

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Instituto de Biologia  
Curso de Ciências Biológicas Bacharelado



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**O papel de polimorfismos genéticos na regulação da expressão gênica  
por microRNAs e susceptibilidade genética ao Transtorno de Déficit de  
Atenção e Hiperatividade (TDAH)**

**Andressa Marques Carvalho**

Pelotas, 2018

**Andressa Marques Carvalho**

**O papel de polimorfismos genéticos na regulação da expressão gênica por microRNAs e susceptibilidade genética ao Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Tovo Rodrigues

Coorientadora: MSc Thais Martins da Silva

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C331p Carvalho, Andressa Marques

O papel de polimorfismos genéticos na regulação da expressão gênica por micrornas e susceptibilidade genética ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) / Andressa Marques Carvalho ; Luciana Tovo Rodrigues, orientadora ; Thais Martins da Silva, coorientadora. — Pelotas, 2018.

63 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Cérebro. 2. Gene-ambiente. 3. Mirnas. 4. Ontologia gênica. 5. SNPS. I. Rodrigues, Luciana Tovo, orient. II. Silva, Thais Martins da, coorient. III. Título.

CDD : 575.21

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Daileia e Valdenir, vocês são a base, obrigada por toda dedicação e amor durante a vida, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço especialmente minha orientadora Luciana Tovo Rodrigues por me proporcionar a oportunidade de trabalhar com ela, por toda paciência e incentivo me guiando de forma sábia e amorosa desde o início.

Agradeço minha coorientadora Thais Martins da Silva, pela dedicação, amizade e todo auxílio na elaboração do trabalho.

Agradeço as meninas do laboratório do Centro de Pesquisas, por todos os momentos compartilhados, em especial a Clarice, que se tornou uma grande amiga, obrigada pelas conversas e pelo apoio nos momentos difíceis.

Agradeço as minhas amigas Ariane, Bibiana e Thaisa, vocês foram essenciais durante a graduação, sou grata por ter encontrado pessoas como vocês no caminho, também agradeço a Ingrid e Sabrina, pela aproximação no último ano de curso, companheirismo e amizade.

Agradeço meu melhor amigo e namorado Felipe, por acreditar em mim e não medir esforços para me ver bem, fazendo tudo possível para me ajudar.

Por fim, gostaria de agradecer aos professores ao longo do curso por serem responsáveis pela minha formação e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor durante essa trajetória, obrigada.

## Resumo

CARVALHO, Andressa Marques. **O papel de polimorfismos genéticos na regulação da expressão gênica por microRNAs e susceptibilidade genética ao Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)**. 2018. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2018.

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos do neurodesenvolvimento mais prevalentes durante a infância e adolescência, afetando cerca de 5% da população nessa faixa etária. O TDAH é particularmente relevante na sociedade, pois impacta diretamente na configuração de saúde mental infantil. A etiologia e a patogênese do TDAH ainda permanecem pouco elucidadas, porém evidências apoiam a existência de interação entre fatores ambientais e genéticos como forte contribuição para o transtorno. Entre os fatores genéticos envolvidos sabe-se que grande parte do genoma é expresso no cérebro e a expressão de genes nesse órgão sofre diversas alterações ao longo do desenvolvimento. Dessa maneira, mutações que possam alterar a expressão ou a função desses genes podem ocasionar ou colaborar para a ocorrência de doenças neurológicas e psiquiátricas. Durante o desenvolvimento os miRNAs tem importante papel regulatório da expressão de genes envolvidos em funções cerebrais, como aprendizagem, emoções, memória e em doenças mentais. Variantes genéticas como os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em genes de miRNA ou em seus genes-alvo são considerados fatores que podem afetar a regulação da expressão gênica. Logo, o projeto teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética em genes de miRNAs importantes para o desenvolvimento cerebral utilizando uma abordagem *in silico*. Bem como explorar o efeito desses genes e polimorfismos na etiologia do TDAH, utilizando as estatísticas sumarizadas do estudo de associação genômica mais recente e robusto para o transtorno conduzido pelo Consórcio de Genômica Psiquiátrica (Psychiatric Genomics Consortium; PGC). Como resultado encontramos 529 variantes genéticas em 64 genes de miRNAs. De acordo com a localização das variantes genéticas, 90,9% estão localizadas em regiões regulatórias de miRNAs e 9,1% em regiões de transcrição. As frequências alélicas para diferentes populações humanas demonstram que a população africana possui maior variabilidade genética, apresentando maior número de sítios polimórficos. Quanto à susceptibilidade genética ao TDAH, nenhuma variante atingiu valor de p significativo empregando-se os dados do PGC. Na análise de associação baseada em genes, o *MIR9-2* chegou próximo ao valor de p significativo ( $p=3,0 \times 10^{-6}$ ). Os resultados sugerem que as variantes genéticas avaliadas aqui podem apresentar importante função regulatória nos genes de miRNA. Entretanto, essas variantes e os genes avaliados não mostraram ser importantes para a susceptibilidade ao TDAH na população Europeia. Trabalhos adicionais nessa área, com evidências *in silico* e *in vitro* e com a avaliação de outras regiões promotoras poderão adicionar informações importantes ao presente estudo. Dado que população africana apresentou

diferenças genéticas importantes, a investigação do papel desses miRNAs em populações de diferente ancestralidade genética torna-se importante.

**Palavras-chave:** cérebro; gene-ambiente; miRNAs; ontologia gênica; SNPs; transtorno de atenção e hiperatividade

## Abstract

CARVALHO, Andressa Marques. **The role of genetic polymorphisms in the regulation of genetic expression. By microRNAs and genetic susceptibility to Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)**. 2018. 63f. Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2018.

The attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most prevalent psychiatric disorders of neurodevelopment during childhood and adolescence, affecting around 5% of the population in this age group. The ADHD is especially relevant on society, because it directly affects infant mental health settings. Both etiology and pathogenesis of ADHD still remain poorly elucidated, although some evidences support the existence of interaction between environmental and genetic factors as a strong contribution to the disorder. Among the genetic factors involved, it is known that a big part of the genome is expressed in the brain and the expression of genes in this organ undergoes several changes throughout development. Thus, mutations that can alter the expression or function of these genes may cause or contribute to the occurrence of neurological and psychiatric diseases. During growth, miRNAs play a role of regulators which controls the expression of genes involved in brain functions such as learning, emotions, memory and some mental disorders. Genetic variants such as Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on miRNA genes or on its target-genes are considered factors that may affect the regulation of genetic expressions. Therefore project goal was to characterize the genetic variability in miRNAs genes, important for the brain development, using an *in silico* approach, as well as explore the effect of these genes and polymorphisms in ADHD, using the summarized statistics of the most recent and robust association study about the disorder, conducted by Psychiatric Genomics Consortium; (PGC). As a result, we found 529 genetics variants at 64 miRNAs genes. According to the location of the genetic variants, 90,9% of the genetic variants are located on miRNAs regulatory regions and 9,1% on transcribed regions. The allelic frequency for different human populations shows that the African population have bigger genetic variability, presenting a bigger number of polymorphic sites. As of the genetic susceptibility for ADHD, none of the variants reached any significant p value using the PGC data. In gene-based association analysis, the *MIR9-2* reached close to significant p values ( $p=3.0 \times 10^{-6}$ ). Results suggest that the genetic variants evaluated may show important regulatory function on miRNAs genes. However, these variants and evaluated genes did not present any influence for ADHD susceptibility on European population. Additional research in this area, with *in silico* and *in vitro* evidence as well as analysis of other promoting regions may add important information to the present study. As the African population presented important genetic differences, the investigation of the role these miRNAs in populations of different genetic ancestry becomes important.

**Key-words:** miRNAs; SNPs; Gene-Environment; Gene Ontology; brain; Attention Deficit Hyperactivity Disorder



## Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismos de origem e processamento de miRNA .....	20
Figura 2	Variações genéticas relacionadas ao miRNA que podem estar associadas a transtornos psiquiátricos .....	22
Figura 3	Número de miRNAs diferencialmente expressos dentro de cada região do cérebro ao longo do desenvolvimento .....	26
Figura 4	Regiões do mundo que compreendem as cinco superpopulações contidas no Projeto 1000 genomas .....	30
Figura 5	Fluxograma das etapas de busca de variantes genéticas a partir de miRNAs .....	34
Figura 6	Gráfico da proporção de SNPs para as cinco populações, de acordo com as três categorias de MAF .....	36
Figura 7	Gráfico da proporção de miRNAs com SNPs com MAF <10% e miRNAs com pelo menos 1 SNP com MAF ≥10% .....	36

## Lista de Tabelas

Tabela 1	miRNAs identificados por Ziats e Rennert (2014) .....	22
Tabela 2	Proporção de miRNAs com SNP com $MAF \geq 10\%$ para as cinco populações do Projeto 1000 Genomas nas três fases do desenvolvimento cerebral .....	39
Tabela 3	Descrição dos achados de associação de marcadores genéticos individuais .....	41

## Sumário

1. Introdução .....	11
1.1 Objetivos .....	13
1.1.1 Objetivo geral .....	13
1.1.2 Objetivos específicos .....	14
2. Revisão da literatura .....	15
2.1 Caracterização epidemiológica e fenotípica do TDAH .....	15
2.2 Etiologia do TDAH .....	16
2.2.1 Fatores ambientais de influência .....	17
2.2.2 Fatores genéticos de influência .....	17
2.3 miRNA .....	19
2.3.1 polimorfismos genéticos e miRNAs .....	21
2.3.2 miRNAs e desenvolvimento do Sistema Nervoso Central .....	22
2.3.3 miRNAs e TDAH .....	23
3. Materiais e métodos .....	25
3.1 Banco de dados .....	25
3.2 miRBase .....	28
3.3 Programas de bioinformática para identificação de SNPs em miRNAs..	28
3.3.1 Projeto 1000 genomas .....	29
3.4 miRTarBase .....	30
3.5 Consórcio de Genômica Psiquiátrica (PGC) .....	31
3.6 VEGAS2 v02.....	32
3.7 Análises estatísticas .....	33
4. Resultados.....	34
5. Discussão .....	42
6. Conclusões .....	50
Referências .....	51
Apêndices .....	62

## 1. Introdução

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos do neurodesenvolvimento mais prevalentes durante a infância e adolescência, afetando cerca de 5% da população nessa faixa etária (FARAONE; MICK, 2010; POLANCZYK et al., 2014). Aproximadamente 65% dos casos diagnosticados durante a infância continuam a manifestar sintomas na idade adulta (FARAONE et al., 2006; SIMON et al., 2009), sendo a prevalência de TDAH na vida adulta estimada entre 2,5 a 4,9% (RAMOS-QUIROGA et al., 2014; SIMON et al., 2009).

O TDAH é particularmente relevante na sociedade, pois impacta diretamente na configuração de saúde mental infantil. As crianças diagnosticadas com o transtorno apresentam prejuízos em vários contextos da vida como, por exemplo, problemas relacionados à educação, ao comportamento social e/ou outros problemas de saúde mental ao longo da vida (KLEIN et al., 2012). Ainda, sabe-se que na vida adulta o risco de acidentes com veículos motorizados, abuso de substâncias ilícitas, problemas com a lei, desemprego, suicídio, problemas de relacionamento, conflitos familiares entre outros é maior entre os indivíduos afetados (POLANCZYK et al., 2014; CHILDRESS et al., 2012).

O diagnóstico do TDAH é clínico, estabelecido com base nos critérios provenientes do Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais (DSM-5) e da Classificação Internacional das Doenças (CID-10), os quais relatam sintomas prejudiciais de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade. No entanto, a etiologia e a patogênese do TDAH ainda permanecem pouco elucidadas. A literatura científica sinaliza que trata-se de uma síndrome heterogênea de origem multifatorial, integrando a existência de interação entre fatores ambientais e genéticos como forte contribuição para o transtorno (BANJEREE et al., 2007; LIONEL et al., 2011; BIEDERMAN, 2005; THAPAR et

al., 2007; FROELICH et al., 2011; PINGAULT et al., 2015). A literatura demonstra uma herdabilidade ao TDAH em torno de 76% (FARAONE; MICK, 2010; LARSSON et al., 2014; BRIKELL et al., 2015). Desse modo a identificação de componentes de risco genético com papel significativo na susceptibilidade à doença é um passo crucial na compreensão da etiologia do TDAH.

Grande parte do genoma é expresso no cérebro (KANG et al., 2011), sendo a expressão apropriada de produtos gênicos (RNA e proteínas) precisamente reguladas espacial e temporalmente. Dessa maneira, variantes genéticas que possam alterar a expressão ou a função desses genes podem ocasionar ou colaborar para a ocorrência de doenças neurológicas e psiquiátricas (TEBBENKAMP et al., 2014). Durante o desenvolvimento, microRNAs (miRNAs), genes não codificantes que controlam a expressão de genes codificantes em nível pós-transcricional, desempenham papel essencial na regulação coordenada e específica dos genes (FINNEGAN; PASQUINELLI, 2013). Recentemente, sua função no sistema nervoso tem sido atribuída ao desenvolvimento de funções cerebrais como aprendizagem, emoções, memória, assim como em doenças mentais (FORERO et al., 2010; BREDY et al., 2011; SALTA; STROOPER, 2012). Ainda, alterações de miRNAs já foram associados a transtornos neurológicos e neuropsiquiátricos, tais como, Esquizofrenia (PERKINS et al., 2007; BEVERIDGE et al., 2011; SANTARELLI et al., 2011; WRIGHT et al., 2016), Transtorno do Espectro do Autista (ABU-ELNEEL et al., 2008; WU et al., 2016; HICKS; MIDDLETON, 2016), Transtorno Bipolar (BAVAMIAN et al., 2015), Transtorno Depressivo Maior (FAN et al., 2014) e Transtorno Obsessivo-Compulsivo (KANDEMIR et al., 2015). Variantes genéticas como os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em genes de miRNA ou em seus genes-alvo são considerados fatores que podem afetar a regulação da expressão gênica (SUN et al., 2009).

Ziats e Rennert (2014) identificaram um conjunto de miRNAs com padrões de expressão diferenciais espacial-temporal no Sistema Nervoso Central durante o desenvolvimento. Os genes-alvo desses miRNAs são altamente relacionados com regulação transcricional, processos de neurodesenvolvimento e distúrbios do desenvolvimento neurológico, sugerindo

que os miRNAs identificados sejam provavelmente núcleos de processos críticos de transição e desenvolvimento do cérebro. Visto que o TDAH é um transtorno do neurodesenvolvimento, é possível que os miRNAs identificados tenham um papel potencial para o desenvolvimento desse transtorno. Portanto a avaliação do progresso obtido até o momento em relação ao papel dos microRNAs em um distúrbio psiquiátrico de neurodesenvolvimento, como o TDAH, é de imensa relevância.

Apesar de o TDAH estar entre os transtornos com maior herdabilidade, os estudos genéticos envolvendo genoma completo e genes candidatos conduzidos até então não foram suficientes para estabelecer a origem do transtorno. Sendo de extrema relevância para que se tenha uma maior compreensão a respeito da funcionalidade e da variabilidade dessas variantes, bem como avaliar o impacto de dessas variantes e genes na susceptibilidade ao transtorno. Porém, o papel de polimorfismos em genes de miRNA diferencialmente expressos durante o desenvolvimento cerebral ainda é pouco explorado

Espera-se que (i) haverá menor número de polimorfismos em regiões semente de miRNAs e maior número nas regiões que compreendem pre-miRNA; (ii) a maior parte das variantes genéticas em miRNA afetarão a expressão gênica desses miRNA; (iii) *loci* em regiões regulatórias de miRNAs apresentarão frequências alélicas maiores que aquelas em regiões semente; e (iv) variantes genéticas e genes de miRNAs importantes para o desenvolvimento cerebral serão importantes na etiologia do TDAH.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Caracterizar a variabilidade genética em genes de miRNAs importantes para o desenvolvimento cerebral e avaliar sua associação com TDAH utilizando uma abordagem *in silico*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- (i) Identificar variantes genéticas presentes nas regiões de genes de miRNA descritos por Ziats e Rennert (2014) através de ferramentas de bioinformática.
- (ii) Realizar a predição de funcionalidade *in silico* das variantes genéticas identificadas no objetivo *i* para avaliar o impacto na regulação da expressão gênica por miRNAs.
- (iii) Descrever as variantes genéticas de acordo com frequência alélica em diferentes populações humanas.
- (iv) Avaliar a importância das variantes genéticas e dos genes de miRNA na susceptibilidade ao TDAH utilizando estatísticas sumarizadas obtidas a partir de resultados de estudos de associação ampla do genoma (GWAS; Genome Wide Association Studies) do Consórcio de Genômica Psiquiátrica.

## **2. Revisão da literatura**

Realizou-se um levantamento na literatura através do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), pubmed na busca de artigos que incluíram a caracterização epidemiológica e fenotípica do TDAH, etiologia do TDAH incluindo fatores ambientais e genéticos de influência, caracterização de miRNAs e polimorfismos em miRNAs e sua influência nos transtornos psiquiátricos em geral, bem como no TDAH.

Os resultados serão apresentados de acordo com a caracterização funcional e variabilidade genética dos polimorfismos, dos miRNAs em relação às diferentes etapas do desenvolvimento cerebral e o papel de variantes genéticas em miRNAs no TDAH.

### **2.1 Caracterização epidemiológica e fenotípica do TDAH**

O TDAH é um transtorno psiquiátrico de grande importância em saúde pública, considerando os problemas de relacionamento causados desde a infância até a fase adulta no âmbito escolar e de trabalho (FARAONE et al., 2003; BARBARESI et al., 2007).

Uma meta-análise realizada por Polanczyk et al., (2007) englobando 102 estudos com indivíduos de 18 anos ou mais, observou uma prevalência de 5,3% de TDAH, com uma estimativa de até 65% dos casos de TDAH diagnosticados na infância persistindo até a vida adulta.

O diagnóstico do TDAH é clínico, estabelecido com base nos critérios provenientes do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais versão 5 (DSM-5) e da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-10). O DSM-5 estabelece alguns



critérios que conduzem o diagnóstico do TDAH, estes devem persistir 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, apresentando-se antes dos 12 anos em mais de um ambiente (casa, escola, trabalho, amigos). Os critérios estão estabelecidos conforme as três distintas apresentações reconhecidas: predominantemente desatento; predominantemente hiperativo/impulsivo e apresentação combinada. Deve haver a presença de pelo menos seis sintomas reportados nos últimos seis meses (DSM-5, 2014).

Em geral, os sintomas de TDAH tem início no primeiro ano de vida e primeira infância (2-4 anos), porém a maioria das crianças é diagnosticada durante a infância tardia (6-7 anos), quando as crianças ingressam na escola, começam ser percebidas as dificuldades de atenção e inquietude com maior frequência pelos professores, quando comparadas a outras crianças da mesma faixa etária e que dividem o mesmo ambiente (POETA; NETO, 2006).

De acordo com Cantwell (1996) e com o DSM (DSM-5, 2014) a proporção de TDAH entre meninos é maior que entre meninas, variando de 2:1 até 4:1. Na vida adulta a proporção é semelhante, aproximadamente 1:1. Ainda segundo Trent e Davies (2012) os meninos com TDAH tendem a exibir o subtipo predominante hiperativo ou a combinação de ambos os tipos, aumentando a ocorrência de problemas como agressão. No sexo feminino, há maior probabilidade de se apresentar sintomas de desatenção, com características de falta de atenção, dificuldade para se ater aos detalhes e falta de organização, com impacto nas atividades diárias. Os indivíduos que apresentam os sintomas combinados se distraem mais facilmente e, a hiperatividade, além de se manifestar como inquietação motora, também se manifesta como verbal e intelectual, apresentando dificuldades de autocontrole e auto regulação em seguir instruções (ROHDE et al., 2004).

## **2.2 Etiologia do TDAH**

A etiologia do transtorno é multifatorial, como fenótipo o TDAH resulta de interações entre fatores genéticos e ambientais que atuam na manifestação de

seus diferentes quadros clínicos (ROMAN et al., 2003). Dentre os fatores ambientais, podemos dividi-los em três momentos: exposição intrauterina, momento do parto e durante a vida. Dentre os fatores genéticos, estes nos indicam alta herdabilidade ao transtorno, através de estudos realizados com famílias, adotados e gêmeos. Ainda, estudos de genética molecular envolvendo genes candidatos e estudos de associação do genoma para descobrir variantes comuns que possam estar associadas ao transtorno têm sido abordados.

### **2.2.1 Fatores ambientais de influência**

Diversos fatores ambientais são atuantes na susceptibilidade ao TDAH. A literatura indica que desde complicações durante a gestação como exposição intrauterina ao álcool, cigarros, cafeína, ocorrência de toxemia ou eclampsia, pós maturação fetal, seguido por problemas no momento do parto, como, longa duração de trabalho de parto, desconforto fetal além da prematuridade indexada pelo baixo peso ao nascer aumentam o risco para a doença (MICK et al., 2002). Durante a vida, fatores como discórdia conjugal, baixa classe social, conglomeração familiar, criminalidade paterna, transtorno mental materno, adoção, também são fatores de risco para o transtorno (BIEDERMAN et al., 2004). Estudos realizados por Biederman et al., (2005) demonstraram que o conflito crônico, redução da coesão familiar e a exposição à psicopatologia dos pais se mostram mais comuns nas famílias de TDAH em comparação com as famílias controle.

### **2.2.2 Fatores genéticos de influência ao TDAH**

Muitos estudos de genética clássica apontam a existência de fatores genéticos na susceptibilidade ao TDAH. Estudos de famílias, de gêmeos e de filhos adotados evidenciam que o TDAH apresenta alta herdabilidade (FARAONE et al., 2005), estimando-se que a herdabilidade do TDAH é de 70-80% (BURT, 2009). Na revisão feita por Faraone et al., (2005) de 20 estudos

com gêmeos nos Estados Unidos, Austrália, Escandinávia e União Europeia, foi observado uma herdabilidade média de 76%.

Os estudos de genética molecular do TDAH começaram em meados dos anos 1990 com pesquisas sobre genes candidatos, onde os genes são escolhidos em bases teóricas para associar um gene específico ao TDAH. Muitos dos genes candidatos foram identificados com um provável papel na etiologia da doença, entre eles estão: *DRD4* (receptor de dopamina D4), *DRD5* (receptor de dopamina D5), *SLC6A3* (família de portadores de soluto 6 membro 3), *SLC6A2* (família de portadores de soluto 6 membro 2), *SLC6A4* (família de portadores de soluto 6 membro 4), *HTR1B* (receptor 5-hidroxitriptamina 1B), *HTR2A* (receptor 5-hidroxitriptamina 2a), *TPH2* (triptofano hidroxilase 2), *SNAP25* (proteína 25 associada ao sinaptossoma), *BDNF* (fator neutrófico derivado do cérebro) (BANASCHEWSKI et al., 2010).

Além dos estudos realizados para genes candidatos, também são efetuados estudos de GWAS para identificar variantes comuns no DNA que aumentem o risco para o TDAH. No último e maior estudo realizado até o momento, recentemente publicado, Demontis et al. (2017) identificaram 12 *loci* de susceptibilidade para TDAH significativamente associados a nível genômico ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ). Foram identificados genes como *ST3GAL3* (mutações nesse gene vem sendo associadas com deficiência cognitiva), *DUSP6* (associado à proliferação e diferenciação celular), *FOXP2* (associado ao desenvolvimento adequado das regiões de fala e linguagem), *POC1B* (atua na formação do corpo basal e dos cílios), *PCDH7* (atua no reconhecimento e adesão das células), *SORCS3* (variação genética nesse gene está associada à doença de Alzheimer), entre outros como: *KDM4A*, *PTPRF*, *SLC6A9*, *ARTN*, *B4GALT2*, *IPO13*, *SPAG16*, *MIR9-2*. Processos importantes entre os genes identificados concentram-se em funções de desenvolvimento neurológico.

### 2.3 miRNA

Os miRNAs constituem uma família de pequenos RNAs endógenos não-codificantes, conservados, com cerca de 22 nucleotídeos que se pareiam a sequências complementares na região 3' UTR dos RNAs mensageiros (mRNA) mediando a repressão da tradução ou a clivagem do mRNA (LAGOS-QUINTANA, 2001; AMBROS, 2004).

Mais da metade dos genes codificadores de proteínas são previstos para serem regulados por miRNAs e cada miRNA pode regular centenas de genes diferentes, assim como regular a expressão de vários genes dentro de uma via biológica ou celular específica (ISSLER; CHEN, 2015). Estudos mostram que a função dos miRNAs no sistema nervoso adulto tem sido associada a plasticidade neuronal, incluindo a regulação da síntese de proteínas sinápticas e morfogênese de espinhos dentrícos, além de estarem envolvidos em funções cerebrais como aprendizagem, memória e emoções em doenças mentais (BREDY et al., 2011; FORERO et al., 2010; SALTA; STROOPER, 2012).

Os miRNA (Figura 1) são estruturados de acordo com seis etapas: 1. São transcritos pela RNA polimerase II e III em transcritos primários de miRNA (pri-miRNA) formando uma estrutura em forma de grampo (BARTEL, 2004); 2. São clivados por um complexo de microprocessador que contém Drosha (ribonuclease 3) e a subunidade da região crítica da síndrome *DiGeorge 8* (DGCR8). Drosha, por sua vez, cliva as extremidades 5' e 3' do grampo e DGCR8 determina o local de clivagem preciso, ocorrendo no núcleo. Após a clivagem da molécula o seu tamanho é reduzido para 70-110 nucleotídeos de comprimento sendo denominado como miRNA precursor (pré-miRNA); 3. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma por *Exportin 5* (XPO5) em conjunto com a proteína nuclear Exportina 5-Ran-GTP; 4. O pré-miRNA é clivado pelo Dicer e sua proteína de ligação *Transactivation Reponsive RNA Binding Protein* (TRBP) gerando um duplex de miRNA de 22 nucleotídeos; 5. Dicer e sua proteína de ligação (TRBP) se dissociam do duplex formando o complexo de silenciamento induzido por *RNA-induced silencing complex* (RISC). Este, por sua vez realiza o silenciamento do gene alvo. O RISC é constituído em parte por enzimas helicases e proteínas argonautas, as quais promovem o desenovelamento do duplex miRNA:miRNA e a quebra das pontes de hidrogênio que unem as duas fitas, de modo que uma fita do duplex possa a

ser incorporada ao RISC junto com Argonaute2 (AGO2); 6. A fita incorporada ao RISC é o miRNA maduro enquanto a outra fita do duplex é degradada.

Os miRNAs atuam na inibição da síntese de proteínas através da ligação entre as sequências de sementes de miRNA e sequências complementares em genes de RNA mensageiro alvo (mRNA). Esta ligação causa degradação e / ou repressão traducional de genes de mRNA dependendo do grau de complementariedade e homologia com seus genes-alvo (COSTA; PACHECO, 2012). A sequência semente do miRNA maduro é constituída pelos nucleotídeos na posição 2 à 7 da extremidade 5' do miRNA.

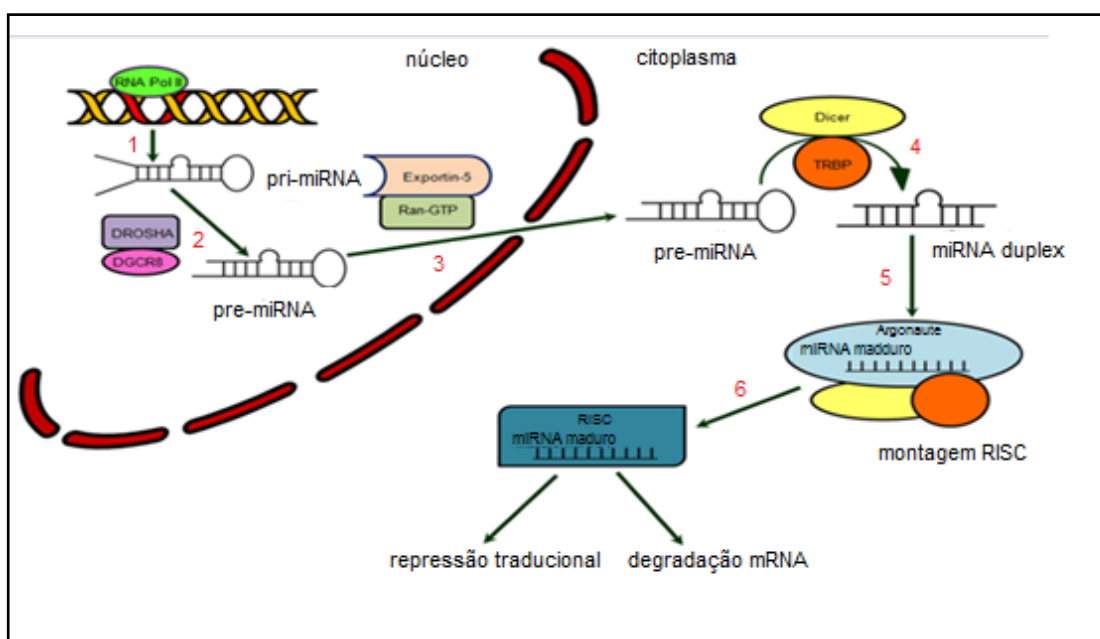


Figura adaptada de SRIVASTAV, 2017, p.3.

**Figura 1** - Mecanismos de origem e processamento de miRNA: (1) transcrição do miRNA pela RNA polimerase II para formar miRNA primário (pri-miRNA); (2) pri-miRNA é processado pela DROSHA e DGCR8 para formar o miRNA precursor (pre-miRNA); (3) Transporte de pre-miRNA em citoplasma mediado por Exportin-5 e Ran-GTP; (4) Clivagem do pre-miRNA por Dicer para formar o duplex de miRNA; (5) miRNA maduro (um dos fios do duplex de miRNA) se liga ao Argonauta seguido do conjunto do complexo RISC; (6) miRNA maduro com Argonauta, Dicer e TRBP forma RISC. Este RISC visa seus mRNAs de miRNA específicos para sua degradação ou repressão.

Após ocorrer a interação os miRNAs têm como principal função regular os genes e o genoma, silenciando-os de forma geral, o que pode levar a um aumento ou diminuição na expressão de um gene ou, inclusive, de uma proteína que atua em uma via de sinalização para um determinado contexto celular (XIAO et al., 2009). A identificação do gene a ser silenciado se dá pelo pareamento de bases complementares através da região semente do miRNA

com seus genes-alvo específicos. Cada situação exige um padrão diferente de expressão gênica, desta forma, a maquinaria de silenciamento pode ser redirecionada através da expressão de novos miRNAs ou da remoção de antigos miRNAs (CARTHEW et al., 2009).

### **2.3.1 Polimorfismos genéticos e miRNAs**

Dentre os polimorfismos presentes no genoma humano, os SNPs são os mais frequentes, representando uma fonte muito significativa de modificações genéticas no genoma humano. São variações na sequência do DNA que envolvem a alteração de um único nucleotídeo, podendo ser bi, tri ou tetra-alélicos, porém a maioria se encontra na forma bi alélica (LIAO; LEE, 2010). Eles compreendem, assim, variações de fácil detecção quando comparados a outros marcadores (TAILLIN-MILLER et al., 1998) e são muito utilizados em estudos de características genéticas complexas e para compreensão da evolução molecular (JEHAN e LAKHANPAUL, 2006).

Quando localizados em miRNAs, SNPs podem afetar a biogênese e função de miRNAs de diversas maneiras. A biogênese de miRNAs pode ser afetada se estes estiverem localizadas em genes da maquinaria de biogênese, bem como podem afetar a expressão se estiverem em região regulatória e afetar a interação com os mRNA-alvo se estiverem localizados na sequência semente de miRNAs e na região de interação do mRNA-alvo. Essas modificações podem levar a implicações funcionais significativas para a ligação do miRNA e regulação pós-transcricional, tendo como produto final alterações no perfil de expressão dos genes alvo, que poderia afetar a suscetibilidade a doenças. A Figura 2 ilustra as alterações e possíveis consequências funcionais de SNPs em miRNAs.

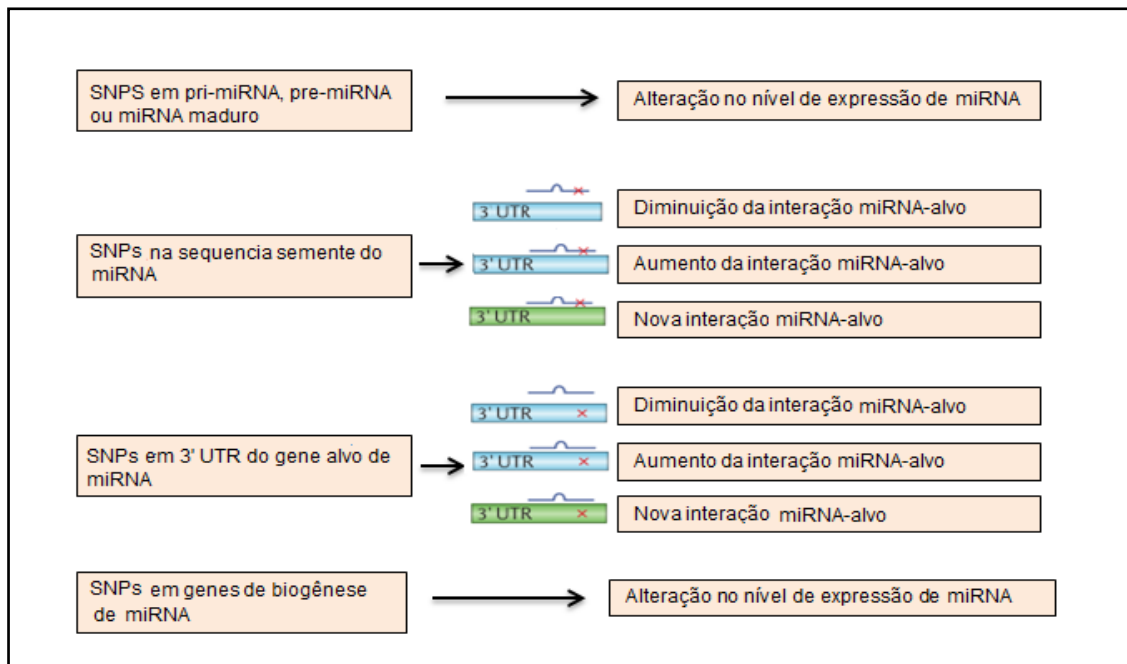


Figura adaptada de ISSLER, 2015, p.206.

**Figura 2** - Variações genéticas relacionadas ao miRNA que podem estar associadas à transtornos psiquiátricos.

### 2.3.2 miRNAs e desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

O neurodesenvolvimento humano exige a expressão coordenada de milhares de genes para que se alcance especialização e interconectividade das regiões cerebrais necessárias. Desregulações em redes genéticas complexas no cérebro em desenvolvimento são considerados mecanismos subjacentes a muitos distúrbios do desenvolvimento neurológico e psiquiátrico (OLDHAM et al., 2008). Dessa maneira, faz-se necessário o entendimento das mudanças normais na expressão gênica ao longo do desenvolvimento neurológico humano. Com o intuito de atingir esse propósito Ziats e Rennert (2014) realizaram uma análise da expressão diferencial de todos os miRNAs presentes no tecido cerebral saudável, derivados de 18 cérebros de indivíduos com idades entre 4 e 19 anos, agrupados em (infância, primeira infância, infância tardia e adolescência) e avaliadas em 6 regiões distintas do cérebro. No total foram descobertos 75 produtos maduros de miRNAs diferencialmente expressos durante o tempo de desenvolvimento dentro das regiões do cérebro, com a maior expressão diferencial decorrendo durante a transição da infância para primeira infância.

As descobertas por Ziats e Rennert (2014) sugerem que os miRNAs identificados provavelmente são núcleos de processos críticos de transcrição e desenvolvimento do cérebro.

### 2.3.3 miRNAs e TDAH

Em uma revisão sistemática realizada recentemente por Srivastav et al., (2017) a partir de nove estudos que descrevem a tendência emergente dos miRNAs no TDAH, incluindo três estudos de expressão gênica, três estudos de associação e três estudos de caso-controle. Destes, três, foram realizados com modelos animais e seis realizados com indivíduos humanos. A partir desses estudos 19 miRNAs foram identificados desempenhando um papel potencial no TDAH: miR-18a, miR-22, miR-24, miR-30b, miR-34b, miR-34c-3p, miR-34c, miR-96, miR-106b, miR-107, miR-125, miR-138, miR-155, miR-296, miR-510, miR-641, miR-1301, miR-6070 e miR-let-7d. Estes miRNAs atuam na regulação transcricional de genes como *BDNF* (fator neurotrófico derivado do cérebro), *HTR2C* (receptor 5-hidroxitriptamina 2C), *MAOA* (monoamina oxidase A), *RGS2* (regulador da sinalização da proteína G2), *MET* (receptor de tirosina quinase), *HMGA2* (grupo de alta mobilidade AT-hook 2), *NOTCH2* (notch 2), *SYT2* (sinaptotagmina 2), *HTR1B* (receptor 5-hidroxitriptamina 1B), *VAMP2* (proteína de membrana 2 associada a vesícula), *SNAP-25* (proteína 25 associada ao sinaptossoma), *SLC6A3* (família de transportadores de soluto 6 membro 3). Estes genes estão relacionados a vias de sinalização por neurotransmissores que incluem: serotonina, dopamina, norepinefrina e acetilcolina, já associadas ao TDAH. Além de genes que atuam na resposta ao estresse oxidativo, embriogênese, migração e sobrevivência celular e diferenciação mesenquimal.

Estudos envolvendo SNPs em genes de miRNA vêm sendo explorados em diversos transtornos psiquiátricos, além do TDAH. Devido ao fato dos miRNAs estarem envolvidos na proliferação, diferenciação e maturação de neurônios, sua disfunção pode vir a contribuir para os déficits de desenvolvimento neurológico associados a diferentes transtornos, como esquizofrenia e transtorno do espectro autista (CAPUTO et al., 2015; WU et al.,



2016). Também há evidências de SNPs atuando na disfunção de miRNAs que agem em vias regulatórias do ciclo circadiano, uma das vias associadas aos transtornos de humor e TDAH (CHENG et al., 2007; WANG et al., 2016).

Em um dos maiores estudos de GWAS para esquizofrenia realizado pelo Consórcio de Genômica Psiquiátrica (PGC), abrangendo 17.836 indivíduos com o transtorno e 33.859 controles saudáveis, o SNP *rs1625579* localizado no miR-137, um regulador conhecido no desenvolvimento neuronal, apresentou uma significativa entre o SNP e o transtorno ( $p=1,6 \times 10^{-11}$ ) (RIPKE et al., 2011). Este mesmo SNP foi demonstrado na literatura como associado ao Transtorno Bipolar (WHALLEY et al., 2012). Outro exemplo de miRNAs associados a mais de um transtorno são os miR-29c, miR-132 e miR-106b, estes foram associados tanto com esquizofrenia como transtorno bipolar, sugerindo que possa haver caminhos comuns entre os transtornos (GEAGHAN; CAIRNS, 2015). Ainda, o miR-132 vem sendo investigado no funcionamento do ciclo circadiano, também associado ao TDAH e transtorno Bipolar (ETAIN et al., 2014).

Ainda, a literatura demonstra o papel da desregulação de miRNAs no transtorno de depressão maior em uma associação com um SNP no gene *P2RX7* (receptor purinérgico P2X 7) envolvido na modulação da neurotransmissão sináptica. Esse SNP (*rs1653625*) ocorre no site alvo do miR-625 e miR-1302 (SPERLAGH et al., 2006.)

Apesar de poucos estudos para o TDAH, o estudo de variantes genéticas na etiologia de outros transtornos tem sido explorado, o que fornece evidências a favor da hipótese de que os miRNAs poderiam estar envolvidos na etiologia de transtornos psiquiátricos. Assim o estudo de variantes genéticas ligadas às etapas do desenvolvimento cerebral pode agregar maior conhecimento a respeito da etiologia de transtornos do neurodesenvolvimento.

### **3. Materiais e métodos**

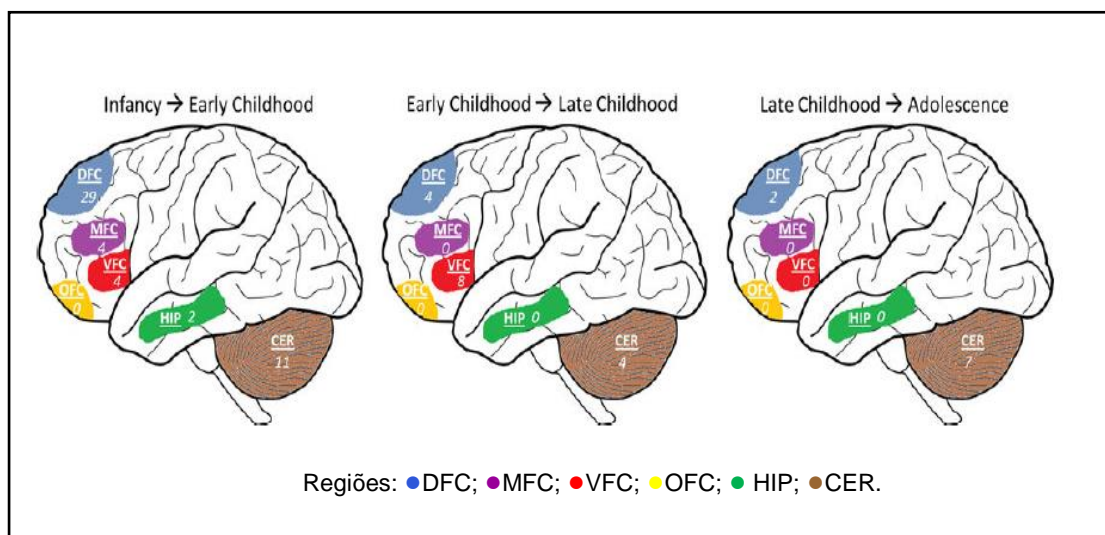
Empregou-se uma abordagem *in silico*, de acordo com as seguintes etapas: (i) Elaboração do banco de dados inicial contendo a identificação dos miRNAs já identificados por ZIATS e RENNERT (2014); (ii) Validação de anotação dos miRNAs incluídos no banco de dados; (iii) Realização da identificação de polimorfismos e sua predição de funcionalidade através de ferramentas de bioinformática específicas para o estudo de polimorfismos genéticos em miRNAs; (iv) Verificação de anotação dos polimorfismos identificados e caracterização de frequências alélicas; (v) Investigação dos genes-alvo de miRNAs que possuem diferenças em relação a variabilidade; (vi) Investigação da importância dos genes e SNPs na susceptibilidade ao TDAH através de estatísticas sumarizadas do GWAS para TDAH; e (vii) Realização de testes baseados em genes através do VEGAS2.

#### **3.1 Banco de dados**

Como banco de dado inicial do projeto, foram utilizadas informações já publicadas de estudos em nível genômico relatando miRNAs diferencialmente expressos durante o desenvolvimento cerebral.

Para determinar os miRNAs a serem incluídos neste estudo foram utilizados as informações apresentadas por Ziats e Rennert (2014). Os dados resultam de 18 cérebros de doadores humanos que abrangem três etapas distintas no desenvolvimento cerebral. A primeira etapa corresponde a infância (4 meses – 1 ano) → primeira infância (2 – 4 anos); a segunda etapa, a primeira infância → infância tardia (8 – 13 anos) e a terceira etapa, da infância tardia → adolescência (15 – 23 anos). Todos os dados que eles obtiveram são provindos do *Allen Institute for Brain Science Brain Span Atlas of the Developing*

*Human Brain* ([www.brainspan.org](http://www.brainspan.org)), para as seguintes regiões de interesse: Córtex Pré-Frontal Dorsolateral (DFC), Córtex Frontal Medial (MFC), Córtex Pré-Frontal Ventrolateral (VFC), Córtex Orbitofrontal (OFC), Hipocampo (HIP) e Cerebelo (CER). Os autores contabilizaram a quantidade de miRNAs diferencialmente expressos ao longo do desenvolvimento para cada região. Na etapa que corresponde a infância → primeira infância, 50 miRNAs foram diferencialmente expressos, enquanto na fase que corresponde à primeira infância → infância tardia 16 miRNAs foram diferencialmente expressos e para ultima etapa estudada, que corresponde à infância tardia → adolescência, 9 miRNAs diferencialmente expressos (Figura 3).



Fonte: Ziats e Rennert (2014).

**Figura 3** – Número de miRNAs diferencialmente expressos dentro de cada região do cérebro ao longo do desenvolvimento.

Os miRNAs diferencialmente expressos em relação as distintas etapas do desenvolvimento cerebral humano foram descobertos através do pacote edgeR (<http://bioconductor.org>). No total foram descobertos 75 miRNAs maduros diferencialmente expressos durante o tempo de desenvolvimento dentro das regiões do cérebro, sendo que 13 desses se repetiram, totalizando 62 miRNAs não redundantes (Tabela 1).

**Tabela 1** - miRNAs identificados por Ziats e Rennert (2014) dentro de cada região em momentos diferentes do desenvolvimento cerebral

DFC	VFC	MFC	OFC	HIP	CER
<b>Infância → Primeira infância (4 meses – 4 anos)</b>					
miR-4423-5p	miR-214-5p	miR-148b-3p	N*	miR-9-5p	miR-216a
miR-219-5p	miR-597	miR-454-3p		miR-4454	miR-217
miR-211-5p	miR-548o-3p	miR-320a			miR-216b
miR-338-5p	miR-4454	miR-585			miR-1246
miR-34c-5p					miR-137
miR-34b-5p					miR-5096
miR-3607-5p					miR-208b
miR-219-2-3p					miR-3687
miR-33b-5p					miR-582-5p
miR-3182					miR-561-5p
miR-625-3p					miR-582-3p
miR-29c-5p					
miR-3615					
miR-29b-3p					
miR-199b-5p					
miR-145-3p					
miR-221-5p					
miR-125b-5p					
miR-125a-5p					
miR-100-5p					
miR-99b-5p					
miR-501-3p					
miR-99a-5p					
miR-212-5p					
miR-96-5p					
miR-488-5p					
miR-135a-3p					
miR-1271-5p					
miR-409-5p					
<b>Primeira infância → Infância tardia (4 anos – 13 anos)</b>					
miR-409-5p	miR-597	N*	N*	N*	miR-873-5p
miR-501-3p	miR-3688-3p				miR-876-5p
miR-1271-5p	miR-34b-5p				miR-582-5p
miR-486-5p	miR-214-5p				miR-876-3p
	miR-142-3p				
	miR-548o-3p				
	miR-1912				
	miR-187-5p				
<b>Infância tardia → Adolescência (13 anos – 23 anos)</b>					
miR-483-3p	N*	N*	N*	N*	miR-1249
miR-4284					miR-1266
					miR-29c-5p
					miR-4515
					miR-582-3p
					miR-193b-5p
					miR-1185-2-3p

Nota: N\* nenhum miRNA diferencialmente expresso.

### 3.2 miRBase

Após a determinação dos produtos de miRNAs maduros utilizados neste estudo, os mesmos foram submetidos ao banco de dados miRBase para validação de anotação e para a obtenção de genes que dão origem a esses produtos (Disponível em: <http://www.mirbase.org/>) (KOZOMARA, 2013).

O banco de dados miRBase é um banco de dados público, estabelecido em 2002, com o objetivo principal de atribuir nomes estáveis e consistentes a miRNAs recém-descobertos e contém sequências e anotações de miRNAs identificados em diversos genomas até o momento. ,. Ainda, fornece as referências primárias que descrevem sua descoberta, links para a evidência de origem para a anotação de miRNAs, coordenadas genômicas e links para bancos de dados de locais alvo de miRNAs previstos e validados.

### 3.3 Programas de bioinformática para identificação de variantes genéticas em miRNAs

Foram utilizados três diferentes programas desenvolvidos para identificar variantes genéticas em miRNAs. Todos os programas são gratuitos para usuários acadêmicos e sem fins lucrativos: PolymiRTS Database 3.0 (BHATTACHARYA et al., 2014), miRNASNP 2.0 (GONG et al., 2015) e dPORE (SCHMEIER et al., 2011).

- ***Polymorphism in microRNAs and their Target Sites (PolymiRTS Database) 3.0***

O PolymiRTS é um banco de dados de variantes genéticas de ocorrência natural nas regiões de miRNAs e nos sítios-alvo de miRNA (Disponível em: <http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>).

É uma plataforma integrada para analisar o impacto funcional de polimorfismos genéticos em regiões de semente de miRNAs e sítios-alvo de miRNAs.

- *microRNA-related single nucleotide polymorphisms (miRNASNP 2.0)*

O miRNASNP é um banco de dados com finalidade de viabilizar informações sobre SNPs relacionados a miRNAs, que incluem SNPs em regiões de transcrição de miRNAs de espécies humanas e outras (Disponível em: <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/index.php>). Ainda, permite explorar informações quanto à energia mínima livre do SNP, sugerindo que quanto maior a mudança de energia (kcal/mol) maior o impacto do SNP na biogênese do miRNA e sua ligação com o mRNA.

- *Polymorphic regulation of microRNA Genes (dPORE)*

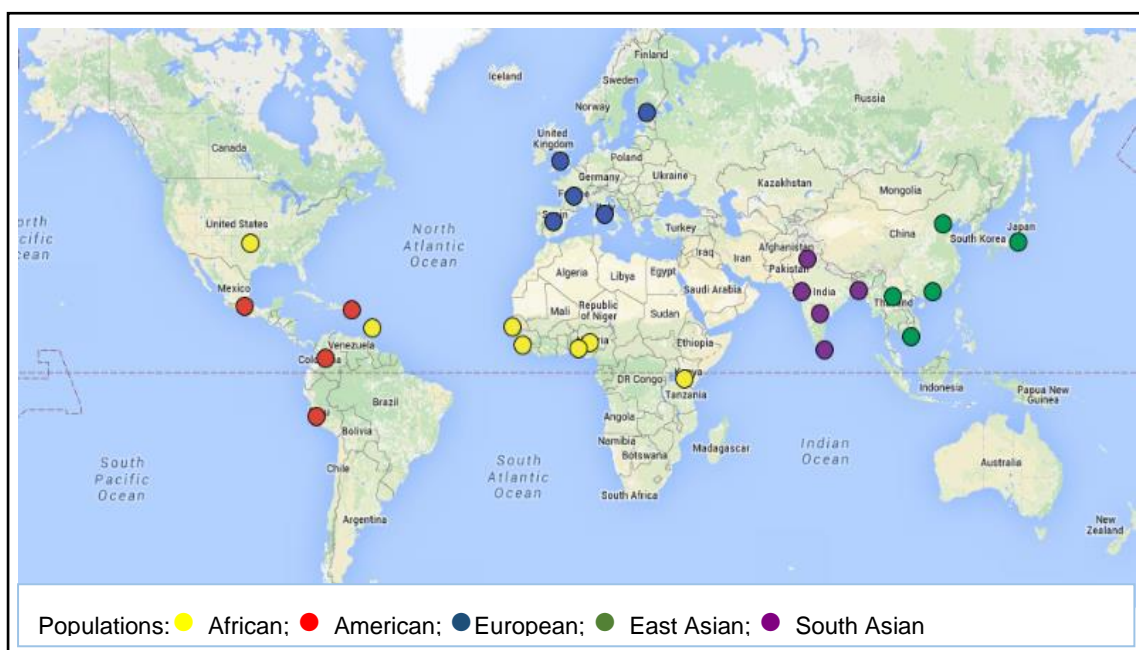
O dPORE busca avaliar o impacto de variantes genéticas na regulação da expressão de miRNAs (Disponível em: <http://www.cbrc.kaust.edu.sa/dpore/>).

Permite reconhecimento de polimorfismos do tipo SNP e INDEL, bem como integra informações de regiões promotoras de genes de miRNAs humanos e sítios de ligação a fatores de transcrição anotados nas regiões promotoras com base em dados experimentais. Ainda, permite explorar o efeito da variante genética na regulação transcricional dos genes de miRNAs por realizar predição de alterações de sítios de interação com fatores de transcrição. De acordo com esse programa, as variantes podem ser classificadas segundo o seu efeito em: (i) Sem alteração; (ii) Perda do sítio de ligação; (iii) Ganho de sítio de interação onde não havia; e (iv) Alteração do sítio de ligação (podendo alterar a proteína com que se liga ou afinidade pela proteína que interage no sítio).

### **3.3.1 Projeto 1000 genomas**

Após identificados, os polimorfismos foram acessados no Projeto 1000 genomas fase 3 (SUDMANT et al., 2015) e *Variant Effect Predictor* (MCLAREN et al., 2016) para verificação de anotação de cada SNP, bem como a distância de cada variante ao transcrito (Disponível em: <http://www.internationalgenome.org/home>).

O projeto 1000 genomas ocorreu entre 2008 e 2015 a partir dele foi criado o maior catálogo público de dados de variações e genótipos humanos. O conjunto de dados final contém informações para 2.504 indivíduos de 26 populações. Para os dados empregados no projeto, a anotação de referência do genoma humano empregada é a GRCh37. As variantes genéticas foram caracterizadas em relação à frequência alélica utilizando-se das informações disponíveis para as seguintes populações continentais depositadas no projeto 1000 genomas: Africanos, Americanos, Europeus, Leste Asiático e Sul Asiático, representadas abaixo (Figura 4).



Fonte: Projeto 1000 genomas, fase três.

**Figura 4** – Regiões do mundo que compreendem as 5 superpopulações contidas no Projeto 1000 genomas.

### 3.4 miRTarBase

O banco de dados miRTarBase (HSU et al., 2013) foi utilizado para investigar funcionalmente os genes-alvo de miRNAs que apresentaram diferenças em relação à variabilidade genética identificados na etapa anterior.

Esse banco contém informações sobre interações de miRNA e genes-alvo validadas experimentalmente. As interações são consideradas com evidência forte quando são validadas por testes de western blot, PCR ou gene

repórter. Análises de enriquecimento gênico funcional em relação a rotas e processos biológicos serão empregados a partir desses dados, com o uso do programa WebGestalt versão 2019 Beta (WANG et al., 2017). Para tal programa, optou-se pela identificação dos dez primeiros elementos mais significantes da análise. Utilizou-se como referência para a análise o genoma humano codificante.

### **3.5 Dados sumarizados do Consórcio de Genômica Psiquiátrica (PGC)**

Para investigar a importância desses genes e SNPs na susceptibilidade ao TDAH, foram empregadas duas abordagens utilizando as estatísticas sumarizadas do GWAS para TDAH mais recente publicado (PGC, 2017), disponibilizadas em junho de 2017. Essas estatísticas sumarizadas são de acesso público, depositadas no site do Consórcio de Genômica Psiquiátrica (Psychiatric Genome Consortium, PGC) (Disponível em: <https://www.med.unc.edu/pgc>).

O PGC consiste em um Consórcio Genômico que abrange grupos de pesquisadores ao redor do mundo com a finalidade de realizar meta-análises e mega-análises de dados genômicos de distintos transtornos psiquiátricos, incluindo o TDAH. A necessidade de um consórcio desse tipo advém da necessidade de aumento de tamanho amostral para que estudos de GWAS tenham poder suficiente para detectar o efeito de polimorfismos de pequeno efeito nos transtornos.

A meta-análise completa para o TDAH abrange dados de arranjo genotípico para 55.374 casos e controles, incluindo crianças e adultos oriundos de 12 coortes (incluindo uma coorte populacional de 14.584 casos e 22.492 controles da Dinamarca coletados pela Iniciativa da Fundação Lundbeck para Pesquisa Psiquiátrica Integrativa (iPSYCH) e 11 coortes europeias, norte-americanas e chinesas). Neste trabalho serão usados dados da meta-análise de ancestralidade europeia que compreende 53.293 (19.099 casos e 34.194 controles).

Primeiramente realizou-se uma busca das estimativas de efeito da associação para os polimorfismos genéticos identificados acima com o TDAH



nas estatísticas sumarizadas. Para cada polimorfismo foram recuperadas as seguintes informações: (i) identificação do polimorfismo; (ii) cromossomo; (iii) alelo de efeito; (iv) localização cromossômica; (v) frequência alélica; e (vi) medida de efeito e valor de significância estatística da associação (valor  $p$ ). Em análises de associação genômica, o valor de referência considerado para a associação é de  $p < 5 \times 10^{-8}$ , ponto de corte definido com base em correção para múltiplos testes. Valores considerados sugestivos de associação são aqueles com a faixa de valores entre  $p > 5 \times 10^{-8}$  e  $p < 5 \times 10^{-6}$ .

Em uma segunda etapa, esse banco de dados foi utilizado para a realização de um estudo de associação baseado em genes, através do programa VEGAS versão 2.0 (MISHRA e MACGREGOR, 2015), descrito abaixo.

### 3.6 VEGAS 2

O Software VEGAS2 é uma plataforma desenvolvida para realizar análise de associação baseadas em genes empregando estimativas de associação das estatísticas sumarizadas de GWAS previamente publicados (MISHRA e MACGREGOR, 2015). O programa está disponível publicamente para uso não comercial (Disponível em: <https://vegas2.qimrberghofer.edu.au/>). A plataforma testa o enriquecimento de múltiplos SNPs associados à doença que individualmente têm um efeito muito modesto no fenótipo. Ele agrega a força de associação de marcadores individuais, empregando informações como, tamanho do gene e desequilíbrio de ligação entre os marcadores para se obter uma informação de associação única por gene. Como parâmetro, foram incluídos SNPs a 50kb ao redor do gene para se estimar a associação. Como resultado, o VEGAS2 fornece um ranqueamento final de todos os genes do genoma com base na significância da associação (valor  $p$ ). Para essa análise, o valor de referência para associação é  $p < 2 \times 10^{-6}$  devido à correção para múltiplos testes.

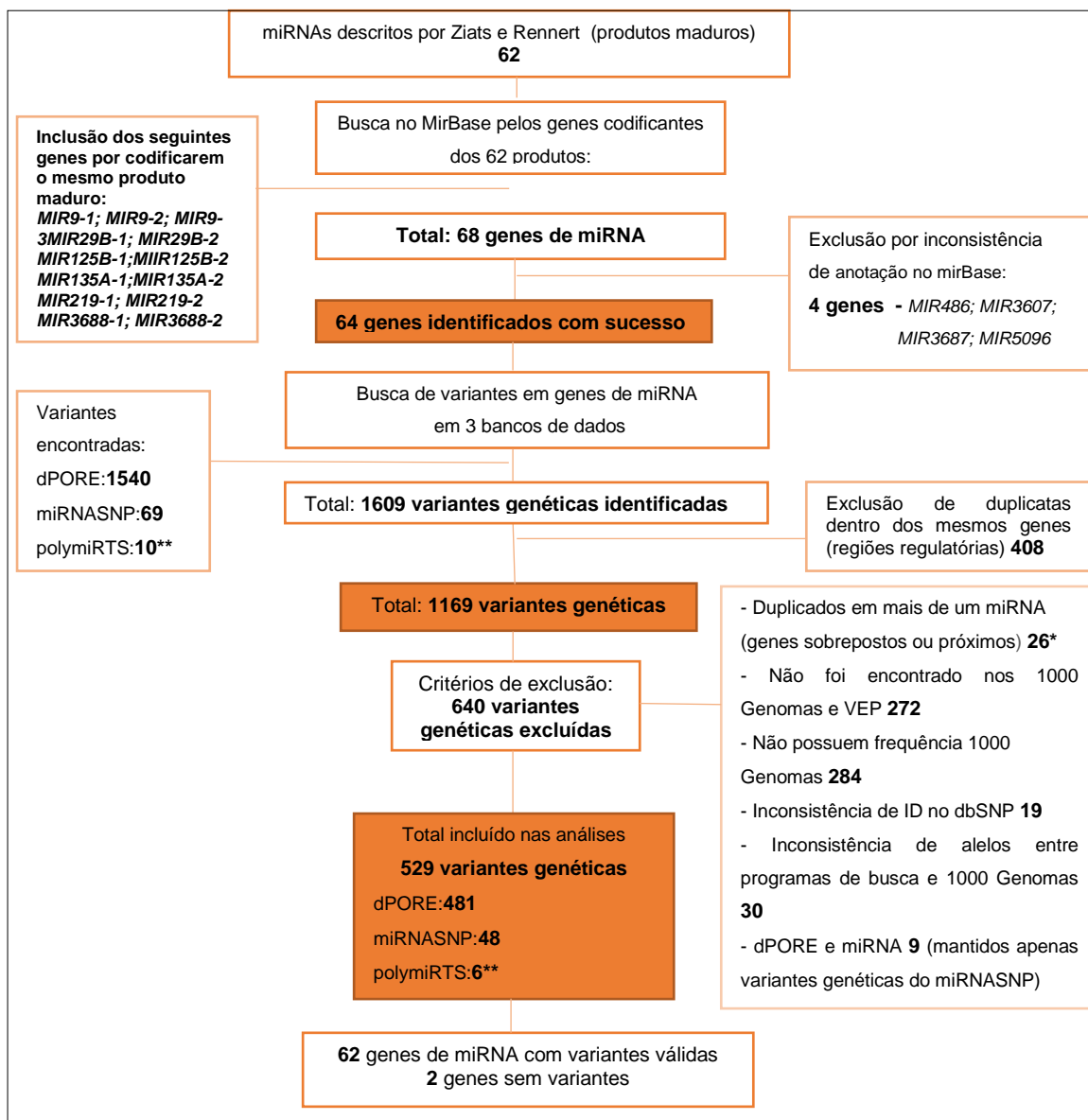
### 3.6 Análises estatísticas

Para comparar a frequência alélica entre as populações, foi estimado o percentual de variantes genéticas para as seguintes categorias de MAF:  $MAF < 1$ , MAF de 1 à 10 e  $MAF \geq 10$ . Posteriormente o teste Exato de *Fisher* foi calculado para comparar as proporções em geral e de miRNAs com pelo menos um polimorfismo com  $MAF \geq 10\%$  entre as etapas do desenvolvimento cerebral e entre as populações.

As análises estatísticas para testar associações entre variáveis estudadas foram realizadas pelos programas estatísticos STATA (versão IC/14.0) e *WinPepi* (versão 11.65). Foi utilizado um alfa de 0,05 para considerar diferenças estatisticamente significantes, exceto para as análises baseadas em dados genômicos mencionados acima, os quais requerem diferentes valores de alfa.

## 4. Resultados

A partir dos 62 miRNAs maduros diferencialmente expressos durante o desenvolvimento cerebral e não redundantes identificados por Ziats e Rennert (2014), foi construído o fluxograma apresentado abaixo representando as etapas de busca das variantes genéticas presentes nos genes de miRNA (Figura 5).



**Figura 5.** Fluxograma demonstrando as etapas de busca das variantes genéticas em genes de miRNA.

**Nota:** \*\* Todos as variantes genéticas do *PolyMirts* estão descritas também no MIRNASNP.

\* 26 variantes genéticas foram observadas em mais de um gene de miRNA (3 em *MIR29B2* e *MIR29C*; 4 em *MIR34B* e *MIR34C*; 19 em *MIR99B* e *MIR125A*).

Ao final, foram identificados 64 genes de miRNA válidos que codificam os produtos de miRNA maduros reportados por Ziats e Rennert (2014). Em relação a polimorfismos, 529 variantes genéticas foram identificadas nos três bancos de dados. Apenas dois genes (*MIR3688-1* e *MIR3688-2*) não apresentaram variabilidade genética.

- **Caracterização funcional e variabilidade genética dos polimorfismos**

Das 529 variantes genéticas, 95,7% (n=506) são polimorfismos do tipo SNP e 4,3% (n=23) INDEL. Dentre os SNPs, 90,5% (n=458) estão localizados em regiões regulatórias e 9,5% (n=48) localizados em região transcrita de genes de miRNA. Em relação aos polimorfismos do tipo INDEL, estes localizam-se exclusivamente em regiões regulatórias.

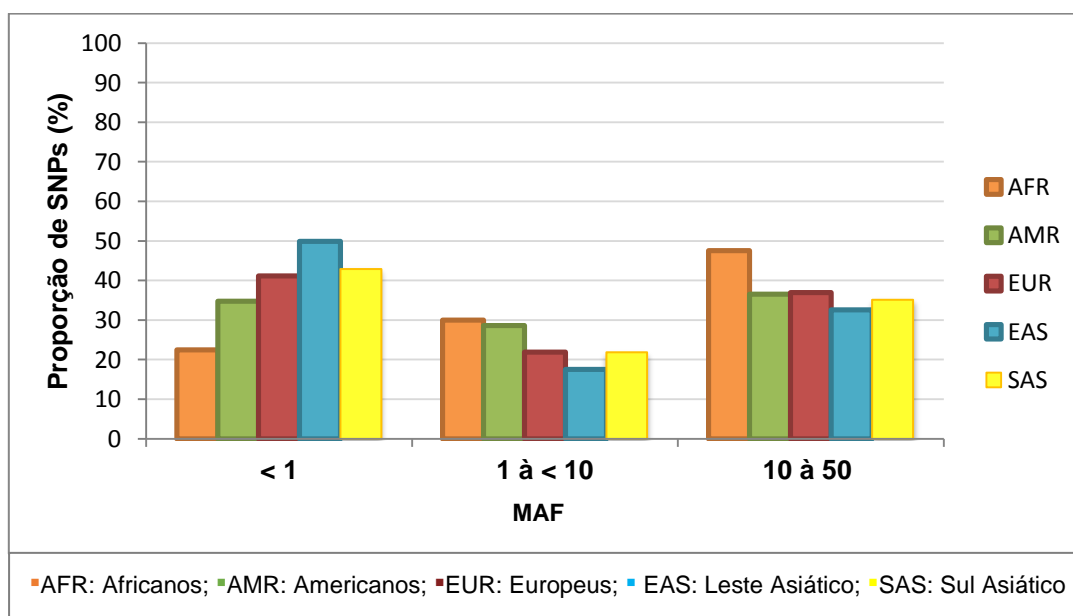
Dentre os 48 SNPs presentes em região transcrita de 26 miRNAs investigados, obteve-se as proporções de acordo com a funcionalidade, sendo 72,9% (n=35) encontrados em região de pré-miRNA, 12,5% (n=6) na região madura do miRNA e 14,6% (n=7) em região de semente.

Em relação ao efeito na regulação transcricional dos genes de miRNAs, considerando os polimorfismos localizados em regiões regulatórias, a distância média dos polimorfismos em relação ao transcrito foi 3468 pb e desvio padrão 2367 pb. A maioria dos polimorfismos teve um efeito predito como alteração funcional do sítio de interação. Do total de polimorfismos, 17,1% (n=82) foram preditos como criadores de novos sítios de interação com fatores de transcrição, 22,7% (n=109) pela perda de sítios, 13,7% (n=66) como modificadores exclusivamente e 30,8% (n=148) foram preditos como tendo mais de uma funcionalidade relacionada à alteração. Apenas 15,8% (n=76) foram descritos como não causando modificação.

Ao comparar a variabilidade genética de ambas categorias de posição de variantes, nota-se diferença em relação à variabilidade dos *loci* avaliados. Dentre as variantes genéticas em regiões transcritas considerando as

informações de frequência alélica da população global do Projeto 1000 Genomas, a maioria (81,3%) apresentam  $MAF < 1\%$ , enquanto apenas 4,2% dos polimorfismos apresentam  $MAF \geq 10\%$ . As variantes regulatórias, por outro lado, se apresentam da seguinte forma: 44,7% representam a categoria de  $MAF \geq 10\%$ , 40,3% com  $MAF$  de 1 à  $< 10\%$ , enquanto 15% representam a categoria  $MAF < 1\%$ .

Em relação à variabilidade genética entre as populações, os polimorfismos foram categorizados em relação à  $MAF$  para as seguintes populações incluídas no projeto 1000 Genomas: Africanos, Americanos, Europeus, Leste Asiático e Sul Asiático, categorizados em  $MAF < 1\%$ ,  $MAF$  1 à  $< 10\%$  e  $MAF \geq 10\%$ . As frequências alélicas dos polimorfismos mostraram-se semelhantes entre as populações, com exceção da população africana. Essa população contém mais variantes genéticas com  $MAF \geq 10\%$  que as demais populações (47,5%, Teste Exato de Fisher,  $p = 1,3 \times 10^{-5}$ ), enquanto a população do Leste Asiático contém o menor valor de variantes genéticas com  $MAF \geq 10\%$  (32,5%). As populações Americana e Europeia se assemelham com uma  $MAF \geq 10\%$  de 36,6 e 37,0 respectivamente (Figura 6).

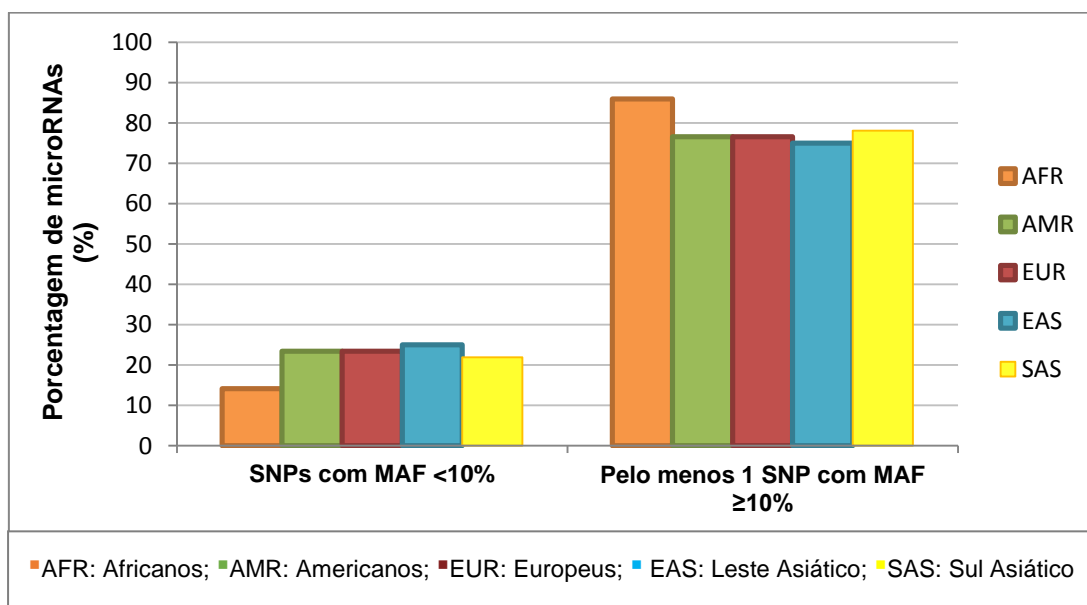


\* Dados obtidos do Projeto 1000 genomas, fase três, versão GRCh37.

**Figura 6** - Gráfico representando a proporção de SNPs para as cinco populações, de acordo com as três categorias de  $MAF$ .

Para investigar se a variabilidade genética encontrada em polimorfismos individuais poderia conferir maior variabilidade nos genes de miRNA como um todo, os miRNA foram classificados em tendo pelo menos um polimorfismo com  $MAF \geq 10\%$ .

Em relação ao número de miRNAs, 85,9% dos miRNAs da população africana possuem pelo menos uma variante com  $MAF \geq 10\%$ , enquanto a população do Leste Asiático demonstrou ser a população com menor variabilidade, com 75% na categoria de  $MAF \geq 10\%$ . Novamente as populações americana e europeia apresentaram valores similares intermediários. Entretanto, o teste Exato de Fisher não indicou diferença significativa entre as populações (valor  $p = 0,566$ ) (Figura 7).



\* Dados obtidos através do Projeto 1000 genomas, fase três, versão GRCh37.

**Figura 7** - Gráfico representando proporção de miRNAs com SNPs com  $MAF < 10\%$  e miRNAs com pelo menos 1 SNP com  $MAF \geq 10\%$ .

- **Caracterização da frequência de polimorfismos em genes de miRNA em relação às diferentes etapas do desenvolvimento cerebral**

Objetivou-se também avaliar se diferentes etapas do desenvolvimento cerebral apresentam diferenças em relação à variabilidade genética dentro de miRNAs. Utilizando os dados já identificados sobre as etapas do desenvolvimento específicas por Ziats e Rennert (2014), realizou-se a

comparação entre as três etapas do desenvolvimento cerebral para cada população em relação à presença de miRNAs com pelo menos um polimorfismo com  $MAF \geq 10\%$ . Também foi feita a comparação da presença de miRNAs com  $MAF \geq 10\%$  entre as populações globais do Projeto 1000 Genomas dentro das três etapas, conforme Tabela 2.

De acordo com a Tabela 2, apesar de a população africana apresentar em todas as etapas maior proporção de miRNAs com variantes polimórficas, não houve diferença estatisticamente significativa entre as populações dentre cada etapa do desenvolvimento ( $p=0,570$ ,  $p=0,966$  e  $p=0,695$  para infância à primeira infância, primeira infância à infância tardia e infância tardia à adolescência, respectivamente).

Em relação às diferentes etapas do desenvolvimento, a etapa Infância tardia → adolescência apresentou, em todas as populações (exceto em africanos), valores mais baixos de proporção de miRNAs com pelo menos um polimorfismo com  $MAF \geq 10\%$  e também menor número de SNPs variantes que as outras etapas. Ainda nota-se que o maior número de miRNAs variáveis estão situados na primeira fase do desenvolvimento cerebral que corresponde a fase de infância → primeira infância (4 meses à 4 anos). Entretanto, não houve diferença entre as etapas para nenhuma população analisada (Tabela 2).

TABELA 2 - Número total de miRNAs com SNPs com MAF $\geq$ 10%, e suas respectivas proporções (%) para as cinco populações do Projeto 1000 Genomas nas três fases do desenvolvimento cerebral. Análises baseadas nos dados de expressão diferencial apresentada por Ziats e Rennert (2014).

POPULAÇÃO	Infância -> primeira infância		Primeira infância -> Infância tardia		Infância tardia -> adolescência		Valor -p para comparação entre as etapas
	Total de miRNAs maduros expressos: 47 Total de genes que dão origem aos miRNA maduros expressos: 50		Total de miRNAs maduros expressos: 14 Total de genes que dão origem aos miRNA maduros expressos: 15		Total de miRNAs maduros expressos: 9 Total de genes que dão origem aos miRNA maduros expressos: 9		
	Número de genes com pelo menos uma variante com MAF $\geq$ 10% (%)	Número mínimo e máximo de variantes genéticas com MAF $\geq$ 10%	Número de genes com pelo menos uma variante com MAF $\geq$ 10% (%)	Número mínimo e máximo de variantes genéticas com MAF $\geq$ 10%	Número de genes com pelo menos uma variante com MAF $\geq$ 10% (%)	Número mínimo e máximo de variantes genéticas com MAF $\geq$ 10%	
AFRICANOS	45 (90)	1; 18	13 (86,7)	1; 13	8 (88,9)	1; 4	0.8577
AMERICANOS	40 (80)	1; 17	11 (73,3)	1; 13	6 (66,7)	1; 5	0.5844
EUROPEUS	41 (82)	1; 17	11 (73,3)	1; 13	5 (55,6)	1; 5	0.4664
LESTE ASIÁTICO	39 (78)	1; 11	12 (80)	1; 19	6 (66,7)	1; 6	0.7050
SUL ASIÁTICO	41 (82)	1; 11	12 (80)	1; 17	6 (66,7)	1; 5	0.5469
Valor p para comparação entre as populações	0,570		0,966		0,695		

Nota: \* Número de variantes genéticas no miRNA com menos variantes e número de variantes genéticas no miRNA com mais variantes com MAF  $\geq$ 10%.

### • Africanos e miRNAs

Conforme os resultados obtidos é possível observar que a população africana possui maior variabilidade em relação aos polimorfismos genéticos avaliados. Proporção mais alta de miRNAs com maior variabilidade também foi observado, apesar de não estatisticamente significativo. Dentre todos miRNAs estudados, essa população apresenta 4 miRNAs que possuem frequência de



MAF $\geq$ 10% para pelo menos uma variante genética encontrada em relação as demais populações, que possuem MAF $<$ 1% para as mesmas variantes genéticas (*MIR219-2*, *MIR483*, *MIR501* e *MIR4284*). Estes miRNAs são diferencialmente expressos na região DFC e mais ou menos expressos nas três etapas do desenvolvimento cerebral. Assim, visou-se avaliar se esses miRNA teriam efeito em processos biológicos específicos. Foi realizada a análise de enriquecimento funcional com os gene-alvo desses miRNA, sendo identificados 23 genes-alvo com pelo menos uma evidência experimental forte, através do banco de dados miRTarBase (Apêndice A).

Como resultado dos fatores de ontologia gênica, apenas a categoria de processos biológicos apresentou rotas estatisticamente significantes. Funções moleculares e componentes celulares não atingiram significância estatística. Entre os dez processos mais fortemente associados, rotas relacionadas a funções neuronais e cardiovasculares foram observadas. Entre as rotas neuronais, destacaram-se diferenciação neuronal ( $p= 5,83 \times 10^{-8}$ ), geração de neurônios ( $p=1,58 \times 10^{-7}$ ), neurogênese ( $p= 3,22 \times 10^{-7}$ ) e axonogênese ( $p= 5,92 \times 10^{-7}$ ), processos importantes para o desenvolvimento cerebral adequado. Os processos relacionados a mecanismos cardiovasculares foram: desenvolvimento do sistema circulatório ( $p= 3,75 \times 10^{-9}$ ), formação da estrutura anatômica envolvida na morfogênese ( $p= 5,44 \times 10^{-9}$ ), diferenciação cardiócita ( $p= 6,38 \times 10^{-9}$ ), regulação da diferenciação de células musculares cardíacas ( $p= 3,53 \times 10^{-8}$ ), diferenciação das células musculares cardíacas ( $p= 1,16 \times 10^{-7}$ ), regulação da diferenciação cardiócita ( $p= 1,48 \times 10^{-7}$ ).

## 5 - O papel de genes e de polimorfismos em miRNAs no TDAH

Abaixo estão descritos os resultados da avaliação referente à importância dos polimorfismos genéticos e genes dos miRNA de interesse na susceptibilidade ao TDAH utilizando estatísticas sumarizadas do consórcio PGC. Das 529 variantes genéticas, foram encontradas 221, presentes em 45

genes de miRNAs. Na busca, estas foram classificadas de acordo com o seu valor de força de associação (Tabela 3). Entre as variantes encontradas não há polimorfismos que estejam associados ou que apresentem sugestão de associação. A maior parte das variantes (92,8%) corresponde a um valor  $p \geq 0,05$ . A variante que obteve o menor valor de  $p$  foi *rs71516536* ( $p=6 \times 10^{-4}$ ), na região regulatória do gene *MIR597*. O valor de  $p$  mais alto correspondeu a 0,980 para *rs6982634* na região regulatória do *MIR320A*.

Dentre as variantes encontradas, 63,3% possuem MAF  $\geq 10\%$  para a população europeia do Projeto 1000 genomas, 35,7% das variantes estão na categoria de MAF entre 1 à 10% e apenas 1,0% delas representam a categoria MAF < 1.

Em relação à análise baseada em genes, 56 dos 64 genes foram identificados e corretamente anotados pelo VEGAS 2. Nenhum se mostrou significativamente associado. Um gene (*MIR9-2*) apresentou valor de  $p=3,0 \times 10^{-6}$  sendo o mais próximo de atingir a significância estatística para este método. Entre o restante dos genes 10% correspondem a valores entre  $\geq 5 \times 10^{-6}$  a < 0,05 e 85,7% equivalem a um valor  $\geq 0,05$ , conforme Tabela 3.

TABELA 3 - Descrição dos achados de associação de marcadores genéticos individuais empregando dados de estatísticas sumarizadas para GWAS do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.

Valores de p	Análise baseada em SNPs *N: 55.374 **N SNPs: 221	Análise baseada em genes *N: 55.374 N genes: 56
$< 5 \times 10^{-8}$	0	0
$\geq 5 \times 10^{-8}$ a $< 5 \times 10^{-6}$	0	1
$\geq 5 \times 10^{-6}$ a < 0,05	16	6
$\geq 0,05$	205	48
Valor máximo	0,980	0,984
Valor mínimo	$6,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-6}$

Nota: \*N: número de indivíduos que foram incluídos no estudo. \*\*N SNPs: Números de SNPs encontrados no banco do PGC para o transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade. \*\*\* Ponto de corte do valor de p significativo para análise baseada em genes:  $2 \times 10^{-6}$ .

## 5. Discussão

Neste trabalho, nós exploramos os genes de miRNAs diferencialmente expressos no desenvolvimento cerebral identificados por Ziats e Rennert (2014) a fim de caracterizá-los em relação a variabilidade genética, identificar possíveis variantes que tenham papel na modulação da funcionalidade desses miRNA e explorar a importância das variantes genéticas identificadas e dos genes de miRNA na susceptibilidade ao TDAH.

A literatura demonstra que mais de 90% das variantes genéticas associadas a doenças multifatoriais e características quantitativas estão localizadas em regiões não codificantes do genoma, por exemplo, em regiões promotoras, silenciadoras ou mesmo genes de RNA não codificantes, o que justifica o estudo do papel de miRNAs nesses fenótipos (HRDLICKOVA et al., 2014). Neste trabalho, explorando miRNAs, observamos que nos genes investigados também houve distribuições preferenciais de polimorfismos em relação à estrutura gênica. Observamos que 90% das variantes genéticas encontradas estão situadas em regiões regulatórias de genes de miRNAs enquanto apenas 10% das variantes genéticas estão situadas em regiões transcritas.

Saunders et al., (2007) realizaram um estudo visando analisar dados de variantes genéticas publicamente disponíveis no contexto de miRNAs e seus sítios-alvo em todo o genoma humano, encontraram um nível relativamente baixo de variação nas regiões transcritas funcionais dos miRNAs e uma maior variação nos sítios-alvo desses miRNAs. Dentre as variantes genéticas encontradas em regiões de transcrição, aproximadamente 90% das regiões que corresponde a pre-miRNA não possuem polimorfismos relatados, além disso, a maioria dos polimorfismos observados ocorreu fora da região de sementes, sugerindo a existência de uma forte pressão seletiva dessa região.

O menor número de variantes genéticas nas regiões que compreendem a sequência semente comparada as regiões que compreendem pre-miRNA também já foram relatadas por Saunders et al., (2007). Os SNPs localizados

em regiões de transcrição embora sejam mais raros, estes quando localizados em região pré-miRNA, determinam a estrutura secundária dos miRNAs, podendo afetar sua estabilidade ou eficiência de processamento. Ainda a região que compõe a sequência semente situada na posição 2-7 da extremidade 5' do miRNA maduro desempenha um papel crítico direcionando a especificidade das interações miRNA/mRNA através do emparelhamento de bases que deve ser complementar, de modo que, uma única alteração de nucleotídeo pode resultar em uma alteração na interação miRNA-alvo levando a uma alteração significativa na expressão da proteína (SUN et al., 2009).

Dessa maneira, espera-se que os polimorfismos em regiões transcritas, por serem mais importantes na função do miRNA, apresentem também frequências alélicas mais baixas. De acordo com a literatura regiões menos conservadas, como as regiões regulatórias, podem ser alvos principais para seleção balanceadora ou positiva, enquanto locais mais altamente conservados como regiões de semente, por exemplo, podem mostrar assinaturas de seleção negativa (HODGKINSON et al., 2013). Resultados encontrados por Han e Zheng (2013) sugerem que quanto mais conservada é uma família de miRNA, menos SNPs ela pode tolerar na região pré-miRNA, madura e semente, o que é consistente com as funções mais importantes dos miRNAs conservados entre as espécies. Os miRNAs relatados como importantes no processo de desenvolvimento cerebral avaliados aqui apresentam padrão similar, no qual as regiões de semente apresentam menor variabilidade que a região pré-miRNA.

Corroborando os achados e o descrito na literatura, variantes genéticas em regiões regulatórias de miRNA apresentaram frequências alélicas maiores, (40,3% classificadas como  $MAF_1$  à 10% e 44,7% com  $MAF \geq 10\%$ ) do que as variantes encontradas na sequência de semente (4,2% classificadas como  $MAF \geq 10$ ). No total, encontramos sete polimorfismos genéticos em regiões de semente de miRNAs. Todos, exceto um, possuem uma  $MAF < 10\%$ . O *rs11973069* localizado na região semente presente no *MIR4284* possui  $MAF > 10\%$  apenas para população africana. De acordo com o valor de delta de energia ( $\Delta G = -0.7$  Kcal/mol), o impacto dessa substituição seria pequeno, o que está de acordo com as hipóteses de restrição funcional mencionadas na literatura. Duas das variantes localizadas em pré-miRNA *rs62376934* (*MIR585*) e *rs745666* (*MIR3615*), possuem  $MAF \geq 10\%$  para as cinco populações do

Projeto 1000 Genomas. Nenhum estudo com transtorno psiquiátrico avaliou essas variantes até o momento. Sua diferença de energia foi -2,9 kcal/mol e 1kcal/mol, sugerindo um potencial funcional maior que a observada para o *rs11973069*. Ambos são diferencialmente expressos na etapa de infância → primeira infância nas regiões do córtex pré-frontal, porém, nenhum estudo avaliando essas variantes ou genes em transtornos psiquiátricos foi identificado.

Dentre as variantes genéticas presentes em região regulatória de miRNAs incluídas no estudo, a maioria (84,3%) são preditas como potencialmente causando pelo menos um efeito em relação a alteração de sítios de regulação. Alterações nessas regiões são descritas como importantes para a modulação da expressão gênica de miRNAs mRNA (ISSLER, 2015).

Devido à ancestralidade compartilhada de todos os seres humanos, apenas um número modesto de variantes apresenta grandes diferenças de frequência entre as populações. Sabe-se que as populações não africanas têm uma menor diversidade genética em comparação com as populações africanas, como consequência do modelo evolutivo e migratório humano “*Out of Africa*”, que propõe que os humanos anatomicamente modernos originaram-se na África e depois se espalharam pelo resto do globo nos últimos 100.000 anos (TISHKOFF et al., 2002; CARBONELL et al., 2012). Exploramos as variantes genéticas de acordo com a frequência alélica em diferentes populações humanas e observamos que a variabilidade maior esperada para a população africana também pode ser identificada para o conjunto de miRNAs avaliado. Resultados semelhantes foram encontrados por Han e Zheng (2013), que conduziram uma análise global de polimorfismos em genes de miRNA com o objetivo de explicar as distribuições de variantes em miRNAs humanos e observaram diferenças significativas para a população africana, que apresentou maior variabilidade genética entre populações de origem americana, europeia e asiática.

Dentre os genes de miRNAs investigados, quatro deles: *MIR219-2*, *MIR483*, *MIR501* e *MIR4284* apresentam pelo menos uma variante genética com  $MAF \geq 10\%$  apenas para população africana. Apesar de não encontramos diferença significativa em relação ao número de miRNAs com pelo menos uma variante genética com  $MAF \geq 10\%$ , a participação desses genes em rotas

biológicas relevantes não pode ser descartada. A análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo regulados por esses miRNAs sugere uma importância desses miRNAs na regulação de rotas como: diferenciação neuronal, geração de neurônios, neurogênese e axonogênese, processos importantes relacionados ao neurodesenvolvimento. Esses achados indicam que os miRNAs envolvidos nessas rotas possam ser diferencialmente regulados na população africana, podendo conferir diferenças na susceptibilidade a doenças psiquiátricas em relação as demais populações. Cabe salientar que as proteínas também foram envolvidas em processos cardiovasculares. Interessantemente, susceptibilidade diferencial a doenças cardiovasculares já foram relatadas na literatura (KAGURA et al., 2015; ZANETTI et al, 2015; 2016; CARNETHON et al., 2017). Assim, por analogia, é plausível que esses miRNAs observados estejam envolvidos na susceptibilidade genética diferencial a transtornos psiquiátricos nessa população.

Adicionalmente, a maior variabilidade genética em polimorfismos regulatórios na população africana pode estar associada a uma regulação diferencial da expressão de miRNAs nessa população. O estudo realizado por Huang et al., (2011) teve como objetivo verificar diferenças de expressão gênica de um conjunto específico de miRNAs em linhagens celulares linfoblastóides entre populações de ascendência europeia e africana e observaram que a expressão diferiu em 16% de todos os miRNAs avaliados. Esses genes apresentavam enriquecimento funcional em rotas diferentes entre as populações, demonstrando assim o papel diferencial na expressão de miRNAs em diferentes ancestralidades. Entretanto há poucos estudos que consideram a ancestralidade para comparar expressões em miRNAs (STOREY et al., 2007; ZHANG et al., 2008; HUANG et al., 2011). Assim, mais estudos de genética e saúde mental explorando adequadamente a relação de ancestralidade e em populações distintas são necessários.

Apesar de a plasticidade da expressão gênica se manter ao longo da vida, cada região do cérebro tem janelas críticas de desenvolvimento que ocorrem em momentos específicos (MARIN, 2016). Em mamíferos miRNAs são altamente expressos durante o desenvolvimento do SNC na fase pré-natal e pós natal sendo menos expressos no SNC maduro (BAK et al., 2008). No entanto, estudos funcionais de miRNAs no sistema nervoso de humanos ainda

são muito escassos. A literatura demonstra que uma mudança marcante da expressão de miRNAs, para seres humanos, ocorre durante a transição da infância para a primeira infância, sugerindo papéis importantes no desenvolvimento inicial. Apenas alguns miRNAs diferencialmente expressos são encontrados em estágios posteriores de desenvolvimento (CHEN e QIN, 2015).

Os resultados de Ziats e Renert (2014) também demonstrou uma maior quantidade de miRNAs com expressão diferencial dentro de um mesmo tecido participando da regulação da expressão gênica na primeira etapa do desenvolvimento, corroborando os achados anteriores. Os nossos resultados adicionam uma importante informação para esse controle. Além de maior quantidade, esses miRNAs do início da vida possivelmente admitam maior flexibilidade de regulação em relação a sua própria expressão, uma vez que a quantidade de miRNAs com pelo menos uma variante genética foi maior nessa etapa e tende a diminuir ao longo do desenvolvimento. Na última etapa, da adolescência, apesar de haver menos miRNAs expressos, eles são menos variáveis. Assim, pode-se supor que alterações nesses miRNAs da última etapa sejam as que potencialmente levem a um maior risco de desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, sendo necessário mais estudos para explorar esta hipótese. Apesar de encontrarmos diferenças entre as etapas, esta diferença não foi significativa, possivelmente devido ao número de miRNAs ser restrito. Entre as populações, pode-se notar que a população africana apresenta maior variabilidade em todas as etapas, corroborando a maior variabilidade genética para essa população já mencionada.

No que diz respeito à susceptibilidade genética ao TDAH, de uma maneira geral, os miRNAs estudados demonstraram não ser essenciais para o desenvolvimento do transtorno com os métodos avaliados. A partir da análise dos dados do PGC, a variante mais próxima de um valor sugestivo de associação foi *rs71516536* no *MIR597* diferencialmente expresso no córtex pré-frontal ventrolateral entre a etapa que corresponde à infância -> primeira infância. Este quando inserido no miRTarBase não reporta nenhum gene alvo associado, na literatura há registros do *MIR597* associado ao câncer de mama (ELE et al., 2017). Assim, o mecanismo pelo qual poderia estar relacionado ao TDAH merece mais investigações.

Considerando a análise baseada em genes realizada através do VEGAS2 o gene *MIR9-2* apresentou o valor mais próximo do valor de  $p$  significativo, com  $p= 3,0 \times 10^{-6}$ , esse gene é diferencialmente expresso no hipocampo entre a etapa que corresponde à infância → primeira infância. O *MIR9-2* já foi relacionado com a neurogênese (COOLEN et al., 2013). Consistentemente com os resultados observados na investigação de variantes genéticas isoladas, o *MIR597* configurou-se como o terceiro gene mais associado ao TDAH.

O estudo do papel de miRNAs na etiologia TDAH é uma abordagem que ainda merece mais atenção. Apesar de não detectarmos associação empregando o banco de dados utilizados, cinco miRNAs que investigamos já foram associados a transtornos psiquiátricos em estudos anteriores.

O miR-125b foi associado ao TDAH através do estudo de expressão gênica realizado por Kandemir et al., (2014), que consistiu na investigação de um conjunto de miRNAs em 52 indivíduos com TDAH e 52 indivíduos saudáveis com faixa etária dos 7 aos 17 anos através de amostras de sangue periférico. Observaram diminuição dos níveis desse miRNA em indivíduos com TDAH comparado aos controles. Esse miRNA foi diferencialmente expresso no córtex pré-frontal dorsolateral entre a etapa que corresponde à infância -> primeira infância (ZIATS e RENNERT, 2014). O cluster miR-34c/b foi relacionado ao TDAH através do estudo de associação caso-controle realizado por Garcia-Martinez et al., (2016) que teve como foco, avaliar fatores de susceptibilidade para o TDAH em miRNAs e seus genes-alvo anteriormente associados ao TDAH ou outros transtornos psiquiátricos. O DNA genômico foi isolado dos leucócitos do sangue periférico de 748 indivíduos com TDAH e 749 indivíduos saudáveis, ambos caucasianos de origem espanhola e adultos. Após a correção de múltiplos testes, apenas uma variante (rs28690953) no locus miR-34b/c foi associada ao TDAH. Foi realizada a análise de expressão gênica das formas maduras de miR-34b e miR-34c para 31 indivíduos com TDAH e 32 controles e identificaram expressão significativa do miR-34b e miR-34c, com níveis 1,4 vezes maiores em pacientes com TDAH em comparação aos controles Estes miRNA são diferencialmente expressos no córtex pré-frontal dorsolateral na etapa de infância → primeira infância e córtex pré-frontal ventrolateral na etapa que corresponde a primeira infância → infância tardia. O *MIR9-2*, gene mais próximo do nível de significância na análise baseada em



genes neste estudo, já foi relatado anteriormente por Hauberg et al., (2016) por demonstrar forte associação com a esquizofrenia, através de uma análise secundária de estatísticas sumarizadas do PGC para esquizofrenia. A variante *rs181900* apresentou o maior valor de associação ( $p = 7,1 \times 10^{-8}$ ). Ainda, neste estudo o *MIR137* ficou em terceiro lugar na análise baseada em genes. O *MIR137* é um dos principais genes de miRNA descritos na literatura para susceptibilidade à esquizofrenia (WRIGHT et al., 2013; WU et al., 2016; CURTIS; EMMETT 2017). Apesar de termos encontrado miRNAs que já foram associados ao TDAH em estudos anteriores, não há registros na literatura que reporte experimentos de regulação de miRNAs com as variantes identificadas neste trabalho. No nosso estudo, priorizamos variantes em sítios regulatórios já anotados. É possível que as variantes genéticas em miRNAs já descritas na literatura estejam em desequilíbrio de ligação com as variantes que identificamos. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de estarem em outras regiões regulatórias não anotadas nos bancos de dados registrados na busca.

Este estudo deve ser interpretado considerando algumas limitações. Primeiro, para as comparações de variabilidade considerando miRNA entre as populações e entre diferentes estágios do desenvolvimento, não observamos diferenças estatisticamente significantes. É possível que isso se tenha dado pelo baixo poder estatístico das análises. Entretanto, cabe salientar que as análises foram realizadas considerando o número integral de miRNAs importantes para o desenvolvimento cerebral, não havendo a possibilidade de se realizar aumento de amostra para se obter maior poder nas análises. As diferenças absolutas, apesar de não significantes estatisticamente não foram mínimas, de modo que a importância biológica dessas diferenças não pode ser descartada. A segunda se refere à característica dos dados utilizados. Apesar de se estimar que grande parte das variantes sejam funcionais, esses dados são baseados em predições realizadas por ferramentas de bioinformática. Assim, experimentos *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar a funcionalidade desses polimorfismos. A terceira limitação diz respeito ao número de variantes encontradas nas informações de estatísticas sumarizadas disponíveis para o fenótipo do TDAH. Dentre as 308 variantes genéticas que não foram encontradas no banco de dados do PGC 68,8% pertencem a

categoria  $MAF < 1$ , 11,7%  $MAF$  1 à 10% e 19,5% representam a categoria de  $MAF \geq 10\%$ . Assim, é possível que haja variantes genéticas importantes à etiologia do transtorno, porém, por se tratar de variantes raras ou de baixa frequência em sua maioria, estas não são incluídas nos delineamentos de estudos de GWAS, que é baseado majoritariamente na hipótese de associação de doenças com variantes comuns. A quarta diz respeito à ancestralidade da amostra com a qual foi realizado o estudo de GWAS. Os dados do PGC para TDAH são de ancestralidade europeia e, para esta população, no geral, os miRNAs avaliados não se mostraram importantes. Sabe-se que os fatores genéticos de risco e as medidas de efeito desses fatores podem variar entre as populações (GRINDE et al., 2018). Adicionado aos resultados observados para as diferenças de populações africanas, é possível que obtivéssemos resultados diferentes se as estatísticas sumarizadas disponibilizadas fossem referentes à população africana.

Ainda um possível papel da regulação por esses miRNA não pode ser descartada. Neste estudo nos detivemos à avaliação de variantes em genes de miRNA. Entretanto, é possível que as variantes de interesse para a etiologia do TDAH possam estar localizadas em regiões de interação no gene-alvo desses miRNAs e estas não foram investigadas aqui. Por exemplo, o efeito do miR-96 relatado por Sanches-mora et al., (2013) através de um estudo de associação entre polimorfismos e níveis de expressão do gene receptor de serotonina (*HTRB1*), considerado candidato no TDAH. O estudo contemplou 695 indivíduos adultos com TDAH e 485 controles pareados por sexo da Espanha. Uma variante *rs13212041* identificada foi localizada no sítio de interação do gene *HTRB1* e miR-96, apresentando papel na inibição da expressão de *HTRB1* mediada por miR-96. Este miRNA é expresso no córtex pré-frontal dorsolateral na etapa que corresponde infância e primeira infância de acordo com Ziats e Rennert (2014).

Adicionalmente, devido à característica poligênica do TDAH, a herdabilidade do transtorno pode ser influenciada por fatores como interação gene-ambiente e gene-gene, que não são identificadas no GWAS. Dessa forma, seria interessante avaliar fatores gene-ambiente ao longo do desenvolvimento do SNC, para uma maior compreensão nas diferenças de expressão de genes de miRNA e seu efeito no gene-alvo.

## 6. Conclusões

Através dos dados obtidos é possível concluir que as variantes genéticas estudadas aqui atuam potencialmente na funcionalidade regulatória dos miRNAs avaliados. Porém são necessários estudos que abordem o efeito de polimorfismos genéticos em regiões regulatórias para uma melhor compreensão das consequências relacionadas a esses polimorfismos. Em relação à variabilidade genética é possível concluir que a população africana é a mais variável em relação às demais populações para os genes avaliados aqui e, uma sugestão de susceptibilidade diferencial a transtornos psiquiátricos foi observada. No que diz respeito as etapas do desenvolvimento, a etapa inicial que corresponde a transição dos quatro meses aos quatro anos de idade demonstrou possuir maior variabilidade genética, o que sugere maior plasticidade na regulação gênica nessa etapa. Estudos adicionais com foco em expressão diferencial espaço-temporal de miRNAs no SNC podem contribuir para maior compreensão dos efeitos diferenciais de expressão ao longo da vida. As variantes encontradas aqui e seus respectivos miRNA, não demonstraram ser de uma maneira geral, importantes na susceptibilidade ao TDAH na população europeia. Trabalhos adicionais nessa área, que investiguem a susceptibilidade do transtorno em outras populações, bem como relação de miRNAs na interação gene-ambiente poderão adicionar informações importantes ao presente estudo, ainda estudos adicionais com avaliação *in silico* e *in vitro* de outras regiões promotoras são necessários.

## Referências

ABU-ELNEEL, K.; LIU, T.; GAZZANIGA, F.S.; NISHIMURA, Y.; WALL, D.P.; GESCHIWIND, D.H.; LAO, L.; KOSIK, K.S. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. **Magazine neurogenetics – Springer** v.9, n.3, p.153, 2008.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v.431, p.350-355, 2004.

BAK, M. et al., MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. **RNA Society**. v. 14, p. 432-444, 2008.

BANASCHEWSKI, T.; BECKER, K. SCHERAG, S.; FRANKE, B.; COGHILL, D. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. **European Child & Adolescent Psychiatry** v.19, n.3, p.237–257, 2010.

BANJEREE, T.D.; MIDDLETON, F.; FARAONE, S.V. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatrica** v. 96, p.1296-1274, 2007.

BARBARESI, W.J.; KATUSIC, S.K.; COLLIGAN, R.C.; WEAVER, A.L. Modifiers of long-term school outcomes for children with attention-deficit/hyperactivity disorder: does treatment with stimulant medication make a difference? Results from a population-based study. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**. v.28, p. 274-287, 2007.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell** v.136, n. 2, p. 215–233, 2009.

BAVAMIAN, S.; MELLIOS, N.; LALONDE, J.; FASS, D.M.; WANG, J.; SHERIDAN, S.D.; MADISON, J.M.; ZHOU, F.; RUECKERT, E.H.; BARKER, D.; PERLIS, R.H.; SUR, M.; HAGGARTY, S.J. Dysregulation of miR-34a links neuronal development to genetic risk factors for bipolar disorder. **Magazine Molecular Psychiatry** v.20, n.5, p.573-584, 2015.

BEVERIDGE, N.J.; GARDINER, E.; CARROL, A.P.; TOONEY, P.A.; CAIRNS, M.J. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. **Magazine Molecular Psychiatry** p. 1176-1189, 2011.

BHATTACHARYA, A.; ZIEBARTH, J. D.; CUI, Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. **Nucleic Acids Research**. v. 42, 2014.

BIEDERMAN, J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. **Biological Psychiatry** v. 57, p.1215-1220, 2005.

BIEDERMAN, J.; KEENAN, K.; FARAONE, S.V. Parent-based diagnosis of attention deficit disorder predicts a diagnosis based on teacher report. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry** . v.29, n.5, p.698–701, 1990.

BIEDERMAN, J.; MONUTEAUX, M.; SEIDMAN, L. Impact of executive function deficits and ADHD on academic outcomes in children. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**. v. 72, p. 757, 2004.

BREDY, T.W.; LIN, Q.; WEI, W.; BAKER-ANDRESEN, D.; MATTICK J.S. MicroRNA regulation of neural plasticity and memory. **Neurobiology of Learning and Memory** p. 89-94, 2011.

BRIKELL, I.; KUJA-HALKOLA, R.; LARSSON, H. Heritability of attention-deficit hyperactivity disorder in adults. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics** p. 406-413, 2015.

BURT, S.A. Rethinking environmental contributions to child and adolescent psychopathology: a meta-analysis of shared environmental influences. **Psychological Bulletin** v. 135, n.4, p.608–637, 2009.

CAPUTO, V.; CIOLFI, A.; MARCI, S.; PIZZUTI, A. The emerging role of MicroRNA in schizophrenia. **CNS & Neurological Disorders – Drug Targets**. v. 14, n 2, p. 208-221, 2015.

CARBONEL, J. et al., A map of human microRNA variation uncovers unexpectedly high levels of variability. **Genome Medicine**. v 4, n. 8, p. 62, 2012.

CARNETHON, M. R. et al., Cardiovascular Health in African Americans: A Scientific Statement from the American Heart Association. **Circulation magazine**. v 136, n. 21, p. 393-423, 2017.

CHILDRESS, A. C.; BERRY, S.A. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder in adolescents. **Drugs**. v. 72, p. 309-325, 2012.

CHENG, H. Y. et al., microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. **Neuron Journal**. v. 54, n 5, p. 813-829, 2007.

COOLEN, M.; SHAUNA, K.; LAURE, B. C. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v. 7, p. 220, 2013.

COSTA, E. & PACHECO, C. MicroRNAs: Perspectivas atuais da regulação da expressão gênica em eucariotos. **Biosaúde, Londrina**, v. 14, n. 2, 2012.

DEMONTIS, D. et al. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for ADHD. **bioRxiv**. 2017.

DSM-5: American psychiatric association, **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**, 5ª edição, ISBN 9788582710883, 2014.

dPORE - miRNA: Dragon database on Polymorphic Regulation of human miRNA genes. Disponível em: <<http://www.cbrc.kaust.edu.sa/dpore/>> Acesso em: 10 dez. 2017.

ETAIN, B. et al. Association between circadian genes, bipolar disorders and chronotypes. **Chronobiology International magazine** v.31 p.807–814, 2014.

FAN, H.M.; SUN, X.Y.; GUO, W.; ZHONG, A.F.; NIU, W.; ZHAO, L.; DAI, Y.H., GUO, Z.M.; ZHANG, L.Y.; LU, J. Differential expression of microRNA in peripheral blood mononuclear cells as specific biomarker for major depressive disorder patients. **Journal of Psychiatric Research** v.59, p.45-52, 2014.

FARAONE, S.V. & MICK, E. Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. **Psychiatric Clinics of North America** v. 57, p. 159-180, 2010.

FARAONE, S.V.; BIEDERMAN, J.; MICK, E. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. **Psychological Medicine**. v. 36, p. 159-165, 2006.

FARAONE, S.V.; PERLIS, R.H.; DOYLE, A.E.; SMOLLER, J.W.; GORALNICK, J.J.; HOLMGREN, M.A. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry - Journal** v.57, p. 1313–1323, 2005.

FARAONE, S.V.; SERGEANT, J.; GILLBERG, C.; BIEDERMAN, J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition. **World Psychiatry** v.2, p.104–113, 2003.

FINNEGAN, E. F. & PASQUINELLI, A. E. MicroRNA biogenesis: Regulating the Regulators. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** v.48, p. 51-68, 2013.

FORERO, D.A.; VAN DER VEN, K.; CALLAERTS, P.; DEL-FAVERO, J. miRNA genes and the brain: implications for psychiatric disorders. **Human Mutation** v. 31, p.1195-1204, 2010.

FROEHLICH, T.E.; ANIXT, J.S; LOE, I.M.; CHIRDKIATGUMCHAI, V.; GILMAR, R.C.; Update on environmental risk factors for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Current Psychiatry Reports** v. 13, p. 333-344, 2011.

GARCIA-MARTINEZ, I.; SANCHEZ-MORA, C.; PAGEROLS, M. RICHARTE, V.; CORRALES, M.; FADEUHILHE, C.; CORMAND, B.; RAMOS-QUIROGA, J.A.; RIBASE, M. Preliminary evidence for association of genetic variants in pri-miR-34b/c and abnormal miR-34c expression with attention deficit and hyperactivity disorder. **Magazine Translational Psychiatry** v.6, n.8, p.879, 2016.

GEAGHAN, M. & CAIRNS, M. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. **Biological Psychiatry** v. 78, p.231-239, 2015.

GOING, J.; LIU, C.; WU, Y.; MA, Z.; CHEN, H. GUO, A. Y An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools. **Database Oxford Academic**. 2015.

HAN, M. & ZHENG, Y. Comprehensive Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Human MicroRNAs. **Plos One**. v. 8, n. 11, 2013.

HAUBERG, M. E.; PANOS, R.; JAKOB, G. et al., Analyzing the Role of MicroRNAs in Schizophrenia in the Context of Common Genetic Risk Variants. **JAMA Psychiatry**. v. 33, n 4, p. 369-377, 2016.

HE, J.; MAI, J.; LI, Y.; CHEN, L.; XU, H.; ZHU, X.; PAN, Q. miR-597 inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion through FOSL2. **Oncology Reports**. v. 37, n 5, p. 2672-2678, 2017.

HICKSS, S.D.; MIDDLETON, F.A. A comparative review of microRNA expression patterns in autism spectrum disorder. 2016. **Frontiers in Psychiatry Journal** v.7 p.176, 2016.

HRDLICKOVA, B.; ALMEIDA, R.C.; BOREK, Z.; WITHOFF, S. Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. **Biochimica Biophysica Acta** v.1842, n.10, p.1910–1922, 2014.

HSU, S. D. et al., miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. **Nucleic Acids Research**. v 42, p. 78-85, 2013.

HUANG, R. S. et al., Population differences in microRNA expression and biological implications. **RNA Biology**. v. 8, n. 4, p. 692-701, 2011.

ISSLER, O. & CHEN, A. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience** v.16, p.201-212, 2015.

JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)- Methods and application: a review. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p.435-459, 2006.

KAGURA, J.; ADAIR, L. S.; MUSA, M. G.; PETTIFOR, J. M; NORRIS, S. A. Blood pressure tracking in urban black South African children: birth to twenty cohort. **BMC Pediatrics**. v. 15, p. 78, 2015.

KANDEMIR, H.; ERDAL, M.E.; SELEK, S.; AY, O.I.; KARABABA, I.F.; KANDEMIR, S.B.; AY, M.E.; YILMAZ, S.G.; BAYAZIT, H.; TASDELEN, B. Evaluation of several micro RNA (miRNA) levels in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. **Neuroscience Letters- Journal** v. 580, p.158-162, 2014.

KANDEMIR, S.B.; ERDAL, M.E.; SELEK, S.; IZCI, O.; KARABABA, I.F.; AY, M.E.; KANDEMIR, S.B.; YILMAZ, S.G.; EKINCI, S.; BAYAZIT, H. Microribonucleic acid dysregulations in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. **Magazine Neuropsychiatric Disease and Treatment** v.11, p.1695-1701, 2015.



KANG, H. J. et al., Spatio-temporal transcriptome of the human brain. **Nature** v. 478, p. 483-489, 2011.

KLEIN, R.G.; MANNUZZA, S.; OLAZAGASTI, M.A.; ROIZEN, E.; HUTCHISON, J.A.; LASHUA, E.C.; CASTELLANOS, F.X. Clinical and functional outcome of childhood attention- Deficit/hyperactivity disorder 33 years later. **JAMA Psychiatry**. v. 69, p. 1295–1303, 2011.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**. v. 44, 2013.

KUNTSI, J. et al. The separation of ADHD inattention and hyperactivity-impulsivity symptoms: pathways from genetic effects to cognitive impairments and symptoms. **Journal of abnormal child psychology** v.42, p. 127-136, 2014.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSHL, T.; Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, p.853-858, 2001.

LARSSON, H.; CHANG, Z.; D'ONOFRIO, B.M.; LICHTENSTEIN, P. The heritability of clinically diagnosed attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. **Psychological Medicine** v. 13, p. 2223-2229, 2014.

LIAO, M.P.Y. & LEE, K.H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical engineering Journal**, v.49, p.149-158, 2010.

LIONEL, A.C. et al. Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. **Science translational Medicine**. v. 10, p. 95, 2011.

MARIN, O. Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. **Nature Genetics**. v. 22, p 1229–1238, 2016.

MCLAREN, et al., The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**. v. 17, n 1, 2016.

MICK, E.; BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; SAYER, J. Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. v. 41, n 4, p. 378-385, 2002.

miRBase - the microRNA database. Disponível em <<http://www.mirbase.org/>> Acesso em: 15 jul. 2018.

miRNASNP\_v2: microRNA-related single Nucleotide Polymorphisms database. Disponível em <<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/index.php>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

MISHRA, A.; MACGREGOR, S VEGAS2: Software para testes mais flexíveis baseados em genes. **Twin Research and Human Genetics**, p. 86-91. 2015.

MOFFITT, T.E. et al., Is adult ADHD a childhood-onset neurodevelopmental disorder? Evidence from a Four-Decade Longitudinal Cohort Study. **American Journal of Psychiatry** p. 967-997, 2015.

NEALE, B.M. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry** v.49 p.884-897, 2010.

OLDHAM, M. et al Functional organization of the transcriptome in human brain. **Nature Neuroscience** v.11, n.11, p.1271-1282, 2008.

PERKINS, D.O.; JEFFRIES, C.D.; JARSKOG, L.F.; THOMSON, J.M; WOODS, K.; NEWMAN, M.A.; PARKER, J.S.; JIN, J.; HAMMOND, S.M. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. **Genome Biology** p. 27, 2007.

PGC: Psychiatric Genomics Consortium. Disponível <<https://www.med.unc.edu/pgc>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

PINGAULT, J.B.; VIDING, E.; GALERA, C.; GREVEN, C.U.; ZHENG, Y.; PLOMIN, R. Genetic and environmental influences on the developmental course of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms from childhood to adolescence. **JAMA Psychiatry** p. 651–658, 2015.

POETA, L.S. & NETO, F.R. Estudo epidemiológico dos sintomas do transtorno do déficit de atenção/hiperatividade e transtornos de comportamento em escolas da rede pública de Florianópolis usando a EDAH. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.26 n.3, p. 150-155, 2006.

POLANCZYK, G.; DE LIMA, M.S.; HORTA, B.L; BIEDERMAN, J.; RHODE, L.A. The world wide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. **American Journal of Psychiatry** v. 164, n.5, p. 942-948, 2007.

POLANCZYK, G.; WILLCUTT, E.G.; SALUM, G.A.; KIELING, C.; RHODE, L.A. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. **International Journal of Epidemiology**. v. 43, p. 434-442, 2014.

PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. Disponível em <<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

Project 1000 Genomes: A Deep Catalog of Human Genetic Variation. Disponível em: < <http://www.internationalgenome.org/home> >. Acesso em: 15 mai. 2018.

RAMOS-QUIROGA, J.A.; NASILLO, V.; FERNANDEZ-ARANDA, F.; CASAS, M. Addressing the lack of studies in attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. **Expert Review Neurotherapeutics**. p. 553-67, 2014.

RIPKE, S.; SANDERS, A.; KENDLER, K.; LEVINSON, D. SKLAR, P.; HOLMANS, P. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. **Nature Genetics** v.43, p. 969–976, 2011.

ROHDE, L.A.; BIEDERMAN, J.; BUSNELLO, E.D.; ZIMMERMANN, H.; SCHMITZ, M.; MARTINS, S. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry** v.6, p. 716-722, 1999.

ROMAN, T.; SCHMITZ, M. e POLANCZYK, G.V. Princípios e práticas em TDAH. **Artes medicas**. p35-52, 2003.

SALTA, E. & DE STROOPER, B. Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. **The Lancet Neurology** v. 11, p. 189-200, 2012.

SANCHEZ-MORA, C. et al., Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs). **European Neuropsychopharmacol** v.23, n.11. p.1463–1473, 2013.

SANTARELLI, D.M., BEVERIDGE, N.J.; TOONEY, P.A.; CAIRNS, M.J. Upregulation of dicer and microRNA expression in the dorso-lateral prefrontal cortex Brodmann area 46 in schizophrenia. **Biological Psychiatry** p.180-187, 2011.

SAUNDERS, M. A.; HAN, L.; WEN-HSIUNG, L. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 9, p. 3300–3305, 2007.

SCHMEJER, S.; SCHAEFER, U.; MACPHERSON, C. R.; BAJIC, V. B. dPORE-miRNA: polymorphic regulation of microRNA genes. **Plos One**. v. 6, n 2, 2011.

SIMON, V.; CZOBOR, P.; BALINT, S. MESZAROS, A.; BITTER, I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. **British Journal of Psychiatry** v. 194, p. 204-211, 2009.

SPERLAGH, B. VIZI, E.S. WIRKNER, K.; ILLES, P. P2X7 receptors in the nervous system. **Progress in Neurobiology magazine** v. 78, p.327–346, 2006.

SRIVASTAV, S.; WALITZA, S.; GRUNBLATT, E. Emerging role of miRNA in attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review. **Springer-Verlag Wien**. v.10, n. 1, p.49-63, 2017.

SUDMANT, et al., An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. **Nature international Journal Science**. v. 526, p. 75-81, 2015.

SUN, G. et al., SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. **RNA Journal**. v. 15, n. 9, p. 1640–1651, 2009.

TAILLON-MILLER, P. et al. Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single nucleotide polymorphisms. **Genome Research**, v.8, n.7, p. 748-754, 1998.

TEBBENKAMP, A.T.; WILLSEY, A.J.; STATE, M.W.; SESTAN, N. The developmental transcriptome of the human brain: implications for neurodevelopmental disorders. **Current Opinion in Neurology** p. 149-156, 2014.

THAPAR, A.; LANGLEY, K. ASHERSON, P.; GILL, M. Gene-environment interplay in attention-deficit hyperactivity disorder and the importance of a developmental perspective. **The British Journal of Psychiatry** v. 190, p.1-3, 2017.

TRENT, S. & DAVIES, W. The influence of sex-linked genetic mechanisms on attention and impulsivity. **Magazine Biological Psychology** p. 1-13, 2012.

VEGAS2v02: Versatile Gene-based Association Study. Disponível em <<https://vegas2.qimrberghofer.edu.au/>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

Wang, K., Li, M. & HAKONARSON, H. Analysing biological pathways in genome-wide association studies. **Nature Reviews Genetics** v. 11, p. 843–854, 2010.

WHALLEY, H.C. et al. Impact of a microRNA MIR137 susceptibility variant on brain function in people at high genetic risk of schizophrenia or bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology** v.37, p.2720–2729, 2012.

WRIGHT, C.; GRUPTA, C.N.; CHEN, J.; PATEL, V.; CALHOUN, V.D.; EHRlich, S. WANG, L.; BUSTILLO, J.R.; PERRONE-BIZZOZERO, N.I.; TURNER, J.A. Polymorphisms in MIR137HG and microRNA-137-regulated genes influence gray matter structure in schizophrenia. **Translational Psychiatry** v. 6, p. 724, 2016.

WRIGHT, C.; TURNER, J. A.; VINCE, D. C.; BIZZOZERO, N. Potential Impact of miR-137 and Its Targets in Schizophrenia. **Frontiers in Genetics**. v. 4, p. 58, 2015.

WU, Y. E., PARIKSHAK, N.N.; BELGARD, T.G.; GESCHWIND, D.H. Genome-wide, integrative analysis implicates microRNA dysregulation in autism spectrum disorder. **Nature Neuroscience** p. 1463-1476, 2016.

YE, C.; HU, Z.; WU, E.; YANG, X.; BUFORD, U.; GUO, Z.; SAVEANU, R.V. Two SNAP-25 genetic variants in the binding site of multiple microRNAs and susceptibility of ADHD: a meta-analysis. **Journal of Psychiatric Research** v. 81, p.56–62, 2016.

ZANETTI, D.; CARRERAS-TORRES, R.; ESTEBAN, E.; VIA, M.; MORAL, P. Potential Signals of Natural Selection in the Top Risk Loci for Coronary Artery Disease: 9p21 and 10q11. **Plos One**. v. 10, n.8, 2015.

ZANETTI, D. et al., Analysis of Genomic Regions Associated With Coronary Artery Disease Reveals Continent-Specific Single Nucleotide Polymorphisms in North African Populations. **International Journal of Epidemiology**. v. 26, n 5, p. 264-271, 2016

ZIATS, M.N. & RENNERT, O.M. Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. **Molecular Psychiatric** v.19, n.7, p.848-852, 2014.

## Apêndices

APÊNDICE A: Genes-alvo identificados no programa miRTarBase para os genes de miRNA com pelo menos um SNP com MAF $\geq$ 10% exclusivos para a população africana.

ID	miRNA	espécie alvo	gene-alvo	reporter assay	western blot	qPCR
MIRT004118	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>SMAD4</i>	1	1	1
MIRT004500	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>BBC3</i>	1	1	1
MIRT006153	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>SRF</i>	1	1	1
MIRT006217	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>MAPK3</i>	1	1	1
MIRT006686	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>PARD3</i>	0	1	1
MIRT053205	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>IGF1</i>	1	1	1
MIRT054030	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>FAM160B2</i>	1	0	1
MIRT437859	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>RASGRF1</i>	1	0	1
MIRT437861	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>CDK4</i>	1	0	1
MIRT437958	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>ALCAM</i>	1	0	0
MIRT732527	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>CKB</i>	1	0	1
MIRT732610	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>SRF</i>	1	0	0
MIRT733338	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>BRCA1</i>	0	0	1
MIRT733767	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>DLC1</i>	1	1	1
MIRT734525	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>NOTCH3</i>	1	1	1
MIRT734856	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>CTGF</i>	1	0	0
MIRT735339	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>RHOA</i>	1	1	1
MIRT735388	hsa-miR-483-3p	Homo sapiens	<i>EI24</i>	1	1	1
MIRT007340	hsa-miR-501-5p	Homo sapiens	<i>LAMTOR5</i>	1	1	1
MIRT733570	hsa-miR-501-5p	Homo sapiens	<i>DKK1</i>	1	1	1
MIRT733571	hsa-miR-501-5p	Homo sapiens	<i>NKD1</i>	1	1	1
MIRT733572	hsa-miR-501-5p	Homo sapiens	<i>GSK3B</i>	1	1	1
MIRT733313	hsa-miR-4284	Homo sapiens	<i>CXCL5</i>	1	0	1