

ANÁLISE DE 27 *LOCI* DE SUSCEPTIBILIDADE AO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM UMA COORTE DE ÍNDIVIDUOS NO SUL DO BRASIL

BÁRBARA SERRAT¹; KAREN Y. SÁNCHEZ-LUQUEZ²;
MARA H. HUTZ³; LUIZ AUGUSTO ROHDE⁴; LUCIANA TOVO-RODRIGUES⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – serratbarbara96@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ksanchezluquez@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul – mara.hutz@ufrgs.br

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul – lrohde@terra.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – luciana.tovo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), conhecido por ser um transtorno do neurodesenvolvimento de alta prevalência na infância, é caracterizado pela hiperatividade, desatenção e impulsividade em níveis excessivos (POLANCZYK et al., 2014). Acometendo cerca de 5% da população infantil e persistindo em dois terços dos indivíduos na idade adulta, o TDAH é capaz de comprometer não somente o processo de aprendizagem infantil, como também o grau de desempenho do indivíduo adulto, tido também como preditor para inúmeras comorbidades (POLANCZYK et al., 2014; DIRKS et al., 2017). Ainda com etiologia não totalmente compreendida, evidências apontam para uma base genética fomentada em cima de muitos genes com pequenos efeitos individuais (TRIPP & WICKENS, 2009).

Revolucionando a forma limitada e demorada anteriormente utilizada para associar marcadores genéticos a doenças e fenótipos complexos, os Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) fazem uma varredura completa do genoma humano, apontando polimorfismos de variante única (SNPs) associados ao que se deseja investigar (UITTERLINDEN, 2016). Dessa forma, os estudos de GWAS permitem um olhar mais amplo acerca dos mecanismos que envolvem inúmeras características e patologias – incluindo o TDAH. O GWAS mais recente para TDAH, realizado por DEMONTIS et al. (2022), contou com 38.691 indivíduos com TDAH e 186.843 controles de ascendência europeia e identificou 27 *loci* associados de forma significativa ao transtorno. Este estudo ainda apontou uma variante comum em indivíduos com TDAH associada a prejuízos cognitivos, raciocínio verbal e funções executivas, dentre elas a atenção (DEMONTIS et al, 2022). Neste contexto, foram identificados 76 genes plausíveis de risco para TDAH, expressos principalmente no córtex frontal e durante o desenvolvimento inicial encefálico. Como resultado das análises de enriquecimento funcional, esses genes foram significativamente super expressos durante o desenvolvimento inicial do cérebro embrionário, sendo associados a vários subtipos neuronais encefálicos específicos, em especial os neurônios dopaminérgicos do cérebro médio (DEMONTIS et al, 2022).

Considerando a importância de estudos como o de DEMONTIS et al (2022) e a carência de estudos em amostragens brasileiras, torna-se importante investigar se as variantes observadas no GWAS são, também, associadas ao transtorno na população brasileira. O objetivo deste estudo é testar a associação entre os 27 *loci* identificados no maior e mais recente GWAS para o TDAH em uma amostra clínica brasileira de probandos com TDAH e seus pais.

2. METODOLOGIA

A amostra é composta por 259 probandos com TDAH e seus pais biológicos, recrutados no Programa Ambulatorial de TDAH (ProDAH) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O diagnóstico foi realizado com base em critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1991). Foram coletadas amostras de sangue dos participantes e de seus pais, a partir do qual o DNA total foi extraído por procedimento padrão (LAHIRI & NURNBERGER-JR, 1991). O *Infinium PsychArray-24 BeadChip* foi utilizado para genotipar ~593.260 marcadores nas amostras de pais e filhos. As variantes não genotipadas foram imputadas pelo protocolo *Rapid Imputation Consortium Pipeline* (Ricopili) (LAM et al, 2020), empregando como painel de referência, os dados da população europeia obtidos pela fase 3 do Projeto 1000 Genomas. Para fins de imputação e posterior análises, o delineamento de famílias foi transformado em caso-pseudocontrole, em que os alelos não transmitidos correspondem aos pseudocontroles.

As variantes selecionadas para análise, foram consideradas a partir do último GWAS para TDAH (DEMONTIS et al, 2022), totalizando 27 loci: rs549845, rs1438898, rs2886697, rs9877066, rs7613360, rs2311059, rs17718444, rs114142727, rs17576773, rs6537401, rs4916723, rs77960, rs10875612, rs2025286, rs73145587, rs9969232, rs7844069, rs4925811, rs11255890, rs11596214, rs2582895, rs704061, rs76284431, rs1162202, rs76857496, rs7506904, rs6082363. Também foram aplicados filtros de exclusão para todas as variantes não genotipadas, para variáveis com presença de *missing* (>5%), considerando equilíbrio de Hardy-Weinberg de p-valor >0.01 e a frequência de alelo de menor frequência (MAF) $\leq 1\%$. Os dados referentes às 27 variantes foram extraídos do banco genômico e usadas como exposição para as análises, de maneira independente. A associação entre as variantes e TDAH foi testada por meio de regressão logística, empregando o modelo genético aditivo, obtendo-se a frequência do alelo menor (MAF), *odds ratio* (OR), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e p-valor, onde as associações foram consideradas estatisticamente significativas quando *p-valor* <0,05 – e o p-valor < 0,002 (corrigido pelo Teste de Bonferroni). As análises foram realizadas no software PLINK 1.9. Posteriormente para analisar o papel funcional dos polimorfismos foram coletadas informações sobre as variantes genéticas estatisticamente associadas, no ClinVar (NCBI), no RegulomeDBv2, no HaploRegv v3, no portal do *Genotype-Tissue Expression* (GTEx), e no QTL base, que contém dados de 233 características quantitativas de loci (QTL) de estudos independentes sobre 13 traços moleculares humanos e mapeou-os em 78 tipos de tecidos/células humanas (DONG & BOYLE, 2019; ZHENG et al, 2020). O estudo foi aprovado junto ao comitê de ética da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra é composta de 76,4%(n=198) indivíduos do sexo masculino, 83,4%(n=216) de cor da pele branca, apresentando média de idade de 10,42 anos (DP \pm 3,2), QI médio de 93,52 (DP \pm 13,1). Com relação aos subtipos de TDAH, 44%(n=114) apresentou o subtipo desatento, 5%(n=13) o subtipo hiperativo e 47,1%(n=122) apresentaram o subtipo combinado, 3,9%(n=10) apresentaram valores limítrofes para diagnóstico. Quanto a transtornos adicionais, 35,5%(n=92) apresentaram Transtorno Desafiador de Oposição, 27,8%(n=72) Ansiedade, 13,9%(n=36) Transtorno de conduta e 8,9%(n=23) Transtorno de Humor.

Das 27 variantes de interesse, os loci rs9877066, rs2311059, rs114142727, rs4916723, rs4925811 e rs1162202 foram removidos após aplicação dos critérios

de controle de qualidade, resultando nas demais 21 variantes extraídas com sucesso. Após correção de múltiplos testes de Bonferroni, não encontramos nenhuma associação entre os SNPs anteriormente mencionados e TDAH, em nossa amostra. Entretanto, uma associação nominal ($p < 0,05$) foi encontrada para a variante rs7844609. O incremento do alelo G foi associado a um aumento do odds de ter TDAH em 1,29 vezes (OR=1,29; IC95%= 0,6133 – 0,9790; $p=0,0325$). As estimativas da associação para os polimorfismos restantes são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estimativas de associação para 21 SNPs previamente associados ao TDAH (DEMON-TIS et al. (2022) na amostra de pacientes em acompanhamento no Programa Ambulatorial de TDAH do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH). Rio Grande do Sul, 2022. (n=259)

SNP	CHR	Bp	Alelo	OR	IC95%	P
rs7844069	8	93277087	T	0,7748	0,6133 – 0,9790	0,0325*
rs2582895	11	28602173	A	0,8007	0,6233 – 1,0280	0,0818
rs1438898	2	145714354	C	0,7936	0,5737 – 1,0980	0,1625
rs6082363	20	93277087	T	1,2100	0,9128 – 1,6040	0,1849
rs76857496	18	5871800	A	0,7633	0,5100 – 1,1420	0,1891
rs73145587	7	67685754	T	1,3240	0,8637 – 2,0290	0,1980
rs704061	12	9771903	C	0,8695	0,6808 – 1,1110	0,2628
rs2025286	6	70858701	C	1,1410	0,8997 – 1,4460	0,2770
rs76284431	14	98690923	A	1,2160	0,8541 – 1,7300	0,2783
rs7506904	18	50625779	G	0,8796	0,6911 – 1,1190	0,2970
rs6537401	4	147099654	A	1,1080	0,8353 – 1,4700	0,4760
rs7613360	3	49916710	T	0,9236	0,7166 – 1,1900	0,5391
rs549845	1	44076469	G	1,0680	0,8239 – 1,3840	0,6200
rs77960	5	103964585	A	1,0580	0,8000 – 1,3990	0,6932
rs17718444	3	71499401	T	1,0480	0,8071 – 1,3600	0,7263
rs11255890	10	8784773	C	0,9754	0,7591 – 1,2530	0,8454
rs10875612	5	144474779	C	0,9779	0,7699 – 1,2420	0,8548
rs9969232	7	114158954	G	0,9885	0,7633 – 1,2800	0,9302
rs2886697	3	20724204	A	1,0110	0,7693 – 1,3300	0,9355
rs11596214	10	106453832	A	0,9911	0,7765 – 1,2650	0,9430
rs17576773	4	112217523	T	1,0090	0,6856 – 1,4850	0,9639

*P-valor $< 0,05$

Bp: GRCh37

A variante associada nominalmente, está localizado no braço curto do cromossomo 8, em região intergênica, sem genes anotados no genoma dentro de uma região de 50 kb. Quanto às análises funcionais, não foi observado resultados de alteração de funcionalidade no repositório Clin Var, GTEx e Haploreg. No RegulomeDB, foi encontrado um escore de 7 como resultado da técnica de *Transcription Factor* CHIP-seq, o que sugere pouca evidência funcional desde SNP. Na base de dados QTLbase, quando uma região de +/- 10M de entorno ao rs7844609 é considerada, achamos informação sugestiva ($p=0,0764$) de que o alelo G do SNP tem atividade regulatória da expressão gênica (eQTL, do inglês expression Quantitative Trait Loci), com efeito negativo na expressão do gene *RUNX1T1* (*RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1*), no tecido retinal, também sugerindo baixo potencial funcional da variante.

Com relação aos achados do estudo de DEMONTIS et al (2022) a direção da associação não foi consistente com as medidas de efeito observadas na amostra brasileira. Nosso estudo revelou que o alelo G apresenta um risco aumentado para o TDAH. Vale salientar que é possível que diferentes variantes possam influenciar a susceptibilidade de populações não europeias, sendo necessário considerar a grande variabilidade oriunda da miscigenação característica do Brasil em nossa amostra. Outro aspecto a ser considerado, é o estágio do ciclo vital nos quais a doença persiste, visto que nossa amostra é composta apenas por crianças. Desta forma, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos deste gene e desta região, bem como a respeito de outros SNPs relacionados com o TDAH, em especial em amostragens brasileiras.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, a associação sugestiva de um de 21 loci reportados no maior e mais recente GWAS para TDAH foi observada em nossa amostra. O efeito funcional do rs7844069 é ainda pouco conhecido. Mais estudos em populações brasileiras, com maior tamanho amostral, são necessários para explorar a relação entre os SNPs testados aqui e TDAH.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. **American Psychiatric Association**, Washington, 1994.
- DEMONTIS, D. et al. Descoberta do primeiro loci de risco significativo em todo o genoma para transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. **Nature genetics**, v.51, p.63-75, 2019.
- DEMONTIS, D. et al. Genome-wide analyses of ADHD identify 27 risk loci, refine the genetic architecture and implicate several cognitive domains. **medRxiv**, 2022.
- DIRKS, H; SCHERBAUM, N; KIS, B; METTE, C. ADHD in Adults and Comorbid Substance Use Disorder: Prevalence, Clinical Diagnostics and Integrated Therapy. **Fortschritte der Neurologie Psychiatrie**, German, v.85, n.6, p.336-344, 2017.
- DONG, S.; BOYLE, A.P. Predicting functional variants in enhancer and promoter elements using Regulome DB. **Human Mutation**, v.40, n.9, p.1292-98,2019.
- KUSTANOVICH, V. et al. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. **Molecular psychiatry**, v.9, n.7, p.711–717, 2004.
- LAHIRI, D.K.; NURNBERGER-JR, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.5444, 1991.
- LAM, M., et al. RICOPILI: Rapid Imputation for Consortias PipeLine. **Bioinformatics**, v.30, n.3, p.930-933, 2020.
- POLANCZYK, GV; WILLCUTT, EG; SALUM, GA; KIELING, C.; ROHDE, LA. Estimativas de prevalência de TDAH em três décadas: uma revisão sistemática atualizada e análise de meta-regressão. **International Journal of Epidemiology**, v.43, p.434-442, 2014.
- TRIPP, G; WICKENS, JR. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**, v.57, n.7-8, p.579-89, 2009.
- UITTERLINDEN, A. An Introduction to Genome-Wide Association Studies: GWAS for Dummies. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.34, n.4, p.196–204, 2016.
- ZHENG, Z. et al. QTLbase: an integrative resource for quantitative trait loci across multiple human molecular phenotypes. **Nucleic Acids Research**, v.48, n. D1, p. D983-91, 2020.