et al. 2017.  Tentaram replicar os achados de Wilmot et al. 2016, mas nenhum achado alcançou significância.
° Goodman et al., 2020	TDAH = 22 (7-17 anos) – 56% meninas  OCD = 59  Controles = 54 (4-19 anos) – 27% meninas	Saliva; 450K	Nenhum sítio foi significativamente associado com TDAH ou TOC após correções para múltiplas testes. Pelo critério nominal de p < 0,05, 188 sítios CpG foram associados com TDAH.  Sem sobreposição com achados prévios.	Considerando o subgrupo com mais sintomas (≥6 SWAN) e critério nominal de p < 0,05: 299 sítios associados com TDAH.  Sem sobreposição com achados prévios.

° Estudo conduzido com crianças, \* estudo conduzido em adultos. DMR - regiões diferencialmente metiladas. 450K - Infinium HumanMethylation450 BeadChip; ↓ hipometilado em casos; ↑ hipermetilado em casos. TSS1500 = dentro de 1500 pares de base do início do sítio de transcrição. TSS200 = dentro de 200 pares de base do início do sítio de transcrição.

## Capítulo II

### Justificativa e Objetivos

---

## 2.1. Justificativa

---

Os transtornos psiquiátricos, em conjunto, figuram entre as principais causas de incapacidade em todo o mundo. Dentro desse escopo, o TDAH é um dos transtornos mais comuns tanto em crianças quanto em adultos. Além dos sintomas característicos da própria condição, o TDAH está relacionado com uma maior predisposição a comportamentos e outras condições psiquiátricas que levam a uma ampla gama de prejuízos em diversas áreas da vida do próprio indivíduo, de seus familiares e da sociedade como um todo.

O TDAH é um transtorno de etiologia multifatorial, sendo manifestado em função da influência de diversos fatores genéticos, ambientais e das inúmeras interações entre tais componentes. Apesar de sua alta herdabilidade, o entendimento do papel de variantes genéticas específicas envolvidas no TDAH ainda permanece um desafio, visto a grande heterogeneidade clínica e provável envolvimento de diferentes mecanismos neurobiológicos. Quanto à contribuição ambiental, existem diversas exposições que se mostraram associadas, mas o tamanho de efeito de componentes individuais é baixo.

Sendo assim, o estudo de mecanismos que são capazes de atuar na interface dos diferentes componentes envolvidos na etiologia dos transtornos é de particular importância. De fato, o número de estudos abordando componentes epigenéticos, e de maneira especial os que avaliam a metilação do DNA, tem aumentado. Porém, poucos trabalhos epigenéticos levaram em consideração o TDAH em amostras de adultos. Ainda, apenas um EWAS, conduzido em amostras de crianças, e um avaliando a persistência do TDAH, tentaram avaliar a metilação do DNA como uma medida global. Eles não identificaram diferença significativa entre casos e controles por essa medida “global”, mas o array utilizado em ambos os trabalhos compreendia apenas cerca de 3% de todos os sítios CpG do genoma humano.

Dessa forma, é necessário que se preencha essa lacuna de conhecimento acerca dos níveis de metilação no TDAH de adultos, particularmente de uma maneira global (a medida mais viável de se aproximar do resultado final de interações entre os fatores ambientais (exposoma) e os genéticos (genoma)). A técnica de quantificação de 5-mC por HPLC foi a escolhida por ser considerado o

padrão ouro nesse intento e não haver nenhum trabalho nesse sentido quanto ao TDAH.

## 2.2. Objetivos

---

### 2.2.1. Objetivo geral

Estudar a influência dos níveis de metilação global em pacientes adultos com TDAH levando em consideração a heterogeneidade fenotípica do transtorno a partir da avaliação de comorbidades associadas.

### 2.2.2. Objetivos específicos

- Compilar as evidências disponíveis na literatura acerca do provável envolvimento dos níveis de metilação global sobre a modulação neuroendócrina em transtornos psiquiátricos (Capítulo III);
- Avaliar os níveis de metilação global (%5-mC) em pacientes com TDAH e controles, considerando também que os efeitos advindos de uma maior ou menor metilação possam ajudar a explicar diferentes manifestações comórbidas e suas diferentes prevalências de acordo com o sexo (Capítulo IV);
- Investigar possíveis efeitos genômicos sobre variações nos níveis de metilação global por intermédio da criação de escores de risco poligênico calculados a partir de GWAS de TDAH e de suas comorbidades (Capítulo IV).

## Capítulo III

**The neuroendocrine modulation of global DNA methylation in  
neuropsychiatric disorders - *Molecular Psychiatry* 26, 66–69 (2021)**



## Capítulo IV

Manuscrito em preparação a ser submetido na revista *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. IF: 4.361.

Global DNA methylation changes in adults with ADHD and its comorbidity with bipolar disorder

## Capítulo V

### Discussão Geral

---

Como foi apresentado ao longo da Tese, o TDAH apresenta uma base biológica multifatorial, sofrendo influência de diversos fatores genéticos e ambientais, o que implica em uma grande heterogeneidade clínica (Luo et al., 2019). Tal condição é observada em todos os continentes com uma frequência alta e semelhante (Polanczyk and Rohde, 2007). Também é interessante o fato de que existam relatos de pelo menos desde a Grécia antiga que descrevem características fenotípicas condizentes com os sintomas atualmente usados no diagnóstico de TDAH (Victor et al., 2018). Tais relatos nos permitem supor o quanto esta característica já devia ser comum, além de impactar a sociedade a ponto de ser descrita na sociedade grega.

Mesmo havendo relatos históricos acerca dessa condição, de sua alta prevalência na população e de apontamentos neurobiológicos relacionados ao transtorno, o TDAH é comumente motivo de discussão sobre sua existência na literatura não especializada. Isso cria um potencial estigma, e por consequência sofrimento adicional desnecessário, sobre os indivíduos por ele acometidos, os quais por vezes ainda são taxados como preguiçosos, desinteressados, desleixados, entre outros termos de conotação negativa. Apenas um aumento no conhecimento quanto a biologia envolvida nesse tipo de condição permitiria reduzir o sofrimento relacionado ao transtorno e suas consequências, além de viabilizar tratamentos psicológicos e farmacológicos mais efetivos com relação a cada quadro do seu espectro. Dessa forma, também seria possível reduzir o impacto econômico que o TDAH (custos médicos, educacionais e no sistema de justiça) representa na economia de diferentes países (Chhibber et al., 2021).

Houve muitos esforços no sentido de verificar quais fatores ambientais poderiam modificar o risco de manifestar o TDAH, porém pouca replicabilidade vem sendo observada entre os estudos (Kim et al., 2020). Quanto à pesquisa da arquitetura genética do TDAH, seguiu-se os mesmos passos que as demais condições psiquiátricas ao longo do tempo conforme a disponibilização de técnicas para cada tipo de análise: estudos de ligação, gene-candidato e GWAS. O GWAS de Demontis e colaboradores foi um marco na genética do TDAH, pois foi o primeiro a apontar SNPs associados ao transtorno, além de estimar a herdabilidade molecular do transtorno em cerca de 20% (Demontis et al., 2019). Esse dado é

muito importante, pois evidenciou que somente uma parcela limitada da herdabilidade total já pôde ser explicada por polimorfismos do tipo SNP, o que dá força a linhas de pesquisa que se dediquem ao entendimento de outras relações, entre elas as de intersecção genoma-exposoma.

Uma forma de avaliar tal interação é por intermédio do estudo de marcas epigenéticas, e estas têm ganho cada vez mais destaque em diferentes áreas, incluindo na genética psiquiátrica. Dentre as marcas epigenéticas a metilação do DNA é certamente a mais pesquisada, sendo um mecanismo ao mesmo tempo estável e dinâmico. Essa característica permite que haja reatividade ao meio e que a metilação do DNA funcione como um “interruptor molecular”. Resta, porém, entender melhor as causas e consequências dessa dinâmica para que possamos avançar na “desativação” de perfis epigenéticos associados ao desenvolvimento de quadros patológicos. Nesse sentido, é intuitivo trabalhar com efeitos relacionados a alterações na metilação de algumas poucas regiões de alguns genes. No entanto, sabe-se muito pouco sobre como regular a metilação de alvos específicos. Some-se a isso o fato já conhecido de que desfechos multifatoriais não são explicados por alterações em uma rota exclusiva e teremos um vislumbre do quanto de entendimento podemos estar perdendo ao não avaliar mecanismos mais gerais, com efeitos globais. O artigo de perspectivas (capítulo III) apresentado foi nesse sentido.

Em tal trabalho, apontamos para alterações no perfil de metilação global do DNA (GMe) que parecem ocorrer em resposta tanto ao ambiente interno (hormônios sexuais) quanto ao externo (hormônios de resposta ao estresse) (Müller et al. 2020). A relação proposta no artigo do Capítulo III é de que níveis aumentados de cortisol de alguma maneira, ainda não determinada, se relacione com menores níveis de GMe. Além disso, tanto os níveis de cortisol quanto de GMe ocorrem em padrões diferentes com relação ao sexo dos indivíduos. O hormônio testosterona, o qual é secretado muito precocemente durante o desenvolvimento, é capaz de influenciar em tais mudanças muito antes da adolescência, no sentido de uma metilação maior em homens. Alterações adicionais nos níveis de metilação são também observáveis ao longo da vida, com outros hormônios sexuais e exposições

também interferindo na manifestação final do transtorno por intermédio destes dois possíveis marcadores.

Além das evidências relacionadas diretamente ao sexo do indivíduo, sabemos que alguns transtornos são mais prevalentes em mulheres do que em homens. Interessantemente, os chamados transtornos internalizantes (cujos efeitos são mais perceptíveis no âmbito do próprio indivíduo), os quais são mais frequentemente observados em mulheres, apresentam uma tendência de níveis de cortisol menores, e GMe maiores, padrão semelhante ao observado para o sexo feminino de maneira geral. Estes mesmos parâmetros em transtornos externalizantes (com manifestação mais perceptível no ambiente externo ao do próprio indivíduo) os quais são mais frequentemente relacionados a homens, foram hipotetizados como tendo o sentido inverso em homens, porém é necessário que avaliações considerando tanto cortisol quanto GMe sejam feitas concomitantemente para confirmar esta hipótese.

Apesar de dois trabalhos prévios terem usado média de valores beta obtidos por EWAS como proxies de GMe no TDAH (caso-controle: Mooney et al., 2020; persistência: Meijer et al., 2020), no capítulo Capítulo IV trouxemos o primeiro estudo a verificar níveis de 5-mC total nesta condição, onde indivíduos com TDAH apresentaram menores níveis de metilação em relação aos controles. Tal achado divergiu da ausência de diferença global relatada por EWAS em um estudo com TDAH em crianças (Mooney et al., 2020). Isso pode apontar para uma prevalência de alterações de metilação nos sítios não marcados por EWAS. Em apoio a essa hipótese, um trabalho verificou que o tratamento com metilfenidato, droga muito usada no tratamento do TDAH (Banaschewski et al., 2010), reduziu a atividade do retrovírus endógeno humanos (HERVs) no paciente com TDAH avaliado (D'Agati et al., 2016). Posteriormente, outro trabalho reforçou tal achado, sendo que pacientes submetidos à terapia com metilfenidato apresentaram uma rápida redução na atividade de HERVs e uma melhora concomitante dos sintomas clínicos do transtorno (Cipriani et al., 2018). A principal forma de regular a atividade de HERVs é por intermédio de mecanismos epigenéticos (Dewannieux and Heidmann, 2013; Schulz et al., 2006), logo a hipometilação observada em indivíduos com TDAH seria um potencial ativador destes. Uma vez que HERVs representam cerca

de 8% do genoma humano (IHGC, 2004) e não são avaliados em EWAS, a falta de sobreposição entre os achados pela medida global e pelos proxies desta medida é possível. Evidentemente que outras diferenças entre os estudos também podem ter influenciado na diferença entre os achados como idade das amostras, tecido fonte do DNA analisado, exposoma diferente entre as populações, entre outros.

Nosso trabalho corroborou achados prévios de menor metilação em mulheres do que em homens (Fuke et al., 2004; Bromberg et al., 2008; Singmann et al., 2015; Suderman et al., 2017). Nesse sentido, achados recentes destacaram que o uso de contracepção hormonal está associado com aumento no risco de manifestação TDAH na prole (Hemmingsen et al., 2020). Tal risco provavelmente está relacionado a uma redução nos níveis de metilação influenciados pelo uso de hormônios, uma vez que maiores níveis de estrogênio já foram relacionados com diminuição de GMe tanto em humanos (Ulrich et al., 2012) quanto em modelo animal (Kovalchuk et al., 2007). Porém, mais dados são necessários para confirmar essa suposição ou verificar agentes capazes de alterar essas relações, uma vez que achados divergentes também estão disponíveis na literatura (Boyne et al., 2017; Iwasaki et al., 2012).

Além da avaliação de 5-mC, outras abordagens emergentes também se amparam em uma leitura mais geral do perfil epigenético nos transtornos psiquiátricos. Como já citado na Tese, aqui podemos citar a perspectiva de avaliação de idade epigenética por intermédio de marcadores de metilação em sítios CpG que foram demonstrados como preditores de idade biológica (DNAm age). O artigo que lançou as origens desse tipo de avaliação também destacou que o relógio epigenético deve representar alterações em poderosos processos biológicos (Horvath, 2013). Assim, o descompasso entre a idade biológica e a epigenética já foi observado em condições como BD, com concomitante aceleração da idade epigenética e redução do volume hipocampal (Fries et al., 2020). Interessantemente, outro estudo já havia demonstrado que níveis aumentados de cortisol (relacionados ao estresse) em meninas adolescentes era também associado tanto com aceleração da idade epigenética quanto redução do volume da mesma região cerebral (Davis et al., 2017). De maneira geral, os achados envolvendo idade epigenética são compatíveis com os dados de metilação global

relacionados ao efeito do estresse, visto que uma maior idade epigenética está associada à hipometilação global (embora com promotores geralmente hipermetilados) (Bell et al., 2019). Embora ainda seja necessário verificar o paralelismo entre GMe e relógio epigenético, evidências como as já demonstradas associações entre níveis aumentados de estresse e menor GMe (Müller et al., 2020), e entre aceleração da idade epigenética em meninas com altos níveis de cortisol (Davis et al., 2017), nos leva a especular que exista uma relação entre ambos. Inclusive, essa avaliação em específico nos permitiria afirmar qual marcador (GMe ou idade epigenética) é o melhor representante de alterações biológicas pervasivas, ou, se são, no mínimo semelhantes.

Ainda, verificamos que a presença de comorbidade com BD alterou a tendência de GMe observada em pacientes com TDAH sem BD. A hipermetilação observada nesse subconjunto de pacientes é um quadro complexo. Por um lado, a literatura apresenta uma tendência de hipometilação pelos proxies de GMe obtidos em sangue (Backlund et al., 2015; Huzayyin et al., 2014; Li et al., 2018), e em amostras submetidas à monoterapia com lítio. No outro, os proxies de GMe obtidos a partir de tecido cerebral (Rao et al., 2012) e em terapia combinada (que refletem um quadro mais variável e grave do transtorno) demonstraram hipermetilação (Backlund et al., 2015). Assim, sugerimos que o perfil de hipermetilação encontrado em pacientes com TDAH e BP comórbido representem um quadro clínico mais grave que seja capaz de “apagar” o componente internalizante do TDAH.

Por último, considerando a influência genética sobre os transtornos em si e sobre os níveis de metilação, analisamos se os PRS de TDAH e de BD influenciavam nos níveis de GMe. Interessantemente, o PRS de TDAH só se mostrou associado com GMe após controlar para BD. Também verificamos que os pacientes com TDAH com alto PRS para BD tinham também os maiores níveis de metilação. Uma vez que esses achados refletiram os achados clínicos, será importante verificar como (em nível mecanístico) o BD é capaz de alterar o sentido da associação em pacientes com TDAH. Vale destacar que, assim como GMe, as análises envolvendo PRSs representam uma medida genômica global. Assim, buscamos aqui conciliar medidas globais envolvendo genômica e epigenômica psiquiátrica. Com base nos dados apresentados na Tese podemos antever uma

importante expansão dessas abordagens em trabalhos futuros. Além disso, a utilização integrada de marcadores genômicos e epigenômicos deve melhorar o nível de predição que esses marcadores, de forma individual, proporcionam em atividades preventivas e terapêuticas.

As hipóteses, e consequentes achados, trazidos pela presente Tese permitiram conectar sistemas que até então haviam sido pouco relacionados. Apesar de se saber que a etiologia da maioria dos transtornos psiquiátricos é multifatorial, houve uma preferência histórica em se avaliar genes e fatores ambientais em específico. É possível afirmar que a abordagem baseada em GMe tem sido subestimada, considerando a relevância das informações disponibilizadas e o seu baixo custo. Uma limitação evidente do trabalho foi a falta de especificidade, porém, havendo a detecção de padrões robustos pela abordagem utilizada, em conjunto com outros marcadores que parecem ser relacionados a esta medida, ela parece estar mais próxima da aplicação clínica do que técnicas mais difundidas.

Uma vez que há muita sobreposição genética entre os transtornos (The Brain Storm Consortium, 2018) e evidência de que há padrões de GMe comuns entre certas condições, a avaliação de GMe talvez possa auxiliar na busca de trajetórias fisiopatológicas comuns em seus correlatos genéticos e epigenéticos. Dessa forma, concluímos que além de um fascinante conjunto de resultados inéditos, também levantamos uma série de perguntas que poderão ser respondidas em um esforço coletivo da comunidade científica a partir de estudos adicionais e complementares.



## Referências Bibliográficas

- Adriani, W., Romano, E., Pucci, M., Pascale, E., Cerniglia, L., Cimino, S., Tambelli, R., Curatolo, P., Granstrem, O., Maccarrone, M., Laviola, G., Addario, C.D., 2018. Potential for diagnosis versus therapy monitoring of attention deficit hyperactivity disorder: a new epigenetic biomarker interacting with both genotype and auto - immunity. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 27, 241–252. <https://doi.org/10.1007/s00787-017-1040-9>
- Alelú-paz, R., Carmona, F.J., Sanchez-mut, J. V, Escanilla, A., Monje, A., Márquez, C.G., Saiz-ruiz, J., Boy, F., 2016. Epigenetics in Schizophrenia : A Pilot Study of Global DNA Methylation in Different Brain Regions Associated with Higher Cognitive Functions 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.01496>
- Al About NM, Tupper C, Jialal I. Genetics, Epigenetic Mechanism. 2020 Nov 6. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 30422591.
- American Psychiatric Association, A., 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-5, Fifth Edit. ed. American Psychiatric Association, Washington DC.
- Arnett, A.B., Pennington, B.F., Willcutt, E.G., Olson, R.K., 2015. Sex Differences in ADHD Symptom Severity. *J* 56, 632–639. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12337>.Sex
- Backlund, L., Wei, Y. Bin, Martinsson, L., Melas, P.A., Liu, J.J., Mu, N., Östenson, C.-G., Ekström, T.J., Schalling, M., Lavebratt, C., 2015. Mood Stabilizers and the Influence on Global Leukocyte DNA Methylation in Bipolar Disorder. *Mol. neuropsychiatry* 1, 76–81. <https://doi.org/10.1159/000430867>
- Banaschewski, T., Becker, K., Scherag, S., Franke, B., Coghill, D., 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: An overview. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 19, 237–257. <https://doi.org/10.1007/s00787-010-0090-z>
- Banerjee, T. Das, Middleton, F., Faraone, S. V, 2007. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder 1269–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00430.x>
- Barbosa, E., Laura, A., Peteffi, G.P., Schneider, A., Müller, D., Rovaris, D., Henrique, C., Bau, D., Linden, R., Antunes, M.V., Charão, M.F., 2019. Increase of global DNA methylation patterns in beauty salon workers exposed to low levels of formaldehyde. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 1304–1314.
- Bard, J.B.L., 2009. Waddington' s Legacy to Developmental and Theoretical Biology. *Biol. Theory* 3, 188–197.
- Barlow, D.P., 2011. Genomic imprinting: A mammalian epigenetic discovery model. *Annu. Rev. Genet.* 45, 379–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132459>
- Baylin, S.B., Jones, P.A., 2011. A decade of exploring the cancer epigenome- biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* 11, 726–734.

<https://doi.org/10.1038/nrc3130>

- Bell, C.G., Lowe, R., Adams, P.D., Baccarelli, A.A., Beck, S., Bell, J.T., Christensen, B.C., Gladyshev, V.N., Heijmans, B.T., Horvath, S., Ideker, T., Issa, J.P.J., Kelsey, K.T., Marioni, R.E., Reik, W., Relton, C.L., Schalkwyk, L.C., Teschendorff, A.E., Wagner, W., Zhang, K., Rakyan, V.K., 2019. DNA methylation aging clocks: Challenges and recommendations. *Genome Biol.* 20, 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>
- Bestor, T.H., 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395–2402.
- Biederman, J., Mick, E., Faraone, S. V, Braaten, E., Doyle, A., Spencer, T., Wilens, T.E., Frazier, E., Johnson, M.A., 2002. Influence of Gender on Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children Referred to a Psychiatric Clinic. *Am. J. Psychiatry* 159, 36–42.
- Biederman, J., Petty, C.R., Evans, M., Small, J., Faraone, S. V., 2010a. How persistent is ADHD? A controlled 10-year follow-up study of boys with ADHD. *Psychiatry Res.* 177, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2009.12.010>.How
- Biederman, J., Petty, C.R., Monuteaux, M.C., Fried, R., Byrne, D., Mirto, T., Spencer, T., Wilens, T.E., Faraone, S. V, 2010b. Adult Psychiatric Outcomes of Girls With Attention Deficit Hyperactivity Disorder: 11-Year Follow-Up in a Longitudinal Case-Control Study. *Am. J. Psychiatry* 167, 409–417.
- Bock, C., Halbritter, F., Carmona, F.J., Tierling, S., Datlinger, P., Assenov, Y., Berdasco, M., Bergmann, A.K., Booher, K., Busato, F., Campan, M., Dahl, C., Dahmcke, C.M., Diep, D., Fernández, A.F., Gerhauser, C., Haake, A., Heilmann, K., Holcomb, T., Hussmann, D., Ito, M., Kläver, R., Kreutz, M., Kulis, M., Lopez, V., Nair, S.S., Paul, D.S., Plongthongkum, N., Qu, W., Queirós, A.C., Reinicke, F., Sauter, G., Schlomm, T., Statham, A., Stirzaker, C., Strogantsev, R., Urduingio, R.G., Walter, K., Weichenhan, D., Weisenberger, D.J., Beck, S., Clark, S.J., Esteller, M., Ferguson-Smith, A.C., Fraga, M.F., Guldborg, P., Hansen, L.L., Laird, P.W., Martín-Subero, J.I., Nygren, A.O.H., Peist, R., Plass, C., Shames, D.S., Siebert, R., Sun, X., Tost, J., Walter, J., Zhang, K., 2016. Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. *Nat. Biotechnol.* 34, 726–737. <https://doi.org/10.1038/nbt.3605>
- Bönsch, D., Wunschel, M., Lenz, B., Janssen, G., Weisbrod, M., Sauer, H., 2012. Methylation matters? Decreased methylation status of genomic DNA in the blood of schizophrenic twins. *Psychiatry Res.* 198, 533–537. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.09.004>
- Booth, M.J., Branco, M.R., Ficz, G., Oxley, D., Reik, W., Balasubramanian, S., 2012. Reports Quantitative Sequencing of 5-Methyl- cytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution. *Science* (80- ). 336, 934–7.
- Bouchard, M.F., Bellinger, D.C., Wright, R.O., Marc, G., 2010. Attention-Deficit /

Hyperactivity Disorder and Urinary Metabolites of Organophosphate Pesticides. *Pediatrics* 125, e1270–e1277. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-3058>

- Boyne, D.J., Friedenreich, C.M., McIntyre, J.B., Stanczyk, F.Z., Courneya, K.S., King, W.D., 2017. Endogenous sex hormone exposure and repetitive element DNA methylation in healthy postmenopausal women. *Cancer Causes Control* 28, 1369–1379. <https://doi.org/10.1007/s10552-017-0958-z>
- Breda, V., Rohde, L.A., Maria, A., Menezes, B., Anselmi, L., Caye, A., Rovaris, D.L., Vitola, E.S., Henrique, C., Bau, D., Grevet, E.H., 2020. The neurodevelopmental nature of attention-deficit hyperactivity disorder in adults. *Br. J. Psychiatry* 1–8. <https://doi.org/10.1192/bjp.2020.200>
- Bromberg, A., Bersudsky, Y., Levine, J., Agam, G., 2009. Global leukocyte DNA methylation is not altered in euthymic bipolar patients. *J. Affect. Disord.* 118, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2009.01.031>
- Brookes, K., Xu, X., Chen, W., Zhou, K., Neale, B., Lowe, N., Anney, R., Aneey, R., Franke, B., Gill, M., Ebstein, R., Buitelaar, J., Sham, P., Campbell, D., Knight, J., Andreou, P., Altink, M., Arnold, R., Boer, F., Buschgens, C., Butler, L., Christiansen, H., Feldman, L., Fleischman, K., Fliers, E., Howe-Forbes, R., Goldfarb, A., Heise, A., Gabriëls, I., Korn-Lubetzki, I., Johansson, L., Marco, R., Medad, S., Minderaa, R., Mulas, F., Müller, U., Mulligan, A., Rabin, K., Rommelse, N., Sethna, V., Sorohan, J., Uebel, H., Psychogiou, L., Weeks, A., Barrett, R., Craig, I., Banaschewski, T., Sonuga-Barke, E., Eisenberg, J., Kuntsi, J., Manor, I., McGuffin, P., Miranda, A., Oades, R.D., Plomin, R., Roeyers, H., Rothenberger, A., Sergeant, J., Steinhausen, H.-C., Taylor, E., Thompson, M., Faraone, S. V., Asherson, P., 2006. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in *DRD4*, *DAT1* and 16 other genes. *Mol. Psychiatry* 11, 934–953. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001869>
- Brunzell, D.H., Stafford, A.M., Dixon, C.I., 2016. Nicotinic receptor contributions to smoking: insights from human studies and animal models. *Curr. Addict. Reports* 2, 33–46. <https://doi.org/10.1007/s40429-015-0042-2>. Nicotinic
- Burghardt, K.J., Khoury, A.S., Msallaty, Z., Yi, Z., Seyoum, B., 2020. Antipsychotic Medications and DNA Methylation in Schizophrenia and Bipolar Disorder: A Systematic Review. *Pharmacotherapy* 40, 331–342. <https://doi.org/10.1002/phar.2375>
- Byrne, E.M., Henders, A.K., Bowdler, L., Mcrae, A.F., Heath, A.C., Martin, N.G., Montgomery, G.W., Krause, L., Wray, N., 2013. Monozygotic twins affected with major depressive disorder have greater variance in methylation than their unaffected co-twin. *Transl. Psychiatry* 3, e269-6. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.45>
- Casalino, L., Verde, P., 2020. Multifaceted Roles of DNA Methylation in Neoplastic Transformation, from Tumor Suppressors to EMT and Metastasis. *Genes (Basel)*. 11, 1–24.

- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386–389. <https://doi.org/10.1126/science.1083968>
- Caye, A., Rocha, T.B.M., Anselmi, L., Murray, J., Menezes, A.M.B., Barros, F.C., Gonçalves, H., Wehrmeister, F., Jensen, C.M., Steinhausen, H.C., Swanson, J.M., Kieling, C., Rohde, L.A., 2016. Attention-deficit/hyperactivity disorder trajectories from childhood to young adulthood evidence from a birth cohort supporting a late-onset syndrome. *JAMA Psychiatry* 73, 705–712. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.0383>
- Ceylan, D., Scola, G., Tunca, Z., Isaacs-Trepanier, C., Can, G., Andreazza, A.C., Young, L.T., Özerdem, A., 2018. DNA redox modulations and global DNA methylation in bipolar disorder: Effects of sex, smoking and illness state. *Psychiatry Res.* 261, 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.12.051>
- Chang, Z., Lichtenstein, P., Asherson, P.J., Larsson, H., 2013. Developmental Twin Study of Attention Problems. *JAMA Psychiatry* 70, 311–318. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.287>
- Chen, Q., Brikell, I., Lichtenstein, P., Serlachius, E., Kuja-Halkola, R., Sandin, S., Larsson, H., 2017. Familial aggregation of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* 58, 231–239. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12616>
- Chen, W., Zhou, K., Sham, P., Franke, B., Kuntsi, J., Campbell, D., Fleischman, K., Knight, J., Andreou, P., Arnold, R., Altink, M., Boer, F., Boholst, M.J., Buschgens, C., Butler, L., Christiansen, H., Fliers, E., Howe-Forbes, R., Gabriëls, I., Heise, A., Korn-Lubetzki, I., Marco, R., Medad, S., Minderaa, R., Müller, U.C., Mulligan, A., Psychogiou, L., Rommelse, N., Sethna, V., Uebel, H., McGuffin, P., Plomin, R., Banaschewski, T., Buitelaar, J., Ebstein, R., Eisenberg, J., Gill, M., Manor, I., Miranda, A., Mulas, F., Oades, R.D., Roeyers, H., Rothenberger, A., Sergeant, J., Sonuga-Barke, E., Steinhausen, H.C., Taylor, E., Thompson, M., Faraone, S. V., Asherson, P., 2008. DSM-IV combined type ADHD shows familial association with sibling trait scores: A sampling strategy for QTL linkage. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 147, 1450–1460. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30672>
- Chen, Y., Ozturk, N.C., Zhou, F.C., 2013. DNA Methylation Program in Developing Hippocampus and Its Alteration by Alcohol. *PLoS One* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060503>
- Chen, Y., Sudre, G., Sharp, W., Donovan, F., Chandrasekharappa, S.C., Hansen, N., Elnitski, L., Shaw, P., 2018. Neuroanatomic , epigenetic and genetic differences in monozygotic twins discordant for attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 23, 683–690. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.45>
- Chhibber, A., Watanabe, A.H., Chaisai, C., Veettil, S.K., Chaiyakunapruk, N., 2021. Global Economic Burden of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Systematic Review. *Pharmacoeconomics.* <https://doi.org/10.1007/s40273-020-00998-0>

- Cho, S., Kim, B., Hong, Y., Shin, M., Jeong, H., Kim, J., Bhang, S., Cho, I.H., Kim, H., 2010. Effect of environmental exposure to lead and tobacco smoke on inattentive and hyperactive symptoms and neurocognitive performance in children 9, 1050–1057. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2010.02250.x>
- Choi, S.W., Mak, T.S.H., O'Reilly, P.F., 2020. Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses. *Nat. Protoc.* 15, 2759–2772. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0353-1>
- Cipriani, C., Pitzianti, M.B., Matteucci, C., D'Agati, E., Miele, M.T., Rapaccini, V., Grelli, S., Curatolo, P., Sinibaldi-Vallebona, P., Pasini, A., Balestrieri, E., 2018. The Decrease in Human Endogenous Retrovirus-H Activity Runs in Parallel with Improvement in ADHD Symptoms in Patients Undergoing Methylphenidate Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms19113286>
- Clive, M.L., Boks, M.P., Vinkers, C.H., Osborne, L.M., Payne, J.L., Ressler, K.J., Smith, A.K., Wilcox, H.C., Kaminsky, Z., 2016. Discovery and replication of a peripheral tissue DNA methylation biosignature to augment a suicide prediction model. *Clin. Epigenetics* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0279-1>
- Consortium, I.H.G.S., 2004. International Human Genome Sequencing Consortium, Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945.
- Consortium, T.B., 2018. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science* (80-. ). 360, eaap8757. <https://doi.org/10.1126/science.aap8757>
- Cordaux, R., Batzer, M.A., 2009. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* 10, 691–703. <https://doi.org/10.1038/nrg2640>
- Crider, K.S., Yang, T.P., Berry, R.J., Bailey, L.B., 2018. Folate and DNA Methylation : A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate ' s Role 1 , 2 21–38. <https://doi.org/10.3945/an.111.000992>. Downloaded
- Crider, K.S., Yang, T.P., Berry, R.J., Bailey, L.B., 2012. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 3, 21–38. <https://doi.org/10.3945/an.111.000992>
- D'Agati, E., Pitzianti, M., Balestrieri, E., Matteucci, C., Vallebona, P.S., Pasini, A., 2016. First evidence of HERV-H transcriptional activity reduction after methylphenidate treatment in a young boy with ADHD. *New Microbiol.* 39, 237–239.
- Dadds, M.R., Schollar, O., Rhoshel, R., Caroline, L., Hawes, D.J., 2016. Epigenetic regulation of the DRD4 gene and dimensions of attention-deficit/hyperactivity disorder in children. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 25, 1081–9. <https://doi.org/10.1007/s00787-016-0828-3>
- Dall'Aglio, L., Muka, T., Charlotte, A.M., Bramer, W.M., Verbiest, M.M.P.J., Nano, J., Hidalgo, A.C., Franco, O.H., Tiemeier, H., 2018. The Role of Epigenetic Modifications in Neurodevelopmental Disorders: A Systematic Review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 94, 17–30.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.07.011>

- Davies, M.N., Volta, M., Pidsley, R., Lunnon, K., Dixit, A., Lovestone, S., Coarfa, C., Harris, R.A., Milosavljevic, A., Troakes, C., Al-sarraj, S., Dobson, R., Schalkwyk, L.C., Mill, J., 2012. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol.* 13, R43. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r43>
- Davis, E.G., Humphreys, K.L., McEwen, L.M., Sacchet, M.D., Camacho, M.C., Maclsaac, J.L., Lin, D.T.S., Kobor, M.S., Gotlib, I.H., 2017. Accelerated DNA methylation age in adolescent girls: associations with elevated diurnal cortisol and reduced hippocampal volume. *Transl. Psychiatry* 7, e1223. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.188>
- Demontis, D., Walters, R.K., Martin, J., Mattheisen, M., Als, T.D., Agerbo, E., Baldursson, G., Belliveau, R., Bybjerg-Grauholm, J., Bækvad-Hansen, M., Cerrato, F., Chambert, K., Churchhouse, C., Dumont, A., Eriksson, N., Gandal, M., Goldstein, J.I., Grasby, K.L., Grove, J., Gudmundsson, O.O., Hansen, C.S., Hauberg, M.E., Hollegaard, M. V., Howrigan, D.P., Huang, H., Maller, J.B., Martin, A.R., Martin, N.G., Moran, J., Pallesen, J., Palmer, D.S., Pedersen, C.B., Pedersen, M.G., Poterba, T., Poulsen, J.B., Ripke, S., Robinson, E.B., Satterstrom, F.K., Stefansson, H., Stevens, C., Turley, P., Walters, G.B., Won, H., Wright, M.J., Albayrak, Ö., Anney, R.J.L., Arranz, M.J., Banaschewski, T.J., Bau, C., Biederman, J., Buitelaar, J.K., Casas, M., Charach, A., Crosbie, J., Dempfle, A., Doyle, A.E., Ebstein, R.P., Elic, J., Freitag, C., Föcker, M., Gill, M., Grevet, E., Hawi, Z., Hebebrand, J., Herpertz-Dahlmann, B., Hervas, A., Hinney, A., Hohmann, S., Holmans, P., Hutz, M., Ickowitz, A., Johansson, S., Kent, L., Kittel-Schneider, S., Lambregts-Rommelse, N., Lehmkuhl, G., Loo, S.K., McGough, J.J., Meyer, J., Mick, E., Middleton, F., Miranda, A., Mota, N.R., Mulas, F., Mulligan, A., Nelson, F., Nguyen, T.T., Oades, R.D., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Palmason, H., Ramos-Quiroga, J.A., Renner, T.J., Ribasés, M., Rietschel, M., Rivero, O., Romanos, J., Romanos, M., Rothenberger, A., Royers, H., Sánchez-Mora, C., Scherag, A., Schimmelmann, B.G., Schäfer, H., Sergeant, J., Sinzig, J., Smalley, S.L., Steinhausen, H.C., Thompson, M., Todorov, A., Vasquez, A.A., Walitza, S., Wang, Y., Warnke, A., Williams, N., Witt, S.H., Yang, L., Zayats, T., Zhang-James, Y., Smith, G.D., Davies, G.E., Ehli, E.A., Evans, D.M., Fedko, I.O., Greven, C.U., Groen-Blokhuis, M.M., Guxens, M., Hammerschlag, A.R., Hartman, C.A., Heinrich, J., Jan Hottenga, J., Hudziak, J., Jugessur, A., Kemp, J.P., Krapohl, E., Murcia, M., Myhre, R., Nolte, I.M., Nyholt, D.R., Ormel, J., Ouwens, K.G., Pappa, I., Pennell, C.E., Plomin, R., Ring, S., Standl, M., Stergiakouli, E., Pourcain, B.S., Stoltenberg, C., Sunyer, J., Thiering, E., Tiemeier, H., Tiesler, C.M.T., Timpson, N.J., Trzaskowski, M., van der Most, P.J., Vilor-Tejedor, N., Wang, C.A., Whitehouse, A.J.O., Zhao, H., Agee, M., Alipanahi, B., Auton, A., Bell, R.K., Bryc, K., Elson, S.L., Fontanillas, P., Furlotte, N.A., Hinds, D.A., Hromatka, B.S., Huber, K.E., Kleinman, A., Litterman, N.K., McIntyre, M.H., Mountain, J.L., Northover, C.A.M., Pitts, S.J., Sathirapongsasuti, J.F., Sazonova, O. V., Shelton, J.F., Shringarpure, S., Tian, C., Vacic, V., Wilson, C.H., Andreassen, O.A., Asherson, P., Burton, C.L., Boomsma, D.I., Cormand, B., Dalsgaard, S.,

- Franke, B., Gelernter, J., Geschwind, D., Hakonarson, H., Haavik, J., Kranzler, H.R., Kuntsi, J., Langley, K., Lesch, K.P., Middeldorp, C., Reif, A., Rohde, L.A., Roussos, P., Schachar, R., Sklar, P., Sonuga-Barke, E.J.S., Sullivan, P.F., Thapar, A., Tung, J.Y., Waldman, I.D., Medland, S.E., Stefansson, K., Nordentoft, M., Hougaard, D.M., Werge, T., Mors, O., Mortensen, P.B., Daly, M.J., Faraone, S. V., Børglum, A.D., Neale, B.M., 2019. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat. Genet.* 51, 63–75. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0269-7>
- Dewannieux, M., Heidmann, T., 2013. Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr. Opin. Virol.* 3, 646–656. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.005>
- Ding, K., Yang, J., Reynolds, G.P., Chen, B., Shao, J., Liu, R., Qian, Q., Liu, H., Yang, R., Wen, J., Kang, C., 2017. DAT1 methylation is associated with methylphenidate response on oppositional and hyperactive-impulsive symptoms in children and adolescents with ADHD. *World J. Biol. Psychiatry* 18, 291–299. <https://doi.org/10.1080/15622975.2016.1224928>
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Insight Rev. Artic.* 429, 457–463.
- Elia, J., Laracy, S., Allen, J., Nissley-Tsiopinis, J., Borgmann-Winter, K., 2012. Epigenetics: Genetics Versus Life Experiences. *Curr Top Behav Neurosci* 9, 317–340. <https://doi.org/10.1007/7854>
- Elliott, E., Manashirov, S., Zwang, R., Gil, S., Tsoory, X.M., Shemesh, Y., Chen, A., 2016. Dnmt3a in the Medial Prefrontal Cortex Regulates Anxiety- Like Behavior in Adult Mice. *J. Neurosci.* 36, 730–740. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0971-15.2016>
- Eriksson, M., Steneroth, G., 2000. pregnancy : environmental factors and outcome after 14-15 years during.
- Fachim, H.A., Srisawat, U., Dalton, C.F., Reynolds, G.P., 2018. Parvalbumin promoter hypermethylation in postmortem brain in schizophrenia. *Behav. Res Environ Methods* 10, 519–524.
- Faraone, S. V., Larsson, H., 2019. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 24, 562–575. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0070-0>
- Faraone, S. V., Perlis, R.H., Doyle, A.E., Smoller, J.W., Goralnick, J.J., Holmgren, M.A., Sklar, P., 2005. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol. Psychiatry* 57, 1313–1323. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.024>
- Farias, A.C., Cunha, A., Benko, C.R., McCracken, J.T., Costa, M.T., Farias, L.G., Cordeiro, M.L., 2010. Manganese in Children with Attention-Deficit = Hyperactivity Disorder : Relationship with Methylphenidate Exposure. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 20, 113–118.
- Fayyad, J., Sampson, N.A., Hwang, I., Adamowski, T., Aguilar-Gaxiola, S., Al-

- Hamzawi, A., Andrade, L.H.S.G., Borges, G., Girolamo, G. de, Florescu, S., Gureje, O., Haro, J.M., Hu, C., Karam, E.G., Lee, S., Navarro-Mateu, F., O'Neill, S., Pennell, B.-E., Piazza, M., Posada-Villa, J., Have, M. ten, Torres, Y., Xavier, M., Zaslavsky, A.M., Collaborators, R.C.K. on behalf of the W.W.M.H.S., 2017. The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Atten. Defic. Hyperact. Disord.* 9, 47–65. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0061-4>.
- Feinberg, A.P., 2007. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447, 433–440. <https://doi.org/10.1038/nature05919>
- Fineberg, S.K., Kosik, K.S., Davidson, B.L., 2009. MicroRNAs Potentiate Neural Development. *Neuron* 64, 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.020>
- Forger, N.G., 2018. Past, present and future of epigenetics in brain sexual differentiation. *J. Neuroendocrinol.* 30.
- Franke, B., Faraone, S. V, Asherson, P., Buitelaar, J., Bau, C.H.D., Ramos-Quiroga, J.A., Mick, E., Grevet, E.H., Johansson, S., Haavik, J., Lesch, K.P., Cormand, B., Reif, A., IMpACT, on behalf of the I.M. persistent A.C., 2011. The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol. Psychiatry* 17, 960–987. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.138>
- Franke, B., Neale, B.M., Faraone, S. V., 2009. Genome-wide association studies in ADHD. *Hum. Genet.* 126, 13–50. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0663-4>
- Fransquet, P.D., Wigglesworth, J., Woods, R.L., Ernst, M.E., Ryan, J., 2019. The epigenetic clock as a predictor of disease and mortality risk: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Epigenetics* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0656-7>
- Fries, G.R., Bauer, I.E., Scaini, G., Valvassori, S.S., Walss-Bass, C., Soares, J.C., Quevedo, J., 2020. Accelerated hippocampal biological aging in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 22, 498–507. <https://doi.org/10.1111/bdi.12876>
- Froehlich, T.E., Anixt, J.S., Loe, I.M., Gilman, R.C., 2011. Update on Environmental Risk Factors for Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder 333–344. <https://doi.org/10.1007/s11920-011-0221-3>
- Garcia, C.R., Bau, C.H.D., Silva, K.L., Callegari-jacques, S.M., Salgado, C.A.I., Fischer, A.G., Victor, M.M., Sousa, N.O., Karam, R.G., Rohde, L.A., Belmonte-de-abreu, P., Grevet, E.H., 2012. The burdened life of adults with ADHD: Impairment beyond comorbidity. *Eur. Psychiatry* 27, 309–313. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2010.08.002>
- Garro, A.J., McBeth, D.L., Lima, V., Lieber, C.S., 1991. Ethanol Consumption Inhibits Fetal DNA Methylation in Mice: Implications for the Fetal Alcohol Syndrome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15, 395–398. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1991.tb00536.x>
- Gizer, I.R., Ficks, C., Waldman, I.D., 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum. Genet.* 126, 51–90. <https://doi.org/10.1007/s00439->



- Glad, C.A.M., Andersson-assarsson, J.C., Berglund, P., Bergthorsdottir, R., Ragnarsson, O., Johannsson, G., 2017. Reduced DNA methylation and psychopathology following endogenous hypercortisolism – a genome-wide study. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep44445>
- Goodlett, C.R., Ph, D., Horn, K.H., 2001. Mechanisms of Alcohol- Induced Damage to the Developing Nervous System 25.
- Goodman, S.J., Burton, C.L., Butcher, D.T., Siu, M.T., Lemire, M., Chater-Diehl, E., Turinsky, A.L., Brudno, M., Soreni, N., Rosenberg, D., Fitzgerald, K.D., Hanna, G.L., Anagnostou, E., Arnold, P.D., Crosbie, J., Schachar, R., Weksberg, R., 2020. Obsessive-compulsive disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: Distinct associations with DNA methylation and genetic variation. *J. Neurodev. Disord.* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s11689-020-09324-3>
- Gouil, Q., Keniry, A., 2019. Latest techniques to study DNA methylation. *Essays Biochem.* 63, 639–648.
- Greenberg, M.V.C., Bourc'his, D., 2019. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 590–607. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>
- Grunau, C., Clark, S.J., Rosenthal, A., 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 29, E65-5.
- Gu, H., Smith, Z.D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., Meissner, A., 2011. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* 6, 468–481. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.190>
- Guintivano, J., Kaminsky, Z.A., 2016. Role of epigenetic factors in the development of mental illness throughout life. *Neurosci. Res.* 102, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.08.003>
- Guintivano, J., Ph, D., Newcomer, A., Sc, M., Cox, O., Sc, B., Maher, B.S., Ph, D., Eaton, W.W., Ph, D., Payne, J.L., Wilcox, H.C., Ph, D., Kaminsky, Z.A., Ph, D., 2014. Identification and Replication of a Combined Epigenetic and Genetic Biomarker Predicting Suicide and Suicidal Behaviors 1287–1296.
- Guney, E., Cetin, F.H., Iseri, E., 2015. The Role of Environmental Factors in Etiology of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, in: Norvilitis, J.M. (Ed.), *ADHD - New Directions in Diagnosis and Treatment* [104]. IntechOpen, London, pp. 15–34.
- Hawi, Z., Cummins, T.D.R., Tong, J., Johnson, B., Lau, R., Samarra, W., Bellgrove, M.A., 2015. The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 20, 289–97. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.183>
- Heinrich, H., Grunitz, J., Stonawski, V., Frey, S., Wahl, S., Albrecht, B., Goecke, T.W., Beckmann, M.W., Kornhuber, J., Fasching, P.A., Moll, G.H., Eichler, A., 2017. Attention, cognitive control and motivation in ADHD: Linking event-

related brain potentials and DNA methylation patterns in boys at early school age. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03326-3>

- Heiss, J.A., Brennan, K.J., Baccarelli, A.A., Téllez-, M.M., Estrada-gutiérrez, G., Wright, R.O., Just, A.C., 2020. Battle of epigenetic proportions: comparing Illumina 's EPIC methylation microarrays and TruSeq targeted bisulfite sequencing. *Epigenetics* 15, 174–182. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1656159>
- Hemmingsen, C.H., Kjaer, S.K., Jezek, A.H., Verhulst, F.C., Pagsberg, A.K., Kamper, M., Lina, J., Hargreave, M., 2020. Maternal use of hormonal contraception and risk of childhood ADHD: a nationwide population - based cohort study. *Eur. J. Epidemiol.* 35, 795–805. <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00673-w>
- Hillemacher, T., Frieling, H., Moskau, S., Muschler, M.A.N., Semmler, A., Kornhuber, J., Klockgether, T., Bleich, S., Linnebank, M., 2008. Global DNA methylation is influenced by smoking behaviour. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 18, 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2007.12.005>
- Hinshaw, S.P., Owens, E.B., Zalecki, C., Huggins, S.P., Montenegro-Nevado, A.J., Schrodek, E., Swanson, E.N., 2012. Prospective Follow-up of Girls with Attention-deficit/ Hyperactivity Disorder into Early Adulthood: Continuing Impairment Includes Elevated Risk for Suicide Attempts and Self-Injury. *J Consult Clin Psychol* 80, 1041–1051. <https://doi.org/10.1037/a0029451.Prospective>
- Horvath, S., 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14, R15. <https://doi.org/10.1145/2820783.2820789>
- Horvath, S., Raj, K., 2018. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat. Rev. Genet.* 19, 371–384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Houtepen, L.C., Van Bergen, A.H., Vinkers, C.H., Boks, M.P.M., 2016. DNA methylation signatures of mood stabilizers and antipsychotics in bipolar disorder. *Epigenomics* 8, 197–208. <https://doi.org/10.2217/epi.15.98>
- Huang, Y., Pastor, W.A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R., Rao, A., 2010. The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. *PLoS One* 5, e8888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008888>
- Huzayyin, A.A., Andreazza, A.C., Turecki, G., Cruceanu, C., Rouleau, G.A., Alda, M., Young, L.T., 2014. Decreased global methylation in patients with bipolar disorder who respond to lithium. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 561–569. <https://doi.org/10.1017/S1461145713001569>
- Iwasaki, M., Ono, H., Kuchiba, A., Kasuga, Y., Yokoyama, S., Onuma, H., Nishimura, H., Kusama, R., Yoshida, T., Tsugane, S., 2012. Association of postmenopausal endogenous sex hormones with global methylation level of leukocyte DNA among Japanese women. *BMC Cancer* 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-323>

- Jiang, T., Zong, L., Zhou, L., Hou, Y., Zhang, L., Zheng, X., Han, H., Li, S., Zhang, W., Zhang, J., Deng, C., Jia, Y., Zhao, C., 2017. Variation in global DNA hydroxymethylation with age associated with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 257, 497–500. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.08.022>
- Joosten, S.C., Smits, K.M., Aarts, M.J., Melotte, V., Koch, A., 2018. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. *Nat. Rev. Urol.* 15. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0023-z>
- Kaminsky, Z., Wang, S.C., Petronis, A., 2006. Complex disease, gender and epigenetics. *Ann. Med.* 38, 530–544. <https://doi.org/10.1080/07853890600989211>
- Kaminsky, Z.A., Tang, T., Wang, S.C., Ptak, C., Oh, G.H.T., Wong, A.H.C., Feldcamp, L.A., Virtanen, C., Halfvarson, J., Tysk, C., McRae, A.F., Visscher, P.M., Montgomery, G.W., Gottesman, I.I., Martin, N.G., Petronis, A., 2009. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat. Genet.* 41, 240–245. <https://doi.org/10.1038/ng.286>
- Karam, R.G., Breda, V., Picon, F.A., Rovaris, D.L., Victor, M.M., Salgado, C.A.I., Vitola, E.S., Silva, K.L., Guimarães-Da-Silva, P.O., Mota, N.R., Caye, A., Belmonte-De-Abreu, P., Rohde, L.A., Grevet, E.H., Bau, C.H.D., 2015. Persistence and remission of ADHD during adulthood: A 7-year clinical follow-up study. *Psychol. Med.* 45, 2045–2056. <https://doi.org/10.1017/S0033291714003183>
- Kessler, R.C., Crum, R.M., Warner, L.A., Nelson, C.B., Schulenberg, J., Anthony, J.C., 1997. Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey. *Arch. Gen. Psychiatry* 54, 313–321.
- Kessler, R.C., Ph, D., Adler, L., Barkley, R., Ph, D., Biederman, J., Conners, C.K., Ph, D., Demler, O., Faraone, S. V, Ph, D., Greenhill, L.L., Howes, M.J., Ph, D., Secnik, K., Ph, D., Spencer, T., Ustun, T.B., Walters, E.E., Zaslavsky, A.M., Ph, D., 2006. The Prevalence and Correlates of Adult ADHD in the United States: Results From the National Comorbidity Survey Replication. *Am. J. Psychiatry* 163, 716–723.
- Khramtsova, E.A., Davis, L.K., Stranger, B.E., 2019. The role of sex in the genomics of human complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 20, 173–190. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0083-1>
- Kim, J.H., Kim, J.Y., Lee, J., Jeong, G.H., Lee, E., Lee, S., Lee, K.H., Kronbichler, A., Stubbs, B., Solmi, M., Koyanagi, A., Hong, S.H., Dragioti, E., Jacob, L., Brunoni, A.R., Carvalho, A.F., Radua, J., Thompson, T., Smith, L., Oh, H., Yang, L., Grabovac, I., Schuch, F., Fornaro, M., Stickley, A., Rais, T.B., Pablo, G.S. De, Shin, J. Il, Fusar-poli, P., 2020. Environmental risk factors, protective factors, and peripheral biomarkers for ADHD: an umbrella review. *The Lancet Psychiatry* 7, 955–970. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(20\)30312-6](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(20)30312-6)
- Kovalchuk, O., Tryndyak, V.P., Montgomery, B., Boyko, A., Kutanzi, K., Zemp, F., Warbritton, A.R., Latendresse, J.R., Kovalchuk, I., Beland, F.A., Pogribny, I.P.,

2007. Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications and aberrant microRNA expression. *Cell Cycle* 6, 2010–2018. <https://doi.org/10.4161/cc.6.16.4549>
- Krontira, A.C., Cruceanu, C., Binder, E.B., 2020. Glucocorticoids as Mediators of Adverse Outcomes of Prenatal Stress. *Trends Neurosci.* 43, 394–405.
- Kurdyukov, S., Bullock, M., 2016. DNA Methylation Analysis: Choosing the. *Biology (Basel)*. 5, 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>
- Lacal, I., Ventura, R., 2018. Epigenetic Inheritance : Concepts , Mechanisms and Perspectives. *Mol. Neurosci.* 11, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00292>
- Lawrence, M., Daujat, S., Schneider, R., 2016. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 32, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- Lee, H.S., Herceg, Z., 2017. Nutritional epigenome and metabolic syndrome, Second Edi. ed, *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805388-1.00030-4>
- Leenen, F.A.D., Muller, C.P., Turner, J.D., 2016. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin. Epigenetics* 8, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0256-8>
- Li, E., Zhang, Y., 2014. DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a019133.
- Li, J., Olsen, J., Vestergaard, M., Obel, C., Li, J., Olsen, J., Vestergaard, M., Obel, C., 2011. Attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring following prenatal maternal bereavement: a nationwide follow-up study in Denmark. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 19, 747–753.
- Li, M., Arcy, C.D., Li, X., Zhang, T., Joobar, R., Meng, X., 2019. What do DNA methylation studies tell us about depression? A systematic review. *Transl. Psychiatry* 9. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0412-y>
- Li, S., Yang, Q., Hou, Y., Jiang, T., Zong, L., Wang, Z., Luo, X., Liang, W., Zhao, H., Ning, Y., Zhao, C., 2018. Hypomethylation of LINE-1 elements in schizophrenia and bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* 107, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.10.009>
- Li, T., Mota, N.R., Galesloot, T.E., Bralten, J., Buitelaar, J.K., IntHout, J., AriasVasquez, A., Franke, B., 2019. ADHD symptoms in the adult general population are associated with factors linked to ADHD in adult patients. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 29, 1117–1126. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.07.136>
- Linares, T.J., Singer, L.T., Kirchner, H.L., Short, E.J., Min, M.O., Hussey, P., Minnes, S., 2006. Mental Health Outcomes of Cocaine-Exposed Children at 6 Years of Age 31, 85–97.
- Lisanti, S., Omar, W.A.W., Tomaszewski, B., Prins, S. De, Jacobs, G., Koppen, G.,

- Mathers, J.C., Langie, S.A.S., 2013. Comparison of Methods for Quantification of Global DNA Methylation in Human Cells and Tissues. *PLoS One* 8, e79044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079044>
- Liu, C., Jiao, C., Wang, K., Yuan, N., 2018. DNA Methylation and Psychiatric Disorders, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.01.006>
- Liyanage, V.R.B., Zachariah, R.M., Davie, J.R., Rastegar, M., 2015. Ethanol deregulates Mecp2/MeCP2 in differentiating neural stem cells via interplay between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at the Mecp2 regulatory elements. *Exp. Neurol.* 265, 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.01.006>
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lövkvist, C., Dodd, I.B., Sneppen, K., Haerter, J.O., 2016. DNA methylation in human epigenomes depends on local topology of CpG sites. *Nucleic Acids Res.* 44, 5123–5132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw124>
- Luo, Y., Lu, X., Xie, H., 2014. Dynamic Alu Methylation during Normal Development, Aging, and Tumorigenesis. *Biomed Res. Int.* 2014, 784706. <https://doi.org/10.1155/2014/784706>
- Luo, Y., Weibman, D., Halperin, J.M., Li, X., 2019. A review of heterogeneity in attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Front. Hum. Neurosci.* 13, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2019.00042>
- Lyko, F., 2018. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat. Rev. Genet.* 19, 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Magnin, E., Maurs, C., 2017. Attention-deficit/ hyperactivity disorder during adulthood. *Neuropsychology* 173, 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.07.008>
- Marks, A.R., Harley, K., Bradman, A., Kogut, K., Barr, D.B., Johnson, C., 2010. Organophosphate Pesticide Exposure and Attention in Young Mexican-American Children: The CHAMACOS Study. *Environ. Health Perspect.* 118, 1768–1774. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002056>
- Martin, E.M., Fry, R.C., 2018. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annu. Rev. Public Health* 39, 309–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040617-014629>
- Martini, J., Knappe, S., Beesdo-baum, K., Lieb, R., 2010. Anxiety disorders before birth and self-perceived distress during pregnancy: Associations with maternal depression and obstetric , neonatal and early childhood outcomes. *Early Hum. Dev.* 86, 305–310.
- McCarthy, N.S., Melton, P.E., Cadby, G., Yazar, S., Franchina, M., Moses, E.K.,

- Mackey, D.A., Hewitt, A.W., 2014. Meta-analysis of human methylation data for evidence of sex-specific autosomal patterns. *BMC Genomics* 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-981>
- McCoy, C.R., Jackson, N.L., Day, J., Clinton, S.M., 2017. Genetic predisposition to high anxiety- and depression-like behavior coincides with diminished DNA methylation in the adult rat amygdala. *Behav. Brain Res.* 320, 165–178. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.008>
- Meijer, M., Klein, M., Hannon, E., van der Meer, D., Hartman, C., Oosterlaan, J., Heslenfeld, D., Hoekstra, P.J., Buitelaar, J., Mill, J., Franke, B., 2020. Genome-Wide DNA Methylation Patterns in Persistent Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and in Association With Impulsive and Callous Traits. *Front. Genet.* 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00016>
- Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E.S., 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07107>
- Melas, P.A., Rogdaki, M., Ösby, U., Schalling, M., Lavebratt, C., Ekström, T.J., 2012. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *FASEB J.* 26, 2712–2718. <https://doi.org/10.1096/fj.11-202069>
- Merwood, A., Greven, C.U., Price, T.S., Rijdsdijk, F., Kuntsi, J., Mcloughlin, G., Larsson, H., 2013. Different heritabilities but shared etiological influences for parent , teacher and self-ratings of ADHD symptoms : an adolescent twin study 5, 1973–1984. <https://doi.org/10.1017/S0033291712002978>
- Mirkovic, B., Chagraoui, A., Gerardin, P., Cohen, D., 2020. Epigenetics and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: New Perspectives? *Front. Psychiatry* 11, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00579>
- Misiak, B., Szmida, E., Karpiński, P., Loska, O., Sasiadek, M.M., Frydecka, D., 2015. Lower LINE-1 methylation in first-episode schizophrenia patients with the history of childhood trauma. *Epigenomics* 7, 1275–1285.
- Moffitt, T.E., Houts, R., Asherson, P., Belsky, D.W., Corcoran, D.L., Hammerie, M.B.A., Harrington, H.B.A., Hogan, S.M.S.W., Meier, M.H., Polanczyk, G. V., Poulton, R., Ramrakha, S., Sugden, K., Williams, B., Rohde, L.A., Casoi, A., 2015. Is Adult ADHD a Childhood-Onset Neurodevelopmental Disorder? Evidence From a Four-Decade Longitudinal Cohort Study. *Am. J. Psychiatry* 172, 967–977. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.14101266>
- Mooney, M.A., Ryabinin, P., Wilmot, B., Bhatt, P., Mill, J., Nigg, J.T., 2020. Large epigenome-wide association study of childhood ADHD identifies peripheral DNA methylation associated with disease and polygenic risk burden. *Transl. Psychiatry* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0710-4>
- Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

- Motlagh, M.G., Katsovich, L., Thompson, N., Lin, H., Lawrence, Y.K., Paul, S., Robert, J.L., Peterson, B.S., Leckman, J.F., 2010. Severe psychosocial stress and heavy cigarette smoking during pregnancy : an examination of the pre- and perinatal risk factors associated with ADHD and Tourette syndrome 755–764. <https://doi.org/10.1007/s00787-010-0115-7>
- Mowlem, F.D., Rosenqvist, M.A., Martin, J., Lichtenstein, P., Asherson, P., Larsson, H., 2019. Sex differences in predicting ADHD clinical diagnosis and pharmacological treatment. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 28, 481–489. <https://doi.org/10.1007/s00787-018-1211-3>
- Müller, D., Grevet, E.H., da Silva, B.S., Charão, M.F., Rovaris, D.L., Bau, C.H.D., 2020. The neuroendocrine modulation of global DNA methylation in neuropsychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00924-y>
- Murata, Y., Ikegame, T., Koike, S., Saito, T., Ikeda, M., Sasaki, T., Iwatad, N., Kasaib, K., Bundo, M., Iwamoto, K., 2020. Global DNA hypomethylation and its correlation to the betaine level in peripheral blood of patients with schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 99, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109855>
- Murphy, T.M., Donovan, A.O., Mullins, N., Farrelly, C.O., Mccann, A., Malone, K., 2015. Anxiety is associated with higher levels of global DNA methylation and altered expression of epigenetic and interleukin-6 genes. *Psychiatr. Genet.* 25, 71–78. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000055>
- Neale, B.M., Medland, S.E., Ripke, S., Asherson, P., Franke, B., Lesch, K., Faraone, S. V., Nguyen, T.T., Schäfer, H., Holmans, P., Daly, M., Steinhausen, H.-C., Freitag, C., Reif, A., Renner, T.J., Romanos, M., Romanos, J., Walitza, S., Warnke, A., Meyer, J., Palmason, H., Buitelaar, J., Vasquez, A.A., Lambregts-Rommelse, N.M.G., Anney, R.J.L., Langely, K., O'Donovan, M., Williams, N., Owen, M., Thapar, A., Kent, L., Sergeant, J., Roeyers, H., Mick, E., Biederman, J., Doyle, A., Smalley, S., Loo, S., Hakonarson, H., Elia, J., Todorov, A., Miranda, A., Mulas, F., Ebstein, R.P., Rothenberger, A., Banaschewski, T., Oades, R.D., Sonuga-Barke, E., McGough, J., Nisenbaum, L., Middleton, F., Hu, X., Nelson, S., Subgroup, G.C.A., 2010. Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder. *J. Am. Acad. child Adolesc. Psychiatr.* 49, 884–897. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2010.06.008>
- Neumann, A., Walton, E., Alemany, S., Cecil, C., González, J.R., Jima, D.D., Lahti, J., Tuominen, S.T., Barker, E.D., Binder, E., Caramaschi, D., Carracedo, Á., Czamara, D., Evandt, J., Felix, J.F., Fuemmeler, B.F., Gutzkow, K.B., Hoyo, C., Julvez, J., Kajantie, E., Laivuori, H., Maguire, R., Maitre, L., Murphy, S.K., Murcia, M., Villa, P.M., Sharp, G., Sunyer, J., Raikkönen, K., Bakermans-Kranenburg, M., IJzendoorn, M. van, Guxens, M., Relton, C.L., Tiemeier, H., 2020. Association between DNA methylation and ADHD symptoms from birth to school age: a prospective meta-analysis. *Transl. Psychiatry* 10, 398. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01058-z>

- Nicolescu, R., Petcu, C., Cordeanu, A., Fabritius, K., Schlumpf, M., Winneke, G., Krebs, R., Kr, U., 2010. Environmental exposure to lead , but not other neurotoxic metals , relates to core elements of ADHD in Romanian children : Performance and questionnaire data \$ , \$\$ 110, 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.04.002>
- Nigg, J.T., Nikolas, M.M.A., Knottnerus, G.M.B.S., Cavanagh, K., Friderici, K., 2011. Confirmation and Extension of Association of Blood Lead with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and ADHD Symptom Domains at Population-Typical Exposure Levels. *J Child Psychol Psychiatry* 51, 58–65. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2009.02135.x>.Confirmation
- Nishioka, M., Bundo, M., Koike, S., Takizawa, R., Kakiuchi, C., Araki, T., Kasai, K., Iwamoto, K., 2013. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. *J. Hum. Genet.* 58, 91–97. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.140>
- Nomura, Y., Marks, D.J., Halperin, J.M., 2011. Prenatal Exposure to Maternal and Paternal Smoking on Attention Deficit Hyperactivity Disorders Symptoms and Diagnosis in Offspring. *J Nerv Ment Dis* 198, 672–678. <https://doi.org/10.1097/NMD.0b013e3181ef3489>.Prenatal
- Notley, C.A., Jordan, C.K., MCGovern, J.L., Brown, M.A., Ehrenstein, M.R., 2017. DNA methylation governs the dynamic regulation of inflammation by apoptotic cells during efferocytosis. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42204>
- Nøvik, T.S., Hervas, A., Ralston, S.J., Pereira, R.R., Lorenzo, M.J., Group, A.S., 2006. Influence of gender on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Europe – ADORE. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 15, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00787-006-1003-z>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Okazaki, S., Otsuka, I., Numata, S., Horai, T., Mouri, K., Boku, S., Ohmori, T., Sora, I., Hishimoto, A., 2019. Epigenetic clock analysis of blood samples from Japanese schizophrenia patients. *npj Schizophr.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41537-019-0072-1>
- Olova, N., Krueger, F., Andrews, S., Oxley, D., Berrens, R. V, Branco, M.R., Reik, W., 2018. Comparison of whole-genome bisulfite sequencing library preparation strategies identifies sources of biases affecting DNA methylation data. *Genome Biol.* 19, 1–19.
- Ornoy, A., Michailovskaya, V., Lukashov, I., 1996. The Developmental Outcome of Children Born to Heroin-Dependent Mothers, Raised at Home or Adopted. *Child Abuse Negl.* 20, 385–396.
- Ottosen, C., Larsen, J.T., Faraone, S. V, Chen, Q., Hartman, C., Larsson, H., Petersen, L., Dalsgaard, S., 2019. Sex Differences in Comorbidity Patterns of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*



58, 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2018.07.910>

- Park, S., Lee, J.M., Kim, J.W., Cho, D.Y., Yun, H.J., Han, D.H., Cheong, J.H., Kim, B.N., 2015. Associations between serotonin transporter gene (SLC6A4) methylation and clinical characteristics and cortical thickness in children with ADHD. *Psychol. Med.* 45, 3009–3017. <https://doi.org/10.1017/S003329171500094X>
- Paul, S., Reyes, P.R., Garza, B.S., Sharma, A., 2020. MicroRNAs and Child Neuropsychiatric Disorders: A Brief Review. *Neurochem. Res.* 45, 232–240. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02917-y>
- Pauly, J.R., Slotkin, T.A., 2008. Maternal tobacco smoking , nicotine replacement and neurobehavioural development. *Acta Paediatr.* 97, 1331–1337. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00852.x>
- Pauwels, S., Duca, R.C., Devlieger, R., Freson, K., Straetmans, D., Van Herck, E., Huybrechts, I., Koppen, G., Godderis, L., 2016. Maternal methyl-group donor intake and global DNA (Hydroxy)methylation before and during pregnancy. *Nutrients* 8, 474. <https://doi.org/10.3390/nu8080474>
- Pérez, R.F., Tejedor, J.R., Bayón, G.F., Fernández, A.F., Fraga, M.F., 2018. Distinct chromatin signatures of DNA hypomethylation in aging and cancer. *Aging Cell* 27, 1–16. <https://doi.org/10.1111/accel.12744>
- Perroud, N.M.D., Zewdie, S., Stenz, L., Adouan, W., Bavamian, S., Prada, P., Nicastro, R., Hasler, R., Nallet, A., Piguet, C., Paoloni-Giacobino, A., Aubry, J.-M., Dayer, A., 2016. METHYLATION OF SEROTONIN RECEPTOR 3A IN ADHD, BORDERLINE PERSONALITY, AND BIPOLAR DISORDERS: LINK WITH SEVERITY OF THE DISORDERS AND CHILDHOOD MALTREATMENT. *Depress. Anxiety* 33, 45–55. <https://doi.org/10.1002/da.22406>
- Petronis, A., 2010. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature* 465, 721–727. <https://doi.org/10.1038/nature09230>
- Petronis, A., 2001. Human morbid genetics revisited : relevance of epigenetics. *Trends Genet.* 17, 142–146.
- Pfeifer, G.P., 2018. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19041166>
- Piñeiro-Dieguez, B., Balanzá-Martínez, V., García-García, P., Soler-López, B., Domingo, M.A., Labarra, J.D.A., Lobato, P.A., Salamanca, A.A., Bes, J.A., Fernández, F.J.B., Moraga, R.B., Blanco, J.B., Perona, A.B., Boniatti, T.C., Gras, J.M.C., Martínez, J.M.C., Machado, I.C., Pena, M.C.C., Flores, C.C., Dono, C.C., Taracena, M.T.D.L., García, B.D.P., Martín, P.F., Del Valle, E.F.G., Fontova, E., Eroles, F.F., Chapa, R.F., Tejedor, I.G., Palomares, A.G., Campayo, J.G., Moreno, J.M.G., Pérez, X.G., Escrig, M.D.C.G., Vives, S.G., Queralt, E.G., Gonochategui, A.G., Escajedo, A.G., Labrador, R.G., Mendoza, A.H., Lorenzo, F.G.I., Iribarren, M.M., Yopez, G.J.D.F., Vazquez, M.A.L., Borrajo, J.M.L., Arribas, S.L., García, J.M.M., Flores, A.M., Fernández-

- Mayoralas, D.M., Navarro, N.M., Recuero, L.M., Gras, I.M., Raga, J.M., López, P.A.M., Horche, J.L.M., Flores, P.L.M., Diago, E.O., Panicali, F., Pastor, F.P., Alfaro, G.P., Rosati, S.P., Sanz, M.P., Presa, A.M.I.Q., Alandes, C.R., Solano, J.J.R., Buguña, J.R.S., Izquierdo, G.S.N., García, M.S., De La Garza, C.L.S., Granado, O.S., Murla, F.S., Ceballos, P.S., Cabra, O.S., Rodríguez, P.A.S., Sender, V.T., Moreira, R.V., Abarquero, M.A.V., Peri, R.V., Mateo, L.V., Zambrano, D., Ramos, J.M.Z., 2016. Psychiatric Comorbidity at the Time of Diagnosis in Adults With ADHD: The CAT Study. *J. Atten. Disord.* 20, 1066–1075. <https://doi.org/10.1177/1087054713518240>
- Plomin, R., 2014. Genotype-Environment Correlation in the Era of DNA. *Behav. Genet.* 44, 629–638. <https://doi.org/10.1007/s10519-014-9673-7>
- Polanczyk, G., Rohde, L.A., 2007. Epidemiology of attention-deficit / hyperactivity disorder across the lifespan. *Curr Opin Psychiatry* 20, 386–392.
- Ptak, C., Petronis, A., 2010. Epigenetic approaches to psychiatric disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 12, 25–35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00014-2>
- Ramsahoye, B.H., 2002. Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography 27, 156–161.
- Rao, J.S., Keleshian, V.L., Klein, S., Rapoport, S.I., 2012. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer’s disease and bipolar disorder patients. *Transl. Psychiatry* 2, e132-7. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.55>
- Reik, W., 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447, 425–432. <https://doi.org/10.1038/nature05918>
- Resendiz, M., Mason, S., Lo, C.L., Zhou, F.C., 2014. Epigenetic regulation of the neural transcriptome and alcohol interference during development. *Front. Genet.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00285>
- Rietveld, C.A., Conley, D., Eriksson, N., Esko, T., Medland, S.E., Vinkhuyzen, A.A.E., Yang, J., Boardman, J.D., Chabris, C.F., Dawes, C.T., Domingue, B.W., Hinds, D.A., Johannesson, M., , Amy K. Kiefer<sup>4</sup>, David Laibson<sup>14</sup>, Patrik K. E. Magnusson<sup>15</sup>, Joanna L. Mountain<sup>4</sup>, Sven Oskarsson<sup>16</sup>, Olga Rostapshova<sup>14</sup>, Alexander Teumer<sup>17</sup>, Joyce Y. Tung<sup>4</sup>, Peter M. Visscher<sup>7, 8,\*</sup>, D.J.B., Koellinger, D.C.P.D., 2014. Replicability and Robustness of GWAS for Behavioral Traits. *Psychol. Sci.* 25, 1975–1986. <https://doi.org/10.1177/0956797614545132.Replicability>
- Rietz, E. Du, Coleman, J., Glanville, K., Choi, S.W., Reilly, P.F.O., Kuntsi, J., 2018. Association of Polygenic Risk for Attention- Deficit/Hyperactivity Disorder With Co-occurring Traits and Disorders. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* 3, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2017.11.013>
- Robertson, K.D., 2005. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>
- Roche, D.J.O., Bujarski, S., Green, R., Hartwell, E.E., Leventhal, A.M., Ray, L.A., 2019. Alcohol, tobacco, and marijuana consumption is associated with

- increased odds of same-day substance co- and tri-use. *Drug Alcohol Depend.* 200, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2019.02.035>. Alcohol
- Rovira, P., Sánchez-Mora, C., Pagerols, M., Richarte, V., Corrales, M., Fadeuilhe, C., Vilar-Ribó, L., Arribas, L., Shireby, G., Hannon, E., Mill, J., Casas, M., Ramos-Quiroga, J.A., Soler Artigas, M., Ribasés, M., 2020. Epigenome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. *Transl. Psychiatry* 10, 199. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0860-4>
- Rozhon, W., Baubec, T., Mayerhofer, J., Scheid, O.M., Jonak, C., 2008. Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography 375, 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.01.001>
- Sánchez-Mora, C., Soler Artigas, M., Garcia-Martínez, I., Pagerols, M., Rovira, P., Richarte, V., Corrales, M., Fadeuilhe, C., Padilla, N., de la Cruz, X., Franke, B., Arias-Vásquez, A., Casas, M., Ramos-Quiroga, J.A., Ribasés, M., 2019. Epigenetic signature for attention-deficit/hyperactivity disorder: identification of miR-26b-5p, miR-185-5p, and miR-191-5p as potential biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *Neuropsychopharmacology* 44, 890–897. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0297-0>
- Schlotz, W., Jones, A., Phillips, D.I.W., Gale, C.R., Sian M. Robinson, Godfrey, K.M., 2010. Lower maternal folate status in early pregnancy is associated with childhood hyperactivity and peer problems in offspring. *J Child Psychol Psychiatry* 51, 594–602. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2009.02182.x>. Lower
- Schulz, W.A., Steinhoff, C., Florl, A.R., 2006. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 310, 211–250. [https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5_11)
- Semmler, A., Heese, P., Stoffel-Wagner, B., Muschler, M., Heberlein, A., Bigler, L., Prost, J.-C., Frieling, H., Kornhuber, J., Banger, M., Bleich, S., Hillemacher, T., Linnebank, M., 2015. Alcohol abuse and cigarette smoking are associated with global DNA hypermethylation: Results from the German Investigation on Neurobiology in Alcoholism (GINA). *Alcohol* 49, 97–101.
- Shen, H., French, B.A., Tilman, B.C., Li, J., French, S.W., 2015. Increased DNA methylation in the livers of patients with alcoholic hepatitis. *Exp Mol. Pathol* 99, 326–329. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>. Gut-Liver
- Shen, X., Yuan, H., Wang, G., Xue, H., Liu, Y., Zhang, C.-X., 2019. Role of DNA hypomethylation in lateral habenular nucleus in the development of depressive-like behavior in rats. *J. Affect. Disord.* 252, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.03.062>
- Shimabukuro, M., Sasaki, T., Imamura, A., Tsujita, T., Fuke, C., Umekage, T., Tochigi, M., Hiramatsu, K., Miyazaki, T., Oda, T., Sugimoto, J., Jinno, Y., Okazaki, Y., 2007. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: A potential link between epigenetics and schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 41, 1042–1046.

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.08.006>

- Silva, M.T.B., Simão, A.F.L., Lobato, R.F.G.L., Sousa, F.C.F.F., Fonteles, M.M.F., Viana, G.S.B., Vasconcelos, S.M.M., 2010. Alcohol and nicotine: mechanisms of dependence. *Rev Neurocienc* 18, 531–537.
- Simon, V., Czobor, P., Bálint, S., Meszáros, Á., Bitter, I., 2009. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br. J. Psychiatry* 194, 204–211. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.048827>
- Smigielski, L., Jagannath, V., Rössler, W., Walitza, S., Grünblatt, E., 2020. Epigenetic mechanisms in schizophrenia and other psychotic disorders: a systematic review of empirical human findings. *Mol. Psychiatry* 25, 1718–1748. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0601-3>
- Sobanski, E., Brüggemann, D., Alm, B., Kern, S., Deschner, M., Schubert, T., Philipsen, A., Rietschel, M., 2007. Psychiatric comorbidity and functional impairment in a clinically referred sample of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 257, 371–377. <https://doi.org/10.1007/s00406-007-0712-8>
- Soeiro-de-souza, G., Andreazza, A.C., Carvalho, A.F., Machado-Vieira, R., Young, L.T., Moreno, R.A., 2013. Number of manic episodes is associated with elevated DNA oxidation in bipolar I disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1505–1512. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000047>
- Sprich, S., Biederman, J., Crawford, M.H., Mundy, E., Faraone, S. V., 2000. Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 39, 1432–1437. <https://doi.org/10.1097/00004583-200011000-00018>
- Srivastav, S., Walitza, S., Grünblatt, E., 2018. Emerging role of miRNA in attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review. *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* 10, 49–63. <https://doi.org/10.1007/s12402-017-0232-y>
- Starnawska, A., Tan, Q., Soerensen, M., McGue, M., Mors, O., Børglum, A.D., Christensen, K., Nyegaard, M., Christiansen, L., 2019. Epigenome-wide association study of depression symptomatology in elderly monozygotic twins. *Transl. Psychiatry* 9. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0548-9>
- Steinhausen, H.C., 2009. The heterogeneity of causes and courses of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 120, 392–399. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2009.01446.x>
- Suzuki, M.M., Bird, A., 2008. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9, 465–476. <https://doi.org/10.1038/nrg2341>
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., David, R., Aravind, L., Rao, A., 2009. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* (80-). 324, 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.Conversion

- Tovo-Rodrigues, L., Quinte, G.C., Brum, C.B., Ghisleni, G., Bastos, C.R., Oliveira, I.O. de, Barros, F.C., Barros, A.J.D., Santos, I.S., Rohde, L.A., Hutz, M.H., Matijasevich, A., 2019. The Role of MIR9-2 in Shared Susceptibility of Psychiatric Disorders during Childhood: A Population-Based Birth Cohort Study. *Genes (Basel)*. 10, 1–11. <https://doi.org/10.3390/genes10080626>
- Tseng, P., Lin, P., Lee, Y., Lung, F., Chen, C.-S., Chong, M.-Y., 2014. Age-associated decrease in global DNA methylation in patients with major depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 10, 2105–2114.
- Ulrich, C.M., Toriola, A.T., Koepf, L.M., Sandifer, T., Poole, E.M., Duggan, C., McTiernan, A., Issa, J.P.J., 2012. Metabolic, hormonal and immunological associations with global DNA methylation among postmenopausal women. *Epigenetics* 7, 1020–1028. <https://doi.org/10.4161/epi.21464>
- van Dongen, J., Zilhão, N.R., Sugden, K., Heijmans, B.T., 't Hoen, P.A.C., van Meurs, J., Isaacs, A., Jansen, R., Franke, L., Boomsma, D.I., Pool, R., Hottenga, J.J., van Greevenbroek, M.M.J., Stehouwer, C.D.A., van der Kallen, C.J.H., Schalkwijk, C.G., Wijmenga, C., Zhernakova, S., Tigchelaar, E.F., Slagboom, P.E., Beekman, M., Deelen, J., van Heemst, D., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., van Duijn, C.M., Hofman, B.A., Uitterlinden, A.G., Jhamai, P.M., Verbiest, M., Suchiman, H.E.D., Verkerk, M., van der Breggen, R., van Rooij, J., Lakenberg, N., Mei, H., van Iterson, M., van Galen, M., Bot, J., Zhernakova, D. V., Hof, P. van 't, Deelen, P., Nooren, I., Moed, M., Vermaat, M., Luijk, R., Bonder, M.J., van Dijk, F., Arindrarto, W., Kielbasa, S.M., Swertz, M.A., van Zwet, E.W., Hoen, P.B. 't, Hannon, E.J., Mill, J., Caspi, A., Agnew-Blais, J., Arseneault, L., Corcoran, D.L., Moffitt, T.E., Poulton, R., Franke, B., 2019. Epigenome-wide Association Study of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Adults. *Biol. Psychiatry* 86, 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.02.016>
- van Mil, N.H., Steegers-Theunissen, R.P.M., Bouwland-Both, M.I., Verbiest, M.M.P.J., Rijlaarsdam, J., Hofman, A., Steegers, E.A.P., Heijmans, B.T., Jaddoe, V.W.V., Verhulst, F.C., Stolk, L., Eilers, P.H.C., Uitterlinden, A.G., Tiemeier, H., 2014. DNA methylation profiles at birth and child ADHD symptoms. *J. Psychiatr. Res.* 49, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.10.017>
- Viana, J., Hannon, E., Dempster, E., Pidsley, R., Macdonald, R., Knox, O., Spiers, H., Troakes, C., Al-Saraj, S., Turecki, G., Schalkwyk, L.C., Mill, J., 2017. Schizophrenia-associated methylomic variation: molecular signatures of disease and polygenic risk burden across multiple brain regions. *Hum. Mol. Genet.* 26, 210–225. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw373>
- Victor, M.M., S da Silva, B., Kappel, D.B., Bau, C.H.D., Grevet, E.H., 2018. Attention-deficit hyperactivity disorder in ancient Greece: The Obtuse Man of Theophrastus. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 52, 509–513. <https://doi.org/10.1177/0004867418769743>
- Vitola, E.S., Bau, C.H.D., Salum, G.A., Horta, B.L., Quevedo, L., Barros, F.C., Pinheiro, R.T., Kieling, C., Rohde, L.A., Grevet, E.H., 2017. Exploring DSM-5

- ADHD criteria beyond young adulthood: Phenomenology, psychometric properties and prevalence in a large three-decade birth cohort. *Psychol. Med.* 47, 744–754. <https://doi.org/10.1017/S0033291716002853>
- Vryer, R., Saffery, R., 2017. What 's in a name? Context-dependent significance of 'global' methylation measures in human health and disease. *Clin. Epigenetics* 9, 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0311-0>
- WADDINGTON, C.H., 1942. CANALIZATION OF DEVELOPMENT AND THE INHERITANCE OF ACQUIRED CHARACTERS. *Nature* 150, 563–565.
- Wagner, C., 2001. Biochemical Role of Folate in Cellular Metabolism. *Clin Reserach Reg Aff.* 18, 161–180.
- Walton, E., Pingault, J.B., Cecil, C.A.M., Gaunt, T.R., Relton, C.L., Mill, J., Barker, E.D., 2017. Epigenetic profiling of ADHD symptoms trajectories: A prospective, methylome-wide study. *Mol. Psychiatry* 22, 250–256. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.85>
- Wang, J., Haj-dahmane, S., Shen, R., 2006. Effects of Prenatal Ethanol Exposure on the Excitability of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Vitro 319, 857–863. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.109041.and>
- Wendt, F.R., Pathak, G.A., Tylee, D.S., Goswami, A., Polimanti, R., 2020. Heterogeneity and Polygenicity in Psychiatric Disorders: A Genome-Wide Perspective. *Chronic Stress* 4, 1–15. <https://doi.org/10.1177/2470547020924844>
- Willcutt, E.G., 2012. The Prevalence of DSM-IV Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder: A Meta-Analytic Review. *Neurotherapeutics* 9, 490–499. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0135-8>
- Williams, J.H.G., Ross, L., 2007. Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 16, 243–253. <https://doi.org/10.1007/s00787-006-0596-6>
- Wilmot, B., Fry, R., Smeester, L., Musser, E.D., Mill, J., Nigg, J.T., 2016. Methylomic analysis of salivary DNA in childhood ADHD identifies altered DNA methylation in VIPR2. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* 57, 152–160. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12457>
- Wolf, E.J., Chen, C. Di, Zhao, X., Zhou, Z., Morrison, F.G., Daskalakis, N.P., Stone, A., Schichman, S., Grenier, J.G., Fein-Schaffer, D., Huber, B.R., Abraham, C.R., Miller, M.W., Logue, M.W., 2020. Klotho, PTSD, and advanced epigenetic age in cortical tissue. *Neuropsychopharmacology* 46, 721–730. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00884-5>
- Wray, N.R., Lee, S.H., Mehta, D., Vinkhuyzen, A.A., Dudbridge, F., Middeldorp, C.M., 2014. Research Review: Polygenic methods and their application to psychiatric traits Naomi. *J. Child Psychol. Psychiatry* 55, 1068–1087. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12295>
- Wu, C., Morris, J.R., 2001. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence.

Science (80-. ). 293, 1103–5.

- Wu, H., Zhang, Y., 2014. Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. *Cell* 156, 45–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>
- Xu, Y., Chen, X.T., Luo, M., Tang, Y., Zhang, G., Wu, D., Yang, B., Ruan, D.Y., Wang, H.L., 2015. Multiple epigenetic factors predict the attention deficit/hyperactivity disorder among the Chinese Han children. *J. Psychiatr. Res.* 64, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.03.006>
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H., 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13, 335–340. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01181-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01181-5)
- Zhou, F.C., Chen, Y., Love, A., 2011. Cellular DNA methylation program during neurulation and its alteration by alcohol exposure. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 91, 703–715. <https://doi.org/10.1002/bdra.20820>
- Zhou, K., Dempfle, A., Arcos-Burgos, M., Bakker, S.C., Banaschewski, T., Biederman, J., Buitelaar, J., Castellanos, F.X., Doyle, A., Ebstein, R.P., Ekholm, J., Forabosco, P., Franke, B., Freitag, C., Friedel, S., Gill, M., Hebebrand, J., Hinney, A., Jacob, C., Lesch, K.P., Loo, S.K., Lopera, F., McCracken, J.T., McGough, J.J., Meyer, J., Mick, E., Miranda, A., Muenke, M., Mulas, F., Nelson, S.F., Nguyen, T.T., Oades, R.D., Ogdie, M.N., Palacio, J.D., Pineda, D., Reif, A., Renner, T.J., Roeyers, H., Romanos, M., Rothenberger, A., Schäfer, H., Sergeant, J., Sinke, R.J., Smalley, S.L., Sonuga-Barke, E., Steinhausen, H.-C., Meulen, E. van der, Walitza, S., Warnke, A., Lewis, C.M., Faraone, S. V., Asherson, P., 2008. Meta-Analysis of Genome-Wide Linkage Scans of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8), 1392–1398. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30878>.Meta-Analysis





## Anexo I - Critérios diagnósticos do DSM-5 para o TDAH

---

### Critérios diagnósticos

---

**A.** Um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade que interfere no funcionamento e no desenvolvimento, conforme caracterizado por (1) e/ou (2):

**1. Desatenção:** Seis (ou mais) dos seguintes sintomas persistem por pelo menos seis meses em um grau que é inconsistente com o nível do desenvolvimento e têm impacto negativo diretamente nas atividades sociais e acadêmicas/profissionais.

**Nota:** Os sintomas não são apenas uma manifestação de comportamento opositor, desafio, hostilidade ou dificuldade para compreender tarefas ou instruções. Para adolescentes mais velhos e adultos (17 anos ou mais), pelo menos cinco sintomas são necessários.

**a.** Frequentemente não presta atenção em detalhes ou comete erros por descuido em tarefas escolares, no trabalho ou durante outras atividades (p. ex., negligência ou deixa passar detalhes, o trabalho é impreciso).

**b.** Frequentemente tem dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas (p.ex., dificuldade de manter o foco durante aulas, conversas ou leituras prolongadas).

**c.** Frequentemente parece não escutar quando alguém lhe dirige a palavra diretamente (p.ex., parece estar com a cabeça longe, mesmo na ausência de qualquer distração óbvia).

**d.** Frequentemente não segue instruções até o fim e não consegue terminar trabalhos escolares, tarefas ou deveres no local de trabalho (p. ex., começa as tarefas, mas rapidamente perde o foco e facilmente perde o rumo).

**e.** Frequentemente tem dificuldade para organizar tarefas e atividades (p. ex., dificuldade em gerenciar tarefas sequenciais; dificuldade em manter materiais e objetos pessoais em ordem; trabalho desorganizado e desleixado; mau gerenciamento do tempo; dificuldade em cumprir prazos).

**f.** Frequentemente evita, não gosta ou reluta em se envolver em tarefas que exijam esforço mental prolongado (p. ex., trabalhos escolares ou lições de casa; para adolescentes mais velhos e adultos, preparo de relatórios, preenchimento de formulários, revisão de trabalhos longos).

**g.** Frequentemente perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (p. ex., materiais escolares, lápis, livros, instrumentos, carteiras, chaves, documentos, óculos, celular).

**h.** Com frequência é facilmente distraído por estímulos externos (para adolescentes mais velhos e adultos, pode incluir pensamentos não relacionados).

**i.** Com frequência é esquecido em relação a atividades cotidianas (p. ex., realizar tarefas, obrigações; para adolescentes mais velhos e adultos, retornar ligações, pagar contas, manter horários agendados).

**2. Hiperatividade e impulsividade:** Seis (ou mais) dos seguintes sintomas persistem por pelo menos seis meses em um grau que é inconsistente com o nível do desenvolvimento e têm impacto negativo diretamente nas atividades sociais e acadêmicas/profissionais.

**Nota:** Os sintomas não são apenas uma manifestação de comportamento opositor, desafio, hostilidade ou dificuldade para compreender tarefas ou instruções. Para adolescentes mais velhos e adultos (17 anos ou mais), pelo menos cinco sintomas são necessários.

**a.** Frequentemente remexe ou batuca as mãos ou os pés ou se contorce na cadeira.

**b.** Frequentemente levanta da cadeira em situações em que se espera que permaneça sentado (p. ex., sai do seu lugar em sala de aula, no escritório ou em outro local de trabalho ou em outras situações que exijam que se permaneça em um mesmo lugar).

**c.** Frequentemente corre ou sobe nas coisas em situações em que isso é inapropriado. (Nota: Em adolescentes ou adultos, pode se limitar a sensações de inquietude.)

**d.** Com frequência é incapaz de brincar ou se envolver em atividades de lazer calmamente.

**e.** Com frequência “não para”, agindo como se estivesse “com o motor ligado” (p. ex., não consegue ou se sente desconfortável em ficar parado por muito tempo, como em restaurantes, reuniões; outros podem ver o indivíduo como inquieto ou difícil de acompanhar).

**f.** Frequentemente fala demais.

**g.** Frequentemente deixa escapar uma resposta antes que a pergunta tenha sido concluída (p. ex., termina frases dos outros, não consegue aguardar a vez de falar).

**h.** Frequentemente tem dificuldade para esperar a sua vez (p. ex., aguardar em uma fila).

**i.** Frequentemente interrompe ou se intromete (p. ex., mete-se nas conversas, jogos ou atividades; pode começar a usar as coisas de outras pessoas sem pedir ou receber permissão; para adolescentes e adultos, pode intrometer-se em ou assumir o controle sobre o que outros estão fazendo).

**B.** Vários sintomas de desatenção ou hiperatividade-impulsividade estavam presentes antes dos 12 anos de idade.

**C.** Vários sintomas de desatenção ou hiperatividade-impulsividade estão presentes em dois ou mais ambientes (p. ex., em casa, na escola, no trabalho; com amigos ou parentes; em outras atividades).

**D.** Há evidências claras de que os sintomas interferem no funcionamento social, acadêmico ou profissional ou de que reduzem sua qualidade.

**E.** Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de esquizofrenia ou outro transtorno psicótico e não são mais bem explicados por outro transtorno mental (p. ex., transtorno do humor, transtorno de ansiedade, transtorno dissociativo, transtorno da personalidade, intoxicação ou abstinência de substância).

---

**Anexo II – Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde – HCPA**  
Projeto 16-0600/CAAE 60633516.2.1001.5327



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**COMISSÃO CIENTÍFICA**

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 160600

**Data da Versão do Projeto:** 17/11/2016

**Pesquisadores:**

EUGENIO HORACIO GREVET  
FELIPE ALMEIDA PICON  
KATIANE LILIAN DA SILVA  
EDUARDO SCHNEIDER VITOLA  
DJENIFER KAPPEL  
VERÔNICA CONTINI  
JAQUELINE BOHRER SCHUCH  
BRUNA SANTOS DA SILVA  
DIEGO LUIZ ROVARIS  
CLAITON HENRIQUE DOTTO BAU  
RENATA BASSO CUPERTINO

**Título:** Estudo prospectivo de indivíduos com e sem transtorno de déficit de atenção/hiperatividade diagnosticados na vida adulta

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 03 de janeiro de 2017.

Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA

# Anexo III– Artigo colaborativo de otimização de protocolo de técnica de HPLC

Environmental Science and Pollution Research  
https://doi.org/10.1007/s11356-018-3674-7

RESEARCH ARTICLE



## Increase of global DNA methylation patterns in beauty salon workers exposed to low levels of formaldehyde

Eduardo Barbosa<sup>1,2</sup> · Ana Laura Anibaletto dos Santos<sup>1</sup> · Giovana Piva Peteffi<sup>1</sup> · Anelise Schneider<sup>1</sup> · Diana Müller<sup>3,4</sup> · Diego Rovaris<sup>3,4</sup> · Claiton Henrique Dotto Bau<sup>3,4</sup> · Rafael Linden<sup>1,2</sup> · Marina Venzon Antunes<sup>1,2</sup> · Mariele Feiffer Charão<sup>1,2</sup>

Received: 8 May 2018 / Accepted: 5 November 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Formaldehyde (FA) is a carcinogenic aldehyde illegally added to creams as a hair straightening agent for the Brazilian blowout (BB). This study aimed to investigate the possible effects of occupational exposure to FA on global DNA methylation in salon workers with different exposure levels. FA exposure was monitored using environmental and biological measurements. The study included 49 salon workers divided by FA levels in the workplace into group A (FA < 0.01 ppm;  $n = 8$ ), group B (0.03 ppm < FA < 0.06 ppm;  $n = 15$ ), and group C (0.08 ppm < FA < 0.24 ppm;  $n = 26$ ). The global DNA methylation levels were 3.12%, 4.55%, and 4.29% for groups A, B, and C, respectively, with statistically higher values for groups B and C compared to group A ( $p = 0.002$ ). A correlation was found between FA in passive samplers and global DNA methylation ( $r_s = 0.307$ ,  $p = 0.032$ ). Additionally, when only taking into account the hairdressers that performed the BB on clients instead of the whole group, a stronger correlation was observed between FA in personal passive samplers and global DNA methylation ( $r_s = 0.764$ ,  $p = 0.006$ ). For the first time, an increase in DNA methylation was observed in subjects occupationally exposed to FA. In conclusion, our results indicated that even low levels of FA exposure could cause a disturbance in DNA methylation, leading to epigenetic changes, which is associated with cancer development. These data suggest a possible contribution of FA to cancer development through occupational exposure.

**Keywords** Formaldehyde · Epigenetic · Global DNA methylation · Occupational exposure · Hair straightening · Brazilian blowout · Formic acid

### Introduction

Formaldehyde (FA) is a volatile aldehyde which is colorless, flammable, highly reactive, and has a pungent odor (IARC 2006; WHO 2010). This aldehyde is widely present in the

environment, but it can quickly undergo photo-oxidation which explains its short half-life of 1 h (WHO 2010). Despite being considered carcinogenic by International Agency for Research on Cancer (IARC 2006), FA is widely added or used during the production of several products like resins, adhesives, binders for plywood, plastics, synthetic fibers, paints, insulation foams, disinfectants, preservatives in paints, and fertilizers (Wieslander et al. 1997; Carmo and Prado 1999; IARC 2006; NTP 2016).

In the cosmetic industry, FA may also be used as a preservative or biocide agent (NTP 2016). Moreover, the aldehyde is also used as an agent in creams for the Brazilian blowout, a hair straightening procedure (Abraham et al. 2009). The use of FA as a hair straightening agent is forbidden by Brazilian National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA 2013). However, several beauty salons still use illegal products or add FA to their creams (Peteffi et al. 2016a). It is known that FA can volatilize from the products in which it is added (IARC

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Mariele Feiffer Charão  
marielecharao@feevale.br

<sup>1</sup> Analytical Toxicology Laboratory, Universidade Feevale, ERS-239, 2755, Novo Hamburgo, RS 93525-075, Brazil

<sup>2</sup> Graduate Program on Toxicology and Analytical Toxicology, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

<sup>3</sup> Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Published online: 12 November 2018

Springer

## **Anexo IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes)**

**Título do Projeto: Níveis de metilação global em pacientes diagnosticados com transtorno de déficit de atenção/hiperatividade na vida adulta**

**(Grupo de pacientes que participarão da avaliação de níveis de metilação global)**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar fatores genéticos, epigenéticos, clínicos, comportamentais e de estilo de vida entre indivíduos com e sem Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH). Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Psiquiatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Esse estudo é justificado por possibilitar um maior entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos no TDAH, podendo resultar em melhores estratégias de diagnóstico ou tratamento.

Se você aceitar participar dessa parte da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: Você responderá a uma entrevista avaliando sintomas de TDAH e outros transtornos psiquiátricos comuns (três entrevistas com duração média de 1h), assim como a avaliação neuropsicológica (com duração média de 1h). Você passará por uma coleta de sangue para extração de DNA (10ml, equivalente a duas colheres de chá) para avaliar genes e níveis de metilação global, os quais podem estar relacionados ao diagnóstico deste transtorno.

As entrevistas realizadas poderão gerar desconfortos psicológicos ou constrangimento, entretanto a qualquer momento você poderá desistir de participar. A coleta de sangue é um procedimento comum, no entanto podem ocorrer pequenos sangramentos ou hematoma (mancha roxa) no local na coleta.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição. Gastos relacionados à participação no estudo (ex: transporte e alimentação), se houverem, serão ressarcidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal, e indenização.

O material biológico proveniente da coleta de sangue (DNA) será depositado e armazenado em um biorrepositório na UFRGS, com a finalidade de serem utilizados tanto por este projeto, quanto por projetos futuros realizados pelo grupo de pesquisa. Você poderá retirar a autorização da utilização e armazenamento desse material a qualquer momento.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados. Os dados obtidos serão depositados em um repositório digital de acesso controlado pelos pesquisadores responsáveis, respeitando a anonimidade dos voluntários.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau, pelo telefone 51-33086718, ou com o pesquisador Prof. Dr. Eugenio Horacio Grevet, pelo telefone 51-33598094 ou com a pesquisadora Diana Müller, pelo telefone 51-991356553 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante de pesquisa

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

## **Anexo V– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Controles)**

**Título do Projeto: Níveis de metilação global em pacientes diagnosticados com transtorno de déficit de atenção/hiperatividade na vida adulta**

**(Grupo de controles que participarão da avaliação de níveis de metilação global)**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar fatores genéticos, epigenéticos, clínicos, comportamentais e de estilo de vida entre indivíduos com e sem Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH). Você está sendo convidado a participar porque não possui diagnóstico de TDAH. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Psiquiatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Esse estudo é justificado por possibilitar um maior entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos no TDAH, podendo resultar em melhores estratégias de diagnóstico ou tratamento.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: Você responderá a uma entrevista avaliando sintomas presentes nos pacientes com TDAH e outros transtornos psiquiátricos comuns (três entrevistas com duração média de 1h), assim como a avaliação neuropsicológica (com duração média de 1h). Você passará por uma coleta de sangue para extração de DNA (10ml, equivalente a duas colheres de chá) para avaliar genes e níveis de metilação global, os quais podem estar relacionados ao diagnóstico deste transtorno.

As entrevistas realizadas poderão gerar desconfortos psicológicos ou constrangimento, entretanto a qualquer momento você poderá desistir de participar. A coleta de sangue é um procedimento comum, no entanto podem ocorrer pequenos sangramentos ou hematoma (mancha roxa) no local na coleta.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição. Sendo necessário forneceremos ressarcimento referente aos possíveis gastos relacionados à participação no estudo (deslocamento e estacionamento).

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal (funcionando como uma garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa).

O material biológico proveniente da coleta de sangue (DNA) será depositado e armazenado em um biorrepositório na UFRGS, com a finalidade de serem utilizados tanto por este projeto, quanto por projetos futuros realizados pelo grupo de pesquisa. Você

poderá retirar a autorização da utilização e armazenamento desse material a qualquer momento.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau, pelo telefone 51-33086718, ou com o pesquisador Prof. Dr. Eugenio Horacio Grevet, pelo telefone 51-33598094 ou com a pesquisadora Diana Müller, pelo telefone 51-991356553 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante de pesquisa

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_