UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇAO EM EPIDEMIOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

PADRÕES DE SONO E TRANSTORNO DO DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH): PERSPECTIVAS OBSERVACIONAL E GENÉTICA

Marina Xavier Carpena

Pelotas, 2020

Marina Xavier Caprena

PADRÕES DE SONO E TRANSTORNO DO DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH): PERSPECTIVAS OBSERVACIONAL E GENÉTICA

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Epidemiologia.

Orientador(a): Prof[a]. Dr[a]. Luciana Tovo Rodrigues

Co-orientador(a): Prof[a]. Dr[a]. Alicia Matijasevich

Pelotas, RS 2020

Banca examinadora:

Profa. Dra. Iná S. Santos (examinador interno)
Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia
Departamento de Medicina Preventiva
Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Lavinia Schuler Faccini (examinador externo)
Departamento de Genética - UFRGS
Serviço de Genética Médica - HCPA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Eugenio Horacio Grevet (examinador externo)
Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal - UFRGS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Alicia Matijasevich (coorientadora)
Departamento de Medicina Preventiva
Faculdade de Medicina (FMUSP)
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Luciana Tovo Rodrigues (orientadora)
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal de Pelotas

RESUMO

CARPENA, Marina Xavier. **Padrões de sono e Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH): perspectivas observacional e genética.** Tese (Doutorado em Epidemiologia). Programa de Pós-graduação em Epidemiologia. Universidade Federal de Pelotas, 2020

Apesar da alta comorbidade entre o Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) e problemas de sono, curta duração de sono e disfunções circadianas relatada na literatura, ainda não está claro se estes padrões de sono são efeitos secundários ou fator de risco para o TDAH. Poucos estudos utilizam delineamento e análise longitudinais para estudar a relação temporal dessa relação. Ademais, até o momento, os estudos que buscaram compreender a relação genética entre as duas condições utilizaram a estratégia de genes-candidato e os resultados se restringem a poucos marcadores genéticos. Esta tese teve como objetivo geral investigar a relação entre padrões de sono e TDAH por meio de uma abordagem longitudinal observacional e outra genética. No primeiro estudo avaliou-se associação entre duração de sono e problemas de sono nos primeiros anos de vida (1,2 e 4 anos) e TDAH aos 11 anos de idade na coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. Baseada na recente descoberta de marcadores genéticos em nível genômico para os fenótipos em estudo, o segundo artigo buscou avaliar a contribuição genética e relação causal entre sono/ciclo circadiano e TDAH. O terceiro artigo teve como objetivo avaliar o efeito mediador de funções executivas relacionadas a atenção na relação entre problemas de sono precoces e TDAH na adolescência. Por fim, o volume conta com um artigo adicional, o qual teve como objetivo de investigar a associação entre polimorfismos do gene *CLOCK* e TDAH em uma amostra clínica de crianças/adolescentes. Considerando os achados dos quatro produtos da tese, pode-se concluir que problemas de sono, especialmente aqueles relacionados com privação crônica de sono, são preditores do TDAH, e possuem componentes

de genética compartilhada e mecanismos relacionados com funções de neuro-atividade em vias de sinalização. Ainda, identificou-se que funções executivas relacionadas a atenção não seriam mediadoras do efeito de problemas de sono precoce em TDAH.

ABSTRACT

CARPENA, Marina Xavier. **Sleep patterns and Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): observational and genetic perspectives**. Thesis (Doctorate in Epidemiology). Graduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas, 2020

Despite the high comorbidity between Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and sleep problems, short sleep duration and circadian dysfunctions reported in the literature, it is not yet clear whether these sleep patterns are side effects or a risk factor for ADHD. Few studies use longitudinal design and analysis to study the temporal relationship of this relationship. Furthermore, studies that have sought to understand the genetic relationship between the two conditions have used the candidate-gene strategy and the results are restricted to a few genetic markers. This thesis aims at investigating the relationship between sleep patterns and ADHD through both observational and genetic approaches. The first study explored the association between sleep duration and sleep problems in the first years of life (1,2 and 4 years) and ADHD at 11 years of age in the 2004 Pelotas birth cohort. Based on the recent discovery of associated genetic markers provided by Genome Wide Association Studies for the phenotypes evaluated in this thesis, the second article sought to assess the genetic contribution and causal relationship between sleep/circadian cycle and ADHD. The third article aimed to evaluate the mediating effect of executive functions related to attention in the relationship between early sleep problems and ADHD in adolescence. Finally, the volume has an additional article, which aimed to investigate the association between markers of the *CLOCK* gene and ADHD in a clinical sample of children / adolescents. Considering all the findings, it can be concluded that sleep problems, especially those related to chronic sleep deprivation, are predictors of ADHD, and have components of

shared genetics and mechanisms related to neuroactivity functions in the process of signaling. Still, it was identified that executive functions related to attention would not mediate the effect of early sleep problems in ADHD.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO **12**

SEÇÃO I. PROJETO DE PESQUISA **13**

SEÇÃO II. MODIFICAÇÕES NO PROJETO DE PESQUISA **123**

SEÇÃO III. RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO **127**

SEÇÃO IV. ARTIGOS **206**

ARTIGO 1 208

ARTIGO 2 226

ARTIGO 3 264

ARTIGO 4. 298

SEÇÃO V. NOTA À IMPRENSA LOCAL **312**

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos àqueles que tornaram possível a execução do meu doutorado. Ao Pós-Graduação em Epidemiologia da UFPel (PPGE) (incluindo professores, funcionários e instituição), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por todo conhecimento, suporte e recursos fornecidos em prol de um ambiente educacional favorável.

Agradeço aos professores (não apenas do PPGE, mas também do meu período de graduação e mestrado na FURG) que estiveram disponíveis para compartilhar o bem mais valioso da humanidade: conhecimento, e, em especial as minhas orientadoras, a profa. Luciana (a qual carinhosamente chamo Lu) e a profa. Alícia – sem elas a condução deste trabalho não seria possível. Lu, se não fosse teus ensinamentos, (super) paciência, cumplicidade e apoio, com certeza essa tese não existiria. És um exemplo de mulher, pesquisadora e professora! Sou imensamente grata pela tua orientação e pela amizade que construímos ao longo destes quatro anos. Alícia, sou imensamente grata pela tua grande disponibilidade em ensinar, de maneira doce e firme, muito especial e única! Obrigada!

Agradeço também aos meus colegas, àqueles que estiveram presentes e foram incansáveis nas reuniões de estudos durante as disciplinas e a prova de qualificação: Luísa (minha *hermana* colombiana), Fran, Mari, Pri, Laísa, dentre outros, e, em especial a Pati, que esteve na minha trajetória desde a graduação e foi fundamental para todo meu processo de (des)construção. Agradeço muito a Thais, colega que se tornou amiga e parceira em muitos projetos.... que sorte a minha trabalhar contigo tantas vezes e encontrar uma parceria tão forte! Muito obrigada por todo suporte, em tantos âmbitos!

Agradeço de forma muito especial aos meus amigos de longa data e minha família, que foram tão compreensíveis e sempre acolheram o meu “hoje não dá”. Patrícia e Ricardo, não

teriam palavras que expressassem meu verdadeiro agradecimento aos 15 anos de amizade, o abraço na hora certa e as longas horas de bate-papo. O suporte e acolhimento de vocês (mesmo fisicamente distante) foi minha força diversas vezes! Também agradeço tanto outros amigos, como Guiga, Tábata, Mônica, Nádia e Bruna (sobretudo com suporte em período de doc e maternância), e outros que sempre entenderam minha ausência devida minha vida acadêmica e não deixaram de estar ao meu lado.

A minha avó, tios, tias, primos e meu irmão Cainan. De maneira direta ou indireta, aqui está um pedacinho de vocês. Vocês que me apoiaram ou incentivaram de alguma maneira, mesmo sem muitas vezes entender bem o que eu fazia ("tu gostas de estudar né, Marina?" "O que tu fazes mesmo?" – perguntas tão presentes nas nossas conversas hehehe), muito obrigada! Agradeço em especial a minha prima Carol, a quem confiei e confio para cuidar do meu bem mais precioso (e isso não é atoa!), e meus tios Adri e Ange que sempre deram suporte a mim e minha pequena! Ainda, a minha família de coração que me deu um suporte único: tia Pati, Cris, Vivi... e tantos outros que estiveram ali para um abraço ou distrair minha Pimpa quando eu mais precisei (hehe) – esses detalhes fizeram toda diferença!

Agradeço da forma mais especial a minha mãe, a mulher que me deu a vida e o "brilho nos olhos". Quem me ensinou a lutar pelo que quero e amar estudar, saber, conhecer! Obrigada, pelo exemplo e suporte sempre ("*all the things you've done give me power to succeed*"). Deixo também meu agradecimento ao homem mais alegre que conheci na vida, meu pai (*in memoriam*), "o cara" que transbordava amor e que sinto tanta falta diariamente.

Agradeço ao meu parceiro, Christian, que além de parceiro na vida, foi um dos importantes "incentivadores" no processo todo. Ele quem diz "tu és muito capaz, as vezes não fazes ideia do quanto". Quem, além de ser coautor de alguns trabalhos acadêmicos, é coautor da minha mais linda e perfeita obra: Esther. Falando nela, "a dona dos meus sonhos e sono".

Ah, realmente, à ela não cabem agradecimentos ou qualquer outro tipo de declaração. Nossa relação não cabe em frases. Ela é a razão de tudo, é o que me move e fez com que eu sonhasse mais alto e buscasse mais. É por ela, para ela.

Obrigada.

APRESENTAÇÃO

A tese está manuscrita conforme as normas regimentais do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia (PPGE) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Esta é requisito para a conclusão do curso de Doutorado em Epidemiologia, de Marina Xavier Carpena, desenvolvido sob orientação da Profa. Dra. Luciana Tovo Rodrigues e coorientação da Profa. Dra. Alicia Matijasevich. O volume é composto por cinco seções: (i) projeto de pesquisa aprovado pela banca examinadora em 24/08/2018; (ii) modificações do projeto realizadas após a qualificação do projeto; (iii) relatório do trabalho de campo desenvolvido como parte do doutorado, realizado entre março e dezembro de 2018; (iv) quatro artigos desenvolvidos ao longo do período de doutoramento; (v) nota à imprensa, contendo a síntese dos resultados obtidos nesta tese e, elaborado para a divulgação à imprensa local e à comunidade não científica.

Os artigos foram formatados de acordo com as normas de cada revista considerada para a submissão/publicação. Os artigos que serão apresentados para a banca são o que seguem:

a. Artigo 1 – "*The Role of Sleep Duration and Sleep Problems During Childhood in the*

Development of ADHD in Adolescence: Findings From a Population-Based Birth Cohort".

b. Artigo 2 – "*Sleep-related traits and Attention Deficit hyperactivity disorder comorbidity shared genetic risk factors, molecular mechanisms and causal effects*"

c. Artigo 3 – "*The effects of persistent sleep disturbances during early childhood over adolescent ADHD, and the mediating effect of attention-related executive functions: data from the 2004 Pelotas Birth Cohort"*

d. Artigo 4 – "*CLOCK Polymorphisms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further Evidence Linking Sleep and Circadian Disturbances and ADHD*"

SEÇÃO I. PROJETO DE PESQUISA

Projeto de pesquisa apresentado em agosto de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA

Padrões de sono e Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH): perspectivas observacional e genética

Marina Xavier Carpena

Pelotas

2018

MARINA XAVIER CARPENA

Padrões de sono e Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH): **perspectivas observacional e genética**

Projeto de Pesquisa apresentado ao programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Epidemiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Tovo-Rodrigues

Coorientador: Tiago Munhoz

Pelotas, 2018

ARTIGOS PLANEJADOS

Artigo 1: Padrões de sono no início da vida e Transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade na adolescência: Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

Artigo 2: Relação entre aspectos genéticos do ciclo circadiano e Transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade: uma revisão sistemática.

Artigo 3: Existe relação causal entre padrões de sono e TDAH? Um estudo de Randomização Mendeliana de duas amostras.

RESUMO

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns na infância, com grande persistência na vida adulta. O TDAH é marcado por um padrão contínuo de desatenção, hiperatividade e/ou impulsividade que interfere no funcionamento e desenvolvimento, tem etiologia complexa e pouco conhecida. Indivíduos com TDAH apresentam menor duração de sono e, em maior frequência, problemas de sono, cronotipo vespertino e disfunções circadianas. Contudo, ainda não está claro se estes padrões de sono são efeitos secundários ou fator de risco para o TDAH. Poucos estudos utilizam delineamento e análise longitudinais para estudar a relação temporal dessa relação. Ademais, até o momento, os estudos que buscaram compreender a relação genética entre as duas condições utilizaram a estratégia de genes-candidato e os resultados se restringem a poucos marcadores genéticos. O presente projeto tratará de investigar a relação entre padrões de sono e TDAH por meio de uma abordagem longitudinal observacional e outra genética. No primeiro estudo pretende-se avaliar associação entre duração de sono, despertares noturnos e problemas de sono nos primeiros anos de vida (1,2 e 4 anos) e suas trajetórias e TDAH aos 11 anos de idade na coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. A recente descoberta de marcadores genéticos em nível genômico para ciclo circadiano e duração de sono oferece subsídios para a condução de estudos que busquem uma melhor compreensão sobre a susceptibilidade genética do TDAH, bem como a investigação acerca da contribuição genética de padrões de sono na etiologia desse transtorno psiquiátrico em uma abordagem genômica. Sendo assim, no outro estudo original, o objetivo é testar se existe relação causal entre padrões de sono e TDAH, e qual a direção dessa relação, utilizando dados públicos. Por fim, também contemplará um estudo de revisão sistemática sobre os achados de estudos de associação entre genes do ritmo circadianos e TDAH. No presente projeto são apresentadas revisões conduzidas que embasem

as propostas, bem como a metodologia que pretende-se utilizar para responder as perguntas de pesquisa.

DEFINIÇÃO DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Sigla/ abreviatura	**Definição**
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
APA	*American Psychiatric Association*
ALSPAC	*Avon Longitudinal Study of Parents and Children*
ASRS	*World Health Organization Adult ADHD Self-report Scale*
BP	Pares de base
CBCL	*Child Behavior Checklist*
CCI	Coeficiente de correlação intraclasse
CID	Classificação Internacional das Doenças
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPRS	*Conners' Parent Rating Scales*
CSHQ	*Childrens's Sleep Habits Questionnaire*
CSM	*Escala composta de Morningness*
DAG	Gráfico acíclico direcionado
DALYs	*Disability-adjusted life*
DAWBA	*Development and Well-Being Assessment*
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DSM	Manual Diagnóstico de Transtornos Mentais
EAGLE	*Genetics and Lifecourse Epidemiology*
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMAC	*Expected Minor Allele Counts*
GWAS	*Genome-wide association analysis study*
HBQ	*McArthur Health and Behavior Questionnaire*
HGDP	*Human Genome Diversity Project*
IDRC	*International Development Research Center*
INFO	escore de qualidade de imputação
InSIDE	Força Independente do Efeito Direto do Instrumento iPSYCH *Lundbeck Foundation Initiative for Integrative Psychiatric Research*
IVW	Variância Inversa Ponderada
KEGG	*Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes*
MAF	Frequência alélica do alelo menos frequente
MBE	Estimador Baseado em Modo Ponderado

MINI	*Mini-International Neuropsychiatric Interview*
NIMH	*National Institute of Mental Health*
NPH	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
NSF	*National Sleep Foundation*
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBQ	*Preschool Behavior Questionnaire*,
PER	*Period homolog*
PGC	*Psychiatric Genomics Consortium*
PMW	Mediana Ponderada Penalizada
PRONEX	Programa de Apoio a Núcleos de Excelência
PSQI	*Pittsburgh Sleep Quality Index*
RM	Randomização Mendeliana
RNA	Ácido ribonucleico
RO	Razão de odds
RP	Razão de prevalência
RR	Risco Relativo
SDQ	*Strengths and Difficulties Questionnaire*
SNiPA	*Nucleotide Polymorphism Annotator*
SNP	*Single Nucleotide Polymorphisms*
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
UTR	Região não traduzida do gene
VNTR	*Variable number of tandem repeates*
WURS-25	Wender Utah Rating Scale-25
ZEMPA	*ZEro Modal Pleiotropy Assumption*

LISTA DE GENES OU FAMÍLIA DE GENES

Gene(s)	**Nome**
5HTT	*Serotonin transporter*
AK5	*Adenylate kinase 5*
APH1A	*Aph-1 homolog A, gamma-secretase subunit*
ARNTL	*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*
BHLHB2	*Basic helix-loop-helix domain containing, class* B2
c-FOS	*Proto-oncogene c-Fos*
CLOCK	*Circadian-locomotor output-cycle kaput*
COMT	*Catecol-o-metiltransferase*
CRY	*Cryptochrome gene family*
CSNK1E	*Casein kinase 1, epsilon*
DAT1	*Dopamine active transporter 1*
DRD	*Dopamine receptors gene family*
FBXL13	*F-box and leucine rich repeat protein 13*
HCRTR2	*Hypocretin receptor 2*
HTR1B	*5-hydroxytryptamine receptor 1B*
PAX8	*Paired box 8*
PER	*Period homolog gene family*
RGS16	*Regulator of G protein signalling* 16
RORA	*Receptores alpha RAR-related orphan*
RORB	*Receptores alpha RAR-related beta*
SNAP25	*Synaptosome associated protein 25*
TIM	*Timeless homolog*
VRK2	*Vaccinia related kinase 2*

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Resultados e descrição dos 13 marcadores estatisticamente significantes para ciclo circadiano (escores de cronotipo) e duração de sono em nível genômico reportados por Jones et al (2016) nas amostras de UK Biobank e 23andMe. 29

Quadro 1. Apresentação das chaves de buscas utilizadas e número de trabalhos encontrados com cada chave em cada uma das bases de dados bibliográficas para a etapa 1 da revisão..... 32

Figura 1. Fluxograma da revisão sistematizada com os descritores para TDAH, sono e delineamento longitudinal.....35

Quadro 2. Apresentação das chaves de busca utilizadas e número de trabalhos encontrados com cada chave em cada uma das bases de dados bibliográficas para a etapa 2 da revisão (estudos genéticos).....41

Figura 2. Fluxograma da revisão sistematizada com os descritores de TDAH, ritmo circadiano e genes de comportamento de sono.....43

Figura 3. Comparação entre os delineamentos Randomização Mendeliana e Ensaio Clínico Randomizado. Adaptado de Ebrahim e Smith, 2003.....56

Figura 4. Gráfico acíclico dirigido (DAG) ilustrativo dos pressupostos de uma variável instrumental em um estudo de Randomização Mendeliana.....58

Figura 5. Fluxograma de acompanhamentos da Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas. Adaptado de Santos et al., 2014.....67

Quadro 3. Apresentação das variáveis de sono que serão utilizadas no Artigo 1 e foram coletadas na Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas.....69

Figura 6. Gráfico acíclico dirigido (DAG) construído para estimar o efeito de padrões de sono no Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH).....74

Quadro 4. Calculo de poder para detectar diferenças nas medias de duração de sono entre

indivíduos com e sem TDAH na coorte de 2004.....75
Quadro 5. Calculo de poder para detectar diferenças nas proporções de despertares noturnos e problemas de sono entre indivíduos com e sem TDAH na coorte de 2004.....76

SUMÁRIO

ARTIGOS PLANEJADOS..... 3

RESUMO.....4

DEFINIÇÃO DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....6

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....9

1 INTRODUÇÃO.....14

2 MARCO TEÓRICO.....17

2.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.....17

2.2 Conceitualização e Diagnóstico de Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.....18

2.3 Etiologia e fatores de risco para o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.....21

2.3.1. Fatores Genéticos.....21

2.3.2. Fatores Ambientais e comportamentais.....24

2.4 Ritmo circadiano e Sono.....25

3. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA.....31

3.1. Relação longitudinal entre Sono e TDAH.....31

3.2. Relação entre aspectos genéticos do ciclo circadiano e TDAH 40

3.3. Mecanismos causais na relação entre TDAH e ciclo circadiano.....50

3.3.1. Randomização Mendeliana.....55

4 JUSTIFICATIVA.....60

5 OBJETIVOS.....63

5.1. Objetivo geral: 63

5.2. Objetivos específicos: 63

6 HIPÓTESES..... 64

6.1. Hipótese geral.....64

6.2. Hipóteses específicas: 64 7
MÉTODOS.....65

7.1. MÉTODOS ESTUDO 1.....65

7.1.1. A Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas 65

7.1.2. Avaliações e instrumentos de coleta de dados.....68

7.1.3. Aspectos Éticos.....72

7.1.4. Processamento e Análises de dados.....72

7.1.5. Cálculo poder.....74

7.2. MÉTODOS ESTUDO 2.....78

7.2.1 Critérios de elegibilidade.....78

7.2.2 Fontes de informação.....78

7.2.3. Estratégia de Busca.....79

7.2.4. Seleção dos estudos.....80

7.3. MÉTODOS ESTUDO 3.....81

7.3.1. Fonte de Dados.....82

7.3.2. Variantes Instrumentais Genéticas.....84

7.3.3. Estimativa do efeito causal.....85

7.3.4. Análises de sensibilidade.....85

8. FINANCIAMENTO.....87

9.CRONOGRAMA.....88

REFERÊNCIAS.....89

APÊNDICES.....102

ANEXOS.....115

1 INTRODUÇÃO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), é caracterizado pela presença de níveis de hiperatividade, desatenção e impulsividade generalizados, excessivos e prejudiciais (1). É estimado que cerca de 2-7% de crianças e adolescentes (2) e de 2-5% de adultos tenham TDAH em todo o mundo (3,4). Adicionalmente, aproximadamente 5% de crianças também sofrem com dificuldades comportamentais de desatenção, hiperatividade e impulsividade, porém encontram-se um pouco abaixo do limite para atender aos critérios diagnósticos completos (2).

Numa revisão sistemática foi identificado que o TDAH é a 98ª maior causa de sobrecarga global de doenças, contribuindo com 941500 anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYs), sendo maior impacto entre meninos e atingindo seu pico entre 10 e 14 anos de idade (5). Nos últimos anos, também tem se observado um aumento na prevalência deste transtorno especialmente nesta mesma faixa etária (2), além do aumento aparente nas prevalências gerais observadas (6). O transtorno também ocasiona custos individual, familiar e social muito grande. Por exemplo, um estudo apresentou que o custo anual estava entre 143 e 266 bilhões de dólares nos Estados Unidos, sendo estes custos atribuídos tantos aos indivíduos acometidos pela doença quanto seus familiares (7). Além disso, é observado o grande impacto do TDAH sobre os sistemas educativo e de saúde, uma vez que estão relacionados com déficits de aprendizagem e maior uso de serviços de saúde, como o relatado em estudos conduzidos na Inglaterra (8–10) e o aumento de mortalidade entre casos (11, 12).

O TDAH é um transtorno com etiologia complexa e pouco conhecida, de início precoce, com consequências e manifestações ao longo da vida, que afetam o indivíduo em diferentes etapas do desenvolvimento (incluindo adolescência e vida adulta), bem como a sociedade em geral com gastos e desfechos negativos (12). Nesse sentido, é importante a identificação de fatores predisponentes de TDAH. Pouco se sabe sobre a relação entre TDAH e alguns fatores

comumente associados ao transtorno, como padrões de sono. Apesar de a importância da manutenção dos ritmos circadianos para a saúde humana já estar consolidada (13,14) e a literatura sobre disfunções de sono e circadianas estar recebendo atenção considerável em pesquisas sobre etiologia de psicopatologias do desenvolvimento em geral (15), a relação causal entre ritmo circadiano e TDAH e seus mecanismos subjacentes é pouco explorado na literatura (16,17). Muitos estudos mostram que casos de TDAH apresentam menores durações de sono, maior dificuldade de pegar no sono, maior frequência de despertares noturnos e de problemas de sono no geral, quando comparados aos controles. Também observou-se um perfil relacionado a preferências por horários tardios de sono (17–19), bem como disfunções circadianas associadas a um aumento de sintomatologia relacionada ao TDAH (16). Contudo, são necessárias mais evidências para identificar se estes padrões de sono são fatores predisponentes, agravantes ou consequências do transtorno, sobretudo com estudos com delineamento e metodologia robusta (17). A maioria dos estudos relatados na literatura apresentam delineamentos que impossibilitam explorar a relação causal entre os fenótipos. Além disso, na literatura tem se identificado associação entre marcadores genéticos circadianos e fenótipo de TDAH, o que poderia indicar uma possível explicação para a relação entre estes fenótipos, os quais estariam associados por meio do compartilhamento de genes envolvidos na etiologia de ambas condições (17,18). No entanto, os estudos que buscaram compreender a relação genética entre as duas condições utilizaram a estratégia de genes-candidato e os resultados se restringem a poucos marcadores. Estudos sobre a relação genética entre TDAH e disfunções circadianas e de sono podem ser úteis tanto na compreensão etiologia e esclarecimento de cada umas das condições, assim como dos mecanismos subjacentes nesta relação.

O objetivo deste estudo será investigar a relação entre padrões de sono e TDAH por meio de uma abordagem longitudinal observacional e outra genética.

2 MARCO TEÓRICO

O marco teórico deste projeto tem como objetivo apresentar um panorama do conhecimento atual sobre TDAH, ritmo circadiano e sono e a relação entre eles. Posterior a esta seção, são apresentadas buscas sistemáticas conduzidas para apropriação e apresentação da literatura existente sobre a relação longitudinal entre sono e TDAH e a relação entre genes envolvidos no ciclo circadiano e TDAH. Ambas as seções têm objetivo de apresentar o conhecimento que embasa a realização do presente projeto.

2.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

O TDAH é considerado um dos mais frequentes transtornos psiquiátricos na infância e adolescência. Segundo estudos de revisão sistemática e metanálise, cerca de 7,2% de crianças e adolescentes são acometidas pelo transtorno no mundo (≤18 anos de idade) (20), sendo a prevalência em crianças em idade escolar de 5% (21). Em Pelotas, o transtorno foi diagnosticado em 2,6% das crianças de 6 anos (22) e em 4% das crianças de 11 anos na Coorte de Nascimentos de 2004 (23).

O TDAH é um transtorno heterogêneo, estando comumente associado a comorbidades psiquiátricas (24,25). Um estudo clínico multicêntrico identificou que das 1919 crianças e adolescentes que tinham TDAH, 66% (n=1269) apresentava pelo menos, uma comorbidade psiquiátrica (25). Dentre as comorbidades investigadas por Reale et al. (2017), os transtornos de aprendizagem foram os mais frequentes (56%), seguidos dos transtornos de sono (23%), transtorno opositor desafiante (20%) e transtornos de ansiedade (12%), apesar de apenas os transtornos de sono e opositor desafiante serem significativamente maior entre casos do que não casos de TDAH. Uma metanálise que incluiu 34 artigos originais identificou que TDAH também está associado a déficits em uma variedade de domínios neurocognitivos, tais como memória operacional, variação de tempo de reação/resposta, resposta inibitória, inteligência, e

planejamento/organização, o que pode repercutir direta e indiretamente na vida acadêmica/profissional e pessoal dos acometidos (26). A presença do transtorno está associada a uma série de prejuízos durante a infância como problemas de aprendizagem, convívio social e risco aumentado para acidentes, além daqueles prejuízos a longo prazo, como risco aumentado para o uso de substâncias e criminalidade (2) .

Os sintomas de TDAH persistem até a idade adulta em cerca de 80% dos casos (27–29), sendo a prevalência nessa fase da vida variando entre 2 a 5% (3,4,30). Na vida adulta, de maneira geral, o TDAH está associado a um risco aumentado para lesões em geral (31), acidentes de trânsito (32), uso/abuso de substâncias, criminalidade (33), comportamentos de risco para AIDS (34), suicídio (35) e mortalidade prematura (11). Além disso, está associado a uma maior taxa de desemprego (34), divórcio e um aumento na utilização dos cuidados de saúde, o que repercute não apenas na vida individual daqueles que têm o transtorno, mas também na sociedade e em gastos públicos de maneira significativa.

2.2. Conceitualização e Diagnóstico de Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

Para a conceituação e diagnóstico na prática clínica e no âmbito de pesquisa, existem listas de sintomas que devem estar presentes e que são indicados em dois manuais de critérios diagnósticos de doenças psiquiátricas internacionalmente aceitos: o Manual Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM), desenvolvido pela *American Psychiatric Association* (APA), e a Classificação Internacional das Doenças (CID), da Organização Mundial da Saúde (OMS). Em ambos manuais, o TDAH é reconhecido pelos seus sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade (1,36).

Na última versão do DSM (DSM-V), o TDAH é considerado um transtorno do neurodesenvolvimento, definido por níveis prejudiciais e um padrão contínuo de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade (1). Transtornos do neurodesenvolvimento são aqueles em que as sintomatologias presentes são provavelmente oriundas de alterações neurológicas precoces no desenvolvimento. Para que uma criança seja diagnosticada com TDAH de acordo

com o DSM-V, é necessário: A) a presença de pelo menos seis sintomas dos 9 listados no manual para cada grupo de sintomatologia de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade; B) a presença dos sintomas antes dos 12 anos de idade; C) presença do sintomas em pelo menos dois ambientes (casa, escola, trabalho, convívio social, amigos ou família, etc.); D) evidências claras de que a sintomatologia gera reais prejuízos no funcionamento do indivíduo; e que E) os sintomas não são decorrentes ou melhor explicador por outra condição clínica ou de saúde mental. Além disso, existe uma subdivisão clínica do transtorno, a qual indica que o transtorno pode se manifestar de forma predominantemente desatenta, predominantemente hiperativa/impulsiva ou combinada (1). Na versão anterior do DSM (DSM-IV), os critérios diagnósticos eram os mesmos, no entanto, os sintomas deveriam surgir até dos sete anos de idade. Cabe destacar ainda que a maioria dos estudos utilizam os critérios do DSM-IV, uma vez que o DSM em sua última versão (DSM-V) foi publicado no ano de 2013.

Na 10ª versão do CID (CID-10), o TDAH é considerado um dos transtornos hipercinéticos (código F90), os quais são caracterizados por início precoce e falta de perseverança nas atividades que exigem envolvimento cognitivo (36). Os distúrbios da atividade e da atenção são o grupo que delimita o TDAH em sua forma clássica neste manual (código F90.0), podendo também ser denominado como síndrome de déficit da atenção com hiperatividade ou transtorno de hiperatividade e déficit da atenção. As características sintomatológicas são basicamente as mesmas listadas no DSM-V e apesar de existirem algumas diferenças diagnósticas. Para o diagnóstico pelo CID-10 é necessária a presença simultânea de sintomas de desatenção, hiperatividade/impulsividade, enquanto no DSM-V são aceitos subtipos clínicos apenas desatento ou apenas hiperativo/impulsivo. Além disso, no CID-10 os sintomas de ansiedade e de depressão são fatores excludentes para o diagnóstico de TDAH, enquanto no DSM-V não (apenas se explicam melhor o caso). Estas diferenças podem refletir

nas prevalências encontradas nos estudos, porém evidências indicam que não refletem de maneira estatisticamente significativas. A prevalência observada de TDAH na coorte de

Nascimentos de 2004 de Pelotas quando as crianças tinham seis anos foi de 2,6% (IC95%: 2,2 - 3,2%) quando os critérios do DSM-IV e 2,2% (IC95%: 1,7 - 2,7%) quando os critérios do CID-10 foram considerados, (22). Quando os participantes da Coorte tinham 11 anos, as prevalência considerando os diferentes critérios também não diferiam significativamente (prevalência pelo DSM-V=4,0 %; IC95%: 3,4-4,7%; prevalência pelos CID-10=3,4%; IC95%: 2,8-4,0%) (23).

Ainda não foi identificado um marcador biológico que seja usado no diagnóstico de TDAH, apesar de existirem evidências de padrões neurobiológicos diferentes entre crianças com TDAH comparadas a controles (1,37). Da mesma forma que as demais psicopatologias, o TDAH deve ser diagnosticado por uma minuciosa avaliação psicológica e psiquiátrica, através de uma entrevista clínica e uso de testes psicológicos validados (38). Ou seja, a investigação clínica dos sintomas e prejuízos em mais de um ambiente (i.e. casa, escola ou trabalho) é o padrão ouro na avaliação do transtorno. Por outro lado, para otimização de recursos humanos e financeiros em pesquisas, o TDAH geralmente é investigado através de questionários aplicados para os pais e professores durante a infância ou de um autorrelato de sintomatologia quando se trata de TDAH na vida adulta. Diversos instrumentos podem ser aplicados com razoável acurácia para identificar TDAH no âmbito de pesquisa, como por exemplo *Strengths and Difficulties Questionnaire* (SDQ), *Child Behavior Checklist* (CBCL) e *Development and WellBeing Assessment* (DAWBA) para crianças e adolescentes e *Mini-International Neuropsychiatric Interview* (M.I.N.I.) para adultos. O uso desses instrumentos é logisticamente vantajoso em comparação à avaliação clínica, pois é de rápida aplicação, com pequenos investimentos financeiros, ainda que não seja considerado padrão-ouro para a identificação de TDAH.

2.3. Etiologia e fatores de risco para o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

O TDAH é um transtorno com etiologia complexa, de origem multifatorial, sem um padrão de herança claro, onde fatores genéticos e ambientais contribuem para a suscetibilidade ao TDAH (39,40). Portanto, nesse segmento do projeto pretende-se explorar fatores genéticos, ambientais e comportamentais descritos na literatura como fatores de risco e associados ao transtorno.

2.3.1. Fatores Genéticos

A herdabilidade do TDAH avaliada por estudos de genética clássica é estimada entre 60 e 91% (39–42), sendo este considerado um dos transtornos com maior componente genético na psiquiatria. Estudos genéticos com famílias, gêmeos e de adoção têm sido tradicionalmente conduzidos para examinar a influência genética do TDAH. Nos estudos com família o risco relativo para TDAH em parentes de primeiro grau é 4 a 9 vezes maior do que na população em geral (43,44). Estudos com gêmeos e de adoção encontraram achados consistentes que indicaram que a maior parte de variação interindividual de escores de TDAH são atribuídos a fatores genéticas e, por conseguinte, a menor parte a riscos ambientais compartilhados (41,42). Estes estudos também contribuem com evidências de que a herdabilidade encontrada nos estudos é similar entre homens e mulheres e que os fatores genéticos de TDAH podem ser compartilhados e sobrepostos com fatores genéticos de outras condições de saúde mental, como espectro autista e transtorno de conduta, dentre outros (41).

As análises de genes candidatos e de associação ampla do genoma (Genome-Wide Association Studies - GWAS) são as abordagens mais utilizadas para estudar a genética de doenças complexas como o TDAH. Estudos com genes-candidatos são conduzidos quando se tem uma hipótese a priori de associação entre o transtorno e um gene ou polimorfismo. A desregulação dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgicos e monoaminergicos com circuitos complexos do Sistema Nervoso Central, incluindo áreas pré-frontal e basal do cérebro tem sido a principal hipótese neurobiológica para explicar os sintomas de TDAH (37,45). A maioria das

evidências para essa hipótese são derivadas de ensaios clínicos de tratamentos com estimulantes, que influenciam direta ou indiretamente nos níveis de dopamina no cérebro humano (46). Essa é a base que norteia o uso de psicoestimulantes no tratamento para TDAH, como por exemplo o metilfenidato, que atualmente é o fármaco de primeira escolha no Brasil para tratamento do TDAH na infância e na vida adulta. Essas hipóteses têm sido testadas em estudos com abordagem gene-candidado. Uma metanálise identificou a associação com marcadores dos seguintes genes: gene transportador de serotonina (*5HTT*), gene transportador de dopamina (*DAT1*), genes codificantes dos receptores de dopamina D4 (*DRD4*) e D5 (*DRD5*), gene do receptor de serotonina 1B (*HTR1B*) e um gene codificante de uma proteína reguladora da vesícula sináptica conhecida como SNAP25 (45). Apesar de ainda não ser identificado grande consistência que possibilite o consolidação dos achados encontrados (41), entre os genes mais associados ao TDAH na literatura estão aqueles envolvidos na neurotransmissão catecolaminanérgica, como os genes *DRD4, DRD5,DAT1* e o gene *CatecolO-Metiltransferase (COMT),* o qual codifica uma enzima que degrada a dopamina (42).

Estudos de associação em nível genômico (GWAS) com TDAH têm sido publicados desde 2010 (47,48). Apesar do baixo poder estatístico para a detecção de marcadores associados ao TDAH, sugestão de associação com marcadores relacionadas ao neurodesenvolvimento foram observadas, levando ao surgimento de diferentes hipóteses para explorar a neurobiologia do transtorno (41,42,47). Apenas recentemente foram identificados loci associados ao TDAH em nível genômico. Foi conduzido uma meta-análises de associação ampla do genoma com 10.183 casos de TDAH e 35.191 controles, oriundos da colaboração internacional de 12 estudos de coortes (Lundbeck Foundation Initiative for Integrative Psychiatric Research – iPSYCH; e 11 estudos colaboradores do consórcio de genética psiquiátrica Psychiatric Genomics Consortium - PGC) (49). Nesse estudo, Demontis et al. (2017) identificaram variantes estatisticamente significantes em nível genômico em 12 loci independentes, revelando

informações novas e importantes sobre a biologia subjacente do TDAH. Vários dos loci estão localizados em ou perto de genes que implicam processos neurodesenvolvimentais que são provavelmente relevantes para o TDAH, incluindo *FOXP2* e *DUSP6*. Integrando seus resultados com os de GWAS anteriores conduzidos sobre sintomas relacionados ao TDAH na população geral de crianças, os autores indicam que é fortalecida a ideia de que o diagnóstico clínico do TDAH é uma expressão extrema de um ou mais traços quantitativos hereditários, pelo menos, no que se refere ao risco genético variante comum (49). Além disso, foram identificados 38 fenótipos dos 220 testados cuja susceptibilidade genética de variantes comuns se mostrou correlacionadas com a de TDAH, incluindo transtorno depressivo maior, desfechos educacionais, fenótipos relacionados com obesidade, tabagismo, sucesso reprodutivo e mortalidade, sugerindo correlação genética entre as características já associadas em estudos epidemiológicos observacionais (49).

Contudo, fatores não herdáveis e ambientais também são importantes para o transtorno. Nesse sentido, também existem estudos na área genética que avaliam a correlação ou interação gene-ambiente e estudos epidemiológicos que avaliam a influência de fatores ambientais e comportamentais. Fatores de risco genéticos e ambientais coocorrem de modo não randômico, visto que características herdáveis podem criar um risco para exposição de determinados fatores de risco ambientais (42). Nesta lógica, os riscos genético e ambiental não seriam necessariamente distintos e certos genes poderiam aumentar a ocorrência de TDAH mesmo que indiretamente. Em contrapartida, estudo de interação gene-ambiente conduzidos com gêmeos e de adoção sugerem que a presença de um efeito genético de risco ou proteção depende da presença de um fator ambiental específico (42).

2.3.2. Fatores Ambientais e comportamentais

O Manual Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-V) menciona os seguintes fatores de risco consolidados para TDAH, além da herdabilidade: ser do sexo

masculino, crianças com muito baixo peso ao nascer (<1.500g), exposição precoce a drogas (i.e. uso de álcool, cigarro, drogas ilícitas e medicamentos psicoativos na gestação), lesões cerebrais, história de abuso infantil, negligência ou múltiplos lares adotivos (1,50). A exposição pré-natal ao tabaco também pode afetar a incidência de TDAH tanto por mecanismos intrauterinos quanto por aspectos psicossociais relacionados com o fato dos pais fumarem (50), bem como o uso de outras substâncias na gestação. A APA (2013) também reporta associação entre o transtorno e hábitos nutricionais (i.e. elevada ingestão de açúcares e cafeína e baixa ingestão de ômega 3) e infecções (e.g., encefalite), tanto em ambiente intrauterino quanto durante o desenvolvimento. Evidências da associação de TDAH e variáveis contextuais também são reportadas, tais como associação negativa com altitude e intensidade solar (51) e associação positiva com exposição a neurotoxinas (i.e. níveis elevados de chumbo) (1,50). Assim como outros transtornos psiquiátricos, viver em desvantagens socioeconômicas também podem ser questões relacionadas a ocorrência de TDAH (22), mesmo que estes sejam fatores que não apresentam tantas consistências na literatura.

O ciclo circadiano e os problemas de sono ao TDAH também estão entre as áreas mais pesquisadas para identificação de fatores de riso que possam auxiliar na detecção, prevenção e tratamento precoce do TDAH (52,53). Sabe-se que os distúrbios do sono podem causar problemas similares a sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade (17) e as queixas de tempo reduzido e privação do sono e transtorno de apneia são comuns em pacientes com TDAH (16). Todavia, ainda não está claro na literatura científica se os problemas de ciclo circadiano são efeitos secundários, se eles desempenham um efeito causal no transtorno ou se apresentam componentes herdáveis compartilhados com TDAH (17,54). Na seção de revisão de literatura do projeto são explorados evidências e os mecanismos que explicariam a associação.

2.4. Ritmo circadiano e Sono

O ritmo circadiano compreende um ciclo fisiológico subjacente a 24 horas que regula funções fisiológicas, incluindo metabolismo, temperatura corporal, secreção de hormônios e padrão de sono/vigília em seres humanos (55,56). Esse ciclo, é controlado por um sistema complexo de regulação molecular e é importante para muitos processos moleculares e comportamentais e, sobretudo, para a regulação dos padrões de sono. A manutenção do ritmo circadiano é controlada por um sistema circadiano endógeno com um percursor mestre, localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo anterior.

Os genes que regulam o ciclo circadiano formam uma família grande e heterogênea, que engloba os genes centrais: circadian-locomotor output-cycle kaput (*CLOCK*), period homolog 1, 2 e 3 (*PER1, PER2, PER3*), cryptochrome 1 e 2 (*CRY 1, CRY 2*), basic helix-loop-helix domain containing, class B2 (*BHLHB2*), casein kinase 1, epsilon (*CSNK1E*), timeless homolog (*TIM*), brain and muscle-Arntlike 1 (*BMAL1*) e receptores alpha RAR-related orphan (*RORA*) e beta (*RORB*). Os genes circadianos são responsáveis pela regulação do ciclo sono/vigília, a liberação de uma série de hormônios, incluindo cortisol e melatonina, e a variação na temperatura corporal central, os quais são os principais marcadores da ritmicidade circadiana (56,57). Outros genes que participam de cascatas mais distais da regulação do ciclo circadiano também são relatados na literatura e em bancos de dados genéticos, como *AK5, APH1A e RGS16* (KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2018).

Os ciclos envolvem uma série de passos de ativação e repressão de expressão gênica sincronizada. A proteína CLOCK (codificada pelo gene CLOCK) forma um heterodímero com BMAL1 (codificado pelo gene receptor Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, ARNTL). Este heterodímero se liga a elementos ativadores E-box a montante dos genes da família gênica Period (*PER1, PER2, PER3*) e Cryptochrome (*CRY1, CRY2*), ativando sua

transcrição. As proteínas PER e CRY heterodimerizam e reprimem sua própria transcrição através da interação física com os complexos CLOCK/BMAL1 (57) .

Os produtos proteicos desses genes representam um sistema de programação interna que interage com fatores de sincronização externos, chamados zeitgeber (58). Os zeitgebers externos, como luz solar, que é o principal deles, também são responsáveis por regulação e modificação do relógio biológico. Nesse sentido, as bases moleculares e celulares da ritmicidade circadiana consistem em regulações em níveis transcricional e traducional positiva e negativa dos genes circadianos (59). Além disso, o ciclo circadiano dos tecidos periféricos é coordenado a partir da relação do relógio biológico central e seus zeitgebers externos, e a expressão sincronizada de genes circadianos é essencial para a organização do ciclo de 24 horas (60,61).

Apesar de o ciclo circadiano apresentar 24 horas em humanos, existe uma grande variabilidade interindividual em relação ao ponto de início do ciclo circadiano mesmo em condições não patológicas. Assim, o início do ciclo circadiano dos indivíduos pode não se alinhar perfeitamente ao início do ciclo de 24 horas do relógio convencional e em uma população pode ser observado diferentes horários de ponto de início que influenciam no horário de sono de cada indivíduo. As preferências individuais por horários específicos de sono e atividade durante o período de 24 horas compreende o cronotipo de cada pessoa (62). O cronotipo pode ser dividido em três tipos: matutino, que compreende aquele indivíduo que tem preferência por dormir e despertar mais cedo; vespertino, que tem preferência por dormir e despertar mais tarde; e intermediário, o qual ajusta os horários de dormir com os sociais (63,64). Nesse sentido, o cronotipo tem sido considerado uma ferramenta útil para estudar os ritmos circadiano.

Na população geral, maior parte dos indivíduos têm preferências intermediárias com respeito aos horários de dormir e uma parcela menor apresenta cronotipos extremos matutino e

vespertino, respeitando distribuição normal (64). O relógio biológico interno de cada indivíduo é o regulador, porém variações genéticas e ambientais parecem influenciar os cronotipos (64). O cronotipo pode ser medido pelo ciclo de repouso e atividade usando actigráfo ou autorrelato, como com o instrumento Morningness/Eveningness Questionnaire que é considerado o padrãoouro nas escalas de autorrelato de cronotipo (65). De maneira geral, indivíduos de cronotipos vespertinos são mais propensos a alguns desfechos negativos em saúde na adolescência e vida adulta (65–69), tais como problemas emocionais, comportamentais, de conduta, desatenção, hiperatividade e depressão. Além disso, é comum observar que aqueles indivíduos com preferências noturnas apresentam maiores problemas de sono, tais como apneia do sono e insônia (65). O início e duração do sono nos dias livres são, por sua vez, um dos principais marcadores do cronotipo e do ciclo circadiano. Disfunções circadianas podem ser marcadas por atraso no ciclo de expressão de marcadores circadianos, como cortisol e melatonina, início atrasado do sono e, consequentemente, menores durações de sono.

Dormir é um processo ativo fundamental na manutenção de diversas funções vitais, tais como funções endócrinas, imunológicas e cognitivas (70,71). O sono é caracterizado como um estado de consciência caracterizado por atividade motora reduzida, diminuição de resposta à estimulação e por posturas corporais especificas (72). O sono parece ter um importante papel na restauração, termorregulação, repouso e consolidação da memória e do aprendizado, apesar de os estudos ainda serem muito controversos, e restrição no tempo de sono podem causar alterações significativas no funcionamento físico, ocupacional, cognitivo e social e repercutir na saúde e capacidade funcional do indivíduo (71). Segundo recomendações da Fundação Americana do Sono (National Sleep Foundation - NSF), a duração de sono varia entre as diferentes faixas etárias. Crianças pré-escolares (3 a 5 anos) devem dormir de 10 a 13 horas por dia, enquanto adultos jovens (18 a 25 anos) e adultos (26 a 54 anos) devem dormir entre 7 e 9 horas de sono por dia para que este cumpra sua função restauradora (73). Dormir um número

inferior de horas do que o recomendado têm sido associado a diversos desfechos negativos em saúde, tais como transtornos mentais no geral, hipertensão e obesidade (71). Disfunções circadianas e de sono além de poder ser um fator de risco, podem ser geradas por diferentes transtornos neuropsiquiátricos ou representarem um fator patofisiológico para o desenvolvimento destes transtornos (74).

No que diz respeito a aspectos genéticos de ciclo circadiano e de sono, estudos de genética clássica mostraram que o cronotipo apresenta herdabilidade de 12 a 42% (75–77). Entretanto, os componentes de genética molecular ainda não estão bem definidos. Estudos de associação de genes-candidatos relataram variação de cronotipos matutino e vespertino associada aos genes *CLOCK, PER1, PER2 e PER3* (78).

Recentemente, três estudos de GWAS foram publicados sobre ritmo circadiano e sono (79–81). Um deles investigou a maior amostra, composta por mais de 125 mil indivíduos europeus (provenientes do UK Biobank) e 90 mil indivíduos de ancestralidade europeia (amostra 23andMe) (80). Jones et al. (2011) identificaram 16 polimorfismos associados ao cronotipo (ser matutino, comparado a vespertino) e três associados a duração de sono na amostra do UK Biobank. Contudo, ao replicar seus achados na amostra do consórcio 23andMe, apenas 13 polimorfismos se mantiveram como resultados significativos (Tabela 1). Os achados indicaram associação entre os fenótipos e sítios próximos a genes conhecidamente envolvidos na regulação do ciclo circadiano, entre eles destacam-se as variantes rs516134, a 20kb do gene *RGS16* (regulator of G protein signalling 16), cujo papel parece ser central na definição do ciclo de 24 horas (82), e rs75804782, localizado a 100kb do gene *PER2*. Para duração de sono foram encontrados três loci associados, sendo duas novas variantes do gene *VRK2* (rs17190618 rs1380703) e uma já conhecida do gene *PAX8* (rs62158211). Neste estudo, a correlação genômica entre cronotipo e/ou duração de sono e diferentes condições de saúde, como obesidade e diabetes tipo II, foram testadas. Entretanto, isso não foi explorado para o TDAH,

bem como com outros transtornos psiquiátricos(80). Este é o único dos três estudos que disponibiliza publicamente as estatísticas sumarizadas da análise de associação genômica. Os outros dois GWAS também encontraram associação entre cronotipo e variantes próximas aos genes *AK5* (rs10493596 e rs76681500), *APH1A* (rs34714364 e rs10157197), *PER2* (rs55694368 e rs35333999) e *RGS16* (rs12736689 e rs1144566), além de encontrarem associação com variantes perto do gene *FBXL13* (rs3972456 e rs372229746), utilizando amostras europeias do 23andMe (n=89283) e UK Biobank (n=100420) (79,81).

Tabela 1: Resultados e descrição dos 13 marcadores estatisticamente significantes para ciclo circadiano (escores de cronotipo) e duração de sono em nível genômico reportados por Jones et al (2016) nas amostras de UK Biobank e 23andMe.

ID Variantes	**Cromossomo**	**Alelos A1/A2**	**Freq**	**Beta(SE)**	**Valor -P**	**Gene próximo**
rs516134	1:182,553,693	C/T	0.03	0.081 (0.011)	9.00E-13	*RGS16*
rs11162296	1:77,700,196	G/C	0.84	-0.037 (0.005)	2.00E-12	*PIGK, AK5*
rs10157197	1:150,250,636	G/A	0.6	0.025 (0.004)	1.00E-09	*PRPF3,TARS2*
rs372229746	7:102,158,815	G/A	0.55	0.028 (0.005)	4.00E-09	*ORAI2,RASA4*
rs75804782	2:239,316,043	T/C	0.88	0.030 (0.006)	3.00E-07	*PER2*
rs76899638	6:55,147,508	A/ATG	0.22	0.026 (0.005)	4.00E-08	*HCRTR2*
rs77641763	9:140,265,782	C/T	0.88	0.039 (0.006)	5.00E-11	*EXD3*
rs9961653	18:56,767,671	T/C	0.42	0.023 (0.004)	1.00E-08	*RAX,CPLX4, LMAN1*
rs2050122	1:19,989,205	T/C	0.2	0.028 (0.005)	2.00E-08	*HTR6*
rs70944707	2:24,257,444	C/CT	0.23	0.030 (0.005)	3.00E-08	*FKBP1B*
rs72720396	1:91,191,582	A/G	0.77	-0.025 (0.005)	1.00E-07	*CALB1*
rs12140153	1:62,579,891	G/T	0.9	0.039 (0.007)	7.00E-09	*INADL*

rs1075265	2:54,354,927	C/G	0.48	-0.025 (0.004)	2.00E-10	*PSME4, ACYP2*
rs62158211	2:114,106,139	G/T	0.79	-0.039 (0.005)	6E-16	*PAX8*
rs17190618	2:58,882,765	A/T	0.84	-0.033 (0.005)	1E-09	*VRK2*
rs1380703	2:57,941,287	A/G	0.62	0.025 (0.004)	8E-09	*VRK2*

Existem fatores socioeconômicos associados a hábitos de sono, como renda, escolaridade, aglomeração familiar, e compartilhamento de quarto e cama (71,83). Estes fatores estariam associados por afetarem higiene do sono (84), que compreende uma série de recomendações voltadas a facilitação do sono, incluindo manejo de luz, ambiente onde se irá dormir, alimentação, atividade física (85). Fatores socioeconômicos podem dificultar tanto na execução de recomendações quanto no acesso e conhecimento das mesmas. Fatores comportamentais estariam intimamente relacionados com padrões de sono, tais como alimentação (86) e atividade física e intervenções comportamentais voltadas para melhor adequação de hábitos de sono incluem orientações acerca destes comportamento, como reduzir consumo de açúcar, café e outros estimulantes e priorizar prática de exercícios físicos no início do dia (71). Adicionalmente, fatores relacionados a questões pré-natais e perinatais também são reportados como associados. Outros fatores já supracitados são aqueles relacionados com a de saúde, como uso de álcool e tabaco, obesidade, hipertensão e transtornos mentais, os quais estão associados ao sono (65,71,86), porém sua relação está fortemente susceptível a causalidadereversa.

Por fim, cabe destacar algumas definições conceituais. Por disfunções circadianas entende-se: síndrome do atraso de fase circadiana, síndrome do avanço de fase circadiana e disritmia circadiana que repercute nos tempos de sono e vigília e *jetlag*. Problemas do sono incluem o grupo de disfunções circadianas, distúrbios respiratórios de sono, de movimento, centrais de hipersonolência, insônias e parasonias (85). Contudo existem evidências de que cronotipo

vespertino e menores durações de sono também estão associados a desfechos de saúde negativos (65,71). A fim de facilitar a leitura, no presente projeto (principalmente na seção de objetivos e metodologia) será utilizado o termo padrões de sono para denotar durações de sono específicas (noturna e total), despertares noturnos, problemas de sono e também o cronotipo (entendendo que, por exemplo, ser matutino confere ao indivíduo a preferência de ir dormir e acordar mais cedo e isso reflete em um padrão de comportamento de sono).

3. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

A revisão bibliográfica sistemática foi conduzida em duas etapas. A primeira foi destinada a explorar a relação longitudinal entre padrões de sono e TDAH, afim de realizar o levantamento de evidências sobre a relação temporal entre as duas condições. Na segunda etapa, foi conduzida a busca sobre a relação entre aspectos genéticos e molecular do ciclo circadiano e fenótipo de TDAH. A seguir serão apresentadas as etapas separadamente, incluindo método utilizado na condução de cada uma e seus achados.

3.1. Relação longitudinal entre Sono e TDAH

Muitos estudos transversais e de caso-controle indicam a associação entre padrões de sono e TDAH. De forma geral, é indicado que muitos indivíduos com TDAH têm problemas relacionados com sono, incluindo dificuldade de iniciar o sono, sono interrompido, sono agitado e diminuição da eficiência do sono, quando comparados aos não acometidos (16,19,87). Contudo, ainda não são bem estabelecidas as relações de temporalidade e causalidade entre padrões de sono e ocorrência de TDAH. Ou seja, não há consenso entre os estudos se padrões de sono são fatores de risco, consequência ou agravantes para TDAH (17). Assim, estudos longitudinais são capazes de fornecer evidências importantes e mais robustas para compreender

essas relações temporal e de causalidade entre as variáveis. Nesse sentido, foi conduzida uma busca nas bases de dados PubMed e Web of Science, com os *MeSH Terms* para TDAH, sono e delineamentos longitudinais (Quadro 1) para compreender melhor a relação longitudinal entre estas duas condições. Foram incluídas pesquisas empíricas sobre a relação entre padrões de sono e TDAH, sem restringir para período de publicação. Foram excluídos aqueles estudos que não eram nos idiomas português, inglês ou espanhol, não apresentavam delineamento longitudinal e que avaliaram amostras clínicas.

Quadro 1. Apresentação das chaves de buscas utilizadas e número de trabalhos encontrados com cada chave em cada uma das bases de dados bibliográficas para a etapa 1 da revisão.

Chave de busca	Base	Encontrados
TS= ((ADHD OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity OR Attention Deficit Hyperactivity Disorders OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorder OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorders OR Deficit-Hyperactivity Disorder, Attention OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity OR Disorders, Attention DeficitHyperactivity OR ADDH OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder) AND (sleep OR circadian rhythm) AND (longitudinal OR cohort))	Web of Science	158
((((((((((((ADHD) OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorders) OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorder) OR Attention DeficitHyperactivity Disorders) OR Deficit-Hyperactivity Disorder, Attention) OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Disorders, Attention Deficit-Hyperactivity) OR ADDH) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder))) AND ((sleep) OR circadian rhythm)) AND ((longitudinal) OR cohort)	PubMed	243

A busca foi conduzida no dia 06/01/2018 e 6 estudos originais foram considerados elegíveis dos 317 artigos localizados (Figura 1). Dentre os estudos não selecionados, encontravam-se estudos que não avaliaram o tema de interesse, estudavam somente uma das sintomatologias (atenção ou hiperatividade), estudavam amostras clínicas, com delineamento transversais e de

casos-controles. Dos seis selecionados, cinco avaliaram o efeito de padrões de sono como exposição no desfecho TDAH e um avaliou o contrário (TDAH como exposição e problemas de sono como desfecho). As exposições de sono avaliadas foram sobretudo problemas de sono, avaliadas por escalas validadas, e duração de sono relatado pela mãe. Todos os estudos foram conduzidos em países desenvolvidos, como Inglaterra, Noruega, Espanha, Estados Unidos da América (EUA) e Austrália. Foi selecionado somente uma coorte retrospectiva, os demais estudos tratavam-se de coortes prospectivas. No Apêndice 1 é apresentado o quadro que apresenta os estudos incluídos nesta revisão.

Dois estudos utilizaram duração de sono como exposição para a ocorrência de TDAH. Na coorte de *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC) foi investigado a relação entre sono e TDAH em crianças (n= 8195) (88). O TDAH foi avaliado pela aplicação do DAWBA para os pais quando a criança tinha 7 anos de idade (intervalo de 90-11 meses). Os pais responderam sobre hábitos de sono aos 0,5; 1,5; 3,5; 5,75; 6,75; 9,58 e 11,7 anos de idade das crianças (equivalente a, respectivamente, 6, 18, 42, 69, 81, 115 e 140 meses) (88). Foi observado que aos, aproximadamente, 5, 6 e 9 anos de idade, os casos de TDAH apresentaram menor duração do sono total e apresentaram mais despertares noturnos (3 ou mais vezes), do que aqueles sem TDAH ($p<0,001$). A diferença na duração de sono foi maior aos ~6 anos, chegando a uma diferença absoluta de 15 minutos (IC95%:8–2), e de despertares noturnos foi maior aos ~9 anos (6,4% para grupo com TDAH *vs* 0,3% grupo sem TDAH). Nesse sentido, os autores indicam que padrões de sono, sobretudo duração de sono, podem ser um potencial endofenótipo para TDAH que pode auxiliar tanto na identificação precoce para potenciais intervenções quanto para melhor compreensão dos mecanismos causais (88).

Peralta et al. (2017) realizaram um estudo com objetivo mais amplo, de analisar a associação entre tempo gasto dormindo, assistindo TV, em atividades estimulantes e em atividade física aos 4 anos e incidência de TDAH e problemas comportamentais aos 7 anos

(n=817). Para avaliar o tempo gasto nas atividades supracitadas aos 4 anos, foi perguntado de maneira direta aos pais, enquanto a avaliação de TDAH aos 7 anos se deu por meio da escala *Conners' Parent Rating Scales (*CPRS) (usou-se de maneira numérica e com ponto de corte>65). Os autores encontraram que dormir mais do que 10h por dia aos 4 anos esteve associado a menor ocorrência de TDAH aos 7 (RR=0,97; IC95%: 0,95; 1,00; *p*=0,035). Esses achados poderiam ser explicados pelas evidências de benefício do sono no desenvolvimento de funções executivas – que desempenham papel central na sintomatologia do TDAH (89). Contudo, deve-se perceber que o intervalo de confiança da medida de associação desta relação contém o valor de nulidade(90).

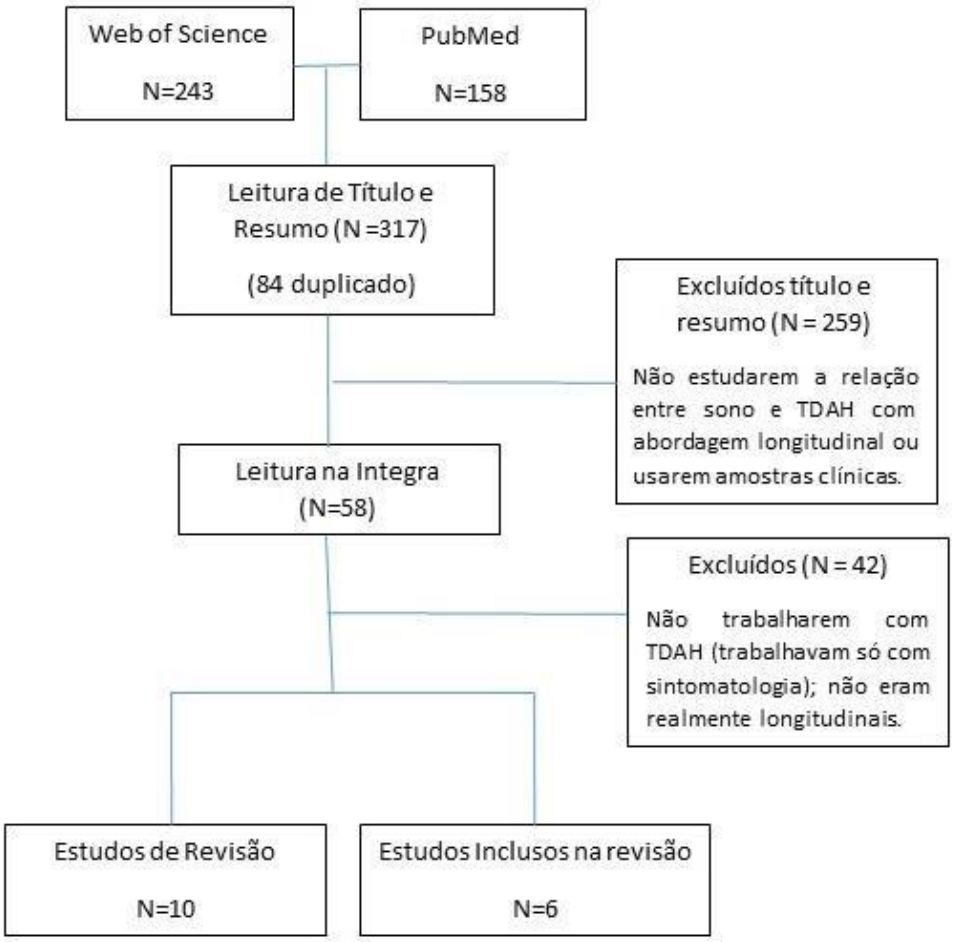


Figura 1. Fluxograma da revisão sistematizada com os descritores para TDAH, sono e delineamento longitudinal.

Os estudos que investigaram a associação de problemas de sono como exposição e TDAH como desfecho obtiveram achados semelhantes, evidenciando que problemas de sono estão associados ao TDAH em etapas posteriores da vida (91–93), independente da temporalidade do acompanhamento. Williams e Sciberras (2016) conduziram um estudo retrospectivo com dados da coorte australiana *Growing Up in Australia* para examinar diferenças de níveis e relações longitudinais entre problemas comportamentais de sono, desregulação emocional e regulação da atenção em toda a infância para crianças com e sem TDAH (n=4109). Neste estudo, TDAH foi avaliado por meio de relato de diagnóstico clínico pelas mães e mensurados os sintomas utilizando a subescala de hiperatividade e desatenção do SDQ (ponto de corte ≥8 para meninos e ≥ 6 para meninas) aos 8 e 9 anos de idade. Para as análises, os autores criaram três grupos: aqueles com diagnóstico de TDAH (relatado pela mãe), aqueles casos cujas mães não relataram diagnóstico, mas apresentavam sintomatologia de TDAH de acordo com o escore de hiperatividade/desatenção da subescala específica do SDQ e aqueles sem TDAH. Foram investigados retrospectivamente problemas de sono, desde o nascimento até os sete anos de idade. A avaliação de problemas de sono se deu por meio do relato da mãe sobre em que medida seus filhos apresentavam problemas de sono, tendo como opções de resposta: não apresenta (1 ponto), apresenta problemas leves (2 pontos), apresenta problemas moderados (3 pontos) e problemas severos (4 pontos). As respostas foram utilizadas de maneira contínua e dicotômica (juntando as categorias "não apresenta" com "apresenta problemas leves" e "apresenta problemas moderados" com "apresenta problemas severos").

Neste estudo, crianças com diagnóstico e sintomatologia TDAH apresentavam com maior frequência problemas de sono moderados/severos a partir dos 2 anos até os 7 anos de idade ($p<0,01$ em todas as idades) (93). Enquanto nos grupos de diagnóstico e sintomatologia de TDAH os problemas de sono se mantiveram relativamente constantes ao longo do tempo, a

prevalência de problemas de sono no grupo sem o transtorno foi decaindo. Os autores identificaram também que problemas de sono no início da infância estão correlacionados com

problemas de sono ao longo do tempo ($r_{0\text{-}1 \text{ e } 2\text{-}3 \text{ anos}}$=0,30; $r_{2\text{-}3 \text{ e } 4\text{-}5 \text{ anos}}$=0,40; $r_{4\text{-}5 \text{ e } 6\text{-}7 \text{ anos}}$= 0,45). Maiores índices de problemas de sono estiveram negativamente correlacionados com regulação atencional aos 2-3 anos para o grupo sem TDAH e aos 4-5 e 6-7 anos para ambos os grupos com e sem TDAH, além de serem associados a maior desregulação emocional aos 4-5 anos de idade. Os autores concluem que, apesar de problemas de sono e de regulação emocional e atencional precoce estarem relacionados com TDAH aos 8-9 anos, estes marcadores não parecem muito sensíveis ou específicos, uma vez que muitas crianças apresentaram essas condições precoces e não desenvolveram o transtorno. Por outro lado, foi identificado a associação entre problemas de sono persistentes desde a infância e TDAH e que problemas de sono em crianças com e sem TDAH precedem desregulação emocional, o que pode contribuir para função atencional reduzida, tornando importante diagnosticar e tratar problemas de sono na infância (93).

Armstrong et al. (2014) investigaram a associação entre padrões de problemas de sono e persistência com sintomas de saúde mental em uma coorte prospectiva que acompanhou indivíduos desde os 4,5 anos até os 18 anos de idade. Os problemas de sono foram avaliados aos 4,5 e 9 anos de idade pelo questionário Hábitos de Sono das Crianças (*Childrens's Sleep Habits Questionnaire)*, o qual contempla insônia, movimentos durante sono, hipersonia, parassonias e uma questão sobre ronco. Este era aplicado para as mães e, para cada problema de sono, era avaliada a frequência semanal. Foram considerados casos com insônia ou outro problema de sono aquelas crianças cujas mães reportavam a presença de um ou mais sintomas de 5 a 7 vezes por semana. Ainda, foram considerados com problemas de sono persistentes aqueles que apresentavam sintomas em ambas idades avaliadas (4,5 e 9 anos). Os sintomas de saúde mental foram avaliados aos 4,5, 9 e 18 anos. Aos 4,5 anos de idade do participante, foi

aplicado o Questionário de Comportamento Pré-escolar (*Preschool Behavior Questionnaire* - PBQ) para as mães. Este instrumento avalia hiperatividade e distração por quatro itens (impaciência, inquietude, baixa concentração e curto período de atenção). Aos 9 anos, foi aplicado para mães, professores e crianças o Questionário de Saúde e Comportamento de McArthur (*McArthur Health and Behavior Questionnaire* - HBQ), enquanto aos 18 anos o adolescente respondeu à versão apropriada para idade do mesmo questionário HBQ. Os autores avaliaram TDAH através da média dos domínios de desatenção e de hiperatividade/impulsividade do HBQ, derivados de uma análise de componentes principais aos 9 anos e outra aos 18 anos. A persistência de insônia aos 4,5 e 9 anos esteve associada a sintomatologia de TDAH aos 9 anos (p=0,001), bem como a persistência de movimentos durante o sono (p=0,008). Ademais, movimentos persistentes durante o sono na infância estiveram associados a sintomas de TDAH aos 18 anos, mesmo após controlar para sintomas de hiperatividade/desatenção aos 4,5 anos (F=6,68; p=0,001).

Apenas um estudo avaliou essa relação utilizando qualidade de sono como desfecho e TDAH como exposição. Este estudo, realizado com indivíduos de uma coorte de nascimentos inglesa *Environmental Risk Longitudinal Twin Study* (n=2232 gêmeos), investigou se as crianças com TDAH apresentariam baixa qualidade de sono na vida adulta-jovem e se essa associação estava relacionada ao TDAH na infância ou TDAH na vida adulta-jovem (94). O diagnóstico de TDAH foi acessado aos 5,7,10,12 e 18 anos de idade, através de entrevistas (considerando os critérios do DSM-IV). Qualidade de sono foi investigada apenas aos 18 anos pelo Índice de Qualidade de Sono de *Pittsburgh* (*Pittsburgh Sleep Quality Index* – PSQI), o qual maiores escores indicam pior qualidade de sono. Os autores observaram efeito do TDAH em pior qualidade de sono na idade jovem-adulta quando houve TDAH na infância (β=0,07; IC95%:0,02; 0,12) e TDAH foi persistente (β =0,19; IC95%: 0,14; 0,25). TDAH persistente se manteve associados mesmo após ajuste para comorbidades psiquiátricas e insônia materna e

quando foi conduzida análise excluindo os participantes que faziam uso de medicação para tratar sintomatologia de TDAH (β=0,12; IC95%: 0,06; 0,17). Aos estimar correlação entre problemas de sono e TDAH nos pares de gêmeos homo e dizigóticos, os autores também estimaram que os problemas de sono e TDAH foram associados tanto por questões genéticas (55%) quanto por influências ambientais não compartilhadas (45%).

Como exposto nos poucos trabalhos longitudinais realizados até o momento, existem evidências tanto de que problemas de sono precoce são capazes de afetar a incidência de TDAH, quanto o contrário, apesar de o número de estudos ser desigual e as evidências mais robustas apontarem que problemas de sono afetem TDAH. Em relação a bidirecionalidade, um estudo de coorte norueguesa (n=795) observou tanto que insônia aos 4 anos está associada a TDAH aos 6 (β=0,47; DP=0,19), como TDAH aos 4 anos está associado a insônia aos 6 anos, mesmo quando ajustado para insônia aos 4 anos (RO= 1,08; IC95%: 1,02, 1,15) (92). Contudo, Steinsbekk e Wichstrom (2015) destacaram que não foi possível confirmar sua hipótese de bidirecionalidade entre problemas de sono e TDAH com a metodologia utilizada, pois trata-se de um estudo observacional, e por isso seria necessário explorar melhor a temporalidade desta relação através de estudos experimentais e estudos genéticos.

Na busca sistemática foram encontradas 10 revisões, porém nem todas exploram especificamente a relação entre sono e TDAH de interesse deste projeto. Muitas revisões mencionavam aspectos do sono somente como fatores associados ao TDAH ou suas características, mas sem objetivo de estudar a relação entre estas condições (95–98). Outras revisões estudaram a relação entre problemas de sono e transtornos do desenvolvimento ou sintomatologia emocional, atencional e comportamental (15,99,100) ou consequências cognitivas, comportamentais e funcionais do sono inadequado (101) de maneira ampla e não focada nas condições de interesse deste trabalho. Na revisão de Cassof et al. (2012) são explorados os mecanismos hipotetizados que poderiam explicar a associação entre disfunções

de sono e TDAH. Os autores descrevem como padrões de sono, tais como restrição/privação de sono, distúrbios respiratórios de sono, síndrome das pernas inquietas e insônia, podem estar relacionados com o desenvolvimento da sintomatologia de TDAH por meio de alterações em funções executivas ou do sistema dopaminérgico e circadiano (16). Recentemente, uma revisão foi publicada com intuito de estudar a relação entre TDAH e insônia, por perspectiva transversal, longitudinal e experimental (insônia como efeito do tratamento medicamentoso para TDAH) (87). Apesar de encontrarem que insônia estaria associada ao TDAH em populações clínicas e comunitárias em estudos transversais, Wynchanck et al. (2017) encontraram que não existe consistência nos achados de que crianças que têm TDAH teriam insônia no futuro. Nesse sentido, os autores destacam que são necessários mais estudos longitudinais para explorar a temporalidade da associação encontrada.

Cabe destacar ainda que nenhum estudo de metanálise sobre esta associação foi encontrado e isto pode ter relação com a heterogeneidade metodológica e dificuldade de agrupar as diferentes medidas reportadas nos estudos sobre o tema. Essa dificuldade de agrupar informações devido à variedade metodológico dos estudos também foi observada quando se trata de conduzir estudos de revisão sistemática e metánalise sobre a prevalência comunitária de TDAH (2). Ademais, apesar de existirem muitos estudos de revisão e algumas pesquisas empíricas, ainda faltam evidências sobre a relação longitudinal entre as duas condições (16). Não é clara a relação longitudinal entre disfunções de sono e sintomatologia de TDAH. Para tanto, novos estudos de coorte são importantes, principalmente com metodologias robustas e com diferentes medidas de sono (102).

3.2. Relação entre aspectos genéticos do ciclo circadiano e TDAH

Foi conduzida uma busca sistemática com o intuito de explorar os trabalhos publicados na literatura acerca da relação entre aspectos genéticos do ciclo circadiano e TDAH, que permita a compreensão desta relação. A busca foi realizada nas bases de dados bibliográficas PubMed

e Web of Science, utilizando os descritores indexados para TDAH e suas variações de termos MeSH, junto com "*sleep behavior genes*" e "*circadian genes*" (Quadro 2). Foram incluídos todos tipos de trabalhos que investigaram a relação de interesse, contando que fossem escritos em português, inglês ou espanhol.

Quadro 2. Apresentação das chaves de busca utilizadas e número de trabalhos encontrados com cada chave em cada uma das bases de dados bibliográficas para a etapa 2 da revisão (estudos genéticos).

Chave de busca	Base	Encontrados
((((((((((ADHD) OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorders) OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorder) OR Attention DeficitHyperactivity Disorders) OR Deficit-Hyperactivity Disorder, Attention) OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Disorders, Attention Deficit-Hyperactivity) OR ADDH) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder)) AND Sleep Behavior Genes	Pubmed	6
((((((((((ADHD) OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorders) OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorder) OR Attention DeficitHyperactivity Disorders) OR Deficit-Hyperactivity Disorder, Attention) OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Disorders, Attention Deficit-Hyperactivity) OR ADDH) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder)) AND CIRCADIAN GENES	Pubmed	23
((ADHD OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity OR Attention Deficit Hyperactivity Disorders OR Attention DeficitHyperactivity Disorder OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorders OR Deficit-Hyperactivity Disorder, Attention OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity OR Disorders, Attention DeficitHyperactivity OR ADDH OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder) AND (Sleep Behavior Genes))	Web of science	22

((ADHD OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity OR Attention Deficit Hyperactivity Disorders OR Attention DeficitHyperactivity Disorder OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorders OR Deficit-Hyperactivity Disorder, Attention OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity OR Disorders, Attention DeficitHyperactivity OR ADDH OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder) AND (CIRCADIAN GENES))	Web of Science	45

Foram encontrados 84 artigos pela busca, a qual foi conduzida no dia 06/01/2018 (Figura 2). Destes, foram incluídos 10 artigos originais e 12 artigos de revisão que exploraram a relação de interesse nessa etapa da revisão. Dentre as pesquisas empíricas, 6 delas foram conduzidas com humanos (Apêndice 2) e 4 com modelos animais (Apêndice 3). Dentre os estudos conduzidos com humanos, cinco foram conduzidos com uma abordagem genecandidato e de associação com variante genética e apenas um foi com delineamento para investigar expressão gênica. Nenhum estudo foi conduzido em países latino-americanos. Todos estudos com modelos animais selecionados avaliaram expressão gênica e foram, sobretudo, com modelos de roedores para avaliar o efeito de medicamentos utilizados no tratamento para TDAH na expressão gênica de genes do ciclo circadiano (n=4). Apenas um estudo foi conduzido com modelo animal de peixe (*zebrafish*) mutante.

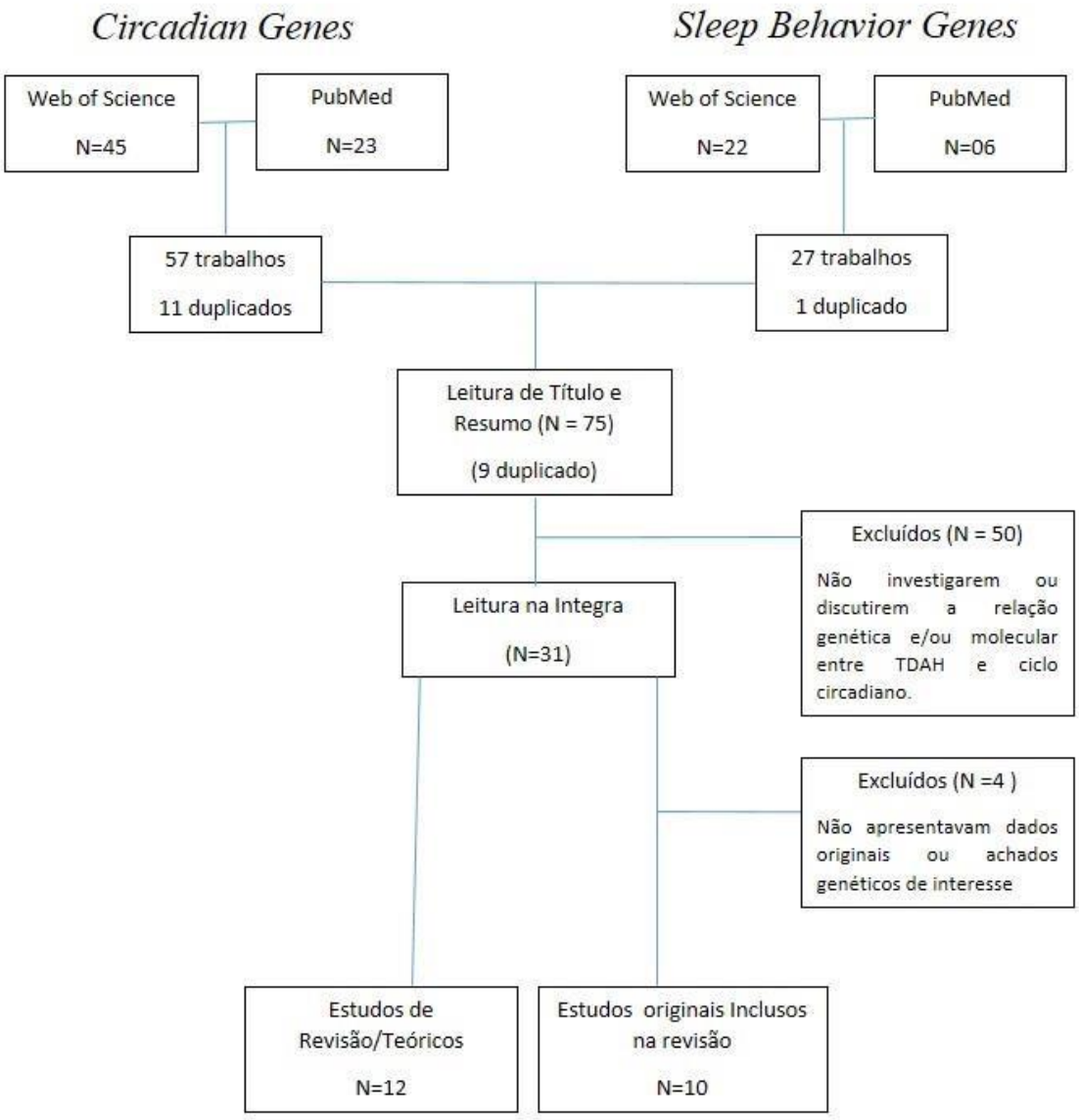


Figura 2. Fluxograma da revisão sistematizada com os descritores de TDAH, ritmo circadiano e genes de comportamento de sono.

Dentre os estudos conduzidos com humanos do tipo gene-candidato, dois foram conduzidos em amostras europeias, dois em europeus e asiáticos (103,104) e um em uma amostra apenas asiática (coreanos) (105). O estudo mais antigo encontrado foi o publicado em 2005, por Van der Heijden et al.,com a hipótese de que o alelo de 4 repetições do polimorfismo do tipo *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) de 54pb no éxon 18 do gene *PER3* está associado à insônia idiopática crônica relacionada com o TDAH. Os autores investigaram o

polimorfismo *PER3 VNTR* em um grupo de 10 crianças com TDAH diagnosticadas com início precoce de insônia no período inicial da noite (antes dos 3 anos de idade) e secreção de melatonina tardio, comparando-os com 10 controles clínicos sem insônia. Contudo, não foi encontrada a associação esperada e os autores justificaram a ausência de associação devido ao pequeno tamanho amostral e ainda é possível que outros polimorfismos dentro do gene sejam mais importantes que o avaliado. Além disso, a manifestação da secreção de melatonina tardia no TDAH associado a insônia no período inicial da noite também pode ser influenciada por fatores ambientais ou comportamentais ou outros fatores genéticos, como outros marcadores, e isso pode ser explorado em futuras pesquisas (106).

Para investigar mais detalhadamente os genes anteriormente associados ao TDAH e ampliar a análise para genes candidatos, Brookes et al. (2006) conduziram uma análise de 51 genes em uma amostra de 674 famílias (filhos, irmãos e pais) europeias com TDAH do tipo combinado, pertencentes ao projeto de *Multisite ADHD Gene* (projeto IMAGE). Os genes candidatos foram selecionados com base na abordagem de biologia de sistemas, sendo selecionados genes envolvidos na regulação de rotas de neurotransmissores (dopamina, norepinefrina e serotonina) e seis genes relacionados com ritmo circadiano (não especificado pelos autores quais). O gene *PER2* esteve entre os genes com um ou mais *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) associados ao TDAH. As associações foram observadas tanto em nível de marcadores individuais (p=0,017) quanto em nível de haplótipo (p=0,016) (103).

O gene mais estudado na relação entre TDAH e sono foi o gene *CLOCK*, investigado por três estudos com abordagem gene-candidato. Esses estudos investigaram o efeito do SNP rs1801260 na região 3′ não traduzida (3'UTR) do gene *CLOCK* no TDAH (54,104,105). A variante rs1801260 (3111T/C) está localizada em uma região de grande importância para a estabilidade, expressão e função do mRNA, estando localizada em um sítio de interação com microRNA. Essa variante já foi relacionada a cronotipo vespertino e disfunções circadianas

(57). Kissling et al. (2008) estudaram este efeito em sintomas de TDAH, em adultos e sintomas avaliados retrospectivamente na infância (por autorrelato). Neste estudo, foi encontrada associação entre portadores do alelo T e o número de sintomas presentes de TDAH relatados pelo indivíduo ou obtidos pela entrevista Wender-Reimherr na vida adulta e na infância (WURS-K). A associação encontrada na infância foi menor (T=7,4; p =0,019) do que a observada em adultos com escores autorrelatados (T=22,8; p<0,001) e do WURS-K (T=21,4; p<0,001) (54). Além disso, os autores identificaram que a diferença relativa entre ter um ou dois alelos T só atingiu significância para os sintomas de hiperatividade/impulsividade autorrelatados, sendo que o nível de significância foi maior ao comparar ambos os genótipos homozigotos (CC vs. TT). De maneira resumida, os resultados de Kissling et al. (2008) sugerem que o alelo T deste polimorfismo é um fator de risco para TDAH em adultos, ao avaliar população da Europa Ocidental e da Alemanha. Xu et al. (2010) estudaram duas amostras de famílias do Reino Unido (n=180) e Taiwan (n=212) com TDAH diagnosticado aos 5-15 anos e observaram um aumento de transmissão do alelo T do SNP rs1801260 na amostra taiwanesa e para as amostras quando combinadas. Todavia, esta associação não foi encontrada quando analisaram apenas a amostra do Reino Unido (104). De maneira geral, os dados de Xu et al. (2010) corroboram com os achados de Kissling et al. (2008), sugerindo que o alelo T do polimorfismo rs1801260 pode ser um alelo de risco no desenvolvimento do TDAH, mas nesse caso, especialmente na população taiwanesa.

Jeong et al. (2014), por vez, testaram o efeito total do polimorfismo em sintomas de TDAH e o efeito mediador do grau de preferência noturna dos indivíduos (cronotipo) na associação. Para este fim, genotiparam o polimorfismo rs1801260 do gene *CLOCK* em uma amostra de 1.289 adultos coreanos saudáveis e, simultaneamente, mediram as preferências diurnas e sintomas relacionados ao TDAH usando a Escala composta de *Morningness* (CSM) e *Wender Utah*

Rating Scale-25 (WURS-25), respectivamente. A versão reduzida, com 25 itens, do WURS-25 avalia retrospectivamente a sintomatologia de TDAH experimentada antes dos 12 anos de idade. O nível de preferência de atividades (cronotipo) foi mensurado pela escala de 13 itens CSM, a qual maiores escores indicam maior preferência por atividades diurnas/matutinas. Primeiro, os autores observaram uma associação entre o rs1802160 e as pontuações de WURS-25 para os homens, mas não para as mulheres (p=0,019). Logo, as pontuações totais do WURS-25 foram correlacionadas negativamente com os escores de CSM para ambos os sexos, indicando a relação entre traços de TDAH e preferência noturna (homens: r=-0,182, p=5,93x10^{-5}; mulheres: r=-0,084, p=0,015). A inclusão do escore CSM como variável mediadora não levou a redução substancial da força da associação entre os escores de WURS25 e rs1801260. Ainda, não foi observada associação entre o escore CSM e o gene *CLOCK*. Os dois últimos achados negativos sugeriram que o grau de preferência da noite não é mediador da associação entre o gene *CLOCK* e as características relacionadas ao TDAH, apesar de as evidências indicarem associação entre traço de TDAH e o rs1802160 do *CLOCK* para os homens da amostra (105).

Apenas um estudo de expressão gênica foi encontrado com humanos (59). Os autores examinaram aspectos moleculares, endócrinos e comportamentais associados ao ritmo circadiano, em adultos com TDAH (n=13) e controles saudáveis pareados por idade e sexo (n=19). Baird et al. (2012) demonstraram que no grupo com TDAH existe significante disfunção não apenas na secreção de fatores endócrinos relacionados ao ciclo circadiano, mas também na expressão circadiana do gene *CLOCK* e na organização circadiana do comportamento medida por actígrafo. Os autores reportaram que os genes *BMAL1* e *PER2* mostraram expressão rítmica compatível com o ritmo circadiano no grupo controle, mas não no grupo TDAH. Foi encontrado também uma clara ritmicidade na secreção de melatonina no grupo controle e uma perda da mesma no grupo com TDAH. Essa perda de ritmicidade devese

provavelmente à amplitude reduzida do ritmo da melatonina, embora os níveis máximos de melatonina ocorram aproximadamente ao mesmo tempo do que no grupo controle. Além disso, o escore de sintomas de TDAH segundo DSM-IV esteve inversamente correlacionado com a amplitude e o ritmo percentual de *PER2*, indicando uma relação entre a força da expressão rítmica do gene *CLOCK* e as classificações clínicas do TDAH. Por fim, os autores concluem que o TDAH nos adultos está relacionado com mudanças significativas no sistema circadiano, ocasionando uma diminuição da duração e qualidade do sono e que terapias para modulação nos ritmos circadianos poderiam representar uma alternativa terapêutica para o TDAH (59).

Considerando os trabalhos com modelos animais, somente um dos estudos utilizou modelo de animal mutante para obter evidências que genes do ciclo circadiano influenciariam no comportamento mímico para TDAH. Este tipo de modelo para TDAH produzido através de mutagênese de genes relacionados ao ciclo circadiano fornecem evidências adicionais relacionando ambas características. Huang et al. (2015) criaram um modelo animal para explicar o TDAH com *zebrafish* com gene *per1* mutado, Huang et al. (2015) observaram que a mutação desse gene em *zebrafish* levou a mimetização do fenótipo relacionado com TDAH. Os autores ainda proveram evidências moleculares de expressão gênica relacionando essa mutação a desregulação dopaminérgica no animal. Portanto, esse gene teria uma função no comportamento de hiperatividade e impulsividade, bem como padrão similar a desatenção.

Existem ainda estudos de modelos animais conduzidos para avaliar o efeito de medicações utilizadas para o tratamento de casos com TDAH na expressão gênica (107–109). Este tipo de pesquisa contribui na investigação de mecanismos subjacentes no tratamento farmacológico, que, por vez, são evidências de associação entre alterações na expressão gênica de genes do ciclo circadiano e redução do comportamento mímico de TDAH. O'Keeffe et al. (2012) examinaram o efeito da atomoxetina no ritmo circadiano, no comportamento livre em períodos de escuridão/luz constantes e na expressão gênica do tecido cerebral em camundongos.

Foi indicado que a atomoxetina pode gerar mudança no ritmo circadiano locomotor ($p<0,001$) e redução na expressão gênica do *Clock e c-Fos* ($p<0,001$), existindo ainda interação entre a droga e exposição a luz para expressão do gene *Clock*. Nesse sentido, os autores sugerem que a droga tem potencial de alterar a fase circadiana e possivelmente uma parte do potencial terapêutico par TDAH da droga se dê por meio da modulação do ritmo circadiano (109). Outro estudo conduzido com camundongos também investigou o efeito da atomexetina na expressão de genes relacionados ao ciclo circadiano no tecido cerebral (107). Neste, foram examinados os efeitos da administração diária da atomexetina e do metilfenidato por 7 dias nos padrões diurnos de expressão gênica de *Per1, Per2, Clock* e c-Fos em diferentes regiões do cérebro de ratos machos. Foi identificado que as drogas apresentam efeitos diferentes em algumas regiões, enquanto em outras atuam da mesma maneira no que diz respeito a modulação da expressão desses genes. Por exemplo, a administração de metilfenidato promoveu uma regulação positiva da expressão do *Per1* na região do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (NPH), enquanto atomoxetina promoveu uma regulação negativa deste gene na mesma região. Todavia, em algumas regiões o efeito da metilfenidato e atomoxetina foi igual (107). No NSQ e no NPH, a administração de ambas as drogas gerou uma redução na expressão do *Per2*, e no *caudate putamen* houve um aumento na expressão de *Per2* e de c-Fos. Segundo os autores, esses efeitos no ciclo circadiano provavelmente possam estar relacionados com o efeito terapêutico para o TDAH, indicando a relação entre a expressão gênica destes genes circadianos e a sintomatologia do transtorno (107).

Recentemente, Dela-Peña et al. (2017) conduziram um estudo para examinar a expressão gênica diferencial no córtex pré-frontal em um modelo animal de roedores que é comumente utilizado para TDAH (ratos espontaneamente hipertensivos), comparado a ratos controles. O modelo animal de TDAH apresentou 21 genes com regulação positiva da expressão e 36 genes com regulação negativa na área do córtex pré-frontal, comparado aos controles.

Entre os genes diferencialmente expressos, o gene circadiano *Per2* apresentou redução no nível de expressão de RNA mensageiro no córtex pré-frontal. Além disso, os autores investigaram a resposta comportamental ao tratamento e identificaram que anfetamina aliviou a hiperatividade no modelo animal de TDAH, enquanto induziu a hiperatividade nos controles e que houve uma correlação positiva entre a expressão gênica do *Per2* e atividade motora no modelo (108).

Os artigos de revisão encontrados na busca estiveram sobretudo preocupados em descrever e explicar a relações genéticas e moleculares do sono e do ciclo circadiano e desfecho de saúde negativo no geral ou na saúde mental, incluindo TDAH (57,74,110–113). Um estudo encontrado também revisou desde aspectos genéticos a metabólicos para apresentar um panorama da diferença do TDAH entre crianças e adultos, indicando que os estudos com adultos têm trabalhado mais com a relação entre TDAH e genes envolvidos no ciclo circadiano (114). Outro estudo trabalhou com a relação circadiana com mecanismos da dopamina, salientando pouca atenção tem sido dada a essa relação e seu papel na fisiologia do TDAH e transtornos aditivos, o que poderia fornecer insights para novos tratamentos (115). Apenas três estudos tiveram intuito principal estudar a relação entre TDAH e ritmo circadiano de maneira direta (18,116,117). Nessas revisões são apontados que aspectos gerais dessa relação (revisadas evidências observacionais de associação e levantado hipóteses explicativas). A relação genética e molecular entre TDAH e ciclo circadiano foi melhor explorada pelos estudos de Coogan (18,116). Nestas revisões os autores indicam que existe um número pequeno de estudos de associação gênica reportam associação entre polimorfismo no genes circadianos e sintomas de TDAH, bem como o observado nesta etapa da revisão conduzida para o projeto. Contudo, também destacam que apesar do número reduzido, são encontradas evidências da associação de TDAH com genes circadianos, como *CLOCK*, *PER1*/2 e *BMAL1* (18,116).

Todavia, todos os estudos de revisão encontrados focaram em aspectos mais gerais ou na relação genética e molecular dos principais genes responsáveis pela manutenção do ciclo

circadiano e TDAH. Nenhuma revisão apresentou como consolidada a relação entre genes circadianos ou de sono e TDAH. Além disso, nenhum estudo encontrado esteve preocupado em estudar a relação entre TDAH e outros marcadores de ciclo circadiano recentemente identificados por estudos de GWAS recentemente publicados (79–81), como, por exemplo, os genes *RGS16* e *HCRTR2* e outros classicamente relacionados com as rotas circadianas, como a família de genes *CRY* .

3.3. Mecanismos causais na relação entre TDAH e ciclo circadiano

Nos últimos 25 anos, um grande grupo de modelos explicativos de TDAH foram desenvolvidos na perspectiva da neuropsicologia. Estes modelos são pautados na ideia de que sintomas de desatenção e impulsividade/hiperatividade observados em pessoas com TDAH seriam devido a um déficit em funções executivas, reguladas pela região do córtex pré-frontal do cérebro humano (26,118–120). Dentre esse grupo, a teoria unificadora de Barkley (1997) foi a mais citada e é considerada a mais influente (26,119). A teoria associou especificamente a inibição de quatro funções executivas com TDAH: memória de trabalho, autorregulação motivacional-afetiva, internalização do discurso/fala e reconstrução (i.e., análise comportamental e síntese) (118). Com a inibição vista como o déficit primário, essas deficiências na função executiva secundária acabaram por levar a déficits no controle motor, incluindo uma performance ineficiente. Baseados nesta ideia, secundariamente, foram presumidas anomalias nos circuitos cerebrais (pré) frontal-temporais e modulado pelos níveis de catecolaminas (119).

O córtex pré-frontal também é uma das regiões reguladoras do ritmo circadiano. O ciclo de sono/vigília é fundamental na manutenção de cognição, comportamento e emoção humana (17,121). Da mesma maneira, uma das hipóteses que explicam a relação entre padrões de sono e TDAH é a do impacto do sono em funções neurocognitivas relacionadas com controle executivo e processamento de informação emocional, as quais são reguladas pelo córtex

préfrontal (15,16). Em outras palavras, determinados padrões de sono, como menor duração de sono, despertares noturnos, problemas de sono, estão relacionadas com manifestações neurocomportamentais, neurocognitivas e funcionais que se sobrepõem com as características do TDAH. Evidências para essa hipótese incluem o resultado de Kidwell et al. (2017), que identificaram um papel moderador da função executiva na associação longitudinal entre problemas de sono identificados aos 3 anos de idade e TDAH em crianças de idade escolar. Em nível celular, a privação de sono está associada à redução da plasticidade sináptica, aumento do estresse oxidativo no hipocampo e morte neuronal, processos que podem afetar as funções neurocognitivas (17). Portanto, déficits em processos atencionais, de regulação emocional, impulsividade de motricidade são exemplos destes sintomas identificados tanto em casos de restrição de sono e/ou curta duração de sono quanto de TDAH (19,101) e podem estar relacionados com a função neurocognitiva do sono.

Vias dopaminérgicas também são compartilhadas em ambas condições (TDAH e disfunções circadianas), além de estarem relacionadas com o NSQ , centro cerebral coordenador da atividade circadiana (115). Existem evidências de que a dopamina é importante na modulação de desempenho em tarefas de funções executivas, bem como maior atividade dopaminérgica está envolvida na manutenção do estado de vigília (16,55). Existem diversas evidências de que a psicofisiologia do TDAH esteja relacionada com sistema dopaminérgico, além do fato que a maioria dos psicofármacos utilizados no tratamento para TDAH agem no sistema dopaminérgico (122,123), sobretudo com receptores de dopamina D4. Ademais, evidências indicam que menores níveis de dopamina cortical estão relacionadas com descontinuidade de sono em casos de TDAH (16). Estes mecanismos dopaminérgicos envolvidos tanto no TDAH quanto do ritmo circadiano poderiam explicar o efeito da incidência solar na correlação e observado entre ocorrência de TDAH indicada por estudos ecológicos (51), bem como explicar o mecanismo envolvido nessa relação.

Face à alta herdabilidade estimada para o TDAH (124), é plausível relacionar o transtorno com o ciclo circadiano por vias/mecanismos genéticos, além daqueles relacionados com sistema dopaminérgico (116). As condições (TDAH e padrões de sono) podem apresentar associação por compartilharem marcadores genéticos. Isto quer dizer que ao invés de uma das condições levar a outra, existiria um grupo gênico que aumentaria a susceptibilidade de ambas condições e, consequentemente, estas estariam associadas. Essa hipótese ainda não está suficientemente testada, mas estudos de genes-candidatos (54,103,104) já identificaram a associação de diagnóstico de TDAH com polimorfismos no gene *CLOCK*, por exemplo, o qual é o principal regulador do ciclo sono/vigília (57). Também são encontrados na literatura evidências da associação de TDAH com gene *PER1/2/3* (18), o qual também desempenha função importante na manutenção dos ritmos circadianos e padrões de sono. Outra possível explicação é que a genética possa ser uma via pela qual sono afeta as funções neurocognitivas relacionadas com fenótipo de TDAH (17). Contudo, Um et al. (2017) apontam que ainda são necessárias mais pesquisas que investiguem se padrões de sono provem uma suscetibilidade intrínseca para TDAH e podem servir como potenciais preditores para o transtorno e que estudos genéticos nesta área serviriam para aprimorar a compreensão desta relação e mecanismos envolvidos.

Além de estarem associados, Kooji et al. (2013) levantam a hipótese que a relação entre padrões de sono e TDAH pode estar envolvida com outras condições de saúde, uma vez que disfunções circadianas são capazes de afetar uma série de aspectos fisiológicos. Ou, os efeitos de disfunções circadianas e de sono gerariam desequilíbrio homeostático e impactos negativos no prognóstico de casos de TDAH (17). No caso da obesidade, por exemplo, o hormônio do apetite pode não estar sincronizado, o que faz com que muitos casos de TDAH não consumam café da manhã por falta de apetite e acabem compensando a ingestão de alimentos mais tarde durante o dia (125). Ademais, em estudos em adultos saudáveis, foi demonstrado que após uma

noite de sono curta, os indivíduos faziam escolhas alimentares mais pobres (isto é, maior ingestão de carboidratos), aumentavam o apetite e apresentavam, entre outros valores sanguíneos, glicose plasmática desfavorável, insulina, leptina (hormônio anorexígeno) e níveis de cortisol (17,117,126). Nessa perspectiva, pode-se compreender que estilo de vida pouco saudável seria resultado do atraso no relógio biológico interno, apesar de que o estilo de vida pouco saudável também seja frequentemente observado nos casos de TDAH (ou seja, tabagismo, abuso de álcool e drogas) e pode contribuir também para resultados negativos na saúde do indivíduo (117). Cortese e Penalver (2010) também apontam que obesidade e fatores associados a ela (como transtorno do sono e apneia) podem se manifestar como sintomatologia de TDAH, mesmo que essa teoria ainda tenha sido pouco explorada na literatura.

Uma possível explicação para coocorrência entre determinados padrões de sono e problemas de saúde mental é que eles compartilham fatores de risco (92). Além de aspectos genéticos mencionados acima, a idade é um fator que pode influenciar na relação entre TDAH e sono. Bogdan e Reeves (2016) avaliaram a associação entre duração de sono e diagnósticos de TDAH autorrelatados em uma coorte de adultos norte-americanos (n=30.858). Apesar de não haver interação significativa entre idade e duração de sono no modelo para TDAH (p=0,19), em sua análise ajustada estratificada por idade foi identificado *odds* para TDAH aumentado para o grupo de 18-29 anos para sujeitos que reportaram dormir ≥ 9h (OR = 1.56, 95% CI 1.13, 2.15) comparado com o grupo referência (8h de sono). Também foi encontrada associação entre dormir ≤ 6h e TDAH para aqueles com 30-39 anos (OR = 1.80, 95% CI 1.28, 2.54) e com de 50 anos ou mais (OR = 2.09, 95% CI 1.42, 3.10) (127). Ou seja, foi encontrado que tanto períodos curtos como longos de duração de sono podem ser fatores que aumentem o *odds* para TDAH, e isso varia nos estratos de idades. Contudo, os autores também não encontraram significância no termo de interação entre sexo biológico e duração de sono (p = 0,81). Gênero também é um fator que está relacionado com ambas condições e pode interagir na relação entre

padrões de sono e TDAH, porém Bogdan e Reeves (2016) também não encontrarem evidências de significância em seus dados ao testar essa interação.

É relevante destacar que os achados supracitados e hipóteses propostas pelos autores demonstram a complexidade da relação entre fenótipos de TDAH e disfunções circadianas e de sono. Hvolby (2015) destaca em seu estudo de revisão que a relação entre TDAH e sono é uma relação complexa, que pode ser bidirecional, a qual pode ser modulada por interação com medicações usadas para tratar TDAH, comorbidades psiquiátricas e uso de medicações relacionadas. Mayes et al. (2009) notaram que crianças medicadas têm maior dificuldade de pegar no sono quando comparadas aqueles não medicados, apesar de também indicarem que a prescrição de medicação pode ser um dos marcadores para severidade de TDAH. A maioria dos casos de TDAH também apresentam outra condição de saúde mental (128). Em torno de 75% das crianças e adolescentes diagnosticadas com TDAH apresentam um transtorno comórbido, o que dificulta e as vezes até impede o diagnóstico e o tratamento ou piora o prognóstico do paciente (24). Nesse sentido, ao estudar casos de TDAH, a exclusão de casos com comorbidades psiquiátricas parece ser uma desvantagem por dois motivos: 1. Excluir-se-iam quase todos casos de TDAH; 2. Devido ao alto nível de comorbidades observado no TDAH, ao excluir estaríamos estudando uma população não representativa. Por outro lado, manter estes casos pode confundir as associações encontradas. Portanto, ao se investigar a relação entre TDAH e sono, é importante levar em consideração comorbidades e uso de medicação e entender a dificuldade de isolar os efeitos de comorbidades e medicações na relação entre ciclo circadiano/sono e TDAH mesmo quando é conduzido controle nas análises. Ademais, ainda que limitadas, existem evidências de bidirecionalidade (92,129) neste relação, o que torna mais difícil distinguir em qual sentido parte a associação observada (se sono prediz TDAH ou viceversa). Poucos estudos conduzem análises longitudinais e conseguem identificar a direção dessa relação. Contudo, em um estudo onde foram revisadas 22 pesquisas longitudinais que

investigavam associação entre problemas regulatórios, de internalização e externalização na infância, foi identificado que que problemas regulatórios na infância, incluindo sono, estavam associados a problemas externalizantes e TDAH no futuro (130), indicando a maior plausibilidade desta direção causal, bem como achados de outra revisão recentemente publicada (17).

Devido à natureza observacional dos estudos sobre sono e TDAH, não é possível tomar conclusões sobre a causalidade. Estudos experimentais, como ensaios clínicos controlados poderiam fornecem evidências nessa relação, contudo, apresentam importantes limitações quando se trata de generalização dos achados e em seu desenvolvimento. Ainda, questões éticas, em alguns casos, podem inviabilizar a execução desse tipo de estudo. Recentemente, estudos de randomização mendeliana (RM) têm sido utilizados com objetivo de fortalecer a inferência causal sobre a relação entre fatores de risco modificáveis e desfechos (131).

3.3.1. Randomização Mendeliana

O termo RM foi introduzido no contexto de estudos sobre a eficácia do transplante halogênico de medula óssea no tratamento da leucemia mieloide aguda, cenário no qual a condução de ensaios clínicos aleatorizados não é factível e a comparação direta de transplantados e não transplantados está sujeita a viés de seleção. A base teórica da RM advém das duas Leis de Mendel (132).A Primeira Lei ou Lei de Segregação, indica que os pares de alelos se separam ou segregam durante a formação de gametas e se unem aleatoriamente na fertilização, o que originará em uma característica herdada. A Segunda Lei de Mendel ou Lei da Segregação Independente, implica que a herança de uma característica é independente de outra ou aleatória em relação à outra, em nível de divisão celular (meiose). Dessa maneira, a abordagem de RM baseia-se no princípio da atribuição aleatória do genótipo de um indivíduo de seus genótipos parentais que ocorre na concepção e é análogo à alocação aleatória de um tratamento em ensaios controlados com intenção de tratar (Figura 3) (133–135). A razão para

utilizar a abordagem RM é superar a confusão residual, a causalidade reversa ou o erro de medida da exposição, que ocorrem frequentemente em estudos observacionais e pode influenciar seus resultados.

A utilização de variantes genéticas como *proxy* de características fenotípicas é a base para essa abordagem. Esse método reduz a probabilidade de encontrarmos associações espúrias, considerando que a distribuição populacional dos polimorfismos não está associada a fatores socioeconômicos e comportamentais, que frequentemente confundem as estimativas dos

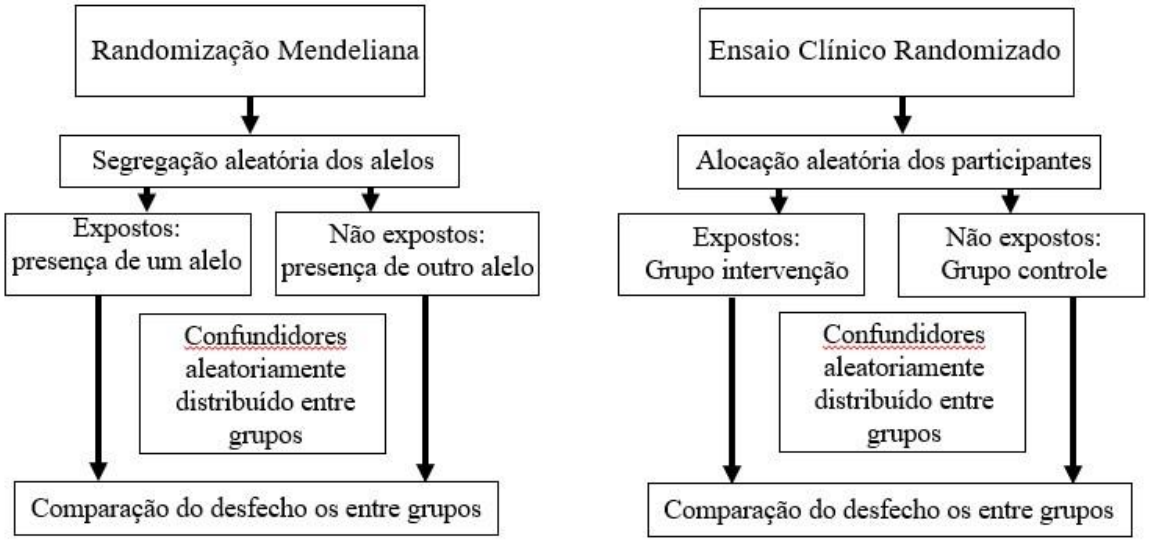


Figura 3. Comparação entre os delineamentos Randomização Mendeliana e Ensaio Clínico Randomizado. Adaptado de Ebrahim e Smith, 2003.

estudos epidemiológicos observacionais (131). Nesse sentido, a RM torna possível estimar o efeito causal em situações em que há confundimento entre exposição e desfecho e que, portanto, a associação entre eles não reflete uma relação de causa e efeito. Ademais, essa abordagem possibilita ser investigada relações bidirecionais, possibilitando testar se exposição causa desfecho de interesse ou vice-versa.

A lógica é baseada em havendo uma relação de causa e efeito entre uma exposição e um desfecho, espera-se que polimorfismos que produzam variações nos níveis dessa exposição estejam associados ao risco de ter o desfecho (136). Para tanto, é utilizado o método de

variáveis instrumentais, o qual para ser aplicado requer o cumprimento de alguns pressupostos. Os três pressupostos fundamentais são: (1) a variável instrumental está associada à exposição; (2) a variável instrumental não é associada a confundidores da associação entre exposição e desfecho e (3) a variável instrumental é condicionalmente independente do desfecho, dada exposição e confusão, ou seja, todo o efeito da variável instrumental sobre o desfecho é mediado pela exposição (Figura 4) (131).

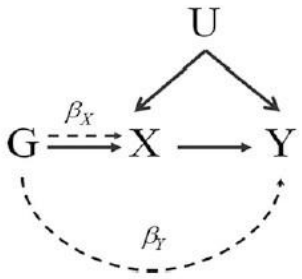


Figura 4. Gráfico acíclico dirigido (DAG) ilustrativo dos pressupostos de uma variável instrumental em um estudo de Randomização Mendeliana. A exposição (X) é associada de maneira causal com o desfecho (Y) se: (1) a variável instrumental (G) é associada com X; (2) G é independente de qualquer fator de confusão (U); e (3) não existe associação entre G e Y, exceto por X. As linhas pontilhadas representam o coeficiente de regressão para o efeito de G no desfecho (β*y*) e na exposição (β*x*). Adaptado de Dimou,e Tsilidis, 2008.

Essa abordagem tem fornecido importantes evidências para compreensão etiológica de diversas condições de saúde (137). Em relação ao sono, por exemplo, foi identificado que há uma redução no *odds* de ser uma pessoa diurna em medida que aumenta o número de cigarros fumados por dia, bem como existe um aumento no número de cigarros e redução no *odds* de parar de fumar para pessoas com insônia, indicando bidirecionalidade na relação (138). Entretanto, não foi estabelecida relação causal entre o consumo de cafeína e o sono (139). Apenas um estudo foi encontrado em relação ao TDAH, o qual utilizou-se do método de RM para testar o efeito causal direto de TDAH no aproveitamento escolar revelou uma associação entre sintomas de TDAH e desempenho educacional independente de fatores genéticos e

ambientais compartilhados (140). Além disso, tem se encontrado outros achados importantes na área de saúde mental, como o estudo de RM que sugeriu que o uso de *cannabis* está associado ao aumento de risco para esquizofrenia (141).

Contudo, existem alguns desafios no cumprimento dos pressupostos nesta abordagem. Um deles é encontrar variáveis instrumentais fortemente associadas à exposição de interesse, uma vez que um único polimorfismo raramente explica uma porção importante de determinado fenótipo. O uso de variáveis instrumentais fracas pode levar a uma menor precisão nas estimativas ou até mesmo a estimativas enviesadas (142,143). Outro desafio é a estratificação populacional, a qual ocorre quando existem subgrupos dentro da população de estudo que tenham diferentes frequências dos alelos de interesse e que concomitantemente tenham diferente risco de ter o desfecho, o que fere o segundo pressuposto, levando a associações espúrias entre o genótipo e o desfecho na população de estudo (144). Em alguns casos envolvendo pleiotropia horizontal ou variantes genéticas em forte desequilibro de ligação, o terceiro pressuposto é o que seria violado, bem como em outros casos em que a relação não tem relação temporal clara (143).

Existem quatro principais tipos de RM: a) RM padrão, utilizando uma amostra; b) RM de duas amostras; c) RM bidirecional; d) RM de dois passos com mediação. O primeiro (RM padrão), foi a mais utilizada até 2011, no qual se investiga apenas uma amostra para obter informações da VI, exposição e desfecho. A segunda (RM de duas amostras), apresenta a vantagem de execução e por isso tem crescido o seu uso, uma vez que pode ser difícil obter medidas na mesma amostra. Com esta abordagem é possível inferir causalidade empregando somente dados sumarizados disponibilizados por grandes estudos de GWAS e isso tem o tornado o método de RM mais popular (137). Os outros dois tipos estão mais relacionados com o objetivo do estudo comumente são combinados com os dois primeiros. A RM bidirecional testa uma única variável como exposição e desfecho de uma outra variável de interesse, afim

de inferir relações complexas as quais não se expressão em uma só direção. Por último, a TD de dois passos com mediação é utilizada para para avaliar se um traço intermediário é mediador de uma relação causal entre VI e desfecho (137).

4 JUSTIFICATIVA

Existe um aumento na prevalência e incidência de TDAH nas últimas décadas que pode ser uma questão de preocupação de saúde pública (6). Apesar de existirem evidências de que mudanças nos critérios diagnósticos possam explicar esse aumento (145), Polanczyk et al. (2014) ressaltam que este aumento também se deve ao fato deste ser um transtorno de etiologia pouco conhecida. Assim, estudos que visem explorar a etiologia e fatores predisponentes para o transtorno são necessários.

Padrões de sono que incluem curta duração, despertares noturnos, problemas de sono e presença de disfunções circadianas são comuns em casos de TDAH (16,19,87), porém essa relação ainda é pouco compreendida, sobretudo no que diz respeito a relação causal e mecanismos subjacentes na susceptibilidade de TDAH. A sobreposição de sintomas, sistemas neuroquímicos e neuroanatômicos envolvidos no ciclo circadiano, sono, atenção e hiperatividade têm sido estudadas, porém ainda não são claras as vias pelas quais as duas condições se relacionam e qual a direcionalidade desta relação, tornando necessário mais trabalhos sobre o tema (19). Poucos estudos exploram de maneira longitudinal a associações entre TDAH e sono e um número ainda menor apresenta um delineamento robusto que forneça fortes evidências causais e mecanismos envolvidos nesta relação. Alguns pesquisadores na área indicam que disfunções no relógio circadiano podem ser fator importante para explicar a alta coocorrência de problemas de sono e transtornos psiquiátricos, como TDAH, bem como o sistema circadiano pode ser alvo terapêutico para estas condições psiquiátricas e comorbidades físicas e psicológicas (116,146).

O TDAH é um transtorno com início precoce e sintomas com grande impacto na vida dos pacientes durante a adolescência e a idade adulta. Portanto, a identificação de endofenótipos e fatores de risco poderia auxiliar na detecção precoce e prevenção do TDAH (52,53). Estudos que examinem a contribuição de padrões de sono e seus marcadores genéticos na determinação do fenótipo de TDAH também podem fornecer evidências que auxiliem na compreensão da relação entre as duas condições (18). Até o momento, poucos estudos com genes candidatos exploraram tais mecanismos e uma análise genômica abrangente se faz necessária. A utilização dos dados recentemente publicados sobre susceptibilidade genética a cronotipo matutino e à duração do sono em um contexto poligênico emerge como abordagem razoável para explorar essa questão no TDAH (80,81). Ainda, os estudos disponíveis sobre o tema apresentam limitações consideráveis, tais como pequenos tamanhos amostrais, heterogeneidade na avaliação do desfecho e ajuste inadequado para a estratificação populacional. Investigar o efeito de genes envolvidos no ciclo circadiano na susceptibilidade ao TDAH e entender quais genes estão envolvidos pode auxiliar para a compreensão etiológica do transtorno, bem como subsidiar o planejamento e delineamento mais eficiente de estratégias preventivas e intervenções de tratamentos.

A escassez de conhecimento acerca da etiologia e marcadores biológicos do TDAH dificulta o diagnóstico, compreensão do transtorno e busca de tratamento e prevenção (17). O número de estudos epidemiológicos acerca do TDAH na América do Sul ainda é inferior ao número na América do Norte, Europa, Ásia e Oriente médio (6). Estudos que explorem fatores de risco em um país como Brasil, com população miscigenada, localizado na América do Sul e de baixa/média renda, se tornam importantes para compreensão do fenômeno nesta realidade de países em desenvolvimento (6,147). A partir do conhecimento de preditores, como curta duração, despertares e problemas de sono, poderiam surgir novas ideias em relação aos procedimentos diagnósticos e de intervenções para prevenção e tratamento de TDAH. Além

disso, apenas recentemente foram identificados marcadores genéticos para ciclo circadiano e duração de sono (80,81),o que torna viável a condução de pesquisas com dados genéticos disponíveis. Nesse sentido, o presente estudo tratará de investigar a relação longitudinal entre TDAH e sono, tanto pela abordagem observacional, quanto pela abordagem genética, afim de contribuir para o conhecimento de preditores e ampliar o conhecimento sobre a relação entre estes dois fenótipos.

5 OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral:

Investigar associação entre padrões de sono e TDAH por meio de uma revisão sistemática e de dados originais em perspectivas observacional e genética nas Coortes de Nascimentos de Pelotas de 1982 e 2004.

5.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar associação entre duração de sono (noturno e total), despertares noturnos e problemas de sono nos primeiros anos de vida (1,2 e 4 anos) e a ocorrência de TDAH aos 11 anos de idade na coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004;
2. Investigar associação entre trajetória de duração de sono (noturno e total) e problemas de sono aos 1, 2 e 4 anos e ocorrência de TDAH e sua sintomatologia aos 11 anos de idade na coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004;
3. Revisar sistematicamente os achados de estudos de associação entre genes de ritmo circadiano e fenótipo de TDAH.
4. Testar a relação causal entre padrões de sono e TDAH, utilizando RM de duas amostras;
5. Identificar a direção da relação causal entre entre padrões de sono e TDAH, utilizando RM de duas amostras.

6 HIPÓTESES

6.1. Hipótese geral

Padrões de sono estarão associados ao TDAH na literatura e por meio de perspectivas observacional e genética nas Coortes de Nascimentos de Pelotas de 1982 e 2004.

6.2. Hipóteses específicas:

1. Menor duração de sono (noturno e total), despertares noturnos e problemas de sono aos 1, 2 e 4 anos estarão associados a maior ocorrência de TDAH aos 11 anos;
2. Trajetórias de menor duração de sono (noturno e total) e problemas de sono nos primeiros anos de vida estarão associadas ao TDAH aos 11 anos;
3. A literatura apresentará evidências de associação entre genes circadianos e fenótipo de TDAH;
4. Haverá relação causal entre padrões de sono e TDAH;
5. Padrões de sono serão preditores de TDAH.

7 MÉTODOS

A apresentação da metodologia dos três estudos planejados foi dividida em três itens. No primeiro item (7.1), é descrito o estudo original e observacional que será conduzido com dados da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004 (Artigo 1: *Padrões de sono no início da vida e Transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade na adolescência: Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004*). Na seção seguinte (7.2), é descrita a metodologia no estudo de revisão sistemática (Artigo 2: *Relação entre aspectos genéticos do ciclo circadiano e Transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade: uma revisão sistemática*). No terceiro segmento, é apresentada a metodologia a ser utilizada na condução do Artigo 3 (*Existe relação*

causal entre padrões de sono e TDAH? Um estudo de Randomização Mendeliana de duas amostras), o qual será conduzido por uma perspectiva genética, com dados disponíveis de estatísticas sumarizadas.

7.1. MÉTODOS ESTUDO 1

Padrões de sono no início da vida e Transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade na adolescência: Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

7.1.1. A Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas

A Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas é um estudo longitudinal, de base populacional e natureza prospectiva. A Coorte inclui todos os nascimentos de 1º de Janeiro até 31 de Dezembro do ano de 2004 identificados através de visitas diárias às maternidades da cidade de Pelotas (RS/Brasil). As mães elegíveis para Coorte, aquelas que moravam na zona urbana de Pelotas ou no Bairro Jardim América do município vizinho, Capão do Leão, eram entrevistadas logo após o parto (abordagem perinatal). O estudo recrutou 4.263 participantes no nascimento, com menos de 1% de recusas no primeiro momento. Foram realizados oito acompanhamentos até o presente momento, começando no perinatal e sendo o último aos 11 anos de idade (2015).

No primeiro, segundo e quarto ano de idade as taxas de retenção foram, respectivamente, 94,0; 93,5 e 92,0% (definidas como número de sujeitos rastreados além do número de mortes no período, dividido pelo total de número de nascimentos) (148). No sexto ano essa taxa foi de 90,2%, sendo que as taxas de acompanhamento foram de pelo menos 87% em todos os subgrupos da amostra, com exceção do grupo de crianças nascidas de mães sem educação, das quais 83,7% foram localizadas (149). Aos onze anos, a taxa de acompanhamento foi de 86,6%,

que nesse acompanhamento os dados de transtornos psiquiátricos são disponíveis para 3562 adolescentes (84,2% da coorte original) (23). O fluxograma de acompanhamento dos períodos a serem utilizados no presente projeto é apresentado na Figura 5. Os critérios de elegibilidade para fazer parte do presente projeto são fazer parte da Coorte e não ter transtorno neurológico grave.

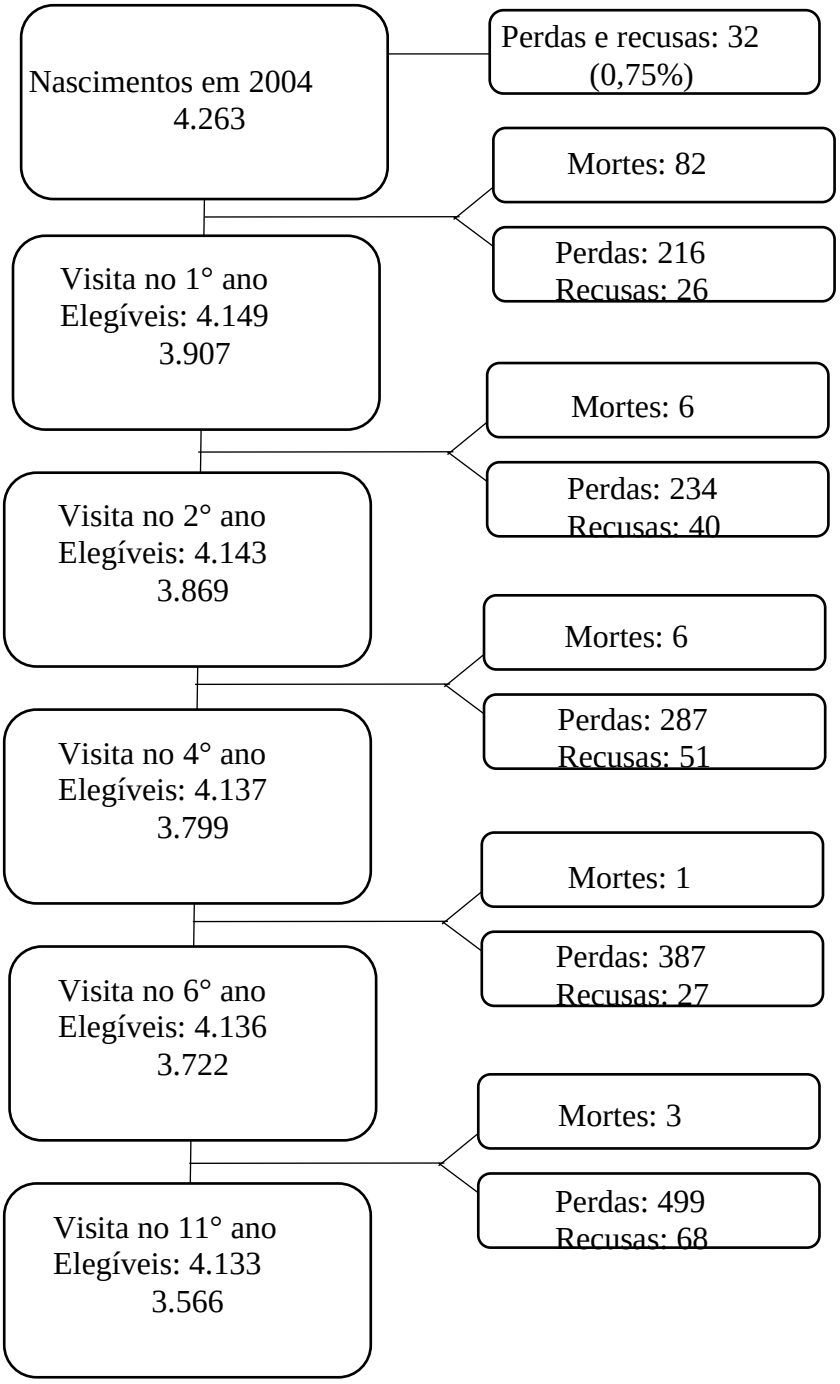


Figura 5. Fluxograma de acompanhamentos da Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas.

Adaptado de Santos et al., 2014.

7.1.2. Avaliações e instrumentos de coleta de dados

Neste projeto, dados do 1°, 2°, 4° e 11° ano de idade serão utilizados para investigar a relação entre exposições que englobarão aspectos relacionados ao sono e ocorrência de TDAH. Como exposições serão utilizados dados sobre sono (duração, despertares noturnos e problemas de sono) coletados até o 4° ano de idade. O desfecho TDAH será avaliado e testado nas análises de duas maneiras: *screnning* positivo (escala de desatenção e hiperatividade do SDQ) e diagnóstico de TDAH (DAWBA) aos 11 anos de idade do participante. Abaixo são descritas as variáveis de exposição, desfecho e covariáveis, bem como a forma e quando foram coletadas na Coorte de 2004.

Exposições

Informações de sono foram coletadas através de relato das mães referentes ao comportamento das crianças nas últimas duas semanas, aos 1, 2 e 4 anos do participante. Um resumo das variáveis de sono que serão utilizadas neste projeto é apresentado no Quadro 3. Tanto duração de sono total quanto duração de sono noturnas serão criadas a partir do relato da mãe de tempo em que a criança dormiu nas últimas duas semanas (horário que foi dormir, horário que acordou, se dormiu de dia e quanto tempo durou a soneca). Para coletar despertares noturnos utilizaram-se três perguntas: “nas últimas duas semanas a criança acordou durante a noite?”, “quantas noites nas últimas duas semanas?” e “quantas vezes por noite?”. Estas perguntas possibilitam identificar as crianças que tem despertares noturnos (forma dicotômica da variável) e nº de despertares noturnos (forma numérica). Problemas se sono foram coletados apenas no 2º e 4º da criança, por meio de cinco perguntas de sim/não feitas para a mãe sobre o sono da criança nas últimas suas semanas. Era perguntado se a criança tinha pesadelos/terrores noturnos, sono agitado, dificuldade para dormir, se a criança acordava à noite e acordava cedo.

Essa escala de problemas de sono foi construída a partir de variáveis consideradas como bons indicadores de potenciais problemas de sono e foi utilizada por outros estudos (83,150).

Quadro 3. Apresentação das variáveis de sono que serão utilizadas no Artigo 1 e foram coletadas na Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas.

Variável	**Acompanhamento**	**Forma de coleta**	**Perguntas utilizadas**	**Construção da variável**	**Operacionalização**
Duração de sono noturno	1, 2 e 4 anos	Relato materno	"Nas últimas duas semanas, a que horas a criança foi para a cama?" e "A que horas a criança acordou?" (horas e minutos).	Diminuição horário de acordar do horário de dormir	Numérico
Duração total de sono (considerando noite e sonecas diurnas)	1, 2 e 4 anos	Relato materno	"Nas últimas duas semanas, mais ou menos, quantas vezes a criança dormiu durante o dia?" e "Quanto tempo mais ou menos a criança dormiu a cada vez" + perguntas de duração de sono noturno	Soma da duração de sono noturno com sono diurno (nº de dias que a criança dormiu de dia*quanto tempo dormiu cada vez)	Numérico
Despertares noturnos	1, 2 e 4 anos	Relato materno	"Nas últimas duas semanas a criança acordou durante a noite?", "Quantas noites nas últimas duas semanas?" e "Quantas vezes por noite?"	Pergunta filtro (sim/não) Multiplicar o n° de noite e vezes por noite para obter n° de despertares nas últimas duas semanas	Dicotômico Numérico
Problemas de sono	2 e 4 anos	Relato materno	Perguntas de sim/não: a criança tem pesadelos/terrores noturnos, a criança tem sono agitado, a criança experimenta dificuldade para dormir, a criança acorda à noite, e a criança acorda cedo	Soma das respostas sim (1) e não (0) das 5 perguntas (escore de 0-5)	Dicotômico (0=não/>0=sim) Numérico

Desfecho

Aos 11 anos foram coletadas informações de saúde mental por meio de uma entrevista as mães ou cuidadores por psicólogas treinadas, utilizando os instrumentos *The Strengths and Difficulties Questionnaire* - SDQ e *Development and Well-Being Assessment* - DAWBA. No presente projeto, o desfecho TDAH será explorado das duas maneiras: rastreio de sintomas (subescala de desatenção/hiperatividade do SDQ) e diagnóstico de TDAH (subescala de TDAH do DAWBA).

O SDQ é um questionário aplicado aos pais e cuidadores para a triagem comportamental de crianças de 3 a 16 anos (151). Consiste em 25 questões, divididas em 5 subescalas (problemas emocionais, problemas de conduta, problemas com pares, comportamento social e desatenção/hiperatividade), com 5 questões cada (Anexo 1). Os cinco itens que compõem a escala de desatenção/hiperatividade do SDQ foram deliberadamente selecionados para derivar a desatenção (dois itens), hiperatividade (dois itens) e impulsividade (um item) porque esses são os três principais domínios de sintomas para um diagnóstico de atenção segundo DSM-IV (152). É uma ferramenta extensamente avaliada (153) com confiabilidade e validade demonstradas (152). A ferramenta foi criada e validada em inglês, porém existe uma versao traduzida para a língua portuguesa, validada e amplamente utilizada em amostras brasileiras (154). Na Coorte de Nascimento de Pelotas, 2004, identificou-se que 367 meninos (20,61%) e 189 meninas (11,34%) com escores≥7 pontos, aos 11 anos e estes serão considerados casos no presente projeto.

O DAWBA consiste em uma entrevista diagnóstica estruturada que avalia a presença relacionados a diferentes categorias nosológicas de acordo com critérios internacional utilizados (CID e DSM) em indivíduos com idades entre 5 e 17 anos (155). O módulo de avaliação de TDAH no DAWBA é uma dentre as 16 seções do instrumento, que consiste em 31 perguntas e inclui classificações de "qualquer transtorno de TDAH", bem como os subtipos

clínicos de TDAH (hiperativo-impulsivo, desatento e combinado) (Anexo 2). O DAWBA tem sido amplamente utilizado como ferramenta de avaliação clínica e validado em uma amostra brasileira (154). A identificação de casos com o DAWBA deve ser conduzida por especialista em saúde mental, de acordo com a sintomatologia e impacto da mesma indicado na aplicação do teste, de acordo com critérios diagnósticos do DSM e CID vigentes. Cabe destacar que considerando os critérios do DSM-5 e CID-10, respectivamente, 144 (4%; IC95%: 3,4-4,7%) e 120 (3,4%; IC95%: 2,5-4,0%) das crianças da Coorte foram identificadas como positivas para TDAH aos 11 anos e, no presente projeto, serão considerados casos aqueles detectados pelos critérios do DSM-5 (23).

Covariáveis

As covariáveis a serem utilizadas para controle nas análises foram coletadas por meio de um questionário aplicado para as mães logo após o nascimento dos participantes da Coorte. São elas: renda familiar relatada pela mãe (em reais), aglomeração familiar (nº pessoas/nº de cômodos), idade materna (anos completos), escolaridade materna (anos completos), *proxy* de saúde mental materna (autorrelato de sentir-se deprimida ou tendo "problema de nervos" durante a gestação), uso de álcool na gestação (autorrelato), uso de tabaco na gestação (autorrelato), idade gestacional (avaliada por três métodos: a data do último período menstrual, por ultrassonografia (quando disponível) e pelo método de Dubowitz, peso ao nascer (as crianças eram pesadas pela equipe do hospital com balanças pediátricas digitais com precisão de 10g, calibradas semanalmente para pesos padrão) e sexo do participante (148).

7.1.3. Aspectos Éticos

Os seguimentos e estudos da Coorte de 2004 a serem utilizados neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas. As mães e responsáveis concordaram em participar de cada

acompanhamento assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em cada uma das visitas. Aos 11 anos, os adolescentes também consentiram em participar do estudo firmando o Termo de Assentimento. Ademais, como procedimento ético, casos graves de problemas de saúde mental identificados durante o estudo foram encaminhados para os serviços de saúde mental da cidade, após confirmada a condição em uma entrevista com um psiquiatra.

7.1.4. Processamento e Análises de dados

Uma abordagem semi-paramétrica baseada em grupo (156,157) será utilizada para identificar os diferentes padrões de duração de sono (total e noturno) e de problemas de sono nos diferentes tempos. Esta é uma forma especializada de modelagem de mistura finita projetada para identificar, em vez de assumir, grupos de indivíduos seguindo trajetórias de desenvolvimento similares). Os modelos serão estimados com o comando "*traj*" do *software* STATA (158). A escolha do número e da forma das trajetórias será baseada no melhor ajuste do modelo (critério máximo de informação *bayesiana* - BIC) e interoperabilidade das trajetórias obtidas (156). Também será avaliada a contribuição das covariáveis de ajusta aos grupos formados como uma segunda forma de identificar se os grupos foram adequadamente traçados. Os grupos de trajetórias serão comparados em relação as características maternas e da criança utilizando chi-quadrado para variáveis categóricas e análise de variância (ANOVA) para variáveis numéricas. Este método possibilitará que os parâmetros que definem as trajetórias e as probabilidades de participação na trajetória sejam estimados em conjunto, traçando trajetórias plausíveis (157). Indivíduos com informações faltantes não serão excluídos do modelo devido à capacidade de modelagem de trajetória baseada em grupos de manipulação de dados perdidos usando estimativa de máxima verossimilhança (156).

Pretende-se descrever as exposições numéricas (duração de sono total, duração de sono noturno, nº de despertares noturnos nas últimas duas semanas e nº de problemas de sono) nos

diferentes acompanhamentos, para os grupos com e sem TDAH aos 11 anos em um gráfico de linhas. Também serão conduzidas análises bivariadas (qui-quadrado e teste *t*, dependendo da operacionalização das variáveis) para explorar a relação entre as exposições de sono (apresentadas no Quadro 3) e TDAH nos diferentes pontos do tempo. Modelos de regressão logística serão utilizados para obter medidas de associação para as variáveis trajetórias geradas e os desfechos triagem e diagnóstico de TDAH aos 11 anos, separadamente. Para o modelo multivariável, pretende-se controlar para os possíveis confundidores: renda familiar, aglomeração familiar, idade materna, escolaridade materna, *proxy* de saúde mental materna, uso de álcool na gestação, uso de tabaco na gestação, idade gestacional, peso ao nascer e sexo do participante. Cabe destacar que este grupo de variáveis contempla o conjunto mínimo de ajuste indicado para o no DAG construído para o estudo (Figura 6). Todas análises serão conduzidas no *software* STATA versão 14.0, adotando nível de significância de 5%.

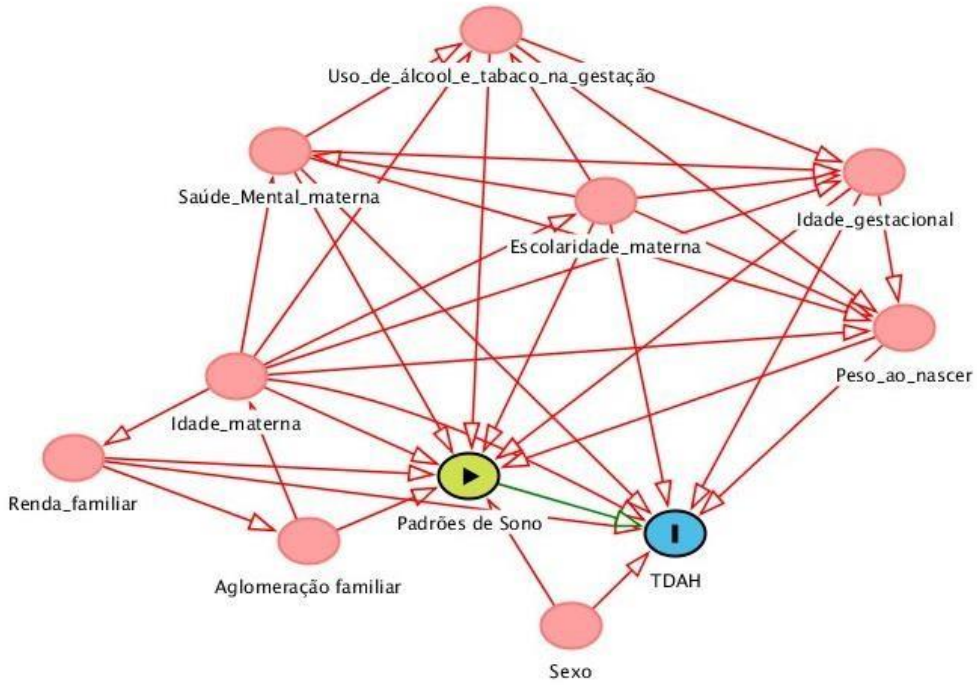


Figura 6. Gráfico acíclico dirigido (DAG) construído para estimar o efeito de padrões de sono no Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH). As setas verdes representam caminhos causais entre padrões de sono e TDAH. As setas vermelhas são os possíveis caminhos

enviesantes (*back-door-path*) da relação, que existem uma vez que as variáveis estão associadas tanto às exposições quanto ao desfecho. O diagrama foi construído com o auxílio do *software* Dagitty (disponível em http://www.dagitty.net).

7.1.5. Cálculo poder

Foram conduzidos cálculos de poder para identificar o quanto existiria de poder (β) nos piores cenários de análise na identificação de diferença de médias e proporção. Foram obtidas informações da Coorte de 2004 publicadas por outros estudos para serem utilizadas como parâmetro. Valores máximo, mínimo, média e medida dispersão de duração de sono total e duração de sono noturno no 1°, 2° e 4° ano de idade (83) foram utilizados para o cálculo de diferenças de médias apresentado no Quadro 4 . Para o cálculo de diferença de proporções, os parâmetros utilizados foram frequências absolutas e relativas das variáveis despertares noturnos (1ano=64,4%; 2anos=48,9%; 4anos=46,4%) e problemas de sono aos 2 e 4 anos (2anos=57,7%; 4anos=55,3%) reportados por estudos conduzidos com a Coorte de 2004 (83,86). Todos os cálculos foram realizados considerando o pior cenário, como a menor prevalência do desfecho aos 11 anos, que é a obtida utilizando o DAWBA (4%) (23) e dispersão de médias de duração de sono maiores do que as apresentadas por estudos conduzidos com dados da Coorte (DP=3 para grupo com TDAH e DP=2 para grupo sem TDAH). Os cálculos foram conduzidos considerando α=5%, no *software* PASS (mais informações: https://www.ncss.com/software/pass/) verão 8.0.

Quadro 4. Calculo de poder para detectar diferenças nas medias de duração de sono entre indivíduos com e sem TDAH na coorte de 2004

	Médias de horas de sono			
	TDAH (N=144; DP=3)	S/ TDAH (N=3418; DP=2)	Diferenças	Poder

Duração de sono total (1,2 e 4º ano)	11,3-12 11,2-12 11,1-12 11-12 10,8-12	12-12,7 12-12,8 12-12,9 12-13 12-13,2	0,7h 0,8h 0,9h 1h 1,2h	79% 88% 94% 98% 100%
Duração de sono noturna (1,2 e 4º ano)	9,3-10 9,2-10 9,1-10 9-10 8,8-10	10-10,7 10-10,8 10-10,9 10,11 10-11,2	0,7h 0,8h 0,9h 1h 1,2h	79% 88% 94% 98% 100%

Quadro 5. Calculo de poder para detectar diferenças nas proporções de despertares noturnos e problemas de sono entre indivíduos com e sem TDAH na coorte de 2004

Variável de exposição	Expostos	Não expostos	%TDAH E	%TDAH NE	RP	PODER
Despertares noturnos (s/n) 1 ano	2516	1391	4,5%	2,5%	1,80	90%
			5,0%	3,0%	1,67	86%
			5,0%	2,5%	2,00	98%
			5,5%	3,5%	1,57	82%
			5,5%	3,0%	1,83	96%
			5,5%	2,5%	2,20	100%
			6,0%	3,5%	1,71	94%
			6,0%	3,0%	2,00	99%
			6,0%	2,5%	2,40	100%
			6,5%	3,5%	1,86	99%
			6,5%	3,0%	2,17	100%
			7,0%	3,5%	2,00	100%
Despertares noturnos (s/n) 2 anos	1842	1925	4,5%	2,5%	1,80	92%
			5,0%	3,0%	1,67	88%
			5,0%	2,5%	2,00	98%
			5,5%	3,5%	1,57	84%
			5,5%	3,0%	1,83	97%
			5,5%	2,5%	2,20	100%
			6,0%	3,5%	1,71	95%
			6,0%	3,0%	2,00	99%
			6,0%	2,5%	2,40	100%
			6,5%	3,5%	1,86	99%
			6,5%	3,0%	2,17	100%
			7,0%	3,5%	2,00	100%

Despertares noturnos (s/n) 4 anos	1727	1994	4,5%	2,5%	1,80	91%
			5,0%	3,0%	1,67	88%
			5,0%	2,5%	2,00	98%
			5,5%	3,5%	1,57	84%
			5,5%	3,0%	1,83	97%
			5,5%	2,5%	2,20	100%
			6,0%	3,5%	1,71	95%
			6,0%	3,0%	2,00	99%
			6,0%	2,5%	2,40	100%
			6,5%	3,5%	1,86	99%
			6,5%	3,0%	2,17	100%
			7,0%	3,5%	2,00	100%
Variável de exposição	Expostos	Não expostos	%TDAH E	%TDAH NE	RP	PODER
Ter problemas de sono 2 anos	2210	1618	4,5%	2,5%	1,80	91%
			5,0%	3,5%	1,43	61%
			5,0%	3,0%	1,67	87%
			5,0%	2,5%	2,00	98%
			5,5%	3,5%	1,57	84%
			5,5%	3,0%	1,83	97%
			5,5%	2,5%	2,20	100%
			6,0%	3,5%	1,71	95%
			6,0%	3,0%	2,00	99%
			6,0%	2,5%	2,40	100%
			6,5%	3,5%	1,86	99%
			6,5%	3,0%	2,17	100%
			7,0%	3,5%	2,00	100%
Ter problemas de sono 4 anos	2090	1690	4,5%	2,5%	1,80	91%
			5,0%	3,0%	1,67	88%
			5,0%	2,5%	2,00	98%
			5,5%	3,5%	1,57	84%
			5,5%	3,0%	1,83	97%
			5,5%	2,5%	2,20	100%
			6,0%	3,5%	1,71	95%
			6,0%	3,0%	2,00	99%
			6,0%	2,5%	2,40	100%
			6,5%	3,5%	1,86	99%
			6,5%	3,0%	2,17	100%
			7,0%	3,5%	2,00	100%

NOTA: E= expostos, NE=Não expostos, RP=Razão de Prevalência; foram suprimidos da tabela todas simulações com poder<70%.

7.2. MÉTODOS ESTUDO 2

Relação entre aspectos genéticos do ciclo circadiano e Transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade: uma revisão sistemática.

Será conduzida uma busca sistemática, em pares, por pesquisas que tenham explorado a associação entre genética do ciclo circadiano e TDAH. Visto que foram conduzidas duas buscas mais gerais para o projeto e não foram identificados estudos que investiguem a relação de genes recentemente identificados como relacionados com ciclo circadiano por estudos de GWAS e TDAH, será proposto um estudo de revisão com 3 etapas de busca para pesquisar exaustivamente os genes descritos atualmente como associados ao ciclo circadiano: buscas com termos gerais já incluídos na revisão deste projeto, buscas com genes identificados na rota relacionado com ciclo circadiano em banco de anotação funcional e buscas com genes identificados em GWAS publicados recentemente.

7.2.1 Critérios de elegibilidade

Serão incluídos na busca todos trabalhos originais que estudem a relação entre aspectos genéticos circadianos e fenótipo de TDAH, sejam eles estudos de associação com variantes genéticas, expressão gênica ou modelos animais. Estudos com animais serão incluídos porque fornecem evidências experimentais importantes que podem contribuir para o reforço da plausibilidade biológica da associação investigada. Não serão excluídos estudos por tipo de delineamento, ano e idioma de publicação ou amostra.

7.2.2 Fontes de informação

O levantamento dos genes envolvidos na rota do ritmo circadiano foi conduzido utilizando a ferramenta *Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes* (KEGG). O KEGG é um banco de integração de anotações funcionais de genes baseado em evidências experimentais construído para auxiliar a investigação e compreensão de funções de alto nível do sistema biológico. As informações utilizadas pelo banco de dados incluem as nível molecular, especialmente conjuntos de dados moleculares de grande escala gerados por sequenciamento do genoma e outras tecnologias experimentais. Os termos *"circadian rhythm"* e "*circadian entrainment"* foram empregados para a seleção de genes envolvidos na rota analisada. Ainda, foram buscados os genes recentemente identificados a ciclo circadiano por artigos de GWAS. Os artigos de GWAS utilizados para levantamento de genes associados ao ritmo circadiano (cronotipo) foram os redigidos por Jones et al., Lane et al. e Youna Hu et al., todos publicados em 2016. Os genes encontrados tanto nas rotas do ritmo circadiano quanto nos GWAS são listados no Apêndice 4 do presente projeto. A busca dos estudos será conduzida nas bases de dados eletrônicas PubMed, PsycINFO, Web of Science e Scopus. Serão incluídos todo tipo de informação que reporte a relação entre genes circadianos e fenótipo de TDAH.

7.2.3. Estratégia de Busca

As buscas com termos gerais serão conduzidas com termos de indexação para TDAH, junto com os termos "*sleep behavior genes*", "*circadian genes*", separadamente (estratégia já utilizada no projeto). As buscas referentes as etapas mais específicas por genes serão conduzidas com os termos de indexação para TDAH com o nome de cada gene separadamente. Estudos conduzidos com seres humanos e modelos animais serão incluídos na busca. Não será restringida a busca por delineamento de estudo ou data de publicação. As chaves de buscas serão:

((((((((((((((Attention Deficit Hyperactivity Disorders) OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity) OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorder) OR ADHD) OR DeficitHyperactivity Disorder, Attention) OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Disorders, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder) OR Attention Deficit Disorder) OR Attention Deficit Disorders) OR Deficit Disorder, Attention) OR Deficit Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit) OR Disorders, Attention Deficit)) AND SLEEP BEHAVIOR GENES

((((((((((((((Attention Deficit Hyperactivity Disorders) OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity) OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorder) OR ADHD) OR DeficitHyperactivity Disorder, Attention) OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Disorders, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder) OR Attention Deficit Disorder) OR Attention Deficit Disorders) OR Deficit Disorder, Attention) OR Deficit Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit) OR Disorders, Attention Deficit)) AND CIRCADIAN GENES

((((((((((((((Attention Deficit Hyperactivity Disorders) OR Attention Deficit Disorders with Hyperactivity) OR Attention Deficit-Hyperactivity Disorder) OR ADHD) OR DeficitHyperactivity Disorder, Attention) OR Deficit-Hyperactivity Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Disorders, Attention Deficit-Hyperactivity) OR Attention Deficit Hyperactivity Disorder) OR Attention Deficit Disorder) OR Attention Deficit Disorders) OR Deficit Disorder, Attention) OR Deficit Disorders, Attention) OR Disorder, Attention Deficit) OR Disorders, Attention Deficit)) AND *GENES* (lista de genes identificados nos 3 GWAS e rota circadian rhythm do KEGG)

7.2.4. Seleção dos estudos

Após o levantamento de trabalhos publicados, a seleção dos trabalhos será conduzida de acordo com os critérios de elegibilidade, em pares e em duas etapas. Na primeira etapa do processo

será realizada a seleção de artigos de interesse baseados na leitura de títulos e resumos. Na segunda etapa, serão lidos todos artigos selecionados na primeira e se manterão no estudo aqueles que cumprem a proposta de estudar a relação entre genes de ritmo circadianos e fenótipo de TDAH. Posterior a seleção dos estudos, cada estudo será lido na íntegra e extraído informações pertinentes utilizando um formulário de extração de dados. O formulário de extração de dados incluirá as seguintes informações: autores, ano de publicação do estudo, país, população, tamanho amostral, delineamento, gene estudado, avaliação do fenótipo de TDAH e evidências de associação disponibilizadas (medidas de ocorrência/tendência central, valores de testes estatísticos, valores de *p* e medidas de efeito). Considerando que espera-se que a literatura sobre o tema seja escassa e heterogênea para permitir uma meta-análise, as informações extraídas dos artigos identificados serão apresentadas e discutidas de maneira narrativa.

7.3. MÉTODOS ESTUDO 3

Existe relação causal entre padrões de sono e TDAH? Um estudo de Randomização Mendeliana de duas amostras

Pretende-se conduzir um estudo de RM de duas amostras, utilizando estatísticas sumarizadas disponíveis dos GWASs sobre padrões de sono e TDAH. A análise de randomização mendeliana terá como objetivo principal investigar se padrões de sono causam TDAH e, secundariamente, em uma análise na direção oposta (se são consequência). Para tanto, serão utilizados dados do GWAS sobre duração de sono conduzido com crianças (n=10554) (159), duração de sono e cronotipo com adultos e idosos (n=128166) (80), insônia com adultos e idosos (n=113006) (160) e crianças com TDAH (n=20183 casos e 35191 controles) (49). Primeiramente pretende-se utilizar os dados sobre duração de sono em crianças como exposição

e TDAH como desfecho. Logo, será utilizado os dados para TDAH como exposição e os dados de GWAS sobre duração de sono, cronotipo e insônia conduzidos com adultos e idosos como desfecho.

Variantes genéticas identificadas a partir dos GWASs de sono serão pesquisadas no GWAS de TDAH para estimar o efeito causal do sono sobre o TDAH e as associações também serão verificadas na direção oposta.

7.3.1. Fonte de Dados

As informações sobre a associação entre polimorfismos genéticos e os fenótipos de interesse serão extraída das estatísticas sumarizadas dos resultados de estudos de GWASs publicamente disponíveis de diferentes consórcios e amostras diferentes, que serão apresentados a seguir. Cabe destacar ainda que, caso sejam publicados estudos mais robustos sobre o tema ao longo da execução do projeto, estes serão utilizados como fonte de dados também.

Duração de Sono na infância: Consórcio *EArly Genetics and Lifecourse Epidemiology* (EAGLE)

O EAGLE é um consórcio de coortes com informações do período pré-natal, de nascimento e desenvolvimento. Ele visa uma colaboração para investigar a base genética dos fenótipos no período de concepção, início da vida até infância. As coortes participantes, incluindo a Coorte Britânica de Nascimento de 1958, ALSPAC, CHOP, COPSAC, DBC; *Exeter Family Study* e Geração R, disponibilizam os dados de genotipagem de cada amostra, afim de acoplar informações e possibilitar o desenvolvimento de estudos maiores, desde julho de 2009. Os dados sobre associação do genoma completo de duração para crianças a serem utilizados no projeto são oriundos do estudo conduzido por Marinelli et al. (2016). As Coortes envolvidas no EAGLE poderiam participar desse estudo se cumprissem os seguintes critérios

de inclusão: descendência europeia, idade de 2 até 14 anos no momento da avaliação. A duração de sono foi coletada pelo relato direto dos pais de quantas horas a criança dormia por dia, incluindo cochilos. Foi utilizado regressão linear para avaliar a associação com duração do sono (em horas), ajustando para idade, sexo e principais componentes dos dados genéticos para contabilizar a estratificação da população e dosagem alélica. SNPs que não atingiram um *Expected Minor Allele Counts* (EMAC) ≥ 100 foram excluídos, sendo este um parâmetro relacionado tanto ao tamanho da amostra (N) quanto à qualidade da imputação (2 * tamanho amostral * MAF * qualidade de imputação). Como resultado do estudo, foi encontrado uma variante top hit associada ao fenótipo, a rs74506765 próxima ao gene *ARAP1* ($p = 2.27*10^{-08}$) e outras perto da significância (159).

TDAH: Consórcio de Genômica Psiquiátrica (PGC)

As estatísticas sumarizadas sobre o GWAS de TDAH foram extraídos do PGC. A amostra de PGC é composta por 20 183 casos de TDAH e 35 191 controles, incluindo o estudo iPSYCH para crianças e adultos, e 11 estudos europeus, norte-americanos e chineses. Ambos os estudos de família e caso-controle foram incluídos O estudo de Demontis et al. (2017) será utilizado como fonte de dados para o presente projeto. Os indivíduos de ascendência europeia compreendiam 96,25% da amostra. A análise de associação genômica ampla foi realizada em cada coorte usando regressão logística, assumindo efeitos genéticos aditivos. Os componentes principais informativos de ancestralidade calculados usando dados de genotipagem genômica ampla foram incluídos como covariáveis para minimizar o viés devido à estratificação da população, juntamente com covariáveis relevantes específicas do estudo, quando aplicável. As variantes com INFO <0,8 ou MAF<0,01 foram excluídas. Como resultado do estudo, doze variantes genéticas independentes (r^2 <0,1) fortemente associadas ao TDAH ($p<5*10^{-8}$) foram identificadas (49).

Cronotipo, Duração de sono e Insônia na vida adulta: UK Biobank

O UK Biobank é um estudo de coorte prospectiva conduzido no Reino Unido, o qual recrutou mais de 500.000 homens e mulheres, com idades entre 40 e 69 anos entre 2006 e 2010. Dados do UK Biobank foram utilizados nos GWAS de duração de sono, cronotipo e insônia. As análises de associação destes estudos foram realizadas utilizando milhões de polimorfismos de nucleotídeo único assumindo efeitos genéticos aditivos e excluindo variantes com MAF <0,01 e INFO <0,8. Detalhes sobre a amostra e o controle de qualidade do SNP podem ser encontrados na documentação do UK Biobank. Para este estudo serão utilizados resultados resumidos e publicamente disponíveis de associação do genoma completo para duração de sono, cronotipo e insônia. Jones et al. (2016) estudaram cronotipo e duração de sono, utilizando modelos lineares ajustados para estrutura populacional genômica, idade, sexo e período do ano em que foram coletados os dados, e duração de sono, quando se tratou do efeito para cronotipo. Nesse estudo, foi encontrado associação entre 16 SNPS para cronotipo matutino e 3 SNPs para duração sono, sendo mantida associação após replicação, para, respectivamente, 13 e 3 SNPs (reportados na Tabela 1) (80). Hammerschlad et al. (2017) realizaram a análise de regressão logística, ajustada para idade, sexo, método de genotipagem e componentes principais genéticos para conduzir o GWAS de insônia. Insônia foi definido pelos autores por meio do relato de ter usualmente problemas em pegar no sono ou acordar no meio da noite, sendo considerados como controles aqueles que disseram não ter ou ter esses problemas raramente ou algumas vezes. Nesse último, foram identificados três loci e sete genes associados a insônia, e mantidas associações para um locus e cinco genes após replicação (n = 7.565) (160).

7.3.2. Variantes Instrumentais Genéticas

Como instrumentos para padrões sono e TDAH, selecionamos variantes genéticas independentes e fortemente associadas a cada fenótipo ($p<5*10^{-8}$), conforme publicado em cada estudo. Contudo, para padrões de sono também pretende-se utilizar um valor de $p<1*10^{-5}$, o

qual é um *p* limítrofe utilizado em outros estudos de RM que utilizam como exposição padrões de sono (138,139) devido ao fato de existirem poucos marcadores identificados nos GWAS publicados até o momento. Quando a variante genética selecionada (índice) não estiver disponível no resultado GWAS, esta será substituída por uma variante proxy (r^2> 0,80) quando possível, considerando a população Européia do Projeto 1000 Genomas (fase 3 versão 5) como painel de referência. Para a pesquisa de proxies de variantes serão utilizados os servidores do *Nucleotide Polymorphism Annotator* (SNiPA) v3.2 e LDlink.

7.3.3. Estimativa do efeito causal

O efeito causal de padrões de sono no TDAH (e vice-versa) será estimado utilizando o estimador de Variância Inversa Ponderada (IVW). O IVW consiste em uma regressão linear das estimativas de associação genética entre as variantes exposição e desfecho, ponderada pelo inverso da variância das estimativas da associação genética para variante desfecho. O intercepto de regressão IVW é restrito a zero, o que corresponde à suposição de que as variantes genéticas afetariam apenas o resultado através da exposição ou que os efeitos pleiotrópicos são equilibrados (161).

7.3.4. Análises de sensibilidade

Para avaliar a robustez da análise primária na estimação do efeito causal, serão utilizados outros estimadores de RM que são considerados mais robustos à pleiotropia horizontal do que o estimador de IVW, como a Regressão de MR-Egger, Mediana Ponderada Penalizada (PMW) e o Estimador Baseado em Modo Ponderado (MBE).

A regressão de MR-Egger estima consistentemente o efeito causal mesmo quando as variantes genéticas violam os pressupostos para variantes instrumentais, desde que a suposição de Força Independente do Efeito Direto do Instrumento (InSIDE) seja válida. InSIDE requer

que a força do instrumento (isto é, a associação entre a variável instrumental e o fenótipo de exposição) não deve correlacionar-se com o efeito direto do instrumento no desfecho (isto é, o efeito do instrumento no desfecho via pleiotropia horizontal) (162). Ainda, o MR-Egger pode estimar de maneira robusta o efeito de pleirotropia horizontal (137).

O método PMW fornece estimativas consistentes quando pelo menos metade do peso na análise for proveniente de instrumentos válidos, onde cada instrumento que contribui para a alta heterogeneidade é ponderado (penalizado) (163). O MBE exige o *ZEro Modal Pleiotropy Assumption (*ZEMPA). A ZEMPA postula que o efeito pleiotrópico horizontal mais comum é zero, o que permite uma estimativa consistente do efeito causal mesmo quando a maioria dos instrumentos genéticos são inválidos. A versão ponderada da ZEMPA pode ser interpretada como postulando que o subconjunto homogêneo de variantes com a maior soma de pesos compreende apenas instrumentos válidos(164).

Também será realizada uma análise *leave-one-out* para identificar marcadores genéticos potencialmente excessivamente influentes removendo 1 variante de cada vez e recalculando a estimativa de IVW. Estas análises serão realizadas utilizando o pacote MR de duas amostras (165)na linguagem *R* (https://www.r-project.org/).

8. FINANCIAMENTO

O Artigo 1 será conduzido com dados previamente coletados da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. A Coorte de 2004 é um estudo conduzido pelo Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas, com o apoio da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO). De 2009 a 2013, a Coorte de nascimentos de 2004 foi financiada pelo *Wellcome Trust.* Fases anteriores do estudo foram financiadas pela Organização Mundial de Saúde, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Saúde e Pastoral da Criança. Ainda, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

9. CRONOGRAMA

	2017											2018												2019												2020											
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Ingresso no PPGE																																														
Revisão bibliográfica																																														
Plano de trabalho																																														
Elaboração do projeto																																														
Defesa do projeto																																														
Artigo 1																																														
Artigo 2																																														
Artigo 3																																														
Defesa de tese																																														
Divulgação dos resultados																																														

REFERÊNCIAS

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Washington, DC; 2013.

2. Sayal K, Prasad V, Daley D, Ford T, Coghill D. ADHD in children and young people: prevalence, care pathways, and service provision. Lancet Psychiatry. 1º de fevereiro de 2018;5(2):175–86.

3. Simon V, Czobor P, Bálint S, Mészáros A, Bitter I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. Br J Psychiatry J Ment Sci. março de 2009;194(3):204–11.

4. Willcutt EG. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a metaanalytic review. Neurother J Am Soc Exp Neurother. julho de 2012;9(3):490–9.

5. Erskine HE, Ferrari AJ, Polanczyk GV, Moffitt TE, Murray CJ, Vos T, et al. The global burden of conduct disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder in 2010. J Child Psychol Psychiatry. 2014;55(4):328–336.

6. Polanczyk GV, Willcutt EG, Salum GA, Kieling C, Rohde LA. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. Int J Epidemiol. abril de 2014;43(2):434–42.

7. Doshi JA, Hodgkins P, Kahle J, Sikirica V, Cangelosi MJ, Setyawan J, et al. Economic Impact of Childhood and Adult Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in the United States. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 1º de outubro de 2012;51(10):990-1002.e2.

8. King S, Griffin S, Hodges Z, Weatherly H, Asseburg C, Richardson G, et al. A systematic review and economic model of the effectiveness and cost-effectiveness of methylphenidate, dexamfetamine and atomoxetine for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. Health Technol Assess Winch Engl. 2006;10(23):iii–iv.

9. Schlander M. Impact of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) on prescription dug spending for children and adolescents: increasing relevance of health economic evidence. Child Adolesc Psychiatry Ment Health. 2007;1(1):13.

10. Snell T, Knapp M, Healey A, Guglani S, Evans-Lacko S, Fernandez J-L, et al. Economic impact of childhood psychiatric disorder on public sector services in Britain: estimates from national survey data. J Child Psychol Psychiatry. 2013;54(9):977–985.

11. Dalsgaard S, Østergaard SD, Leckman JF, Mortensen PB, Pedersen MG. Mortality in children, adolescents, and adults with attention deficit hyperactivity disorder: a nationwide cohort study. The Lancet. 30 de maio de 2015;385(9983):2190–6.

12. Rolon-Arroyo B, Arnold DH, Harvey EA, Marshall N. Assessing attention and disruptive behavior symptoms in preschool-age children: The utility of the Diagnostic Interview Schedule for Children. J Child Fam Stud. 2016;25(1):65–76.

13. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. Nat Rev Genet. 2005;6(7):544.

14. Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. Sleep Med Rev. 2007;11(6):429–438.

15. Sadeh A, Tikotzky L, Kahn M. Sleep in infancy and childhood: implications for emotional and behavioral difficulties in adolescence and beyond. Curr Opin Psychiatry. novembro de 2014;27(6):453–9.

16. Cassoff J, Wiebe ST, Gruber R. Sleep patterns and the risk for ADHD: a review. Nat Sci Sleep. 2012;4:73–80.

17. Um YH, Hong S-C, Jeong J-H. Sleep Problems as Predictors in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Causal Mechanisms, Consequences and Treatment. Clin Psychopharmacol Neurosci. fevereiro de 2017;15(1):9–18.

18. Coogan AN, McGowan NM. A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. Atten Deficit Hyperact Disord. 7 de janeiro de 2017;

19. Hvolby A. Associations of sleep disturbance with ADHD: implications for treatment. ADHD Atten Deficit Hyperact Disord. 1º de março de 2015;7(1):1–18.

20. Thomas R, Sanders S, Doust J, Beller E, Glasziou P. Prevalence of AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. Pediatrics. 2 de março de 2015;peds.2014-3482.

21. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. Am J Psychiatry. junho de 2007;164(6):942–8.

22. Petresco S, Anselmi L, Santos IS, Barros AJD, Fleitlich-Bilyk B, Barros FC, et al. Prevalence and comorbidity of psychiatric disorders among 6-year-old children: 2004 Pelotas Birth Cohort. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 2014;49(6):975–83.

23. La Maison C, Munhoz TN, Santos IS, Anselmi L, Barros FC, Matijasevich A. Prevalence and risk factors of psychiatric disorders in early adolescence: 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 13 de abril de 2018;

24. Banaschewski T, Becker K, Döpfner M, Holtmann M, Rösler M, Romanos M. AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder. Dtsch Ärztebl Int. março de 2017;114(9):149–59.

25. Reale L, Bartoli B, Cartabia M, Zanetti M, Costantino MA, Canevini MP, et al. Comorbidity prevalence and treatment outcome in children and adolescents with ADHD. Eur Child Adolesc Psychiatry. 1º de dezembro de 2017;26(12):1443–57.

26. Pievsky MA, McGrath RE. The Neurocognitive Profile of Attention-

Deficit/Hyperactivity Disorder: A Review of Meta-Analyses. Arch Clin Neuropsychol Off J Natl Acad Neuropsychol. 6 de julho de 2017;1–15.

27. Caye A, Spadini AV, Karam RG, Grevet EH, Rovaris DL, Bau CHD, et al. Predictors of persistence of ADHD into adulthood: a systematic review of the literature and metaanalysis. Eur Child Adolesc Psychiatry. 1º de novembro de 2016;25(11):1151–9.

28. Faraone SV, Biederman J, Wilens TE, Adamson J. A naturalistic study of the effects of pharmacotherapy on substance use disorders among ADHD adults. Psychol Med. dezembro de 2007;37(12):1743–52.

29. Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? World Psychiatry Off J World Psychiatr Assoc WPA. junho de 2003;2(2):104–13.

30. Fayyad J, De Graaf R, Kessler R, Alonso J, Angermeyer M, Demyttenaere K, et al. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. Br J Psychiatry J Ment Sci. maio de 2007;190:402–9.

31. Dalsgaard S, Leckman JF, Mortensen PB, Nielsen HS, Simonsen M. Effect of drugs on the risk of injuries in children with attention deficit hyperactivity disorder: a prospective cohort study. Lancet Psychiatry. 1º de agosto de 2015;2(8):702–9.

32. Chang Z, Lichtenstein P, D'Onofrio BM, Sjölander A, Larsson H. Serious Transport Accidents in Adults With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and the Effect of Medication: A Population-Based Study. JAMA Psychiatry. 1º de março de 2014;71(3):319–25.

33. Lichtenstein P, Larsson H. Medication for attention deficit-hyperactivity disorder and criminality. N Engl J Med. 21 de fevereiro de 2013;368(8):776.

34. Barkley R, Murphy K, Fischer M. ADHD in adults: What the science says. Guilford Press; 2010.

35. Furczyk K, Thome J. Adult ADHD and suicide. ADHD Atten Deficit Hyperact Disord. 1º de setembro de 2014;6(3):153–8.

36. Organização Mundial da Saúde. CID-10: Classificação Estatística Internacional de Doenças. Vol. 1. Edusp.; 1994.

37. Bush G, Valera EM, Seidman LJ. Functional Neuroimaging of AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder: A Review and Suggested Future Directions. Biol Psychiatry. 1º de junho de 2005;57(11):1273–84.

38. Barlow DH, Durand M. Abnormal psychology: An integrative approach. Nelson Education.; 2011.

39. Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, et al. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Biol Psychiatry. 1º de junho de 2005;57(11):1313–23.

40. Nigg JT. What causes ADHD?: Understanding what goes wrong and why. Guilford Press; 2006.
41. Faraone SV, Larsson H. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry. 11 de junho de 2018;1.

42. Stergiakouli E, Thapar A. Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). Neuropsychiatr Dis Treat. 2010;6:551–60.

43. Chen Wai, Zhou Kaixin, Sham Pak, Franke Barbara, Kuntsi Jonna, Campbell Desmond, et al. DSM-IV combined type ADHD shows familial association with sibling trait scores: A sampling strategy for QTL linkage. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 18 de novembro de 2008;147B(8):1450–60.

44. Faraone SV. Genetics of Childhood Disorders: XX. ADHD, Part 4: Is ADHD Genetically Heterogeneous? J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 1º de novembro de 2000;39(11):1455–7.

45. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. Hum Genet. 2009;126(1):51–90.

46. Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding Y-S, et al. Dopamine Transporter Occupancies in the Human Brain Induced by Therapeutic Doses of Oral Methylphenidate. Am J Psychiatry. 1º de outubro de 1998;155(10):1325–31.

47. Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CHD, Ramos-Quiroga JA, et al. The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. Mol Psychiatry. outubro de 2012;17(10):960–87.

48. Neale BM, Medland SE, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch K-P, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of attention deficit/hyperactivity disorder. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. setembro de 2010;49(9):884–97.

49. Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, et al. Discovery Of The First Genome-Wide Significant Risk Loci For ADHD. bioRxiv. 3 de junho de 2017;145581.

50. Froehlich TE, Anixt JS, Loe IM, Chirdkiatgumchai V, Kuan L, Gilman RC. Update on Environmental Risk Factors for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Curr Psychiatry Rep. 1º de outubro de 2011;13(5):333.

51. Arns M, Swanson JM, Arnold LE. ADHD Prevalence: Altitude or Sunlight? Better Understanding the Interrelations of Dopamine and the Circadian System. J Atten Disord. janeiro de 2018;22(2, SI):163–6.

52. Castellanos FX, Tannock R. Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. Nat Rev Neurosci. agosto de 2002;3(8):617–28.

53. Gurevitz M, Geva R, Varon M, Leitner Y. Early markers in infants and toddlers for development of ADHD. J Atten Disord. 2014;18(1):14–22.

54. Kissling C, Retz W, Wiemann S, Coogan AN, Clement RM, Hunnerkopf R, et al. A polymorphism at the 3'-untranslated region of the CLOCK gene is associated with adult attention-deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet. 5 de abril de 2008;147(3):333–8.

55. Dibner C., Schibler U. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. J Intern Med. 6 de fevereiro de 2015;277(5):513–27.

56. Waddington Lamont E, Legault-Coutu D, Cermakian N, Boivin DB. The role of circadian clock genes in mental disorders. Dialogues Clin Neurosci. setembro de 2007;9(3):333–42.

57. Schuch JB, Genro JP, Bastos CR, Ghisleni G, Tovo-Rodrigues L. The role of CLOCK gene in psychiatric disorders: Evidence from human and animal research. Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet. 13 de setembro de 2017;

58. Coogan AN, Thome J. Chronotherapeutics and psychiatry: setting the clock to relieve the symptoms. World J Biol Psychiatry Off J World Fed Soc Biol Psychiatry. setembro de 2011;12 Suppl 1:40–3.

59. Baird AL, Coogan AN, Siddiqui A, Donev RM, Thome J. Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels. Mol Psychiatry. outubro de 2012;17(10):988–95.

60. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. In: Circadian clocks. Springer; 2013. p. 3–27.

61. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. Hum Mol Genet. 2006;15(suppl_2):R271–R277.

62. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Merrow M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. J Biol Rhythms. 2003;18(1):80–90.

63. Roenneberg T. Internal time: Chronotypes, social jet lag, and why you're so tired. Harvard University Press; 2012.

64. Wittmann M, Dinich J, Merrow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. Chronobiol Int. 2006;23(1–2):497–509.

65. Partonen T. Chronotype and Health Outcomes. Curr Sleep Med Rep. 1º de dezembro de 2015;1(4):205–11.

66. Gelbmann G, Kuhn-Natriashvili S, Pazhedath TJ, Ardeljan M, Wöber C, Wöber-Bingöl Ç. Morningness: protective factor for sleep-related and emotional problems in childhood and adolescence? Chronobiol Int. 2012;29(7):898–910.

67. Merikanto I, Lahti T, Kronholm E, Peltonen M, Laatikainen T, Vartiainen E, et al. Evening types are prone to depression. Chronobiol Int. 2013;30(5):719–725.

68. Mirghani HO. The effect of chronotype (morningness/eveningness) on medical students' academic achievement in Sudan. J Taibah Univ Med Sci. 1º de dezembro de 2017;12(6):512–6.
69. Urbán R, Magyaródi T, Rigó A. Morningness-Eveningness, Chronotypes and HealthImpairing Behaviors in Adolescents. Chronobiol Int [Internet]. abril de 2011 [citado 19 de maio de 2018];28(3). Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818690/

70. Benedito-Silva AA. Cronobiologia do ciclo vigília-sono. Med E Biol Sono. 2008;25–33.

71. Maski KP, Kotagal S, Kothare SV. The Science of Sleep: Ontogeny, Phylogeny, and More. In: Sleep in Childhood Neurological Disorders. EBSCO Publishing : eBook Collection (EBSCOhost); 2018. p. 1–26.

72. Rattenborg NC, Iglesia HO de la, Kempenaers B, Lesku JA, Meerlo P, Scriba MF. Sleep research goes wild: new methods and approaches to investigate the ecology, evolution and functions of sleep. Phil Trans R Soc B. 19 de novembro de 2017;372(1734):20160251.

73. Hirshkowitz M, Whiton K, Albert SM, Alessi C, Bruni O, DonCarlos L, et al. National Sleep Foundation's sleep time duration recommendations: methodology and results summary. Sleep Health. março de 2015;1(1):40–3.

74. Dueck A, Berger C, Wunsch K, Thome J, Cohrs S, Reis O, et al. The role of sleep problems and circadian clock genes in attention-deficit hyperactivity disorder and mood disorders during childhood and adolescence: an update. J Neural Transm Vienna Austria 1996. fevereiro de 2017;124(Suppl 1):127–38.

75. Allebrandt KV, Roenneberg T. The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies. Braz J Med Biol Res. 2008;41(8):716–721.

76. Gottlieb DJ, T O'Connor G, Wilk JB. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. BMC Med Genet. 2007;8(1):S9.

77. Klei L, Reitz P, Miller M, Wood J, Maendel S, Gross D, et al. Heritability of morningness-eveningness and self-report sleep measures in a family-based sample of 521 hutterites. Chronobiol Int. 2005;22(6):1041–1054.

78. Levandovski R, Sasso E, Hidalgo MP. Chronotype: a review of the advances, limits and applicability of the main instruments used in the literature to assess human phenotype. Trends Psychiatry Psychother. 2013;35(1):3–11.

79. Hu Y, Shmygelska A, Tran D, Eriksson N, Tung JY, Hinds DA. GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person. Nat Commun. 2 de fevereiro de 2016;7:10448.

80. Jones SE, Tyrrell J, Wood AR, Beaumont RN, Ruth KS, Tuke MA, et al. Genome-Wide Association Analyses in 128,266 Individuals Identifies New Morningness and Sleep Duration Loci. PLOS Genet. 5 de agosto de 2016;12(8):e1006125.

81. Lane JM, Vlasac I, Anderson SG, Kyle SD, Dixon WG, Bechtold DA, et al. Genomewide association analysis identifies novel loci for chronotype in 100,420 individuals from the UK Biobank. Nat Commun. 9 de março de 2016;7:10889.
82. Doi M, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, et al. Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. Nat Commun. 2011;2:327.

83. Netsi E, Santos IS, Stein A, Barros FC, Barros AJD, Matijasevich A. A different rhythm of life: sleep patterns in the first 4 years of life and associated sociodemographic characteristics in a large Brazilian birth cohort. Sleep Med. 1º de setembro de 2017;37:77–87.

84. Sciberras E, Song JC, Mulraney M, Schuster T, Hiscock H. Sleep problems in children with attention-deficit hyperactivity disorder: associations with parenting style and sleep hygiene. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2017;26(9):1129–1139.

85. AASM AA of SM. International classification of sleep disorders–third edition (ICSD-3). Darien IL Am Acad Sleep Med. 2014;

86. Halal CS, Matijasevich A, Howe LD, Santos IS, Barros FC, Nunes ML. Short sleep duration in the first years of life and obesity/overweight at age 4 years: a birth cohort study. J Pediatr. 2016;168:99–103.

87. Wynchank D, Bijlenga D, Beekman AT, Kooij JJS, Penninx BW. Adult AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and Insomnia: an Update of the Literature. Curr Psychiatry Rep. 30 de outubro de 2017;19(12):98.

88. Scott N, Blair PS, Emond AM, Fleming PJ, Humphreys JS, Henderson J, et al. Sleep patterns in children with ADHD: a population-based cohort study from birth to 11 years. J Sleep Res. abril de 2013;22(2):121–8.

89. Turnbull K, Reid GJ, Morton JB. Behavioral sleep problems and their potential impact on developing executive function in children. Sleep. 2013;36(7):1077–1084.

90. Peralta GP, Forns J, Garcia de la Hera M, Gonzalez L, Guxens M, Lopez-Vicente M, et al. Sleeping, TV, Cognitively Stimulating Activities, Physical Activity, and ADHD Symptom Incidence in Children: A Prospective Study. J Dev Behav Pediatr JDBP. 18 de dezembro de 2017;

91. Armstrong JM, Ruttle PL, Klein MH, Essex MJ, Benca RM. Associations of child insomnia, sleep movement, and their persistence with mental health symptoms in childhood and adolescence. Sleep. 1º de maio de 2014;37(5):901–9.

92. Steinsbekk S, Wichstrom L. Stability of Sleep Disorders From Preschool to First Grade and Their Bidirectional Relationship with Psychiatric Symptoms. J Dev Behav Pediatr. maio de 2015;36(4):243–51.

93. Williams KE, Sciberras E. Sleep and Self-Regulation from Birth to 7 Years: A Retrospective Study of Children with and Without Attention-Deficit Hyperactivity Disorder at 8 to 9 Years. J Dev Behav Pediatr JDBP. junho de 2016;37(5):385–94.

94. Gregory AM, Agnew-Blais JC, Matthews T, Moffitt TE, Arseneault L. ADHD and Sleep Quality: Longitudinal Analyses From Childhood to Early Adulthood in a Twin Cohort. J Clin Child Adolesc Psychol Off J Soc Clin Child Adolesc Psychol Am Psychol Assoc Div 53. abril de 2017;46(2):284–94.
95. Alhraiwil NJ, Ali A, Househ MS, Al-Shehri AM, El-Metwally AA. Systematic review of the epidemiology of attention deficit hyperactivity disorder in Arab countries. Neurosci Riyadh Saudi Arab. abril de 2015;20(2):137–44.

96. Bailey T, Joyce A. The role of the thalamus in ADHD symptomatology and treatment. Appl Neuropsychol Child. 2015;4(2):89–96.

97. Nygaard U, Riis JL, Deleuran M, Vestergaard C. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Atopic Dermatitis: An Appraisal of the Current Literature. Pediatr ALLERGY Immunol Pulmonol. dezembro de 2016;29(4, SI):181–8.

98. Taurines R, Schmitt J, Renner T, Conner AC, Warnke A, Romanos M. Developmental comorbidity in attention-deficit/hyperactivity disorder. Atten Deficit Hyperact Disord. dezembro de 2010;2(4):267–89.

99. Gregory AM, Sadeh A. Annual Research Review: Sleep problems in childhood psychiatric disorders - a review of the latest science. J CHILD Psychol PSYCHIATRY. março de 2016;57(3, SI):296–317.

100. Ming X, Walters AS. Autism spectrum disorders, attention deficit/hyperactivity disorder, and sleep disorders. Curr Opin Pulm Med. novembro de 2009;15(6):578–84.

101. Beebe DW. Cognitive, Behavioral, and Functional Consequences of Inadequate Sleep in Children and Adolescents. Pediatr Clin North Am. junho de 2011;58(3):649+.

102. Gregory AM, Sadeh A. Sleep, emotional and behavioral difficulties in children and adolescents. SLEEP Med Rev. abril de 2012;16(2):129–36.

103. Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, et al. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. Mol Psychiatry. outubro de 2006;11(10):934–53.

104. Xu X, Breen G, Chen C-K, Huang Y-S, Wu Y-Y, Asherson P. Association study between a polymorphism at the 3'-untranslated region of CLOCK gene and attention deficit hyperactivity disorder. Behav Brain Funct BBF. 12 de agosto de 2010;6:48.

105. Jeong SH, Yu J-C, Lee CH, Choi K-S, Choi J-E, Kim SH, et al. Human CLOCK geneassociated attention deficit hyperactivity disorder-related features in healthy adults: quantitative association study using Wender Utah Rating Scale. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. fevereiro de 2014;264(1):71–81.

106. van der Heijden K, Blok M, Spee K, Archer S, Smits M, Curfs L, et al. No evidence to support an association of PER3 clock gene polymorphism with ADHD-related idiopathic chronic sleep onset insomnia. Biol RHYTHM Res. dezembro de 2005;36(5):381–8.

107. Baird AL, Coogan AN, Kaufling J, Barrot M, Thome J. Daily methylphenidate and atomoxetine treatment impacts on clock gene protein expression in the mouse brain. Brain Res. 2013;1513:61–71.

108. Dela Pena IJI, Dela Pena I, de la Pena JB, Kim HJ, Sohn A, Shin CY, et al. Transcriptional profiling of SHR/NCrl prefrontal cortex shows hyperactivity-associated genes responsive to amphetamine challenge. Genes Brain Behav. setembro de 2017;16(7):664–74.

109. O'Keeffe SM, Thome J, Coogan AN. The noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine phase-shifts the circadian clock in mice. Neuroscience. 10 de janeiro de 2012;201:219–30.

110. Antúnez JM, Navarro JF, Adan A. Circadian typology and problems in mental health [Tipología circadiana y problemas de salud mental]. An Psicol. 2014;30(3):971–84.

111. Baron KG, Reid KJ. Circadian misalignment and health. Int Rev Psychiatry Abingdon Engl. abril de 2014;26(2):139–54.

112. Charrier A, Olliac B, Roubertoux P, Tordjman S. Clock Genes and Altered Sleep-Wake Rhythms: Their Role in the Development of Psychiatric Disorders. Int J Mol Sci. 29 de abril de 2017;18(5).

113. Dueck A, Thome J, Haessler F. The role of sleep problems and circadian clock genes in childhood psychiatric disorders. J Neural Transm Vienna Austria 1996. outubro de 2012;119(10):1097–104.

114. Bonvicini C, Faraone SV, Scassellati C. Common and specific genes and peripheral biomarkers in children and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. World J Biol Psychiatry Off J World Fed Soc Biol Psychiatry. 24 de fevereiro de 2017;1–21.

115. Mendoza J, Challet E. Circadian insights into dopamine mechanisms. Neuroscience. 12 de dezembro de 2014;282:230–42.

116. Coogan AN, Baird AL, Popa-Wagner A, Thome J. Circadian rhythms and attention deficit hyperactivity disorder: The what, the when and the why. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 3 de junho de 2016;67:74–81.

117. Kooij JJS, Bijlenga D. The circadian rhythm in adult attention-deficit/hyperactivity disorder: current state of affairs. EXPERT Rev Neurother. outubro de 2013;13(10):1107– 16.

118. Barkley R. Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: Constructing a unifying theory of ADHD. 121(1). 1997;65–94.

119. Mahone EM, Denckla MB. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Historical Neuropsychological Perspective. J Int Neuropsychol Soc JINS. outubro de 2017;23(9–10):916–29.

120. Pennington BF, Ozonoff S. Executive functions and developmental psychopathology. J Child Psychol Psychiatry. 1996;37(1):51–87.

121. Wright Jr KP, Lowry CA, LeBourgeois MK. Circadian and wakefulness-sleep modulation of cognition in humans. Front Mol Neurosci. 2012;5:50.

122. Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. Biol Psychiatry. 2005;57(11):1215–1220.

123. Connolly JJ, Glessner JT, Elia J, Hakonarson H. ADHD & pharmacotherapy: past, present and future: a review of the changing landscape of drug therapy for attention deficit hyperactivity disorder. Ther Innov Regul Sci. 2015;49(5):632.

124. Hawi Z, Cummins TDR, Tong J, Johnson B, Lau R, Samarrai W, et al. The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry. 2015;20(3):289.

125. Fliers EA, Buitelaar JK, Maras A, Bul K, Hohle E, Faraone SV, et al. ADHD Is a Risk Factor for Overweight and Obesity in Children. J Dev Behav Pediatr. outubro de 2013;34(8):566–74.

126. Cortese S, Penalver CM. Comorbidity Between ADHD and Obesity: Exploring Shared Mechanisms and Clinical Implications. Postgrad Med. setembro de 2010;122(5):88–96.

127. Bogdan AR, Reeves KW. Sleep Duration in Relation to Attention Deficit Hyperactivity Disorder in American Adults. Behav Sleep Med. 20 de junho de 2016;1–11.

128. NIMH NI of MH. NIMH » Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): The Basics [Internet]. 2016 [citado 16 de julho de 2018]. Disponível em: https://www.nimh.nih.gov/health/publications/attention-deficit-hyperactivity-disorderadhd-the-basics/index.shtml

129. Owens JA. The ADHD and Sleep Conundrum: A Review. J Dev Behav Pediatr. agosto de 2005;26(4):312.

130. Hemmi MH, Wolke D, Schneider S. Associations between problems with crying, sleeping and/or feeding in infancy and long-term behavioural outcomes in childhood: a meta-analysis. Arch Dis Child. julho de 2011;96(7):622–9.

131. Dimou NL, Tsilidis KK. A Primer in Mendelian Randomization Methodology with a Focus on Utilizing Published Summary Association Data. In: Genetic Epidemiology. Springer; 2018. p. 211–230.

132. Mendel G. Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen Naturforschenden Vereines Brunn 4 3. 1866;44.

133. Gray R, Wheatley K. How to avoid bias when comparing bone marrow transplantation with chemotherapy. Bone Marrow Transplant. 1991;7:9–12.

134. Wheatley K, Gray R. Commentary: Mendelian randomization—an update on its use to evaluate allogeneic stem cell transplantation in leukaemia. Int J Epidemiol. 2004;33(1):15–17.

135. Thanassoulis G, O'Donnell CJ. Mendelian randomization: nature's randomized trial in the post–genome era. Jama. 2009;301(22):2386–2388.

136. Davey Smith G, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? Int J Epidemiol. 2003;32(1):1–22.
137. Zheng J, Baird D, Borges M-C, Bowden J, Hemani G, Haycock P, et al. Recent developments in Mendelian randomization studies. Curr Epidemiol Rep. 2017;4(4):330–345.

138. Gibson M, Munafo MR, Taylor A, Treur JL. Evidence for genetic correlations and bidirectional, causal effects between smoking and sleep behaviours. bioRxiv. 2018;258384.

139. Treur JL, Gibson M, Taylor AE, Rogers PJ, Munafò MR. Investigating genetic correlations and causal effects between caffeine consumption and sleep behaviours. J Sleep Res. 2018;e12695.

140. de Zeeuw EL, van Beijsterveldt CE, Ehli EA, de Geus EJ, Boomsma DI. Attention deficit hyperactivity disorder symptoms and low educational achievement: Evidence supporting a causal hypothesis. Behav Genet. 2017;47(3):278–289.

141. Vaucher J, Keating BJ, Lasserre AM, Gan W, Lyall DM, Ward J, et al. Cannabis use and risk of schizophrenia: a Mendelian randomization study. Mol Psychiatry. 2017;

142. VanderWeele T. Explanation in causal inference: methods for mediation and interaction. Oxford University Press; 2015.

143. VanderWeele TJ, Tchetgen EJT, Cornelis M, Kraft P. Methodological challenges in Mendelian randomization. Epidemiol Camb Mass. 2014;25(3):427.

144. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. The Lancet. 2003;361(9357):598–604.

145. Rydell M, Lundström S, Gillberg C, Lichtenstein P, Larsson H. Has the attention deficit hyperactivity disorder phenotype become more common in children between 2004 and 2014? Trends over 10 years from a Swedish general population sample. J Child Psychol Psychiatry. 27 de fevereiro de 2018;

146. Buttgereit F, Smolen JS, Coogan AN, Cajochen C. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. junho de 2015;11(6):349–56.

147. Vitola ES, Bau CHD, Salum GA, Horta BL, Quevedo L, Barros FC, et al. Exploring DSM-5 ADHD criteria beyond young adulthood: phenomenology, psychometric properties and prevalence in a large three-decade birth cohort. Psychol Med. março de 2017;47(04):744–54.

148. Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, Domingues MR, Barros FC, Victora CG. Cohort Profile: The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Int J Epidemiol. dezembro de 2011;40(6):1461–8.

149. Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, Zanini R, Chrestani Cesar MA, Camargo-Figuera FA, et al. Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. Int J Epidemiol. 1º de outubro de 2014;43(5):1437-1437f.
150. O'Connor TG, Caprariello P, Blackmore ER, Gregory AM, Glover V, Fleming P, et al. Prenatal mood disturbance predicts sleep problems in infancy and toddlerhood. Early Hum Dev. 2007;83(7):451–458.

151. Goodman R. The Strengths and Difficulties Questionnaire: a research note. J Child Psychol Psychiatry. 1997;38(5):581–586.

152. Goodman R. Psychometric properties of the strengths and difficulties questionnaire. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2001;40(11):1337–1345.

153. Woerner W, Fleitlich-Bilyk B, Martinussen R, Fletcher J, Cucchiaro G, Dalgalarrondo P, et al. The Strengths and Difficulties Questionnaire overseas: evaluations and applications of the SDQ beyond Europe. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2004;13(2):ii47–ii54.

154. Fleitlich-Bilyk B, Goodman R. Prevalence of Child and Adolescent Psychiatric Disorders in Southeast Brazil. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 1º de junho de 2004;43(6):727–34.

155. Goodman R, Ford T, Richards H, Gatward R, Meltzer H. The Development and WellBeing Assessment: description and initial validation of an integrated assessment of child and adolescent psychopathology. J Child Psychol Psychiatry. 2000;41(5):645–655.

156. Nagin DS. Group-based modeling of development. Harvard University Press; 2005.

157. Nagin DS, Tremblay RE. Developmental trajectory groups: Fact or a useful statistical fiction? Criminology. 2005;43(4):873–904.

158. Jones BL, Nagin DS. A Stata plugin for estimating group-based trajectory models. 2012;

159. Marinelli M, Pappa I, Bustamante M, Bonilla C, Bonilla C, Suarez A, et al. Heritability and genome-wide association analyses of sleep duration in children: the EAGLE consortium. Sleep. 2016;39(10):1859–1869.

160. Hammerschlag AR, Stringer S, de Leeuw CA, Sniekers S, Taskesen E, Watanabe K, et al. Genome-wide association analysis of insomnia complaints identifies risk genes and genetic overlap with psychiatric and metabolic traits. Nat Genet. 2017;49(11):1584.

161. Burgess S, Butterworth A, Thompson SG. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data. Genet Epidemiol. 2013;37(7):658–665.

162. Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression. Int J Epidemiol. 2015;44(2):512–525.

163. Bowden J, Davey Smith G, Haycock PC, Burgess S. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator. Genet Epidemiol. 2016;40(4):304–314.

164. Hartwig FP, Davey Smith G, Bowden J. Robust inference in summary data Mendelian randomization via the zero modal pleiotropy assumption. Int J Epidemiol. 2017;46(6):1985–1998.

165. Zheng J, Haycock P, Hemani G, Elsworth B, Shihab H, Laurin C, et al. LD hub and MRbase: online platforms for preforming LD score regression and Mendelian randomization analysis using GWAS summary data. In: Behavior Genetics. 2016. p. 815–815.

APÊNDICES

Apêndice 1: Quadro de revisão dos estudos observacionais longitudinais que investigaram associação entre sono e Transtornos do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) incluídos na primeira etapa de busca.

Autor, ano	País	Amostra/N	Desfecho	Instrumento desfecho	Exposição	Instrumento exposição	Medidas apresentadas	Principais resultados	Observações
Peralta et al., 2017	Espanha	Comunitária /817	TDAH (7 anos)	Conners' Parent Rating Scales - CPRS CPRS (>65)	Tempo gasto dormindo (categorias de >10hr/dia e ≤10hr/dia) (4 anos)	Pela questão: Quantas horas por dia o seu filho despende dormindo (incluindo momentos de cochilo)?	>10 hr/d RR=0,97 (95%: 0,95;1,00)	Maior duração de sono protege contra TDAH	Ajuste para variáveis: sexo, amamentação, tabagismo materno, escolaridade materna e paterna, inteligência materna, saúde mental materna, creche/pré-escola, condições neuropsicológicas, saúde mental no *baseline* e região.

Autor, ano	País	Amostra/N	Desfecho	Instrumento desfecho	Exposição	Instrumento exposição	Medidas apresentadas	Principais resultados	Observações

Scott et al., 2013	Inglaterra	Comuni-tária/ 7000	TDAH (90–111 meses)	DAWBA	Duração de sono Despertares noturnos (relato de 3 ou mais) (6,18,42,69, 81 e 115 e 140 meses)	Questionários aplicados nos pais com perguntas sobre os padrões de sono dos filhos. A duração do sono foi calculada do tempo que a criança "normalmente" fica na cama e acorda na manhã.	Despertares noturnos entre TDAH e Não-TDAH (p<0,01 todas associações): 69 meses – TDAH=2,8%, Não-TDAH=0,6%; 82 meses – TDAH=3,5%, Não-TDAH=0,4%; 115 meses - TDAH=6,4%, NãoTDAH=0,4% Diferença absoluta na duração de sono total (Não-TDAH – TDAH): 69 meses - 12m (IC95%: 5-19); 81 meses -15m; (IC95%: 8-22); 115 meses - 11m (IC95%: 4-18) Pegar no sono (1DP) entre pontos no tempo: 42-69 meses RO= 1,49 (IC95%: 1,01-2,22); 115-140 meses RO=1,93 (IC95%: 1,19-3,12)	Crianças com TDAH tiveram menor duração de sono e apresentaram mais despertares Entre os 5 e 9 anos parece ser o momento que estas diferenças aparecem.	Para estimar diferenças na duração de sono total, foi ajuste para: sexo, idade materna, prematuridade, tamanho da família (3 ou mais crianças por família).

Autor, ano	**País**	**Amostra/N**	**Desfecho**	**Instrumento desfecho**	**Exposição**	**Instrumento exposição**	**Medidas apresentadas**	**Principais resultados**	**Observações**

Armstrong et al., 2014	Estados Unidos da América (EUA)	Comunitária / 396	TDAH (4,5, 9 e 18 anos)	MacArthur Health and Behavior Questionnaire (HBQ)	Insônia persistente Movimentos durante o sono persistentes (4,5 e 9 anos)	*Children's Sleep Habits Questionnaire* foi aplicado nas mães (problemas de sono incluíram insônia, movimentos durante o sono, hipersonia	Aos 4,5 anos: crianças com insônia apresentaram maiores escores de hiperativo-desatenção (F=8,74, p=0,003) Aos 9 anos: tanto a insônia (F=8,18; *p*=0,004) quanto movimentos durante o sono (F=17,00; *p*<0,001) foram associados aos sintomas de TDAH. Insônia persistente foi associada a: sintomas de TDAH aos 9 anos (F=7,44; *p*=0,001)); Persistência de movimentos durante o sono foi associada ao TDAH aos 9 anos (F=4,88; *p*=0,008) e aos 18 anos (F=6,68; *p*=0,001 – ajustado também para sintomas de TDAH aos 4,5 anos).	A persistência de insônia e movimentos durante o sono esteve associada ao TDAH aos 9 anos. Ademais, persistência de movimentos durante o sono esteve associado a sintomatologia de TDAH aos18 anos.	Ajustado para sexo e apneia do sono. Não mostra tamanho de efeito

Autor, ano	**País**	**Amostra/N**	**Desfecho**	**Instrumento desfecho**	**Exposição**	**Instrumento exposição**	**Medidas apresentadas**	**Principais resultados**	**Observações**

Gregory et al., 2017	Inglaterra	Comunitária / 2232	Qualidade Sono (score) (18 anos)	Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)	TDAH (5,7,10,12 e 18 anos)	Sintomas de TDAH aos 5,7,10 ou 12 anos relatados pelas mães, e aos 18, entrevista estruturada com os participantes sobre 18 sintomas (DSM-V)	Crianças com TDAH tiveram pior qualidade de sono na vida adulta do que criança sem TDAH (B=0,07, IC95%: 0,02; 0,12) (medida com ajuste do modelo 1) Adultos com TDAH também tiveram pior qualidade de sono quando comparados a adultos sem TDAH (B=0,12; IC5%: 0,06; 0,17) (medida com ajuste do modelo 4)	Indivíduos com TDAH tiveram um score de sono mais pobre tanto quando sintomas aconteceram na infância quanto aos 18 anos.	Ajuste: modelo 1= Sexo, classe social; modelo 4= modelo 1 + TDAH adulto, comorbidade psiquiátrica e insônia materna. Pesquisa feita em gêmeos, avalia possível carga genética

Autor, ano	**País**	**Amostra/N**	**Desfecho**	**Instrumento desfecho**	**Exposição**	**Instrumento exposição**	**Medidas apresentadas**	**Principais resultados**	**Observações**

Steinsbekk et al., 2015	Noruega	Comunitária / 795	Nº sintomas TDAH Insônia Hipersonia Sonambulismo (6 anos)	*Preschool Age Psychiatric Assessment (PAPA interview)*	Nº sintomas TDAH Insônia Hipersonia Sonambulismo (4 anos)	Entrevista psiquiátrica estruturada com os pais (PAPA interiew) baseada nos critérios do DSM IV para insônia, hipersonia e transtorno de pesadelos.	Exposição TDAH: Insônia: RO=1,08 (IC05%:1,02; 1,15); Hipersonia: RO=0,93 (IC95%: 0,88; 1,05); Sonambulismo: RO=0,90 (IC95%: 0,71; 1,14). Desfecho TDAH: Insônia: β =0,47 (DP=0,19); Hipersonia: β = 0,10 (DP=0,07); Sonambulismo: β = 0,49 (DP=0,06)	Sintomas de TDAH foram associados com risco de insônia, bem como o contrário.	Ajustado para outros sintomas mentais; Os achados indicam bidirecionalidade, mas não confirmaram a hipótese

Autor, ano	**País**	**Amostra/N**	**Desfecho**	**Instrumento desfecho**	**Exposição**	**Instrumento exposição**	**Medidas apresentadas**	**Principais resultados**	**Observações**

Williams et al., 2016	Austrália	Comunitária / 4109	TDAH (8-9 anos)	SDQ-subescala	Transtorno do sono severos/moderado (0-1 2-3 4-5 6-7 anos)	Reporte da mãe em cada acompanhamento	0-1 anos: (TDAH=21%, Não-TDAH=17%, p=0.18) 2-3 anos: (TDAH=16%, Não-TDAH=11%, p=0.006) 4-5 anos (TDAH=16%, Não-TDAH=7%, p<0.001) 6-7 anos (TDAH=14%, Não-TDAH=6%, p<0.001)	Crianças com TDAH tiveram maiores problemas de sono 2-3 anos e 6-7 especialmente	Não ajustado

Apêndice 2: Quadro de revisão dos estudos genéticos que investigaram associação entre genes circadianos/do sono e Transtornos do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), conduzidos em humanos e incluídos na segunda etapa de busca.

						Mensuração				
Autor, ano	**Delineamento**	**País**	**População**	**Idade da amostra**	**N**	**Sono**	**TDAH**	**Genes**	**Principais resultados**	**Observações**
Baird et al., 2012	Expressão gênica	País de Gales	Clínica	Adultos; Média de idade grupo controle= 32,3±13,3 e casos= 31,3±11,7.	Casos de TDAH (n=13); controles (n=19)	Actígrafo e marcadores endócrinos (melatonina e cortisol)	Escala de TDAH par adultos da OMS (ASRS), escala de Conners e escala de Wender–Utah (WURS)	*BMAL1* *PER2*	BMAL1 e PER2 mostraram expressão cíclica compatível com o ritmo circadiano no grupo controle, mas não no grupo TDAH. Ritmicidade na secreção de melatonina no grupo controle e uma perda da mesma no grupo com TDHA	Casos e controles pareados por sexo e idade.
Brookes et al., 2006	Genecandidato	Bélgica, Alemanha, Holanda	Clínica/ Familiar	5–17 anos	674 famílias	-	Versões longas da escala de Conners para pais e professores	Seis genes relacionados com ciclo circadiano	Associação entre fenótipo de TDAH e *PER2* em nível de SNP (p=0,017) e na análise de haplótipo (p=0,016)	Objetivo principal não era investigaram a

		, Irlanda, Israel, Espanha, Suíça e Reino Unido.					e Questionários de Pontos Fortes e Dificuldades (SDQ) versões pais e professores	(não descriminados no artigo), dentre eles *PER2* e *CSNK1E.*		relação entre genes do sono e fenótipo de TDAH.
Van Heijden et al., 2005	Genecandidato	Holanda	Clínica	Crianças (6-12 anos)	Casos de TDAH (n=10); controles clínicos (n=10)	Actígrafo no pulso não dominante 24h por uma semana	Entrevistas clínicas e diagnósticas utilizando formulários para pais, crianças e professores	Polimorfismo *PER3* VNTR	Casos com insônia crônica não diferem de controles em frequência alélica de 4 repetições do gene *PER3*(RO= 0,62; IC95%: 0,16; 2,4; *p*=0,73). A frequência do alelo de 4 repetições não esteve a secreção de melatonina tardia (r=0,18; *p*=0,46), início do sono (r= 0,13; *p*= 0,60) ou duração do sono (r= 0,14; *p*= 0,55)	Controles selecionados aleatoriamente da clínica genética. Pode não ter existido uma boa avaliação comportament

									permaneceu não significativa após controle para idade.	al e de problemas de sono entre os controles.
Jeong et al., 2014	Associaçã o com variante genética	Coréia	Trabalh adores e universit ários	25.06 ± 6.05	1289	Escala de *Morningne ss* (CSM)	Escala de Wender Utah -25 (WURS-25)	5 SNPs no gene *CLOCK*: rs1801260 rs3805148 rs12504300 rs4864542 rs12649507	rs1801260 foi associado com as pontuações WURS em ambos os alelos (p=0,018) e análises por haplótipos (intervalo de valores de p: 0,015–0,017) apenas em participantes do sexo masculino. Depois de controlar a pontuação total do CSM como uma covariável, a força da associação não mudou em nada, sugerindo que a associação não foi mediada pela preferência noturna.	Não faz análise de mediação apesar de falar de mediação nos resultados e discussão

Kissling et al., 2008	Genecandidato	Alemanha	Clínica	Adultos 31,3±11,7	143 homens	-	Entrevista diagnóstica de Wender–Reimherr	Polimorfismo na região 3'UTR rs1801260 do gene *CLOCK*	Forte associação entre TDAH e pelo menos um alelo de risco T na região estudada (p<0,001)	Processo amostral não claro
Xu et al., 2010	Genecandidato	United Kingdom and Taiwan	Clínica/ familiar	Crianças 10,41± 2,34	United Kingdom (n = 180) Taiwan (n = 212)	-	Diagnóstico clínico de TDAH (DSM-IV) aos 5-15 anos e escala de Conners	Polimorfismo na região 3'UTR rs1801260 do gene *CLOCK*	Aumento da transmissão do alelo T do polimorfismo rs1801260 na amostra tailandesa (χ^2=6,701, RO=2,06; p=0,010). Transmissão preferencial do alelo T do rs1801260 polimorfismo em ambas amostras (χ^2=7,136, RO=1,53; p=0,008).	Pouco clara a descrição da amostra

Apêndice 3: Quadro de revisão dos estudos genéticos que investigaram associação entre genes circadianos/do sono e Transtornos do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), conduzidos em modelos animais e incluídos na segunda etapa de busca.

Autor, ano	**Animal usado**	**Genes avaliados**	**Método**	**Síntese dos principais resultados**	**Conclusões principais**
Baird et al., 2013	Camundongos machos de linhagem C57BL/6J	*Per1, Per2, Clock* e *C-Fos*	Análises do efeito do tratamento com metilfenidato (MPH) e atomoxetina (ATX) na expressão tecido-cerebral de genes relacionados com ciclo circadiano	MPH: aumenta expressão de *c-Fos* no dorso medial do hipotálamo, áreas do fórnix límbico e córtex cerebral e área estriada e tegmental ventral; regula positivamente a expressão de *Per1* no NPH; ATX: regula negativamente a expressão do *Per1* no NPH e aumenta expressão do *Per1* na área tegmental ventral. MPH e ATX: reduz expressão *Per2* no NSQ e NPH; aumenta expressão de *Per2* e *c-Fos* no *caudate putamen.*	Metilfenidato e atomoxetina atuam nos padrões diurno da expressão genica dos genes Clock, Per1, Per2 e c-Fos. São observados efeitos diferentes em regiões diferentes do cérebro. Os efeitos oriundos da medicação podem estar relacionados com o tratamento do TDAH.
O'Keeffe et al., 2012	Camundongos machos de linhagem C57BL/6J	*Clock, Bmal1, Per2* e *c-Fos*	Análises do efeito do tratamento com atomoxetina no ciclo circadiano, e em períodos de escuridão constantes e expressão tecido-cerebral	O uso da atomoxetine, comparado a solução salina controle, gerou: mudança no ritmo circadiano locomotor (p<0,001) e uma redução na expressão gênica do *Clock* e *c-Fos* (p<0,001). O tratamento de exposição a luz teve efeito na expressão genica do *Clock* (p<0,005); O tratamento de luz e atomoxetina interagiram influenciando o no ritmo circadiano locomotor (p<0,001) e na expressão do gene *Clock.*	A atomoxetina tem o potencial de alterar a fase circadiana, bem como o potencial para alterar o arrastamento para *zeitgebers* de luz, e possivelmente uma parte do potencial terapêutico da droga se dê por meio da modulação do ritmo circadiano
Dela Peña et al., 2017	Ratos machos espontaneamente hipertensicos (SHR/Ncrl), Wistar Kyoto (WKY/Ncrl – controles genéticos) e Wistar (controles "saudáveis").	*Per2* e outros não relacionados ao ciclo circadiano	Análises de expressão tecido-cerebral em ratos modelo de TDAH (SHR/Ncrl) e controles wistars	O tratamento com anfetamina reduziu: a sintomatologia hiperativa em SHRs, níveis mRNA de *Per2* no córtex pré-frontal de SHRs/NCrl. Adicionalmente, comparado aos WKY/NCrl e Wistar rats, os SHR/NCrl apresentaram 21 genes com regulação positiva da expressão e 36 com regulação negativa no córtex pré-frontal. Também foi observado correlação positiva entre a distância percorrida no teste de campo aberto e os níveis de expressão de *Per2* (r=0,476, p=0,118), indicando correlação direta entre atividade locomotora aumentada em SHR/NCrl e gene expressão.	A diferente expressão do gene *Per2* pode desempenhar um papel na fisiopatologia do fenótipo hiperativo do TDAH.

Huang et al., 2015	Zebrafish, incluindo um tipo selvagem AB e linhagem de mutantos	*Period1b (per1b* - gene relacionado a ritmo circadiano e análogo ao *PER1* em humanos*)*	Análises de comportamento animal e de expressão em *zebrafish per1b-/-*	Comparado aos controles selvagens, os peixes mutantes *per1b* apresentaram comportamento mimético de TDAH: maior atividade motora, menor habilidade de aprender ou focar em uma tarefa específica durante o dia (p<0,001), menor capacidade de formar memórias de longo prazo (p<0,05), mais sensíveis às mudanças rápidas de luz/escuridão e são perceptivelmente mais agitados durante o pulso escuro. Comparado aos controles selvagens, os peixes mutantes *per1b* apresentaram desregulação dopaminérgica: tinham níveis significativamente menores de dopamina (p<0,05 testes tanto corpos larvais inteiros como cérebros adultos), decréscimo significativo no número de neurônios dopaminérgicos (p=0,008), super-expressão dos genes envolvidos na síntese e degradação/modificação de *dopamina tyrosine hydroxylase (th), dopamine beta-hydroxulase (dbh) e monoamina oxidase A (mao)* (p<0,05).	A mutação desse gene em *zebrafish* levou a mimetização do fenótipo relacionado com TDAH e esteve relacionada com a desregulação dopaminérgica no animal.

Nota: NSQ=Núcleo Supraquiasmático; NPH=Núcleo Paraventricular do Hipotálamo.

SEÇÃO II. MODIFICAÇÕES NO PROJETO DE PESQUISA

Solicitação de modificação enviada e deferida em junho de 2020

MODIFICAÇÕES NO PROJETO

Conforme o projeto de pesquisa apresentado, inicialmente foi proposta a condução de um estudo de revisão sistemática de literatura incluindo estudos que tivessem explorado a associação entre genética do ciclo circadiano e TDAH. Segundo a busca realizada em 06/01/2018, para o projeto de tese, foram encontrados 6 estudos de revisão narrativa ou sistemática sobre tema, 10 relacionado a observações e evidencias genéticas, e os quais seriam incluídos no estudo de revisão sistemática proposto.

Atualizando esta busca para artigos publicados no período de 2017-2020, foram encontrados 22 artigos de revisão sobre o tema (data 25/07/2020). Ao refazer a busca utilizando a metodologia proposta na sessão 7.2. do Estudo 2 da tese no mesmo período, foram encontrados apenas 5 estudos empíricos:

- Carpena, M. X., Hutz, M. H., Salatino-Oliveira, A., Polanczyk, G. V., Zeni, C., Schmitz, M., ... & Tovo-Rodrigues, L. (2019). *CLOCK* Polymorphisms in AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further Evidence Linking Sleep and Circadian Disturbances and ADHD. Genes, 10(2), 88.
- Coogan AN, Schenk M, Palm D, et al. Impact of adult attention deficit hyperactivity disorder and medication status on sleep/wake behavior and molecular circadian rhythms. Neuropsychopharmacology. 2019;44(7):1198-1206. doi:10.1038/s41386-019-0327-6
- McGowan NM, Uzoni A, Faltraco F, Thome J, Coogan AN. The impact of social jetlag and chronotype on attention, inhibition and decision making in healthy adults [published online ahead of print, 2020 Jan 14]. J Sleep Res. 2020;e12974. doi:10.1111/jsr.12974 - Wang Y, Peng S, Liu T, et al. The potential role of clock genes in children attention-deficit/hyperactivity disorder. Sleep Med. 2020;71:18-27. doi:10.1016/j.sleep.2020.02.021

- Shen C, Luo Q, Chamberlain SR, et al. What Is the Link Between AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder and Sleep Disturbance? A Multimodal Examination of

Longitudinal Relationships and Brain Structure Using Large-Scale Population-Based Cohorts [published online ahead of print, 2020 Mar 31]. Biol Psychiatry. 2020;S00063223(20)31381-0. doi:10.1016/j.biopsych.2020.03.010

Nesse sentido, apesar de um número razoável de artigos originais cumprissem os critérios de inclusão, a publicação das diversas revisões recentes sobre o tema reduziu a nossa probabilidade de acrescentar informação inovadora e relevante no escopo científico sobre o tema. Da mesma maneira, impossibilitaria a publicação do artigo em uma revista de alto fator de impacto. Portanto, o artigo de revisão sistemática foi substituído por um artigo contendo dados originais da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

No artigo incluído, foram realizadas análises de mediação para estimar o efeito de sono direto e indireto no TDAH, que perpassa pelo fenótipo de funções executivas relacionadas a atenção. O estudo justifica-se uma vez que esta via é a teoria neuropsicológica mais utilizada na literatura para explicar a associação entre os fenótipos de sono e TDAH (sessões 1. INTRODUÇÃO e 2. MARCO TEÓRICO do projeto explanam melhor esta relação). Apesar de ser uma teoria utilizada como base para explicações científicas, poucos estudos até o presente momento realizaram análises para testá-la.

Ainda, como fonte adicional de informação ao volume final, foi acrescentado um o publicado pela aluna e sua orientadora supracitado (Carpena, M. X., Hutz, M. H., Salatino-Oliveira, A., Polanczyk, G. V., Zeni, C., Schmitz, M., ... & Tovo-Rodrigues, L. (2019). *CLOCK* Polymorphisms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further Evidence Linking Sleep and Circadian Disturbances and ADHD. Genes, 10(2), 88). O acréscimo deste manuscrito no volume final se justifica pelo fato deste ser um artigo

relevante, que aborda a associação entre a genética de sono/ritmo circadiano e TDAH e corrobora com as evidências apresentadas no artigo 3, o qual foi desenvolvido e publicado no período de doutorado da aluna.

SEÇÃO III. RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

Trabalho de campo, realizado entre março e dezembro de 2018

Relatório
Trabalho de Campo

Subestudo Microbioma

2017

Autoras:

Francine dos Santos Costa

Mariana Otero Xavier

Marina Xavier Carpena

Romina Buffarini

Thais Martins da Silva

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO 111

Histórico de colaboração Brasil - Canadá 111

OBJETIVOS 112

PREPARAÇÃO DO TRABALHO DE CAMPO 113

Seleção de subamostra 113

EQUIPE DE TRABALHO 114

INSTRUMENTOS DE PESQUISA 115

Questionário 115

Antropometria..... 118

Manual de instruções 119

SELEÇÃO E TREINAMENTO DE ENTREVISTADORAS 119

LOGÍSTICA DO TRABALHO DE CAMPO 121

Coleta de dados 121

Central de agendamento 121

Plantões 122

Armazenamento de material biológico no laboratório 123

Materiais para o trabalho de campo 124

Perdas e recusas 124

Estratégias adotadas para reversão de recusas 124

Reuniões de equipe 125

Gerenciamento de dados 125

Análise de consistência 126

Controle de qualidade 126

Envio das amostras ao Canadá 126

RECEITAS E DESPESAS 127

RESULTADOS GERAIS 128

REFERÊNCIAS 132

APÊNDICES 134

1. APRESENTAÇÃO

A Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004 caracteriza-se pelo acompanhamento de 4.231 crianças nascidas vivas em maternidades do município de Pelotas (RS), no período de 1° de janeiro a 31 de dezembro de
2004. O estudo do tipo longitudinal denomina-se "Coorte de Nascimentos de 2004", sob coordenação dos pesquisadores Dra. Iná Silva Santos, Dr. Aluísio J. D. Barros e Dra. Alicia Matijasevich. Desde 2004, foram realizados seis acompanhamentos (aos 3, 12, 24, 48 meses, 6-7 anos e 11 anos) com todos os participantes[1,2].

Este relatório tem por objetivo descrever as atividades desenvolvidas no subestudo intitulado "Perfil do Microbioma intestinal em adolescentes da Coorte de Nascimentos Pelotas 2004", projeto originado a partir de uma parceria entre a Universidade de Toronto e a Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

1.1. Histórico de colaboração Brasil - Canadá

Fundada em 1827 e localizada em Ontário, Canadá, a Universidade de Toronto é uma instituição pública de liderança na educação. Oferece mais de 700 cursos de graduação e 200 de pós-graduação localizados em seus 3 *campi* na área de Toronto, cobrindo diversas áreas do conhecimento. A Universidade de Toronto é considerada a melhor universidade do Canadá na área de Ciências da Saúde e Medicina, com um ótimo programa na área de pesquisa com professores de renome de vários países, que atrai milhares de estudantes canadenses e internacionais.

O Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) da UFPel historicamente produziu pesquisas pioneiras sobre determinantes precoces da saúde. Na última década, houve acúmulo de evidências científicas internacionais que apontam para o potencial papel modulador do microbioma, particularmente do microbioma intestinal, na saúde humana.

Isso despertou o interesse dos pesquisadores da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004 em estudar de que forma as experiências precoces determinam a composição do microbioma intestinal em adolescentes e de que forma o perfil do microbioma intestinal na adolescência se relaciona com a saúde futura. A UFPel e a Universidade de Toronto apresentam colaboração em projetos há aproximadamente seis anos. Publicações como Coll *et al.* (2017)[3], Santos *et al*. (2016)[4] e Bassani *et al*. (2014)[5] demonstram a cooperação entre ambas as universidades em projetos de Pesquisa em áreas da saúde.

Pesquisadores da Universidade de Toronto, Canadá, do Departamento de Ciências Nutricionais (Dr. Elena Comelli) e do hospital pediátrico "Sick Children" (Prof. Robert Bandsma), são especialistas em saúde pediátrica e no estudo do microbioma intestinal. Em 2015, esses pesquisadores procuraram os coordenadores da Coorte de Pelotas de 2004 por meio do pesquisador Diego Bassani, ex-aluno do Programa de PósGraduação em Epidemiologia (PPGE) da UFPel e atualmente professor ajdunto da UofT, com o intuito de propor uma colaboração visando sequenciar o microbioma intestinal de uma subamostra dos adolescentes da Coorte de 2004.

Dessa maneira, foi solicitado um financiamento escrito colaborativamente que visasse a coleta de material biológico em adolescentes brasileiros e canadenses e se fizesse o sequenciamento e análise de composição de bactérias intestinais na Universidade de Toronto, em seu centro de tecnologia de sequenciamento, no laboratório "Centre for the Analysis of Genome Evolution & Function" da Universidade de Toronto. O financiamento intitulado "Microbiome and Nutrition Collaborative Grant" foi submetido e concedido no início de 2016.

O projeto no Brasil foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (FAMED) UFPel sob os números de protocolos 1.896.438 e 2.266.020, bem como pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP) sob registros 2.306.259 e 2.372.760. A coordenação do estudo por parte da UFPel ficou a cargo dos professores Dr. Aluísio J. D.

Barros, Dra. Luciana Tovo Rodrigues e Dra. Maria Carolina Borges.

2. OBJETIVOS

O objetivo primário do presente projeto consistiu em coletar material fecal dos participantes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004. O material coletado será utilizado para avaliar o padrão da microbiota intestinal dos adolescentes. A integração dos dados sobre o padrão da microbiota intestinal com outros dados regularmente coletados nos acompanhamentos da Coorte permitirá:

(1) A investigação de fatores determinantes na infância críticos ao estabelecimento do perfil da microbiota intestinal na adolescência, em particular no que se refere à condição socioeconômica, padrão de dieta e trajetória de crescimento infantil;

(2) A avaliação da relação entre o padrão da microbiota intestinal no início da adolescência e o crescimento, maturação sexual e composição corporal ao longo da adolescência.

Para os objetivos específicos deste projeto, além dos dados já coletados nos acompanhamentos anteriores[1,2], foram acrescentadas avaliações antropométrica, de composição corporal, dos hábitos alimentares e de fatores sociodemográficos.

3. PREPARAÇÃO DO TRABALHO DE CAMPO

A preparação para o trabalho de campo do subestudo iniciou no mês de março de 2017. Durante as reuniões semanais de equipe, prévias ao início do trabalho de campo, foram discutidos aspectos logísticos e pertinentes à construção dos instrumentos de pesquisa.

3.1. Seleção de subamostra

Entre setembro de 2009 e janeiro de 2010 foi realizado o primeiro acompanhamento de saúde bucal com uma subamostra da Coorte de Nascimentos de 2004

(1303 indivíduos). Em 2017 foi realizado o segundo acompanhamento com os nascidos entre os mesmos meses no ano de 2004. A coleta de dados teve início em abril deste ano e término em outubro de 2017.

Os participantes do estudo do microbioma intestinal foram sorteados a partir da amostra de saúde bucal. Foi realizada seleção aleatória a partir dos estratos de escore z de IMC para idade. Foram excluídos da subamostra aqueles adolescentes com comprometimento cognitivo, que inviabilizaria a coleta de fezes ou aplicação do questionário, gestantes e adolescentes que tiveram filho nos seis meses anteriores a entrevista. Dos 1303, 409 adolescentes foram sorteados para participar do estudo de caracterização de microbioma por meio da coleta de amostras de fezes.

4. EQUIPE DE TRABALHO

A equipe de trabalho inicial do subestudo foi composta pelos seguintes integrantes:

Coordenadores: Dr. Aluísio J. D. Barros, Dra. Luciana Tovo Rodrigues e Dra. Maria Carolina Borges

Supervisora do trabalho de campo: Dra. Romina Buffarini

Doutorandas: Marina Xavier Carpena e Thais Martins da Silva

Responsáveis pelo banco de dados: Rafaela Costa Martins (responsável pelo banco do Subestudo) e Cauane Blumberg Silva (responsável pelo banco da Coorte de 2004).

Secretária: Nathália Victória Pinto da Silva (encarregada de agendar as entrevistas e repassar a agenda para as entrevistadoras, auxiliar as supervisoras de campo em questões administrativas - como pagamento, distribuição de vales transporte, compra e reposição de material, contato com fornecedores, entre outros).

Três entrevistadoras: responsáveis por aplicar questionário, coletar informações antropométricas e receber/entregar a amostra fecal no CPE.

Além disso, desde o princípio a equipe contou com o apoio da Doutoranda Lorena Lopez da Universidade de Toronto, que auxiliou na elaboração dos instrumentos de pesquisa e na supervisão do trabalho de campo com a participação semanal nas reuniões da equipe.

No decorrer do trabalho de campo, a equipe sofreu algumas modificações. A supervisora Romina Buffarini fez parte da equipe até o mês de junho de 2017, quando se ausentou para assumir uma bolsa de pós-doutorado no PPGE. Nessa ocasião foi incorporada à equipe a doutoranda do PPGE Mariana Otero Xavier. A partir deste período as três doutorandas se responsabilizaram pela supervisão geral do trabalho de campo.

Posterior a aprovação do projeto no CONEP, a doutoranda do PPGE Francine dos Santos Costa (supervisora geral do subestudo da Saúde Bucal) foi convidada a trabalhar no levantamento das assinaturas do novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico para envio das amostras ao Canadá. Além disso, ficou responsável pelo rastreio de indivíduos até então não encontrados e auxílio nas demais tarefas de campo do período. Para a realização de resolução de inconsistências, controle de qualidade e para acelerar o processo de agendamento de entrevistas, a equipe contou com a colaboração de dois bolsistas de Iniciação Científica (IC), Rodrigo Darley e Miguel Mascarenhas durante os meses de julho a dezembro de 2017.

5. INSTRUMENTOS DE PESQUISA

5.1. Questionário

O questionário foi elaborado pelas doutorandas Marina Xavier Carpena, Thais Martins da Silva e Lorena Dominguez (Canadá), sob orientação da supervisora de campo Romina Buffarini e das coordenadoras de campo Luciana Tovo Rodrigues e Maria Carolina Borges. O questionário foi elaborado com base em questionários anteriores e inclusão de outros temas julgados relevantes ao projeto proposto (Apêndice 1).

Os questionários foram elaborados na versão papel e, posteriormente, inseridos no formato digital para serem aplicados através do uso de *tablets,* através do programa REDCap® (Research Electronic Data Capture)[6]. A doutoranda Rafaela Costa Martins foi responsável por esta etapa.

Em maio de 2017 os questionários foram testados em adolescentes não elegíveis para o estudo. O teste foi realizado com o objetivo de avaliar o tempo de aplicação, a compreensão por parte das entrevistadas e o funcionamento do *tablet*.

O questionário foi dividido em 8 blocos: Bloco A – Identificação; Bloco B – Animais domésticos; Bloco C – Estilo de vida; Bloco D1 – Coleta de fezes (Informações da folha de coleta); Bloco D2 – Coleta de fezes (Informações perguntadas); Bloco E – Medicamentos e doenças crônicas; Bloco F – Puberdade; Bloco G - Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e Bloco H – Medidas antropométricas. Cada um dos blocos será detalhado nos itens que seguem:

a) Identificação

Este bloco abrange apenas a identificação dos participantes, como: nome do adolescente, sexo e cor da pele. Ainda, questões de identificação da entrevistadora podem ser observadas: nome da entrevistadora, código da entrevistadora, data e horário da entrevista.

b) Animais domésticos

O bloco de animais domésticos inclui perguntas acerca de quantos e quais bichos de estimação (assim considerado pelo adolescente) o entrevistado possui, bem como, o período que esse(s) animal(is) costuma ficar dentro de casa.

b) Estilo de vida

Este bloco foi construído com o objetivo de abranger questões relacionadas com o estilo de vida do adolescente, incluindo mudanças na prática de atividade física no último ano e consumo alimentar da última semana. As questões de alimentação dizem respeito ao número de dias que o adolescente consumiu determinado alimento na última semana, bem

como, o número de vezes ao dia. Para certos alimentos, como por exemplo, refrigerante e suco artificial, foi perguntado o tipo consumido (normal, diet/light/zero ou ambos). Por fim, este bloco ainda contou com questões referentes a adesão a dietas do tipo sem lactose, sem glúten, vegana ou vegetariana, ainda o motivo e quais alimentos e adolescente evita consumir.

c) Coleta de fezes

Este bloco foi dividido em duas partes, uma para preenchimento do próprio adolescente ao final da coleta de fezes (Bloco D1) e a outra, perguntada pela entrevistadora, no mesmo da visita e entrega do material coletado (Bloco D2) (Apêndice 2). A primeira etapa inclui questões sobre a coleta, como dia, horário, dificuldade durante a realização da coleta, uso de medicamentos (antibiótico, laxante, probiótico ou outro tipo) queixas como febre, diarreia, entre outros no dia anterior a realização da coleta de fezes, bem como a identificação do tubo. A segunda etapa era composta por questões sobre como ficou armazenamento o material coletado até a sua entrega e sobre o funcionamento intestinal do adolescente (como por exemplo, a frequência semanal e diária de evacuações).

d) Medicamentos e doenças crônicas

O bloco de medicamentos foi construído com base em questionários aplicados em acompanhamentos anteriores da coorte, bem como, baseou-se na literatura para o questionamento sobre o uso de medicamentos que poderiam modificar/influenciar a microbiota intestinal. Este bloco abrange perguntas sobre o uso de antibióticos, laxantes, probióticos e outros medicamentos de uso contínuo. Ainda, foi questionado o motivo do uso do medicamento, quem o indicou, quantos tratamentos foram realizados e há quanto tempo o medicamento foi utilizado pela última vez.

f) Puberdade

Este bloco foi construído com uma ferramenta de autoavaliação da puberdade já utilizada anteriormente (como por exemplo nos estudos de ALSPAC e NHANES III). Para o

presente estudo, foram adicionadas instruções para o entrevistador neste bloco. As instruções foram desenvolvidas com a ajuda da Dra. Jill Hamilton, endocrinologista da SickKids, com experiência em trabalhar com puberdade e o com o questionário em questão.

Apesar de ter sido a primeira vez que essas instruções foram utilizadas e de não haver estudo de validação para este método, a escala de Tanner, a qual se baseia este instrumento já foi validada anteriormente para ambos os sexos[7,8]. Da mesma maneira, os desenhos utilizados por este questionário para ajudar na autoavaliação do estágio puberal por parte do adolescente entrevistado já foram validados[9].

g) Questionário de Frequência Alimentar

Este bloco foi construído com base em questionários aplicados em acompanhamentos anteriores da coorte. O adolescente foi convidado a relatar a frequência de consumo alimentar com ajuda de uma escala *Likert* com as seguintes categorias: nunca ou quase nunca, 1 a 3 vezes no mês, 1 vez por semana, 2 a 4 vezes na semana, 5 a 6 vezes na semana, 1 vez por dia, 2 a 4 vezes por dia, cinco vezes ou mais por dia. Adicionalmente, para cada alimento questionado, foi perguntada a quantidade ingerida com as seguintes opções de resposta: menos, igual ou mais. Para ajudar a dimensionar a quantidade ingerida, neste momento, era apresentado ao adolescente um livro com figuras ilustrativas de porções consideradas para cada alimento.

h) Medidas antropométricas

O último bloco do questionário incluiu a antropometria, a qual será detalhada no próximo tópico deste relatório.

5.2. Antropometria

Quanto às medidas antropométricas, foram aferidas a circunferência da cintura, altura e peso dos adolescentes. Todo o procedimento foi baseado na metodologia proposta

por Habicht (1974)[10], a qual diz respeito à adequação da técnica de coleta para aumentar sua precisão e exatidão. Primeiramente, foi feita a medida da circunferência da cintura com fita métrica inextensível de marca Cescorf ®, com extensão de 2,0 metros, graduação em milímetros e numerada a cada centímetro. A cintura foi mensurada diretamente sobre a pele no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, ao final de uma expiração normal de maneira a não comprimir a pele. A medida foi tomada duas vezes e, em caso de uma diferença maior de 1cm entre ambas, foi realizada uma terceira medida. Os valores foram registrados no questionário.

Posteriormente, o adolescente era convidado a vestir um avental para a tomada das medidas de altura e peso. A medida da altura foi realizada com um antropômetro adulto montável da marca ALTURAEXATA®, com altura máxima de 2,13m e escala em 100cm, com os indivíduos em pé, com os pés descalços e paralelos, de maneira que os ossos do tornozelo permanecessem encostados no antropômetro, com os braços ao longo do corpo e a cabeça com olhar fixo num ponto a frente, conforme plano de *Frankfurt.* Ao final da primeira medida, o processo foi repetido e, assim como ocorreu com a circunferência da cintura, havendo diferença superior a 1 cm entre as duas medidas, a altura foi aferida uma terceira vez.

Por último, o peso foi aferido. A balança digital marca TANITA® modelo BC558, com capacidade máxima de 150 quilogramas e precisão de 100 gramas, foi posicionada em piso plano firme e suficientemente iluminado. O entrevistado ao subir na balança deveria manter o corpo ereto e a cabeça erguida, com o peso igualmente distribuído nos dois pés e com os braços estendidos ao longo do corpo. A leitura da medida foi feita após o sinal da balança. Após o final do processo, o peso foi aferido novamente seguindo o mesmo procedimento das medidas anteriores e foram registradas as roupas que o entrevistado estava vestindo no momento da pesagem.

5.3. Manual de instruções

O manual de instruções para a coleta de dados serviu como guia para as entrevistadores e supervisoras do trabalho de campo no momento da entrevista. Foi o material de apoio nos casos de dúvidas, tanto no registro de informações no *tablet*, quanto para esclarecer questões relacionadas ao tipo de resposta. Um exemplar impresso fazia parte do material de cada entrevistadora, assim como uma versão eletrônica presente em cada um dos *tablets* utilizados por elas.

6. SELEÇÃO E TREINAMENTO DE ENTREVISTADORAS

Nos meses de abril e maio de 2017 ocorreu a seleção e recrutamento de pessoal para trabalhar no acompanhamento. A seleção de entrevistadoras foi divulgada no site do PPGE, com período de inscrição entre 31 de março a 6 de abril de 2017. Para compor o cargo de entrevistadora as candidatas deveriam estar de acordo com os seguintes requisitos: ser do sexo feminino, maior de 18 anos de idade, possuir ensino superior completo, dispor de veículo próprio e disponibilidade de horários para cumprimento de uma jornada de trabalho com 44 horas semanais.

Após a análise das fichas de inscrição, foi realizada uma entrevista presencial com 09 candidatas, sob responsabilidade da supervisora de campo Romina Buffarini, pela coordenadora do campo Luciana Tovo Rodrigues e pela secretária das coortes de Pelotas Mariana Haertel, no dia 10 de abril de 2017. Nesta instância, 07 candidatas foram préselecionadas e convidadas a participar do treinamento presencial para a aplicação do questionário.

A responsabilidade pela organização das atividades referente ao treinamento posterior a seleção ficou a cargo das doutorandas. O treinamento incluiu: (a) apresentação geral da coorte e instruções gerais a respeito do trabalho e postura adequada da entrevistadora; (b) leitura de cada bloco do questionário geral e do manual de instruções

com o objetivo de fornecer as instruções específicas de cada questão; (c) aplicações simuladas entre as próprias candidatas; (d) treinamento de uso do *tablet.*

O treinamento deve duração de três dias, de 3 a 5 de maio. Ao final de cada dia, dramatizações eram realizadas com a intenção de desenvolver a capacidade de manejo do *tablet* das candidatas e como uma maneira das doutorandas avaliarem o desempenho de cada uma. Ao final do treinamento, foi cedido um turno para as entrevistadoras estudarem o manual de instruções. Por fim, foi realizada prova escrita.

A avaliação para seleção final de 2 entrevistadoras foi realizada através da prova teórica e pontualidade, postura e desempenho durante o treinamento, avaliado pelas doutorandas. Duas candidatas foram aprovadas primeiramente neste processo de seleção e 2 suplentes foram chamadas posteriormente, para substituição das entrevistadoras desistentes. Além disso, uma aluna de mestrado foi indicada para compor a equipe de coleta de dados como entrevistadora, totalizando uma equipe com 3 entrevistadoras.

A padronização de medidas ocorreu nos dias 11, 12 e 15 de maio de 2107. Realizou-se o treinamento prático para a padronização da coleta das medidas antropométricas, com carga horária total de aproximadamente 18 horas com as candidatas selecionadas na sede do PPGE. Durante o processo de padronização, as candidatas foram orientadas sobre a realização da técnica correta das medidas de peso, altura e circunferência da cintura. Utilizaram-se planilhas de avaliação para cada candidata com as médias dos erros técnicos das medidas de peso, altura e circunferência da cintura observadas, segundo os erros intra e inter-observador - erros entre os resultados obtidos pela própria entrevistadora e erros de cada entrevistadora comparados ao padrão-ouro, respectivamente - e de acordo com a metodologia de Habicht (1974)[10] supracitada. Durante o treinamento a pessoa considerada padrão-ouro na aferição das medidas antropométricas mensurou o peso, altura e circunferência da cintura de 10 voluntários, em duas rodadas distintas. O mesmo processo foi realizado pelas candidatas ao cargo de entrevistadora, quantas vezes fosse necessário

até se obter concordância entre os resultados encontrados. O processo de padronização foi realizado novamente durante a nova seleção de entrevistadoras que precisou ser realizada durante o trabalho de campo.

7. LOGÍSTICA DO TRABALHO DE CAMPO

7.1. Coleta de dados

O trabalho de campo teve início em 18 de maio de 2017. A captação dos adolescentes elegíveis se deu via entrevistadoras do subestudo da Saúde Bucal. Estas entrevistadoras eram avisadas anteriormente sobre os adolescentes elegíveis para o subestudo do Microbioma. Na ocasião da entrevista de saúde bucal, para aqueles adolescentes elegíveis também para o subestudo do Microbioma era entregue a carta de apresentação para explicar a pesquisa (Apêndice 3) e realizado o convite ao adolescente e seu respectivo responsável. Após aceito o convite, eram entregues o TCLE (Apêndice 4) e Termo de Assentimento (Apêndice 5) ao responsável e ao adolescente, respectivamente. Após o consentimento era entregue um envelope com o kit para coleta de amostra fecal e explicado o procedimento de coleta de fezes (Apêndice 6) verbalmente, além de apresentado um vídeo explicativo no *tablet* como material de apoio.

Figura 1. Kit de coleta de fezes

7.1.1. Central de agendamento

A central de agendamento (CA), sob responsabilidade da secretária Nathália Victória, consistiu em um ponto chave para a realização de todo o trabalho de campo. Era de responsabilidade da CA a marcação e confirmação de todas as entrevistas.

Após a primeira etapa da captação dos adolescentes elegíveis pelas entrevistadoras do subestudo da Saúde Bucal, as entrevistas eram sincronizadas pela supervisora do subestudo da Saúde bucal dos *tablets* dessas entrevistadoras para download no sistema. Assim, a secretária do subestudo do Microbioma tinha conhecimento de quais adolescentes já haviam aceitado o convite e estavam com o material necessário para a coleta. Esperavase passar aproximadamente dois dias da entrega do material (kit de coleta) e a secretária ligava para realizar o agendamento da entrevista e recolhimento da amostra fecal.

Cada entrevistadora do subestudo do Microbioma recebia até às 18horas do dia anterior a agenda de trabalho do dia seguinte, onde constavam o nome do adolescente e do responsável, bem como informações de endereço e telefone para contato. De posse dessas informações, a entrevistadora se deslocava até a casa do participante para realizar a entrevista e receber a coleta da amostra fecal. Primeiramente a entrevistadora, se apresentava mediante a carta de apresentação e se certificava de que o participante havia realizado a coleta de amostra fecal. Após esse procedimento, eram realizadas a entrevista e as medidas antropométricas.

Ressalta-se que, mesmo após já ter sido realizada uma abordagem pessoalmente pela equipe do estudo de saúde bucal, muitas vezes a CA encontrou dificuldades em localizar os adolescentes pelo telefone e endereços indicados. Nesses casos foram utilizadas estratégias de busca dos adolescentes elegíveis via contato com os vizinhos, e redes sociais como o *Facebook* dos pais e *Whats app*.

7.1.2. Plantões

No início do trabalho de campo o descarregamento de *tablets* e entrega da amostra de coleta de fezes para as supervisoras era realizado ao final de cada dia de entrevista ou na manhã seguinte (quando a entrevista era realizada no turno da noite). A partir de julho, foram estipulados três dias (segunda, quarta e sexta-feira) para que as entrevistadoras fossem ao QG da Coorte de 2004 no Centro de Pesquisas para descarregar as entrevistas dos *tablets* e levar as amostras de coleta de fezes para que as supervisoras pudessem armazenar o material biológico no laboratório. Nesses três dias de plantão, durante todo o dia estava presente no QG da Coorte de 2004 pelo menos uma supervisora e diariamente as supervisoras estavam constantemente à disposição das entrevistadoras via telefone e/ou *Whatsapp* para resolução de qualquer problema ou dúvidas que porventura surgissem durante o trabalho de campo das entrevistadoras. Ademais, nesses três dias de entrega das amostras e descarregamento das entrevistas dos *tablets* era sempre realizada uma conferência dos diários de campo (cadernos de anotações das entrevistadoras) para sanar quaisquer dúvidas ou resolver problemas pertinentes ao estudo junto às entrevistadoras.

7.1.3. Armazenamento de material biológico no laboratório

A entrega das amostras para os plantonistas era realizada após a entrevista, durante o descarregamento dos dados. As amostras eram registradas em um caderno de registro e, em seguida, levadas ao laboratório para armazenamento. O manuseio foi realizado de acordo com as normas de biossegurança vigentes no laboratório, utilizando luvas durante todo o procedimento. Às amostras, as quais eram entregues em envelopes e recipiente hermeticamente fechado, eram atribuídos os respectivos números de registro e, após, realizado o armazenamento em caixas com dimensões especialmente projetas, em temperatura ambiente, que variou de 18° a 20°C.

Além do registro das amostras em caderno, foram preenchidas duas planilhas no Microsoft Excel®, uma para controle de dados referentes à amostra e outra para controle da temperatura da sala de armazenamento, no laboratório. Na planilha de controle da

amostra eram registradas informações sobre: número da caixa, número da amostra, número de identificação do participante, número de identificação do tubo, data da coleta, data e hora da entrega e registro da amostra, quem entregou e quem recebeu a amostra e observações referentes a quantidade de amostra coletada (no limite recomendado, acima da linha limite ou abaixo da linha limite do tubo).

Durante o campo, as amostras foram pesadas em balança de alta precisão quando houvesse suspeita de perda do meio líquido do tubo ou quantidade insuficiente de fezes. No apêndice 7 deste relatório consta o detalhamento dos procedimentos que foram adotados para a coleta e transporte de amostra de fezes durante o trabalho de campo.

7.1.4. Materiais para o trabalho de campo

Todas as entrevistadoras receberam uma mochila contendo dois jalecos e um crachá identificador com o logotipo das coortes de nascimentos de Pelotas, além dos demais materiais, como o *tablet*, questionários em papel (caso ocorresse qualquer problema com o *tablet*), manual de instruções, diário de campo, instrumentos para realização da antropometria e luvas para recebimento da coleta de fezes. As entrevistadoras foram orientadas a se deslocarem para o trabalho e realizarem entrevistas somente vestindo o uniforme.

7.2. Perdas e recusas

As perdas do estudo foram de dois tipos: aquelas que ocorreram no estudo de saúde bucal e aquelas que ocorreram após o convite para participação no estudo do Microbioma. Foram considerados como perdas todos os participantes com os quais não foi possível entrar em contato, seja por telefone ou no domicílio. As tentativas de contato foram feitas pelo telefone (pelo menos seis tentativas em horários alternados), visita domiciliar em horários alternados e através de redes sociais.

As recusas foram de três naturezas: recusas definitivas (aquelas que eram recusas para os dois subestudos no geral), recusas indiretas (que foram para entrevistadoras da saúde bucal no momento do convite) e recusas diretas (para a equipe do Microbioma). Todas as recusas identificadas durante o trabalho de campo eram encaminhadas para a central de agendamento que, imediatamente, repassava a informação para os supervisores e responsáveis pela tentativa de reversão das mesmas.

7.2.1 Estratégias adotadas para reversão de recusas

Em caso de recusa para a entrevistadora no estudo de Saúde Bucal ou para a equipe do estudo do Microbioma, era realizado contato telefônico com o participante e responsável pela central de agendamentos para agendar a tentativa de reversão. A tentativa de reversão era realizada com o auxílio de um vídeo explicando com detalhes a importância da participação na pesquisa. Em caso de insucesso, as recusas foram denominadas "definitivas".

7.3. Reuniões de equipe

Semanalmente eram realizadas reuniões de equipe para atualização do andamento do campo, bem como discussão de eventuais problemas e definição das medidas a serem tomadas para solucioná-los. Destas reuniões participavam as coordenadores, as supervisoras de campo e a doutoranda do Canadá, a secretária, além de em muitas delas estar presente também a responsável pelo banco de dados. As reuniões gerais da equipe completa, incluindo as entrevistadoras, eram realizadas somente mediante necessidade. Normalmente as reuniões era realizadas nas quintas feiras e até este dia todos os membros da equipe poderiam enviar pautas que gostariam que fossem discutidas na reunião da semana para a doutoranda responsável pela organização das reuniões. Os números do campo, ou seja, número de entrevistas realizadas, entrevistas pendentes, número de perdas e recusas, bem como casos peculiares a serem resolvidos eram sempre relatados e

discutidos nas reuniões. Toda e qualquer decisão tomada sobre os assuntos abordados durante as reuniões ficavam registrados em ata disponível para todos os membros da equipe em uma pasta compartilhada.

7.4. Gerenciamento de dados

Conforme mencionado anteriormente, a sincronização dos t*ablets* para *download* das entrevistas, tanto da abordagem inicial pela equipe da Saúde Bucal, quanto as entrevistas realizadas posteriormente pelo subestudo do Microbioma eram realizadas semanalmente. No início do campo o descarregamento ocorria mais frequentemente (quase diariamente) do que no final do campo (três vezes na semana), quando começou a diminuir o fluxo de entrevistas.

O REDCap® (Research Electronic Data Capture)[6] foi o software utilizado na coleta e gerenciamento de dados. O programa permite que seja realizada a coleta via *tablet* e que após o *download* os dados fiquem armazenados *online* na nuvem. Desde o programa podese conduzir *backup* e baixar o banco de dados, assim como foi realizado em diferentes momentos do projeto e salvo a atualização do banco de dados a cada 15 dias.

7.4.1. Análise de consistência

Após a sincronização de todos os *tablets* com entrevistas do subestudo do Microbioma, a responsável pelo banco de dados, era avisada sobre o término e procedia então a extração dos dados para um banco em formato ".dta". Neste banco era rodado o script para detecção de inconsistências. Um relatório de inconsistências era disponibilizado para as supervisoras, via e-mail. As inconsistências apontadas no relatório eram transferidas para uma planilha de Excel e, após solucionadas, eram enviadas novamente com as respectivas resoluções para a responsável pelo banco de dados realizar os ajustes

necessários no banco. O prazo para resolução das inconsistências era de uma semana após o *download* da entrevista e envio da planilha.

7.4.2. Controle de qualidade

A qualidade dos dados foi assegurada por um conjunto de medidas adotadas anteriormente ao trabalho de campo e por meio da aplicação do questionário de controle de qualidade (CQ) para avaliar a repetibilidade e/ou concordância das respostas em dois momentos do estudo. Semanalmente, 10% dos entrevistados eram sorteados aleatoriamente para realização do CQ. Estes recebiam uma ligação telefônica, realizada pelas supervisoras ou pelo bolsista responsável, e respondiam a uma versão reduzida do questionário e também a questões sobre a percepção e satisfação relativa ao trabalho da entrevistadora (total de 15 perguntas). O questionário de controle de qualidade está apresentado no Apêndice 8.

7.5. Envio das amostras ao Canadá

Para que fosse possível o envio das amostras para análise foi necessária coleta de um segundo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido. Uma entrevistadora, especialmente treinada para tal função, visitou as residências de todos os participantes do estudo do Microbioma. O envio das amostras para a Universidade de Toronto, Canadá, será realizado através de uma empresa especializada no transporte de material biológico. O transporte será feito em embalagem recomendada pela empresa, em temperatura ambiente.

8. RECEITAS E DESPESAS

	Justificativa	Unidade (R$)	Participantes (número)	Período (meses)	Total (R$)
Recursoshumanos					
Bolsa CNPq (DTI-C)	Pagamento de um entrevistador	1100		3	3300
Bolsa CNPq (DTI-C)	Pagamento de um técnico para avaliação de composição corporal	1100		3	3300
Bolsa CNPq (DTI-C)	Pagamento de um técnico para avaliação antropométrica	1100		3	3300
Material de consumo					
Materiais de consumo da clínica	Materiais necessários ao funcionamento dos equipamentos de composição corporal e outros custos associados à clínica do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da UFPel	2000		3	6000
Kits para coleta de fezes	Materiais necessários para coleta e armazenamento das fezes	100	1200		120000
Outros gastos					
Transporte das amostras coletadas	Pagamento de motociclista para coletar as fezes no domicílio dos participantes e entregar na clínica do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da UFPel	10	1200		12000
Ressarcimento aos participantes	Ressarcimento dos participantes por custo de deslocamento e refeições durante o tempo de permanência espera na clínica do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da UFPel	50	1200		60000
TOTAL					**207900**

9. RESULTADOS GERAIS

O fluxograma apresentado na Figura 2. demonstra o detalhamento dos números finais do trabalho de campo do subestudo Microbioma. A amostra original foi inicialmente composta por 409 indivíduos, porém foram necessárias reposições para se atingir o número mínimo necessário para o estudo. Ao final, o total de 499 compuseram a amostra final. A coleta de dados ocorreu entre março e dezembro de 2017. Ao todo foram entrevistados 366 adolescentes, sendo 192 (52,5%) do sexo masculino. A Tabela 1 apresenta uma breve descrição da amostra.

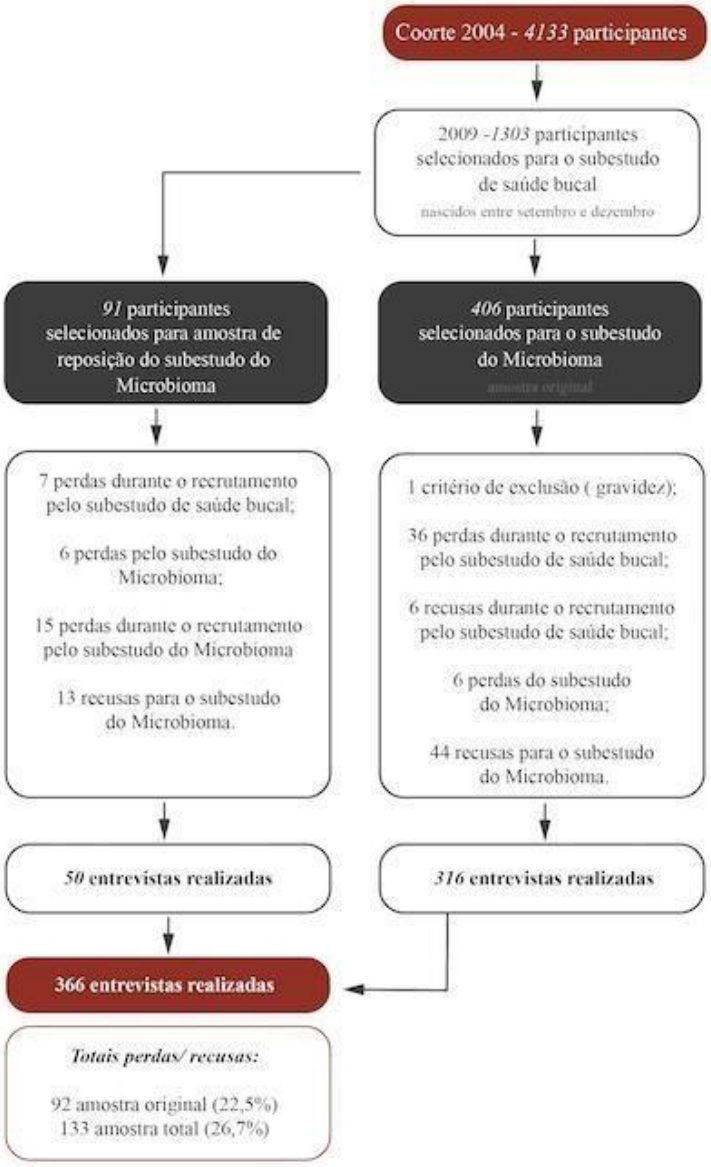


Figura 2. Fluxograma subestudo Microbioma

Tabela 1. Descrição da amostra subestudo Microbioma. Pelotas, RS, 2017. (n= 366)

Variáveis	N	%
Sexo		
Masculino	192	52,5
Feminino	174	47,5
Cor da pele		
Branca	236	64,4
Preta	54	14,8
Parda	57	15,6
Amarela	6	1,6
Indígena	9	2,5
IGN	4	1,1
Estado nutricional*		
Baixo peso	11	3,0
Eutrofia	192	52,9
Excesso de peso	75	20,7
Obesidade	85	23,4
TOTAL	366	100,0

*a variável contém 3 dados faltantes

Nas Tabelas 2 e 3 pode-se observar uma comparação entre os participantes e as perdas/recusas do subestudo Microbioma - somente amostra original e amostra total, respectivamente - de acordo com características socioeconômicas, demográficas e de saúde das mães e das crianças coletadas no *baseline* e no acompanhamento dos 11 anos de idade da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. Não foram verificadas diferenças significativas, exceto em relação ao fumo materno na gestação (mais prevalente entre as perdas/recusas) na análise realizada considerando a amostra total (Tabela 3).

Com intuito de detectar possíveis problemas na coleta de dados e verificar a repetibilidade das respostas, foi aplicado um controle de qualidade em 10,1% da amostra

(37 indivíduos). O *kappa* das questões D014 (*Você tem cachorro em casa?*) e D015 (*Tomou antibiótico nos últimos 6 meses?*) foram, respectivamente, 0,89 e 0,59. O questionário de controle de qualidade completo está disponível no Apêndice 8 deste relatório.

Tabela 2. Comparação de características maternas e da criança (estudo perinatal da coorte 2004) e estado nutricional (aos 11 anos) entre os participantes e as perdas/recusas da amostra original do subestudo Microbioma. Pelotas, RS, 2017. (n= 408)

Variáveis	**Realizados N (%)**	**Perdas/recusas N (%)**	***p****
Sexo			1,00
Masculino	163 (51,6)	47 (51,1)	
Feminino	153 (48,2)	45 (48,9)	
Cor da pele			0,365
Branca	220 (69,8)	57 (63,3)	
Preta	33 (10,5)	9 (10,0)	
Parda	54 (17,1)	19 (21,1)	
Outra	8 (2,5)	5 (5,6)	
Escolaridade materna (anos)			0,302
0-4	35 (11,2)	16 (17,6)	
5-8	110 (35,3)	27 (29,7)	
9-11	112 (35,9)	29 (31,9)	
12 ou mais	55 (17,6)	19 (20,9)	
IEN (quintis)			0,958
1 (mais baixo)	53 (21,1)	14 (22,6)	
2	45 (17,9)	12 (19,3)	
3	54 (21,5)	11 (17,7)	
4	60 (23,9)	14 (22,6)	
5 (mais alto)	39 (15,5)	11 (17,7)	
Fumo Gestação			0,138
Não	239 (73,6)	62 (67,4)	
Sim	77 (24,4)	30 (31,6)	
Algum transtorno mental			0,304

Não	274 (87,0)	75 (82,4)	
Sim	41 (13,0)	16 (17,6)	
Estado nutricional			0,685
Eutrófico	246 (77,8)	75 (81,5)	
Sobrepeso	52 (16,5)	14 (15,2)	
Obesidade	18 (5,7)	3 (3,3)	
TOTAL	316 (100,0)	92 (100,0)	

Nota: * valor de *p* teste Exato de Fisher.

Tabela 3. Comparação de características maternas e da criança (estudo perinatal da coorte 2004) e estado nutricional (aos 11 anos) entre os participantes e as perdas/recusas da amostra total do subestudo Microbioma. Pelotas, RS, 2017. (n= 499)

Variáveis	**Realizados N (%)**	**Perdas/recusas N (%)**	**(*p*)***
Sexo			0,840
Masculino	191 (52,2)	68 (51,1)	
Feminino	175 (47,8)	65 (48,9)	
Cor da pele			0,418
Branca	248 (68,0)	83 (64,3)	
Preta	45 (12,3)	19 (14,7)	
Parda	64 (17,5)	21 (16,3)	
Outra	8 (2,2)	6 (4,6)	
Escolaridade materna (anos)			0,380
0-4	46 (12,8)	25 (18,9)	
5-8	125 (34,7)	41 (31.1)	
9-11	127 (35,3)	43 (32,6)	
12 ou mais	62 (17,2)	23 (17,4)	
IEN (quintis)[a]			0,838
1 (mais baixo)	64 (22,1)	18 (20,5)	
2	54 (18,6)	21 (23,9)	
3	63 (21,7)	19 (21,6)	
4	67 (23,1)	17 (19,3)	
5 (mais alto)	42 (14,5)	13 (14,8)	
Fumo Gestação			0,042

Não	274 (74,9)	87 (65,4)	
Sim	92 (25,1)	46 (34,6)	
Algum transtorno mental			0,766
Não	317 (86,9)	113 (85,6)	
Sim	48 (13,1)	19 (14,4)	
Estado nutricional			0,444
Eutrófico	292 (79,8)	111 (84,4)	
Sobrepeso	56 (15,3)	19 (14,3)	
Obesidade	18 (4,9)	3 (2,3)	
TOTAL	366 (100,0)	133 (100,0)	

Nota: * valor de *p* teste Exato de Fisher.

REFERÊNCIAS

1. Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, Domingues MR, Barros FC, Victora CG. Cohort profile: the 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort study. Int J Epidemiol. 2011;40(6):1461-8.

2. Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, Zanini R, Chrestani Cesar MA, Camargo-Figuera FA, et al. Cohort profile update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years followup. Int J Epidemiol. 2014;43(5):1437-a-f.

3. Coll CV, Domingues MR, Hallal PC, da Silva IC, Bassani DG, Matijasevich A, et al. Changes in leisure-time physical activity among Brazilian pregnant women: comparison between two birth cohort studies (2004 - 2015). BMC public health. 2017;17(1):119.

4. Santos IS, Bassani DG, Matijasevich A, Halal CS, Del-Ponte B, da Cruz SH, et al. Infant sleep hygiene counseling (sleep trial): protocol of a randomized controlled trial. BMC psychiatry. 2016;16(1):307.

5. Bassani DG, Corsi DJ, Gaffey MF, Barros AJ. Local distributions of wealth to describe health inequalities in India: a new approach for analyzing nationally representative household survey data, 1992-2008. PloS one. 2014;9(10):e110694.

6. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. Journal of biomedical informatics. 2009;42(2):377-81.

7. Marshall WA, Tanner JM. 1969. Variações no padrão de alterações puberais em meninas. Arco. Dis. Criança. 44 (235): 291-303.

8. Marshall WA, Tanner JM. 1970. Variações no padrão de alterações puberais em

meninos. Arco. Dis. Criança. 45 (239): 13-23.

9. Schmitz KE, Hovell MF, Nichols JF, Irvin VL, Keating K, Simon GM, et al. 2004. Um estudo de validação das autoavaliações da puberdade dos adolescentes iniciais. J. Early Adolesc. 24 (4): 357-384.

10. Habicht JP. [Standardization of quantitative epidemiological methods in the field]. Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana Pan American Sanitary Bureau. 1974;76(5):375-84.

APÊNDICES

1. **Apêndice 1 – Questionário completo aplicado aos adolescentes**

Universidade Federal de Pelotas
Centro de Pesquisas Epidemiológicas
Coortes de Nascimentos de 2004
SUBESTUDO AOS 12 ANOS
QUESTIONÁRIO GERAL

Sou da Faculdade de Medicina e faço parte do mesmo estudo que você participou desde o nascimento. A última visita foi aos 11 anos de idade e, agora que você está com 12 anos, gostaria de conversar com você sobre sua saúde. Podemos conversar?

BLOCO A – IDENTIFICAÇÃO	
0. Número de identificação do adolescente	___ ___ ___ ___ ___ ___
1. Nome da entrevistadora: _____	2. Código da entrevistadora: ___ ___
3. Data da entrevista 4. Horário de inícioda entrevista	___ ___/___ ___/__ __ __ __ ___ ___:___ ___
5. Como você se classifica em termos de cor da pele ou raça?*(Ler opções)*	**(1) Branca** **(2) Preta** **(3) Parda** **(4) Amarela** **(5) Indígena** (9) IGN
6***. Sexo (apenas observar e anotar a opção correspondente)*** (1) Masculino (2) Feminino	
BLOCO B – ANIMAIS DOMÉSTICOS	

7. Na sua casa, você tem cachorro? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ➐ 8***	7.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	7.b. Quantas horas o(s) cachorro(s) fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN

8. Na sua casa, você tem gato? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ➐ 9***	8.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	8.b. Quantas horas o(s) gatos(s) fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN
9. Na sua casa, você tem coelho? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ➐ 10***	9.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	9.b. Quantas horas o(s) coelho(s) fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN
10. Na sua casa, você tem peixe? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ➐ 11***	10.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	
11. Na sua casa, você tem pássaro? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ➐ 12***	11.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	11.b. Quantas horas o(s) pássaro(s) fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (99) IGN

12. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação?
(0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN ➐ 13

12.b. Quantos? 12.a. Qual?_____ (1) (2) 2 _____ (4) 4+	1 (3) 3 (9) IGN	12.c. Quantas horas esse(s)<**ANIMALDOMÉSTICO**>fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN

12.1. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação?
(0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN ➐ 13

12.1.a. Qual?_____ _____	12.1.b. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	12.1.c. Quantas horas esse(s)<**ANIMALDOMÉSTICO**>fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN

12.2. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação?
(0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN ➐ 13

12.2.a. Qual?_____ _____	12.2.b. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	12.2.c. Quantas horas esse(s) <**ANIMAL DOMÉSTICO**> fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN
12.3. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ➋ 13***		
12.3.a. Qual?_____ _____	12.3.b. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	12.3.c. Quantas horas esse(s) <**ANIMAL DOMÉSTICO**> fica(m) dentro de casa? __ __ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN

BLOCO C – ESTILO DE VIDA

Agora eu vou lhe fazer algumas perguntas sobre seu estilo de vida e alimentação.

13. No último ano, você mudou a quantidade ou intensidadeemque faz exercícios físicos? (0) Não (1) Sim	13.a. Você passou a fazer menos ou mais exercícios físicos? (1) Menos (2) Mais (9) IGN
(9) IGN ***SE NÃO OU IGN ➋ 14***	
14. Desde <**DIA DA SEMANA**>passada, em quantos dias você comeu feijão? __(número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➋ 15***	14.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu feijão? __ __(número de 1-10) (99) IGN

15. Desde <**DIA DA SEMANA**>passada, em quantos dias você comeu salada de alface e tomate ou salada de qualquer outra verdura ou legume CRU? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➐ 16***	15.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu salada de alface e tomate ou salada de qualquer outra verdura ou legume CRU? __ __(número de 1-10) (99) IGN
16. Desde <**DIA DA SEMANA**>passada, em quantos dias você comeu verdura ou legume COZIDO com a comida ou na sopa, como por exemplo, couve, cenoura, chuchu, berinjela, abobrinha, sem contar batata, mandioca ou inhame? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➐ 17***	16.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu verdura ou legume COZIDO com a comida ou na sopa, como por exemplo, couve, cenoura, chuchu, berinjela, abobrinha, sem contar batata, mandioca ou inhame? __ __ (número de 1-10) (99) IGN
17. Desde <**DIA DA SEMANA**>passada, em quantos dias você comeu frutas, como por exemplo, laranja, maçã, banana? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➐ 18***	17.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu frutas, como por exemplo, laranja, maçã, banana? __ __(número de 1-10) (99) IGN

18. Desde **<DIA DA SEMANA>**passada, em quantos dias você tomou refrigerante? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➋ 19***	18.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você tomou refrigerante? __ __ (número de 1-10) (99) IGN
18.b. Pensando nesse(s) dia(s) em que você tomou refrigerante, de que tipo era? *(Ler opções)* **(1) normal** **(2) diet/light/zero** **(3) ambos**	

(9) IGN	
19. Desde **<DIA DA SEMANA>**passada, em quantos dias você tomou suco artificial em pó ou de caixinha? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➋20***	19.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você tomou suco artificial em pó ou de caixinha? __ __ (número de 1-10) (99) IGN

19.b. Pensando nesse(s) dia(s) em que você tomou suco artificial, de que tipo era? *(Ler opções)* **(1) normal** **(2) diet/light/zero** **(3) ambos** (9) IGN

20. Desde **<DIA DA SEMANA>**passada, em quantos dias você tomou iogurte ou leite fermentado (tipo Yakult)? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➋21***	20.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você tomou iogurte ou leite fermentado (tipo Yakult)? __ __ (número de 1-10) (99) IGN
21. Desde **<DIA DA SEMANA>**passada, em quantos dias você comeu alimentos doces, tais como: sorvetes, chocolates, bolos, biscoitos ou doces? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ➋22***	21.a. Pensando neste(s) dia(s),quantas vezes por dia você comeu alimentos doces, tais como: sorvetes, chocolates, bolos, biscoitos ou doces? __ __ (número de 1-10) (99) IGN

22. Desde **<DIA DA SEMANA>**passada, em quantos dias você comeu salgados, pizza, batata frita, cachorro quente, ou outros tipos de lanches? __ (número de 0-7) (9) IGN ***SE 0 OU IGN ❼23***	22.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu salgados, pizza, batata frita, cachorro quente, ou outros tipos de lanches? __ __ (número de 1-10) (99) IGN
23. Você faz dieta sem lactose? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ❼ 24***	23.a. Restrição total de lactose é não consumir nada de leite ou derivados. Você faz restrição total? (0) Não (1) Sim (9) IGN
23.b. Quais alimentos você evita?_____ _____	23.c. Qual o motivo?_____ _____
24. Você faz dieta sem glúten? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ❼25***	24.a. Restrição total de glúten é não consumir nada de alimentos com glúten. Você faz restrição total? (0) Não (1) Sim (9) IGN
24.b. Quais alimentos você evita?_____ _____	24.c. Qual o motivo?_____ _____
25. Vegetariano é quem não consome nenhum tipo de carne, incluindo carne de rês, frango, porco ou peixe. Você é vegetariano? (0) Não (1) Sim (9) IGN	26. Vegano é quem não consome nenhum tipo de produto de origem animal, como carnes, ovos, leite e mel. Você é vegano? (0) Não (1) Sim (9) IGN

ATENÇÃO ENTREVISTADORA:
<u>Não há necessidade de perguntar isso ao adolescente, pois ele(a) já terá preenchido essas informações antes da entrevista. Você deve aproveitar esse momento para revisar essas informações com o adolescente e entrar os dados no sistema.Questões não preenchidas na ficha deverão ser perguntadas.</u>

BLOCO D1– COLETA DE FEZES (INFORMAÇÕES FOLHA DE COLETA)

27. Dia em que coletou as fezes	___ ___/ ___ ___/___ _____ ___ (99/99/9999)
28. Horário em coletou as fezes	___ ___:___ ___ (99:99)
29. ***Observar e anotar.*** Qual o número do tubo utilizado?	1 0 0 0 __ __ __ __

30. Você tomou algum tipo de antibiótico no dia anterior à coleta de fezes? (0) Não (1) Sim (9) IGN	31. Você tomou algum tipo de laxante no dia anterior à coleta de fezes? (0) Não (1) Sim (9) IGN
32. Vocêtomou algum tipo de probiótico no dia anterior à coleta de fezes?Como por exemplo: Probiotil, Probiatop, Simfort, Vitlplex, Leiba, Prolive, Lactipan, Lacteol, Lactofilus (0) Não (1) Sim (9) IGN	33. Vocêtomou algum outro tipo de remédio no dia anterior à coleta de fezes? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN → 34*** 33.a. Qual?_____ _____

Nos 15 dias anteriores à coleta de fezes, você teve...			
34. Febre	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
35. Dor na barriga (sem contar cólica menstrual)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
36. Diarréia	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
37. Intestino preso	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
38. Tosse	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
39. Peito encatarrado	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
40. Dor de garganta	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
41. Nariz escorrendo	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
42. Vômitos	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN

43. Você teve alguma dificuldade ao coletar as fezes?
(0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN →44

43.1. Qual foi a dificuldade?

43.a. Teve problemas para entender as instruções?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.b. Achou difícil coletar a amostra de fezes?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.c. Teve dificuldade em evacuar?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.d. Não tinha vaso sanitário?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.e. O papel rasgou?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.f. Deixou o xixi entrar em contato com as fezes?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.g. Precisou usar o Kit alternativo (saco plástico azul)?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.h. Outro?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN

43.i. Qual?_____

44. Como estava a aparência das fezes no momento da coleta?
(0) normal
(1) dura
(2) mole
(3) líquida
(4) Outro
(9) IGN

SE OUTRO➐ 44.a

44.a. Qual?_____

BLOCO D2 – COLETA DE FEZES (INFORMAÇÕES PERGUNTADAS)

45. Você deixou o tubo em algum local protegido do sol? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE SIM➐ 46***	45.a. Onde deixou? _____ _____
46. Você deixou o tubo em local refrigerado (por exemplo, na geladeira ou freezer)? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE SIM➐ 47***	46.a. Onde deixou? _____ _____

47. ***Dia no qual o(a) adolescente entregou o tubo com as fezes para a equipe de pesquisa:*** ___ ___/ ___ ___/ __ __ __ __
(99/99/9999)

48. Em uma semana normal, quantos dias por semana você costuma fazer cocô?

__ (número de 0-7)
(9) IGN

49. Em um dia normal, quantas vezes você costuma fazer cocô?

(0) 0
(1) 1 vez
(2) 2 vezes
(3) 3 vezes ou mais

(9) IGN

BLOCO E – MEDICAMENTOS E DOENÇAS CRÔNICAS	
Agora vou lhe fazer algumas perguntas sobre a sua saúde. **Vou pedir que você responda com a ajuda da sua mãe, pai ou outro adulto.**	
50. Você tem algum problema crônico no intestino? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ❼51***	50.a.Qual(is)?_____ _____
51.Você tem alguma outra doença crônica? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ❼52***	51.a. Qual(is)? _____ _____
Agora vou lhe fazer algumas perguntas sobre remédios que você tomou ultimamente.	
52. Você tomou algum tipo de antibiótico nos últimos <u>6 meses</u>? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN ❼ 54***	

52.1. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 (5) 5

Agora você pode me falar o(s) nome(s) do(s) antibiótico(s) que você tomou nos últimos <u>6 meses</u>? Você poderia me mostrar as caixas e receitas?					
*Nome do remédio**(LETRAS MAIÚSCULAS E SEM ACENTO)***					
52.1.a.					
52.1.b.					
52.1.c.					
52.1.d.					
52.1.e.					
52.2. ***Apresentação da embalagem ou receita.*** (0) Não (1) Sim		52.3. Por qual motivo <**NOME ANTIBIÓTICO**>foi usado?	52.4. Quem indicoueste remédio?***(Ler opções)*** **(1) médico** **(2) outro prof saúde** **(3) mãe** **(4) familiar/amigo** **(5) outro** (9) IGN	52.5. Quantos tratamentoscom **<NOME ANTIBIÓTICO>** você fez nos últimos 6 meses?	52.6. Quando foi a última vez que você tomou**<NOME ANTIBIÓTICO>**?***(não pode ser superior a 180 dias)***
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 1>					
a	__	_____ _____	__	__ __ (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 2>					
b	__	_____ _____	__	__ __ (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 3>					
c	__	_____ _____	__	__ __ (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 4>					
d	__	_____ _____	__	__ __ (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 5>					
e	__	_____ _____	__	__ __ (99) IGN	__ ____ dia(s) (999) IGN

53. Você tomou algum tipo de laxante nos últimos 6 meses?
(0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN ➐ 54

53.1 Quantos?
(1) 1 (2) 2
(3) 3 (4) 4
(5) 5

Agora você pode me falar o(s) nome(s) do(s) laxante(s) que você tomou nos últimos 6 meses? Você poderia me mostrar às caixas e receitas?

*Nome do remédio**(LETRAS MAIÚSCULAS E SEM ACENTO)***
53.1.a.
53.1.b.
53.1.c.
53.1.d.
53.1.e.

53.2. ***Apresentação da embalagem ou receita.*** (0) Não (1) Sim		53.3. Por qual motivo **<NOME LAXANTE>**foi usado?	53.4. Quem indicou este laxante?***(Ler opções)*** **(1) médico** **(2) outro prof saúde** **(3) mãe** **(4) familiar/amigo** **(5) outro** (9) IGN	53.5. Com qualfrequência você usou **<NOME LAXANTE>**nos últimos 6 meses?	53.6.Quando foi a última vez que você tomou**<NOME LAXANTE>**?***(não pode ser superior a 180 dias)***
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 1>					
a	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77)<1vez/mês (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 2>					
b	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 3>					

c	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 4>					
d	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	____ __ dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 5>					
e	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	__ __ __dia(s) (999) IGN

54. Você tomou algum tipo de probiótico, ou seja, algum produto com microorganismos vivos para melhorar a flora intestinal, nos últimos 6 meses? Como por exemplo: Probiotil; Probiatop; Simfort; Vitlplex; Leiba; Prolive; Lactipan; Lacteol; Lactofilus.
(0)Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN ➐ 55

54.1. Quantos?
(1) 1 (2)
2 (3) 3
(4) 4
(5) 5

Agora você pode me falar o(s) nome(s) do(s) probióticos(s) que você tomou que você tomou nos últimos 6 meses? Você poderia me mostrar as caixas e receitas?
Nome do remédio ***(LETRAS MAIUSCULAS E SEM ACENTO)***
54.1.a.
54.1.b.
54.1.c.
54.1.d.
54.1.e.

54.2. ***Apresentação da embalagem ou receita.*** (0) Não (1) Sim	54.3. Por qual motivo <**NOME DO PROBIÓTICO**> foi usado?	54.4. Quem indicou este probiótico?***(Ler opções)*** **(1) médico** **(2) outro prof saúde** **(3) mãe** **(4) familiar/amigo** **(5) outro** (9) IGN	54.5.Com qualfrequência você usou <**NOME PROBIÓTICO**>nos últimos 6 meses?	54.6. Quando foi a última vez que você tomou<**NOME PROBIÓTICO**> ?***(não pode ser superior a 180 dias)***
Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 1>				

a	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	__ __ __ dia(s) 999 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 2>					
b	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	__ __ __ dia(s) 999 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 3>					
c	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	__ __ __ dia(s) 999 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 4>					
d	__	_____ _____	__	__ __vez(es)/semana __ __ vez(es)/mês (77) <1vez/mês (99) IGN	__ __ __ dia(s) 999 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 5>					

_____ __ __vez(es)/semana

__ _____ __ __ __ vez(es)/mês __ __ __ dia(s) e (77) <1vez/mês 999 (IGN)
(99) IGN

55. Você tomou algum outro tipo de remédio nos últimos <u>15 dias</u>? (0)
Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN ➐ 56

55.1. Quantos?
(1) 1
(2) 2
(3) 3
(4) 4
(5) 5

Agora você pode me falar o(s) nome(s) desse(s) outro(s) remédio(s) que você tomou que você tomou nos últimos <u>15 dias</u>?
Você poderia me mostrar as caixas e receitas?

Nome do remédio ***(LETRAS MAIÚSCULAS E SEM ACENTO)***

55.1.a.

55.1.b.

55.1.c.

55.1.d.

55.1.e.

	55.2. ***Apresentação da embalagem ou receita.*** (0) Não (1) Sim	55.3. Por qual motivo **<NOME REMÉDIO>**foi usado?	55.4. Quem indicou este remédio?***(Ler opções)*** **(1) médico** **(2) outro prof saúde** **(3) mãe** **(4) familiar/amigo** **(5) outro** (9) IGN	55.5. Quantos dias você fez uso desse remédio nos últimos 15 dias?***(não pode ser superior a 15)***	55.6.Quando foi a última vez que você tomou**<NOME REMÉDIO>**?***(não pode ser superior a 15 dias)***
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 1>					
a	__	_____ _____	__	__ __ dia(s) (99) IGN	__ __ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 2>					
b	__	_____ _____	__	__ __ dia(s) (99) IGN	__ __ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 3>					
c	__	_____ _____	__	__ __ dia(s) (99) IGN	__ __ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 4>					
d	__	_____ _____	__	__ __ dia(s) (99) IGN	__ __ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 5>					

e	__	_____ _____	__	__ __ dia(s) (99) IGN	__ __ dia(s) 99 (IGN)

BLOCO F – PUBERDADE *(PARA MENINAS)*
Agora vamos a falar sobre puberdade
56. Você já menstruou? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***SE NÃO OU IGN➐ 58***
57. Você está grávida ou com suspeita de gravidez? (0) Não (1) Sim (9) IGN ***Se SIM: encerra questionário.*** ***Se NÃO ou IGN pula para bloco G (QFA).***

58. O corpo muda ao longoda puberdade de uma maneira diferente para cada um, e os microbios que moram no nosso intestino também mudam durante esse período. Por este motivo estamos interessados em conhecer sobre essas mudanças!
Gostaria de mostrar à sua filha alguns desenhos que descrevemos fases da puberdade e gostaria que ela aponte para onde ela acharque está em relação ao desenvolvimento dela (*neste momento mostre-lhes a folha apropriada sem explicartodos os estágios*). Podemos fazer esta partecom o adulto presente, ou se ela se sentirmais confortável, podemos fazer sem a presença do adulto. Nós não vamos examinar a adolescente, apenas iremos descrever as etapas do desenvolvimentoe pedir que ela marque a etapa com a qual se sente mais identificada.

(Se a adolescente se sentir completamente desconfortável fazendo isso, então você pode perguntar se a mãe/o pai pode selecionar onde eles pensam que a adolescente está no desenvolvimento puberal – anote no questionário se mãe/pai selecionou).
➓ ***ATENÇÃO: Caso o entrevistado não saiba ler ou tenha dificuldade com o uso do tablet, prossiga a entrevista normalmente.***

<u>Explique o seguinte ao menina:</u>
Com este questionário, gostaria de perguntar-lhe como é o seu corpo neste momento, especialmente os seios (também chamados se mamas). Precisamos saber disso porque o desenvolvimento das mamas é um indicador confiável do estágio da puberdadeno qual vocêestá.
Por favor, olhe para cada um dos desenhos e escolha o estágio que você acha que corresponde à aparência atual de seus seios. Se os lados direito e esquerdo parecem diferentes, responda a pergunta com base na mama maior.

Ler cada estágio para a adolescente.
58. ***Parte 1. Mamas:*** **Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual**

Fase 1. Nada mudou
Fase 2. Há uma leve elevação no mamilo (botão), mas o tecido mamário não se estende além de mamilo.
Fase 3. O tecido mamário aumentou e se estendeu além do mamilo.
Fase 4. Existe um botão (broto) secundário. O tecido mamário e o mamilo aumentam e ficam mais saltados Fase 5. A mama está totalmente desenvolvida.

NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA A ADOLESCENTE MARCAR A FASE ESCOLHIDA

[1]	**Fase 1**
[2]	**Fase 2**
[3]	**Fase 3**
[4]	**Fase 4**
[5]	**Fase 5**

59. Parte 2. Pelos pubianos: **Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual**

Fase 1. Nada mudou
Fase 2. Tem poucos pelos
Fase 3. Os pelos estão mais escuros e crespos
Fase 4. Os pelos agora estão escuros e crespos. Espalham-se por uma região maior, mas não se espalharam para as pernas.
Fase 5. Os pelos são iguais aos de uma mulher adulta.

NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA A ADOLESCENTE MARCAR A FASE ESCOLHIDA

60. ***O adolescente precisou de ajuda para preencher esta parte? (apenas observar e anotar a opção correspondente)*** (0) Não
(1) Sim
(9) IGN

Se NÃO ou IGN pula para bloco G (QFA).

60.a. ***Quem lhe ajudou?*** (1) Pai
(2) Mãe
(3) Avó/Avô
(4) Outrapessoa
(9) IGN

BLOCO F – PUBERDADE *(PARA MENINOS)*

58. O corpo muda ao longo da puberdade de uma maneira única para todos, e os micróbios que moram no nosso intestino também mudam durante esse período. Por este motivo estamos interessados em conhecer sobre essas mudanças!
Gostaria de mostrar a seu filho alguns desenhos que descrevem as fases da puberdade e gostaria que a aponte para onde ele acharque está em relação ao desenvolvimento dele (*neste momento mostre-lhes a folha apropriada sem explicando todos os estágios*). Podemos fazer esta partecom o adulto presente, ou, se ele se sentir mais confortável, podemos fazer sem a presença do adulto. Nós não vamos examinar o adolescente, apenas iremos descrever as etapas do desenvolvimento e pedir que ele marque a etapa com a qual se sente mais identificado.

(Se a adolescente se sentir completamente desconfortável fazendo isso, então você pode perguntar se a mãe/o pai pode selecionar onde eles pensam que a adolescente está no desenvolvimento puberal – anote no formulário se mãe/pai selecionou).
❼ ***ATENÇÃO: Caso o entrevistado não saiba ler ou tenha dificuldade com o uso do tablet, prossiga a entrevista normalmente.***

<u>Explique o seguinte ao menino:</u>
Com este questionário, gostaria de perguntar-lhe como é o seu corpo neste momento, especialmente sua genitália. Precisamos saber disso porque o desenvolvimento dos órgãos genitais é um indicador confiável do estágio puberal no qual você está *(neste momento entregue as folhas de estágio puberal).* Por favor, olhe para cada um dos desenhos e escolha o estágio que você acha que corresponde à aparência atual da sua genitália. Escolha a figura mais próxima do seu estágio atual.

Ler cada estágio para a adolescente.
58. Parte 1. Genitália: **Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual**

Fase 1. Nada mudou.
Fase 2. O pênis aumenta um pouco. Os testículos descem um pouco no escroto (“saco”) Fase
3. O pênis e os testículos aumentam mais
Fase 4. A “cabeça” do pênis aumenta, o escroto fica mais escuro.
Fase 5. O pênis e os testículos estão totalmente desenvolvidos, iguais aos de um homem adulto.

NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA O ADOLESCENTE MARCAR A FASE ESCOLHIDA

[1] **Fase 1**

[2] **Fase 2**

[3] **Fase 3**

[4] **Fase 4**

[5] **Fase 5**

59. Parte 2. Pelos pubianos: **Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual** **Fase 1. Nada mudou.** **Fase 2. Tem poucos pelos.** **Fase 3. Os pelos estão mais escuros e crespos.** **Fase 4. Os pelos agora estão escuros e crespos. Espalham-se por uma região maior, mas não se espalharam para as pernas.** **Fase 5. Os pelos são iguais aos de um homem adulto.** ***NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA O ADOLESCENTE MARCAR A FASE ESCOLHIDA***

60. ***O adolescente precisou de ajuda para preencher esta parte? (apenas observar e anotar a opção correspondente)*** (0) Não
(1) Sim
(9) IGN

Se NÃO ou IGN pula para bloco G (QFA).

60.a. ***Quem lhe ajudou?*** (1) Pai
(2) Mãe
(3) Avó/Avô
(4) Outrapessoa
(9) IGN

BLOCO G – QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Vamos falar mais um pouco sobre sua alimentação. Para cada alimento que vou listar, responda se você consumiu este alimento nos<u>ÚLTIMOS 12 MESES</u>, ou seja, desde <MÊS> do ano passado até agora, de acordo com a seguinte escala de frequência.

➐ ***ATENÇÃO: Mostrar escala de frequência neste momento.***

*** Caso você NÃO tenha consumido o alimento, ou comeu MENOS DE 1 VEZ POR MÊS, então responda "NUNCA ou QUASE NUNCA". Se você consumiu mais de 1 vez por mês, veja as outras opções de frequência mensal, semanal ou diária e escolha a que representa esse consumo nestes últimos 12 meses.**

*** Para os alimentos que você consumiu mais de uma vez por mês, quero que você observe as imagens no livro eme diga se NORMALMENTE você costuma comer MENOS ou MAIS da quantidade apresentada.**

OK?

Vamos começar!

ALIMENTO	*FREQUÊNCIA*								*QUANTIDADE*			
"COM QUAL FREQUENCIA VOCÊCONSOME PÃES E CEREAIS MATINAIS"	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Pão integral, centeio ou preto	○	○	○	○	○	○	○	○	**2 fatias ou 1cacetinho integral**	○	○	○
Pão branco: caseiro, de forma, francês	○	○	○	○	○	○	○	○	**1cacetinho ou 2 fatias de pão de forma**	○	○	○
Bolacha doce, recheada, ou cookies	○	○	○	○	○	○	○	○	**5 unidades**	○	○	○
Bolachasalgada	○	○	○	○	○	○	○	○	**5 unidades**	○	○	○
Bolo semrecheio	○	○	○	○	○	○	○	○	**1fatiamédia**	○	○	○
Granola	○	○	○	○	○	○	○	○	**4 colheres de sopa**	○	○	○
Cereais matinais, como sucrilhos, cornflakes, choco krispies, pop	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 xícara**	○	○	○
Barra de cereais	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 barrinha**	○	○	○
"AGORA VOU LHE PERGUNTARSOBRE CEREAIS, TUBÉRCULOS E MASSAS"	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Arrozbranco	○	○	○	○	○	○	○	○	**3colheres sopa**	○	○	○
Batata cozida, assada ou purê	○	○	○	○	○	○	○	○	**4colheressopa**	○	○	○
Batata, polenta ou aipim <u>FRITOS</u>	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pires**	○	○	○
Miojo, nissin, cupnoodles	○	○	○	○	○	○	○	○	**1pacoteoucopo**	○	○	○
Macarrão, espagueti, massa parafuso, entre outros	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pegador**	○	○	○

Lasanha, nhoque, ravióli	○	○	○	○	○	○	○	○	

ALIMENTO	***FREQUÊNCIA***								***QUANTIDADE***			
"AGORA VOU LHEPERGUNTAR SOBRE FEIJÃO E ERVILHA"	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Feijão	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 concha media**	○	○	○
Lentilha, ervilha, grão de bico	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 concha média**	○	○	○
"AGORA VOULHEPERGUNTAR SOBRE LEITE E DERIVADOS"	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Leite de vaca (líquido ou pó)	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 copo médio ou 2 colheres de sopa pó**	○	○	○
Na maioria das vezes, que tipo de leite você toma*:* [ ] integral, [ ] semi ou [ ] desnatado?												
Na maioria das vezes, vocêusa açúcar no leite?[ ]Não [ ] Sim									**3 colheres de chá**	○	○	○
Leite de soja (líquido ou pó)	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 copo médio ou 2 colheres sopa pó**	○	○	○
Iogurte	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 copo médio ou 2 potes ou 1 garrafinha**	○	○	○
Na maioria das vezes, você toma o iogurte [ ] diet, light ou [ ] normal?												
Queijo	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 fatia**	○	○	○
Na maioria das vezes, que tipo de queijo você come*:* _____: [ ] ricota/minas [ ] mussarela [ ] lanche												
Requeijão	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 colher de sopa**	○	○	○
Você costuma consumir estes produtos sem lactose? [ ]Não [ ] Sim												
Se sim: Quais alimentos sem lactose você costuma consumir?												
"AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBREFRUTAS"	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***

LaranjaouBergamota	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 unidade**	○	○	○
Banana	○	○	○	○	○	○	○	○	**3 unidades (banana prata)**	○	○	○
Mamão	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 fatia**	○	○	○
MaçãouPêra	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 unidade**	○	○	○

AS PRÓXIMAS FRUTAS SÃO AQUELAS QUE GERALMENTE CONSUMIMOS EM DETERMINADAS ESTAÇÕES DO ANO. VOCÊ COME ESTAS FRUTAS? QUAL A FREQUÊNCIA QUE VOCÊ COME QUANDO É A EPOCA DESSAS FRUTAS?												
Melancia ou melão	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 fatia**	○	○	○
Abacaxi	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 fatia**	○	○	○
Abacate	○	○	○	○	○	○	○	○	**½ unidade**	○	○	○
Manga	○	○	○	○	○	○	○	○	**½ unidade**	○	○	○
Morango	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pires**	○	○	○
Uva	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 cacho**	○	○	○
Pêssego	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 unidade**	○	○	○
Goiaba	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 unidade**	○	○	○
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE VEGETAIS”	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Alface	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 folha**	○	○	○
Tomate	○	○	○	○	○	○	○	○	**5 rodelas**	○	○	○
Couve	○	○	○	○	○	○	○	○	**2 colheres de sopa**	○	○	○
Repolho	○	○	○	○	○	○	○	○	**2colheres de sopa**	○	○	○
Chuchu	○	○	○	○	○	○	○	○	**3colheres de sopa**	○	○	○
Abóbora	○	○	○	○	○	○	○	○	**2colheres de sopa**	○	○	○
Pepinoao natural	○	○	○	○	○	○	○	○	**5 rodelas**	○	○	○
Vagem	○	○	○	○	○	○	○	○	**3colheres de sopa**	○	○	○
Cenoura	○	○	○	○	○	○	○	○	**3colheres de sopa**	○	○	○

Beterraba	○	○	○	○	○	○	○	○	**2colheres de sopa**	○	○	○
Couve-flor	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pires**	○	○	○
Pimentão	○	○	○	○	○	○	○	○				
Cebola	○	○	○	○	○	○	○	○				
Alho	○	○	○	○	○	○	○	○				
Na maioria das vezes, você adiciona óleoou azeite na salada? [ ] Não [ ] Sim												
***Se sim,* qual tipo de óleo? [ ] óleo de soja [ ] azeite de oliva extra virgem [ ] outros azeites**												
Na maioria das vezes, você coloca sal na salada ou no prato de comida pronto?[ ]Não [ ] Sim									**1 colher de café rasa ou 1 saquinho (1g)**	○	○	○

"AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE CARNES E OVOS"	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Carne vermelha, na forma de bife, pedaço, guisado outras	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pedaço ou bife ou 4 colheres sopa (guisado)**	○	○	○
Na maioria das vezes, você come a carne: [ ] frita, [ ] assada/grelhada ou [ ] cozida?												
Na maioria das vezes, você come a gordura da carne? [ ] Não [ ] Sim												
Carne de porco	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pedaçogrande**	○	○	○
Com qual frequência você come as carnes na forma de churrasco?	○	○	○	○	○	○	○	○				
Frango	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 coxa/sobrecoxa ou 1 bife**	○	○	○
Na maioria das vezes, você come o frango: [ ] frito, [ ] assado/grelhado ou [ ] cozido?												
Na maioria das vezes, você come a pele do frango? [ ] Não [ ] Sim												

Peixe	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 filégrande**	○	○	○
Na maioria das vezes, vocêcome o peixe: [ ] frito, [ ] assado/grelhado ou [ ] cozido?												
Peixe enlatado como sardinha e atum	○	○	○	○	○	○	○	○				
Camarão	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pires**	○	○	○
Miúdos, como moela, fígado, coração, rim, ou outros	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 bife ou 3 colheres de sopa**	○	○	○
Hamburguer industrializado OU Nuggets	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 hambúrguerou 2nuggets**	○	○	○
Salsicha	○	○	○	○	○	○	○	○	**1unidademédia**	○	○	○
Lingüiça ousalsichão	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 salsichão ou 4 rodelas de linguiça**	○	○	○
Mortadela, presunto, salame	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 fatia**	○	○	○
Bacon outoucinho	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pedaço**	○	○	○
Ovos	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 unidade**	○	○	○
Na maioria das vezes, você come o OVO: [ ] frito ou [ ] cozido?												

“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE MANTEIGA E MAIONESE”	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***		
Manteiga	○	○	○	○	○	○	○	○		
Margarina	○	○	○	○	○	○	○	○		
Maionese	○	○	○	○	○	○	○	○		
“AGORA VOU LHE			***1x***	***2-***			***2-4x***	***≥5x***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***

PERGUNTARSOBRE ALGUNS DOCES”	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***semana***	***4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***dia***	***dia***		***Menos***	***Igual***	***Mais***
Sorveteoupicolé	○	○	○	○	○	○	○	○	**2 bolas de sorvete ou 1 picolé**	○	○	○
Balasoupirulito	○	○	○	○	○	○	○	○	**4 unidades**	○	○	○
Doce à base de leite, como doce de leite, e pudins	○	○	○	○	○	○	○	○	**2 colheres de sopa ou 1 fatia**	○	○	○
Doces à base de frutas, como geleias, goiabada	○	○	○	○	○	○	○	○	**2 colheres de sopa**	○	○	○
Chocolate em pó ou Nescau	○	○	○	○	○	○	○	○	**2 colheres de sopa**	○	○	○
Chocolate em barra ou bombom	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 barra pequena ou 1 bombom**	○	○	○
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE ALGUMAS BEBIDAS”	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Refrigerante tipo Cola, como Cocacola, Pepsi-cola,Fruki-Cola	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 copo**	○	○	○
Outros refrigerantes: Guaraná, Limão, Laranja	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 copo**			
Quando o (a) vocêtoma refrigerante, qual o tipo mais consumido: [ ] Diet/Light ou [ ] Normal ?												
Suco de caixa ou pó	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 copo**	○	○	○
Suco natural (fruta ou polpa)	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 copo**	○	○	○
Geralmente, você usa açúcar no suco?[ ] Não [ ] Sim:									**3 colheres de chá**	○	○	○
Café	○	○	○	○	○	○	○	○	**1xícaramédia**	○	○	○
Geralmente, vocêusa açúcar no café? [ ]Não [ ] Sim									**3 colheres de chá**	○	○	○
Chá	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 xícara**	○	○	○
Geralmente, você usa açúcar no chá? [ ]Não [ ] Sim									**3 colheres de chá**	○	○	○

Chimarrão	○	○	○	○	○	○	○	○				
“VOCÊ TOMA COM FREQUENCIA ALGUMA BEBIDA DE ALCOOL?” (*SE NAO, PULAR O BLOCO*)									**[ ] Não [ ] Sim**			
	Nunca ou quase nunca	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
CervejaouChopp	○	○	○	○	○	○	○	○	**2 latas de cerveja ou 2 copos de chopp**	○	○	○
Vinho	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 taça**	○	○	○
Cachaça/uísque/vodka, drinks ou batidas	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 dose ou 1 drink**	○	○	○
“AGORA VOU LHEPERGUNTAR SOBRE ALIMENTOS DIVERSOS”	***Nunca ou quase nunca***	***1-3x mês***	***1x semana***	***2-4x semana***	***5-6x semana***	***1x dia***	***2-4x dia***	***≥5x dia***	***PENSANDO EM...***	***VOCÊ CONSOME...***		
										Menos	***Igual***	***Mais***
Chips e salgadinhos	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 pacote**	○	○	○
Pizza	○	○	○	○	○	○	○	○	**1 fatia**	○	○	○
Bauru, cheesburguerou cachorro quente	○	○	○	○	○	○	○	○				
Salgados como quibe, pastel, empada, esfirra, coxinha de galinha	○	○	○	○	○	○	○	○				
Pipoca doce ou salgada	○	○	○	○	○	○	○	○				
Alimentos em conserva, como ervilha, milho, pepino ou picles	○	○	○	○	○	○	○	○				
Castanha, noz, amêndoa ou avelã	○	○	○	○	○	○	○	○	**3 unidades**	○	○	○

61. ***Alguém lhe ajudou a responder ao questionário de alimentação?(apenas observar e a opção correspondente)*** (0) Não (1) Sim (9) IGN **Se NÃO ou IGN pula para bloco H (MEDIDAS).**	***61.a. SE SIM:Quem lhe ajudou a responder ao questionário de alimentação?*** (1) Pai (2) Mãe (3) Avó/Avô (4) Outra pessoa (9) IGN ***61.b. SE OUTRO. Quem?_____***

BLOCO H – MEDIDAS

***MEDIDA 1* – Agora, gostaria de medir a sua altura. Você pode ficar descalço, por favor, suba no estadiômetro de costas para ele, com os pés juntos, de maneira que os ossos do tornozelo fiquem encostados. Por favor, permaneça com as mãos ao longo do corpo e olhando para frente.**

Alerta: Para registrar a medida utilize vírgula. Utilize a casa decimal após a vírgula e não arredonde.

Resultado da medida1: __ __ __ , __ cm
[888,8 =NSA]
[999,9 = IGN]

Resultado da medida2: __ __ __ , __ cm
[888,8 =NSA]
[999,9 = IGN]

Se a altura não pode ser medida por qualquer motivo, registre aqui:

_____

_____

MEDIDA 2 – **Agora, gostaria de medir a sua cintura. Você pode permanecer de pé. Por favor, vou precisar que você fique com a cintura exposta para medi-la.**

Alerta:Para registrar a medida utilize vírgula.
Preencha todas as casas, incluindo o zero quando necessário e não arredonde. Ex.: 82,4 = 082,4

Anote o resultado da 1ª medida:__ __ __ , __cm
[888,8 =NSA]
[999,9 = IGN]

Anote o resultado da 2ª medida:__ __ __ , __ cm
[888,8 =NSA]
[999,9 = IGN]

Se a diferença entre a primeira e a segunda medida for maior do que 1 cm, realizar a terceira medida.

Anote o resultado da 3ª medida: __ __ __, __cm
[888,8 =NSA]
[999,9 = IGN]

Se a circunferência da cintura não pode ser medida por qualquer motivo, registre aqui:

_____

_____

MEDIDA 3 – **Agora, gostaria de pesar você. Para isso, preciso que você fique com a sua roupa íntima e vista o avental. Por favor, vou precisar que você suba na balança e olhe para frente, com os braços ao longo do corpo. Permaneça em pé, com o peso igualmente distribuído em ambos os pés.**
Se precisar, procurar um local mais discreto, mas <u>SEMPRE</u> acompanhado por um adulto.

Alerta: Para registrar a medida utilize vírgula. Preencha todas as casas, incluindo o zero quando necessário e não arredonde. Ex.: 90,8 = 090,8

Anote o valor que aparecer no visor da balança:__ __ __ ,__kg
[888,8 =NSA]
[999,9 = IGN]

Anote o valor que aparecer no visor da balança:__ __ __ ,__kg
[888,8 =NSA]
[999,9 = IGN]

Se o peso não pode ser aferido por qualquer motivo, registre aqui.

_____

_____

_____

Anote as roupas que o entrevistado está usando.

_____

_____

_____

Horário do fim da entrevista: __ __ : __ __

Apêndice 2 – Ficha de coleta de fezes

FICHA DE COLETA DE FEZES		
ATENÇÃO: Preencher esta ficha logo depois de ter realizado a coleta de fezes (cocô).		
Nome e sobrenome do participante		
Dia em que coletou as fezes	___ ___ / ___ ___	
Horário em coletou as fezes	___ ___ : ___ ___	
Por favor, marque com um "X" a resposta correta para as perguntas abaixo		
Você tomou algum tipo de antibiótico no dia anterior à coleta de fezes? ( ) Não ( ) Sim	Você tomou algum tipo de laxante no dia anterior à coleta de fezes? ( ) Não ( ) Sim	
Você tomou algum tipo de probiótico no dia anterior à coleta de fezes? Por exemplo: Probiotil, Probiatop, Simfort, Vitlplex, Leiba, Prolive, Lactipan, Lacteol, Lactofilus ( ) Não ( ) Sim	Você tomou algum outro tipo de remédio no dia anterior à coleta de fezes? ( ) Não ( ) Sim ***SE SIM***. Qual?_____	
Nos 15 dias anteriores à coleta de fezes, você teve....		
Febre	( ) Não	( ) Sim
Dor na barriga (sem contar cólica menstrual)	( ) Não	( ) Sim
Diarréia	( ) Não	( ) Sim
Intestino preso	( ) Não	( ) Sim
Tosse	( ) Não	( ) Sim
Peito "encatarrado"	( ) Não	( ) Sim
Dor de garganta	( ) Não	( ) Sim
Nariz escorrendo	( ) Não	( ) Sim
Vômitos	( ) Não	( ) Sim
Teve alguma dificuldade ao coletar as fezes? ( ) Não ( ) Sim		
SE SIM. **Qual foi a dificuldade?** Você pode marcar com um "X"uma ou mais das opções abaixo		
( ) Teve problemas para entender as instruções ( ) Achou difícil coletar a amostra de fezes ( ) Teve dificuldade em evacuar ( ) Não tinha vaso sanitário ( ) O papel rasgou ( ) Deixou o xixi entrar em contato com as fezes ( ) Precisou usar o Kit alternativo (saco plástico azul) ( ) Outro *Qual?*_____		
Como estava a aparência das fezes no momento da coleta? ( ) Normal ( ) Dura ( ) Mole ( ) Líquida ( ) Outro *Qual?*_____		

Acesse nosso tutorial (MICROBIOMA – SOP) no *link*: https://www.youtube.com/watch?v=gTPwLUsXTAo

Guardar o Kit com a amostra em <u>local protegido do sol e sem refrigeração</u>.

Em caso de dúvidas, você pode ligar para Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante a cobrar: 9090 3284 1301 ramais: 357 e 368 - QG 2004

Apêndice 3 – Carta de Apresentação

Programa de Pós-graduação em Epidemiologia
Departamento de Medicina Social
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Pelotas

COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2004
SUBESTUDO AOS 12 ANOS DE IDADE

CARTA DE APRESENTAÇÃO

Você está sendo convidado(a) para participar voluntariamente deuma pesquisa da "Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004", desenvolvida pelo Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas e chamada "PERFIL DO MICROBIOMA INTESTINAL EM ADOLESCENTES DA COORTE DE NASCIMENTO DE PELOTAS DE 2004".Nesta etapa, nosso objetivo é avaliar seu crescimento, alimentação e perfil de bactérias intestinais.

A pesquisa será realizada na sua casa, por entrevistadoras devidamente treinadas e identificadas. Iremos pré-agendar um horário no qual as entrevistadoras irão obter suas medidas de peso, altura e circunferência da cintura e realizar perguntas sobre sua alimentação, estilo de vida e desenvolvimento físico. Além destes procedimentos, você irá coletar uma amostra de fezes em sua casa. Estas amostras serão recolhidas em seu domicílio pela nossa equipe de pesquisa no dia em que for feita a entrevista. Todos os resultados do estudo serão apresentados sem identificar individualmente qualquer participante.Caso você se sinta desconfortável com alguma pergunta ou com a entrevista, não é obrigado(a) a respondê-la.

Sua participação é muito importante, pois com os resultados obtidospoderemos entender melhor os fatores que influenciam o crescimento e até mesmo problemas de saúde, como a desnutrição e a obesidade.

Caso tenha alguma dúvida, poderá entrar em contato com os responsáveis da pesquisa para esclarecê-las.

Maiores informações:
Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante
Rua Marechal Deodoro 116, 3º piso, 96020-220, Pelotas, RS,
Fone/Fax: 53 3284 1301
Investigadores responsáveis:
Dr. Aluísio Jardim Dornellas Barros/
Dra. Iná da Silva dos Santos/
Dra. Alicia MatijasevichManitto

Apêndice 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Programa de Pós-graduação em Epidemiologia
Departamento de Medicina Social
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Pelotas

COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2004

SUBESTUDO AOS 12-13 ANOS DE IDADE

Investigadores responsáveis: Dr Aluísio Jardim Dornellas Barros/ Dra Iná da Silva dos Santos/ Dra Alicia Matijasevich Manitto

Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante
Rua Marechal Deodoro 116, 3º piso, 96020-220, Pelotas, RS, Fone/Fax: 53 3284 1301

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA MÃE OU RESPONSÁVEL

Parte dos adolescentes nascidos em Pelotas, em 2004, e que residam na área urbana da cidade estão sendo convidados para participar de um subestudo da "Coorte de Nascimentos de 2004", chamado "PERFIL DO MICROBIOMA INTESTINAL EM ADOLESCENTES DA COORTE DE NASCIMENTO DE PELOTAS DE 2004".

OBJETIVO DO SUBESTUDO: Avaliar o perfil das bactérias do intestino e sua relação com o crescimento e desenvolvimento dos adolescentes aos 12-13 anos de idade.

PROCEDIMENTOS: Seu filho será convidado para participar de uma entrevista em que serão feitas algumas perguntas sobre alimentação, estilo de vida e desenvolvimento físico. Além disso, serão medidos o peso, a altura e a circunferência da cintura. Forneceremos ao seu filho, também, um pote de plástico e pediremos que ele colete uma amostra de fezes em sua casa. Estas amostras serão recolhidas em seu domicílio no momento da entrevista pela nossa equipe de pesquisa. O material será encaminhado ao laboratório do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da UFPel, onde as amostras serão mantidas de acordo com as normas para armazenamento de material biológico humano (biorrepositório). As amostras de fezes do seu filho, se você autorizar, serão armazenadas, e, no futuro, serão utilizadas apenas para detectar o perfil de bactérias das fezes. Todo o material que não for utilizado para pesquisa, será destruído de acordo com a legislação do nosso país. O DNA do seu filho não será analisado nessa amostra de fezes. Qualquer outra pesquisa que contemple o uso dessas amostras armazenadas deverá ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas e você receberá um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorizar esses testes antecipadamente. Se em algum momento você decidir que não deseja mais ter este material armazenado para este estudo, você poderá entrar em contato com a nossa equipe para que suas amostras sejam destruídas, sem ter que explicar as suas razões para fazê-lo.

BENEFÍCIOS: As descobertas deste estudo permitirão entender melhor os fatores que influenciam o crescimento e até mesmo problemas nutricionais, como a desnutrição e a obesidade. Por isso, a participação do seu filho é muito importante. Você poderá ter acesso a qualquer resultado de exame se assim desejar. Caso seja detectado algum resultado fora do normal em um dos testes, o adolescente será encaminhado para um tratamento adequado.

RISCOS E DESCONFORTO: Seu filho poderá deixar de responder qualquer pergunta ou deixar de fazer

qualquer exame que não quiser. Os procedimentos planejados (coleta de fezes, questionário e testes antropométricos) não têm caráter invasivo ou acarretam qualquer dano à saúde do seu filho. A coleta de fezes pode causar algum desconforto ao adolescente. Para reduzir qualquer possível constrangimento, a coleta de fezes será feita no domicílio. O projeto se compromete a dar todo suporte necessário.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA: A participação no estudo é voluntária e seu filho pode deixar de participar a qualquer momento, sem ter que dar qualquer justificativa para tal. Se o seu filho resolver não participar, isto não vai lhe causar nenhum problema de atendimento médico na Faculdade de Medicina ou em qualquer outro serviço público de saúde.

DESPESAS E COMPENSAÇÕES: Não há nenhum gasto, despesa, nem qualquer outra responsabilidade para participar do estudo. Apenas pedimos que as perguntas sejam respondidas com sinceridade.

CONFIDENCIALIDADE: Todos os resultados das análises serão mantidos em sigilo e serão utilizados somente para fins científicos. Depois da entrevista e dos exames, as informações prestadas serão utilizadas sem identificação em todas as etapas do estudo. O nome, endereço e telefone só serão utilizados para contatos visando futuras entrevistas deste estudo. Em nenhum caso, seu filho será identificado por outros. Todos os resultados do estudo serão apresentados sem identificar individualmente qualquer participante.

Recebi as explicações sobre o estudo registradas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Tive oportunidade de esclarecer minhas dúvidas, sendo que todas as minhas perguntas foram respondidas claramente. Declaro estar de acordo em que meu filho participe voluntariamente deste estudo, sabendo que ele tem o direito de deixar de participar a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou perda de qualquer direito.

Eu concordo que meu filho participe no estudo acima

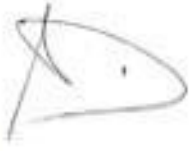
Nome do adolescente _____

Nome da mãe ou responsável _____

_____
Assinatura da mãe ou responsável

Nome da entrevistadora que toma o consentimento _____

_____ Data ____/____/____
Assinatura



ASSINATURA DO INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Apêndice 5 – Termo de Assentimento

Programa de Pós-graduação em Epidemiologia
Departamento de Medicina Social
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Pelotas

COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2004
SUBESTUDO AOS 12-13 ANOS DE IDADE

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-INFORMADO DO ADOLESCENTE

Você está sendo convidado para participar, voluntariamente, do subestudo da "Coorte de Nascimentos de 2004"com o nome de "PERFIL DO MICROBIOMA INTESTINAL EM ADOLESCENTES DA COORTE DE NASCIMENTO DE PELOTAS DE 2004". Sua mãe ou responsável por você já permitiu sua participação. Queremos avaliar seu crescimento, peso, altura, circunferência da cintura e perfil de bactérias intestinais no seu 12º-13º ano de vida.

A pesquisa será realizada na sua casa, por entrevistadoras devidamente treinadas. Serão realizadas medidas de peso, altura, e circunferência da cintura. Além da realização dessas medidas, você irá responder um questionário que terá perguntas gerais sobre alimentação, estilo de vida e desenvolvimento físico. Você também deverá coletar uma amostra de fezes em sua casa. Estas amostras serão recolhidas em seu domicílio pela nossa equipe de pesquisa no dia que for feita a entrevista e o material será encaminhado ao laboratório do Centro de Pesquisas. Os resultados serão mantidos em sigilo e serão usados apenas para fins desta pesquisa. Sua participação neste estudo será voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento.

Este projeto não envolve nenhum risco para você. Os resultados das análises nos ajudarão a entender melhor os fatores que influenciam o crescimento e até mesmo problemas nutricionais, como a desnutrição e a obesidade. Você não terá que pagar por nenhum dos procedimentos. Depois da entrevista, as informações prestadas serão utilizadas sem identificação em todas as etapas do estudo. Todos os resultados do estudo serão apresentados sem identificar individualmente qualquer participante.

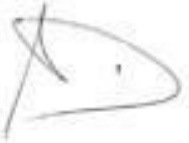
Nome do(a) adolescente: _____

_____
Assinatura

Data: __ __/__ __/__ __ __ __

_____
Entrevistadora

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O (a) adolescente compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento.



ASSINATURA DO INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Apêndice 6 – Instruções da coleta de fezes para o adolescente

Instrução de Coleta de amostra fecal

Nosso corpo é a casa de milhões de micróbios e a maioria deles vive em nosso intestino. Estes micróbios nos ajudam a digerir alguns alimentos e nos protegem contra organismos perigosos, eles têm o poder de nos manter saudáveis ou nos deixar doentes. Micróbios no nosso intestino podem mudar conforme envelhecemos. Embora cientistas saibam muito sobre esses micróbios, ainda há muito mais o que aprender. Nós gostaríamos de saber quais tipos de micróbios estão vivendo em seu intestino nesse momento e nós podemos saber por meio de alguns experimentos com seu cocô.

O modo mais fácil de conhecer quais micróbios estão vivendo em seu intestino é pegando uma amostra do seu cocô. Por favor, leia as instruções abaixo lenta e cuidadosamente para que possamos obter uma amostra do seu cocô.

O kit que você recebeu contém:

Tubo plático Norgen®

Este tubo contém uma colher anexada à tampa e uma pequena quantidade de líquido* que ajudará a preservar seu cocô.

Par de luvas

As luvas protegerão suas mãos de contaminação.

Papel coletor Fe-Col®

Este papel coletor tornará mais fácil para você coletar seu cocô.

Lenços umedecidos de álcool

Estes pequenos lenços ajudarão você a limpar o tubo no final da coleta.

Saco plástico com fecho de correr (zip)

Você irá usar essa bolsa no final, para guardar o tubo plástico.

* Não beba o líquido do tubo plástico. Se o conteúdo entrar em contato com sua pele ou olhos, lave bem com água.

Por favor, verifique se tudo está no pacote. Se alguma coisa estiver faltando, por favor, informe a entrevistadora.

Instruções:

1. Vá ao banheiro e tenha certeza que você tem tudo que você precisa.
2. Por favor, urine antes de você começar e então lave suas mãos com sabonete. É muito importante que a urina não entre em contato com a amostra de fezes.

SE VOCÊ QUISER QUE ALGUÉM LHE AJUDE, POR FAVOR, CHAME ESSA PESSOA ANTES DE COMEÇAR.

Quem lhe ajudar deve fazer todos os passos abaixo, exceto o número 5.

3. os:

Passo 1
Ponha as luvas antes de começar.
*Se alguém está lhe ajudando, ele/ela deve pôr as luvas e fazer os próximos passos.

Passo 2
Abra cuidadosamente o pacote plástico do papel coletor Fe-Col®. Fique com o papel na mão e ponha a embalagem no lixo.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

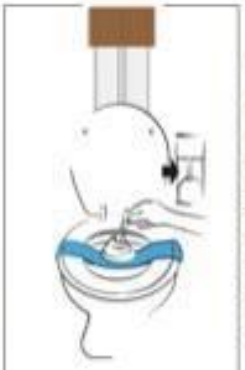
Passo 3
Desdobre cuidadosamente o papel coletor e deslize cobrindo o acento do sanitário.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 4
Empurre o papel coletor com muito cuidado no centro do sanitário para fazer uma curva.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 5
Sente na privada e faça cocô no papel coletor. Limpe-se quando terminar. Não ponha o papel na privada.
*Se alguém estiver lhe ajudando, você pode pedir para ele/ela sair do banheiro nesse passo.

Passo 6
Desenrosque a tampa do tubo plástico com muito cuidado para o líquido não derramar. Seu tubo contém uma colher anexada a tampa.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 7a
Usando a colher grudada na tampa, retire um pedacinho do seu cocô de três localidades diferentes do seu cocô. Cada pedacinho deve ser colocado dentro do tubo. Cada vez que colocar a colher com o cocô no tubo, observe a altura do liquido do tubo.



Passo 7b
Quando o liquido atingir a linha preta, você deve parar de colocar cocô no tubo. Não coloque mais do que isso. Não raspe a colher no papel coletor, pois isso irá prejudicar a amostra.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 8
Feche a bem tampa e agite suavemente até que o seu cocô esteja bem misturado com o liquido do tubo. Limpe qualquer resíduo do tubo com o lenço umedecido de álcool.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 9
Rasgue o papel coletor dos dois lados e deixe na água do vaso por um minuto. (antes de dar descarga).
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

4. Preencha a ficha que você recebeu com as informações necessárias sobre a coleta
5. Guarde o tubo plástico que contém a sua amostra de cocô na bolsa plástica com fecho zip
6. Insira esse saquinho com o tubo e a folha de coleta dentro do envelope que você recebeu.
7. Verifique se seu nome está escrito no envelope do lado de fora.
    a. Se você coletou a amostra no mesmo dia que o(a) entrevistador(a) foi a sua casa, dê a ele(a) o envelope.
    b. Se você coletou a sua amostra em outro dia, ponha o envelope em um local fresco e seco em sua casa e aguarde que a equipe de pesquisa entrará em contato e buscará a amostra em sua casa.

ATENÇÃO!!

Caso o papel coletor rasque, você poderá usar o kit alternativo (saco plástico azul e luvas brancas). O papel plástico azul deve ser usado no lugar do papel coletor Fe-Col®, descrito no passo 2. As mesmas instruções devem ser seguidas, entretanto, o descarte do saco plástico deve ser feito no saco de lixo comum. Não dê a descarga com o saco plástico do kit alternativo.

Acesse nosso tutorial (MICROBIOMA - SOP) no link https://www.youtube.com/watch?v=gTPwLUsXTAo

Em caso de dúvidas, você pode ligar para Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amilcar Gigante a cobrar: 9090 3284 1301 ramais: 357 e 368 - QG 2004

Apêndice 7 – POP coleta de fezes

COLETA DE AMOSTRA FECAL - P O P

Objetivo

O objetivo deste POP é descrever os procedimentos para coleta e transporte de amostra de fezes coletadas com Sistema de Coleta e Preservação de Ácidos Nucleicos Fecais (Corporação Norgen Biotek Corporation) até o laboratório do centro de Pesquisas Epidemiológicas da Universidade Federal de Pelotas.

Responsabilidade

Esse POP é destinado à equipe de trabalho de campo que será encarregada de fornecer instruções aos participantes e será responsável pelo recebimento e armazenamento das amostras de fezes. É responsabilidade do usuário seguir as diretrizes especificadas aqui.

Os pesquisadores supervisores detêm a responsabilidade global pela implementação padronizada dos procedimentos.

Abreviaturas/Definições

POP Procedimento Operacional Padrão

Material necessário

- Kit de coleta de fezes:
  - Coletor de Ácido Nucleico Fecal e Tubo de Preservação (Norgen Biotek®)
  - Etiquetas
  - Luvas de nitrilo
  - Papel coletor de fezes Fe-Col®
  - Lenços umedecidos com álcool
  - Uma pequena bolsa plástica (com fecho zip)
  - Envelope de papel pardo
  - Instruções impressas para a coleta
  - Ficha de coleta das fezes
- Papel higiênico
- Sabonete para as mãos
- Caneta ou marcador

Métodos

1. **Considerações gerais**
   - 1.1 Lavar as mãos é obrigatório e essencial.
   - 1.2 O volume da amostra deve ser pelo menos 5ml ou uma colher de chá cheia (aproximadamente). Quantidades suficientes de amostra devem ser obtidas para efetuar todos testes.
   - 1.3 Devem ser utilizados dispositivos adequados de coleta e recipientes de amostra para garantir uma ótima armazenagem e avaliação dos microbiomas.
   - 1.4 Manipular cuidadosamente todas as amostras e tratá-las como material potencialmente infeccioso.
   - 1.5 São aplicados os seguintes prazos (limites de tempo):
     - 1.5.1 Recolher a amostra fecal imediatamente após a evacuação.
     - 1.5.2 Registrar DATA e HORÁRIO em que a amostra de fezes foi obtida.

2. **Coleta de amostra fecal**

   Forneça a ficha de instrução ao adolescente, em presença da mãe/pai/responsável, e explique-a para ele.

COLETA DE AMOSTRA FECAL - P O P

Nosso corpo é a casa de milhões de micróbios e a maioria deles vive em nosso intestino. Estes micróbios nos ajudam a digerir alguns alimentos e nos protegem contra organismos perigosos, eles têm o poder de nos manter saudáveis ou nos deixar doentes. Micróbios no nosso intestino podem mudar conforme envelhecemos. Embora cientistas saibam muito sobre esses micróbios, ainda há muito mais o que aprender. Nós gostaríamos de saber quais tipos de micróbios estão vivendo em seu intestino nesse momento e nós podemos saber por meio de alguns experimentos com seu cocô.

O modo mais fácil de conhecer quais micróbios estão vivendo em seu intestino é pegando uma amostra do seu cocô. Por favor, leia as instruções abaixo lenta e cuidadosamente para que possamos obter uma amostra do seu cocô.

2.1 Verifique com o adolescente e com seu pai/mãe/responsável o conteúdo do kit que eles receberam. Verifique se tudo está incluso e explique o uso de cada item:

Tubo plático Norgen®	**Par de luvas**	**Papel coletor Fe-Col®**	**Lenços umedecidos de álcool**	**Saco plástico com fecho de correr (zip)**
Este tubo contém uma colher anexada à tampa e uma pequena quantidade de líquido* que ajudará a preservar seu cocô.	As luvas protegerão suas mãos de contaminação.	Este papel coletor tornará mais fácil para você coletar seu cocô.	Estes pequenos lenços ajudarão você a limpar o tubo no final da coleta.	Você irá usar essa bolsa no final, para guardar o tubo plástico.

*** Não beba o líquido do tubo plástico. Se o conteúdo entrar em contato com sua pele ou olhos, lave bem com água.**

2.2 Explique que eles precisaram também de papel higiênico e sabonete.

2.3 Explique as instruções ao adolescente e ao responsável. Pergunte se eles têm alguma dúvida durante o processo.

1. Vá ao banheiro e tenha certeza que você tem tudo que você precisa.
2. Por favor, urine antes de você começar e então lave suas mãos com sabonete. É muito importante que a urina não entre em contato com a amostra de fezes.

SE VOCÊ QUISER QUE ALGUÉM LHE AJUDE, POR FAVOR, CHAME ESSA PESSOA ANTES DE COMEÇAR.

Quem lhe ajudar deve fazer todos os passos abaixo, exceto o número 5.

3. Siga esses passos:

COLETA DE AMOSTRA FECAL - P O P

	Passo 1 Ponha as luvas antes de começar. *Se alguém está lhe ajudando, ele/ela deve pôr as luvas e fazer os próximos passos.		**Passo 2** Abra cuidadosamente o pacote plástico do papel coletor Fe-Col®. Fique com o papel na mão e ponha a embalagem no lixo. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.
	Passo 3 Desdobre cuidadosamente o papel coletor e deslize cobrindo o acento do sanitário. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.		**Passo 4** Empurre o papel coletor com muito cuidado no centro do sanitário para fazer uma curva. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.
	Passo 5 Sente na privada e faça coco no papel coletor. Limpe-se quando terminar. Não ponha o papel na privada. *Se alguém estiver lhe ajudando, você pode pedir para ele/ela sair do banheiro nesse passo.		**Passo 6** Desenrosque a tampa do tubo plástico com muito cuidado para o liquido não derramar. Seu tubo contém uma colher anexada a tampa. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.
	Passo 7 Usando a colher grudada na tampa, retire um pedacinho do seu cocô de três localidades diferentes do seu cocô. Cada pedacinho deve ser colocado dentro do tubo. Cada vez que colocar a colher com o cocô no tubo, observe a altura do liquido do tubo.		**Passo 7** Quando o liquido atingir a linha preta, você deve parar de colocar cocô no tubo. Não coloque mais do que isso. Não raspe a colher no papel coletor, pois isso irá prejudicar a amostra. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 8
Feche a bem tampa e agite suavemente até que o seu cocô esteja bem misturado com o liquido do tubo. Limpe qualquer resíduo do tubo com o lenço umedecido de álcool.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 9
Rasgue o papel coletor dos dois lados e deixe na água do vaso por um minuto. (antes de dar descarga).
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 10
Dê descarga no seu papel coletor e no resto do seu cocô no banheiro.
*Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.

Passo 11
Remova as luvas e as ponha no lixo.

4. Preencha a ficha que você recebeu com as informações necessárias sobre a coleta
5. Guarde o tubo plástico que contém a sua amostra de cocô na bolsa plástica com fecho zip
6. Insira esse saquinho com o tubo e a folha de coleta dentro do envelope que você recebeu.
7. Verifique se seu nome está escrito no envelope do lado de fora.
    a. Se você coletou a amostra no mesmo dia que o(a) entrevistador(a) foi a sua casa, dê a ele(a) o envelope.
    b. Se você coletou a sua amostra em outro dia, ponha o envelope em um local fresco e seco em sua casa e aguarde que a equipe de pesquisa entrará em contato e buscará a amostra em sua casa.

2.4 . No fim do dia, entregue as amostras à doutoranda de plantão. Observe para as amostras não ficarem pegando sol ou ficarem em local quente quando estiver em campo.

2.5 . Ao chegar no laboratório, as amostras devem ser registradas no banco de dados.

3. Registro de amostras

3.1 Todas as amostras coletadas DEVEM ser registradas no registro de coleta e transporte de amostra.

3.2 O horário da coleta da amostra e o transporte para o laboratório devem ser registrados no registro de coleta e transporte de amostra.

3.3 A temperatura do ambiente em que as amostras são armazenadas deve ser monitorada e registrada diariamente.

4. Referências

CHAIN Whole Stool Collection SOP
Norgen® Stool Nucleic Acid Collection and Preservation System Protocol

Apêndice 8 – Questionário de controle de Qualidade

QUESTIONÁRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE PELO TELEFONE
ESTE BLOCO DEVE SER PREENCHIDO ANTES DO TELEFONEMA

[DCQ01] __ __ __ __

Número de identificação da criança

__ __

Nome mãe _____ *Nome adolescente*

_____

Telefones __ __ __ __ __ __ __ __ - __ __ __ __ __ __ __ __ __

*DN:*____/____/_____

*Endereço*_____

_____

_____

_____

ESTE BLOCO DEVE SER PREENCHIDO DURANTE O TELEFONEMA

Meu nome é _____. Sou supervisor(a) da pesquisa que está sendo feita com as adolescentes nascidas em 2004 em Pelotas. ¿Quem fala? [DCQ02]

Adolescente 1	Mãe 2	Pai 3	Avó/Avô 4	Outro 5

Seu filho coletou uma amostra de Você coletou uma amostra de cocô em um tubinho? um tubinho? [DCQ03]

não *(atenção)* 0 cocô

sim 1

ATENÇÃO❼ SE NÃO*, encerrar a entrevista e anotar observações abaixo:*

_____

_____

Uma de nossas entrevistadoras visitou à sua casa para buscar o tubinho com cocô? [DCQ04]

não *(atenção)* 0

sim 1

ATENÇÃO❼ SE NÃO*, encerrar a entrevista e anotar observações abaixo:*

_____

_____

A entrevistadora realizou uma entrevista à/ao adolescente? [DCQ05]

não *(atenção)* 0

sim 1

ATENÇÃO❼ SE NÃO*, encerrar a entrevista e anotar observações abaixo:*

_____

_____

Quem ficou com adolescente durante a entrevista? Mãe 1 Pai 2 Avó/Avô 3 [DCQ06] Outro (atenção) 4

ATENÇÃO❼ SE OUTRO*, anotar quem abaixo:* _____ _____
Eu posso falar com a/o adolescente sobre a entrevista? não *(atenção)* 0 [DCQ07] sim 1
ATENÇÃO❼ SE NÃO, Eu posso falar com **<PESSÕA QUE FICOU COM** não *(atenção)* 0 **A/O ADOLESCENTE NA ENTREVISTA>?** [DCQ08] sim 1
ATENÇÃO❼ SE NÃO*, encerrar a entrevista e anotar observações abaixo:* _____ _____
Nós estamos entrevistando algumas famílias para saber como está sendo o trabalho de nossas entrevistadoras e também para esclarecer dúvidas que você ou sua mãe possa ter sobre a pesquisa. Este questionário é muito rápido, menos de 2 minutos.
1. Quanto tempo, mais ou menos **durou a visita de nossa entrevistadora** menos de 1 hora **na sua casa**? *(atenção)* 1 *(insistir para obter uma resposta sem induzir)* entre 1 e 2 horas 2 mais de 2 horas 3 mais de 3 horas 4 [DCQ09]
2. Você teria algo a reclamar **da entrevista na sua casa**? não 0 [DCQ10] sim *(atenção)* 1
ATENÇÃO ❼ SE SIM*, anotar com detalhes abaixo:* _____ _____

3. Seu filho foi medido?	3.a. Você foi medido? não 0 [DCQ11] sim 1
4. Seu filho foi pesado?	4.a. Você foi pesado? não 0 [DCQ12] sim 1
5. A barriga de seu filho foi medida?	5.a. Sua barriga foi medida? não 0 [DCQ13] sim 1
6. Na sua casa você tem cachorro? não 0 [DCQ14] sim 1	
7. Seu filho(a) tomou algum tipo de antibiótico em os últimos 6 meses?	7.a. Você tomou algum tipo de antibiótico em os últimos 6 meses? não 0 [DCQ15] sim 1
8. Seu filho(a) tem algum problema crônico no intestino?	8.a. Você tem algum problema crônico no intestino? não 0 [DCQ16] sim 1
9. A entrevistadora preguntou a seu filho(a) sobre o consumo de uma lista de alimentos e mostrou figuras?	9.a. A entrevistadora preguntou sobre o consumo de uma lista de alimentos e mostrou figuras? não 0 [DCQ17] sim 1
Data da entrevista do controle de qualidade [DCQ18] __ __ / __ __ / __ __	
Horário da entrevista do controle de qualidade [DCQ19] __ __ : __ __	
Nome e número da Entrevistadora: [DCQ20] _____ __ __	
Muito obrigado por sua participação.	

OBSERVAÇÕES:

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

SEÇÃO IV. ARTIGOS

Essa seção é composta de quatros artigos originais

ARTIGOS

Nesta secção serão apresentados os três artigos propostos na tese e um artigo adicionalmente construído paralelo a tese, com dados do PRODAH que também contribuem para o objetivo principal do projeto de tese e para os achados do volume como um todo (Artigo 4).

ARTIGO 1

Carpena, M. X., Munhoz, T. N., Xavier, M. O., Rohde, L. A., Santos, I. S., Del-Ponte, B., ... & TovoRodrigues, L. (2020). The Role of Sleep Duration and Sleep Problems During Childhood in the Development of ADHD in Adolescence: Findings From a Population-Based Birth Cohort. *Journal of Attention Disorders*, *24*(4), 590-600.

Artigo aceito em 10 de Setembro de 2019, publicado *online* em 16 de outubro de 2019 e publicação *em edição* no dia 1º de fevereiro de 2020.

The Role of Sleep Duration and Sleep Problems During Childhood in the Development of ADHD in Adolescence: Findings From a Population-Based Birth Cohort

Marina Xavier Carpena[1], Tiago N. Munhoz[1], Mariana Otero Xavier[1], Luis Augusto Rohde[2,3,4], Iná S. Santos[1,5], Bianca Del-Ponte[1], Fernando C. Barros[1], Alícia Matijasevich[6], and Luciana Tovo-Rodrigues[1]

[1]Federal University of Pelotas, Brazil
[2]Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
[3]Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
[4]National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents, São Paulo, Brazil
[5]Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
[6]Universidade de São Paulo, Brazil

Corresponding Author: Luciana Tovo-Rodrigues, Adjunct Professor, Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Marechal Deodoro Street 1160, 2nd Floor, Pelotas RS 96020-220, Brazil. Email: luciana.tovo@gmail.com

Abstract

We aimed to investigate the association between sleep in early life and ADHD in adolescence. As a secondary analysis, we tested whether the associations may be specific to ADHD. Data from 3,467 participants of the 2004 Pelotas Birth Cohort were used. Information on their sleep duration and problems was collected at 12, 24, and 48 months of age. ADHD diagnosis and hyperactivity/inattention problems were assessed with the Development and Well-Being Assessment (DAWBA) and the Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ) among participants at 11 years of age. Difficulty going to sleep at 24 months, nightmares at 24 months and at 48 months, and restless sleep at 48 months were consistently associated with ADHD as well as with other mental disorders. The results suggest that sleep disturbances may be more important ADHD predictors than sleep duration or sleep duration trajectories. However, it may also be considered early markers of other mental disorders.

Keywords: Sleep disorders, sleep, ADHD, cohort study, mental health

Introduction

Sleep/circadian rhythm problems are among the most frequent medical conditions associated with ADHD, a disorder characterized by a persistent and impairing pattern of inattention, hyperactivity, and impulsivity (Cassoff, Wiebe, & Gruber, 2012; Um, Hong, & Jeong, 2017).

Many case-control and cross-sectional studies have reported an association between ADHD and short sleep duration, great difficulty in falling asleep, great frequency of nocturnal awakenings, sleep problems/dysfunctions, and late sleep-time preferences (Cassoff et al., 2012; Coogan & McGowan, 2017; Díaz-Román, Mitchell, & Cortese, 2018; Hvolby, 2015; Um et al., 2017). Few longitudinal studies have assessed the role of sleep duration and sleep problems as an early ADHD predictor (Armstrong, Ruttle, Klein, Essex, & Benca, 2014; Gregory, Agnew-Blais, Matthews, Moffitt, & Arseneault, 2017; Scott et al., 2013; Steinsbekk & Wichstrom, 2015; Tso et al., 2019; Williams & Sciberras, 2016) as well as the effect of some important sleep measures such as daytime sleep duration or restless sleep (Cortese, Faraone, Konofal, & Lecendreux, 2009; Díaz-Román, Hita-Yáñez, & Buela-Casal, 2016).

Shorter total sleep duration and more nocturnal awakenings at 5, 6, and 9 years of age were associated with ADHD at ages 7 to 9 years in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) cohort (Scott et al., 2013). In another population-based study, moderate to severe sleep problems from 2 to 7 years of age were associated with hyperactivity/inattention symptoms from 8 to 9 years (Williams & Sciberras, 2016). Recently, a Chinese population-based cohort study reported an association between early sleep deprivation and an elevated risk of ADHD in middle childhood (Tso et al., 2019). However, there is great variability in how previous studies have selected and used confounding variables for adjustment in multivariable analyses when assessing the effect of sleep on ADHD. Many important theoretical variables, such as socioeconomic, maternal/pregnancy, and birth-related factors, are not included in the models; thus, findings may be hampered by confounding factors.

Moreover, most studies evaluate sleep variables at specific and single time points. In this sense, the long-term effect of sleep duration in early life and its changes with respect to several time points are largely unknown. Analyses considering changes in sleep duration over time have only been carried out by Scott et al. (2013) and Armstrong et al. (2014). According to the former, a reduction in sleep duration from 3 to 5 years of age increased the risk of ADHD (Scott et al., 2013). Armstrong et al. (2014) observed that the persistence of insomnia at both 4.5 and 9 years was associated with ADHD symptoms at 9 years, and the persistence of movements during sleep was associated with ADHD symptomatology at 9 and 18 years of age (Armstrong et al., 2014). Studies evaluating sleep trajectories as a predictor of ADHD can provide meaningful information about the link between both traits; however, they are scarce in the literature.

Another important issue related to sleep problems in ADHD is the presence of psychiatric comorbidities (DíazRomán et al., 2018). Sleep problems are associated with both internalizing and externalizing problems in childhood and adolescence and can also predict other mental health outcomes (Sadeh, Tikotzky, & Kahn, 2014). For example, the cohort study cited above found that persistent insomnia was also associated with both depression and externalizing symptoms at age 9 years and both anxiety and externalizing symptoms at age 18 years (Armstrong et al., 2014). In review studies, other circadian and sleep problems have been associated with several emotional and behavioral conditions in addition to ADHD, such as depression, anxiety, risk-taking, and aggression (Brown et al., 2018; Sadeh et al., 2014; Zee, Attarian, & Videnovic, 2013). Therefore, we cannot assure that sleep problems are specific to ADHD. For instance, although sleep problems were recognized as being related to ADHD according to observational epidemiologic studies, they were removed from the ADHD diagnostic criteria in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4th

ed.; DSM-IV; American Psychiatric Association [APA], 1994; Cortese, 2015) due to the need for more well-conducted studies in the field assessing the specificity of the association.

Considering the current exposed pitfalls of the association between sleep characteristics and ADHD and the lack of birth cohort studies with a considerable sample size (Cortese et al., 2009; Díaz-Román et al., 2016), this study has the following aims: (a) to investigate the effect of sleep duration and sleep problems at 12, 24, and 48 months on ADHD at 11 years of age in a Brazilian population-based birth cohort; (b) to investigate the effect of 3-point (12, 24, and 48 months of age) sleep duration trajectories on the same outcome; and (c) to evaluate the specificity of the effect on ADHD and hyperactivity/ inattention problems, testing the effect of sleep variables over other mental disorders.

Method

Sample

The 2004 Pelotas Birth Cohort is a population-based longitudinal study conducted with hospital childbirths in the southern Brazilian city of Pelotas. Among the 4,263 live births, 4,231 mothers agreed to participate in the study. For the current analyses, twin births and children with neurodevelopmental impairments due to genetic syndromes were excluded. We included data from children visited at ages 12, 24, and 48 months and at 11 years. The follow-up rates during these visits were 94.3%, 93.5%, 92.0%, and 86.6%, respectively (Santos et al., 2011; Santos et al., 2014). At the 11-year followup, 92 participants potentially eligible for the study were not included due to death. All data were collected by trained interviewers.

ADHD

At the 11-year follow-up, trained psychologists applied the Development and Well-Being Assessment (DAWBA; Goodman, Ford, Richards, Gatward, & Meltzer, 2000) to mothers and caregivers to assess ADHD and other mental health disorders. ADHD was evaluated by a specific DAWBA section consisting of 31 closed- and open-ended questions. For the final classification, two independent and experienced mental health professionals assessed all of the responses. Cases were defined according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.; DSM-5; APA, 2013) criteria, as were other mental disorders. The DAWBA was adapted and has been validated for the Brazilian population aged between 4 and 16 years (Fleitlich-Bilyk & Goodman, 2004).

Sleep Behavior (Exposures of Interest)

Nighttime sleep duration. Maternal reports of children's sleep behavior were collected at 12, 24, and 48 months. To assess children's bed and wake times in the past 2 weeks, mothers were asked the following questions: "In the last two weeks, at what time did your child go to bed at night?" and "At what time did the child wake up in the morning?" In addition to bedtime, mothers were asked about how long it took the child to fall asleep (sleep latency). Mothers were also asked about night awakenings: "In the last 2 weeks, did the child wake up during night?" If they responded yes to this question, we asked, "How many nights in the last two weeks?" and "How often each night?" We calculated nighttime sleep duration by discounting the latency and the wake time after sleep onset. The mean wake time after sleep onset was calculated by multiplying the average number of nocturnal awakenings in the last 2 weeks by the estimated time the child

was awake in each event at each time point. The duration of each nocturnal awakening was based on data from the Sleep Trial, carried out with a subsample of the Pelotas 2015 Birth Cohort Study, which included all the children born in Pelotas in 2015 (Santos et al., 2016). Sleep duration, objectively measured by actigraphy, during that trial showed that each nighttime awakening lasted an average of 22 min at 12 months and 7 min at 24 months of age. Given that no local data on the duration of night awakenings at 48 months was available, we assigned 7 min to each.

Daytime sleep duration. Mothers were also asked, "In the last 2 weeks, approximately how many naps did the child take during the day?" and "Approximately how long did each nap last?" We multiplied these two variables to calculate daytime sleep duration. Total sleep duration. Sleep duration over the 24-hr period (total sleep duration) was calculated by adding the nighttime and daytime sleep duration variables. In this study, sleep durations ranging between 3 and 20 hr per day were considered plausible values. Values out of this range, as assessed manually by two specialized analysts, were considered outliers and were excluded from analyses (N = 13).

Total sleep duration trajectories from 12 to 48 months (short sleepers, typical sleepers, and longer sleepers) were also built. A semiparametric, group-based approach was used to identify the different patterns of total sleep duration reported by mothers from 12 to 48 months of age. This is a specialized form of finite mixture modeling designed to identify rather than assume groups or clusters of individuals following similar developmental trajectories (Nagin, 2005; Nagin & Tremblay, 2005). A polynomial function was used to model the relationship between total sleep duration and age. The models were estimated with the Stata procedure "traj" (B. L. Jones & Nagin, 2012). A logistic model was used to fit the data. The choice of the number and shape of trajectories was based not only on the best fit of the model (maximum Bayesian information criteria [BIC]) but also on the interpretability of the obtained trajectories (Nagin, 2005) . Individuals with missing information were not excluded from the model due to trajectory modeling ability based on lost data manipulation groups using maximum likelihood estimation. However, total sleep duration trajectories were created considering only individuals with at least two time points of total sleep data and those with outcome data at 11 years (n = 3,376) to obtain more plausible trajectories.

Sleep disturbances. Sleep disturbance variables were intended to indicate behaviors that may increase the risk of future sleep problems. The following variables collected at the 24- and 48-month follow-ups were employed: The child has trouble going to sleep (yes/no), the child has nightmares/night terrors (yes/no), and the child has restless sleep (yes/no). These variables were already reported as good indicators of sleep problems in infancy in previous studies (Netsi et al., 2017; O'Connor et al., 2007).

Potential Confounding Factors

The following covariates, collected at the perinatal study (cohort baseline), were used for adjustment in multivariable analyses: wealth index (continuous score), maternal schooling (complete years), maternal age (complete years), maternal marital status (single or married/living with someone), maternal skin color (White, Black, or Other—including Brown, Yellow, or Indigenous), parity (number of previous live births or stillbirths, categorized as <2 and ≥2), maternal alcohol (yes/no) and tobacco (yes/no) use in pregnancy, maternal reported nervous or depression symptoms in pregnancy (yes/no), C-section (yes/no), child sex (male/female), birth weight (evaluated by calibrated electronic scale), and gestational age (considering <37 weeks as preterm birth).

The wealth index (an indicator of material living standards) considers the possession of durable consumer goods (e.g., television, car, computer, and stoves) and household characteristics (e.g., number of toilets) and is constructed through principal components analysis. For our analyses, the first component was selected and categorized in quintiles (Barros & Victora, 2005). Continuous variables were maintained in their original form for multiple regression models, and when we used these variables to describe our sample, we categorized them for a better comprehension.

Data Analysis

All analyses were conducted using Stata software (Version 14.0) and a significance level of 5%. We describe variables with a normal distribution using the mean and standard deviation (SD). For numerical variables with asymmetric distribution, we used medians and interquartile intervals (IQs), and for nominal variables, we used percentages. Bivariate analyses (chi-square tests and t tests, depending on the type of variables) were conducted to explore the relationship between sleep exposures and ADHD at different time points. Crude and adjusted logistic regression models were used to assess the strength of the association between sleep variables and ADHD at 11 years, independently of confounding factors, to test our Hypotheses 1 and 2:

Hypothesis 1: A trajectory of short sleep duration would increase the occurrence of ADHD. To test this hypothesis, we compared the odds of the development of ADHD in persistently longer sleepers or shorter sleepers against typical sleepers during childhood.

Hypothesis 2: Short sleep duration (at night, day, and total), sleep difficulties, restless sleep, and nightmares during early life are risk factors for ADHD at 11 years. To test this hypothesis, we used sleep duration as continuous exposure variables and sleep problems as dichotomized exposures. Each exposure variable at each time point wave was explored in a single crude and adjusted model.

We also conducted a complementary analysis to test whether sleep duration and problems would be specific to ADHD:

Hypothesis 3: We hypothesized that the associations tested above would be observed only for ADHD and not for other mental disorders.

Therefore, we created an outcome variable with three categories: "no mental disorder," "ADHD," and "any other mental disorders (despite ADHD)," considering the mental health status assessed by the DAWBA. Multinomial logistic regression crude and adjusted models were used to assess the effect of sleep variables on ADHD and any other mental disorder compared with the group of individuals with no mental disorders in these analyses.

Secondary Analysis

As a secondary analysis, we assessed inattention/hyperactivity problems evaluated by the Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ) as a secondary outcome. The SDQ is a screening questionnaire applied with the DAWBA, and it measures 25 psychological attributes divided into five scales: Inattention/Hyperactivity Symptoms, Conduct Problems, Emotional Symptoms, Peer Relationship Problems, and Prosocial Behavior. The questionnaire was adapted and previously validated for the Brazilian population of children and teenagers aged between 4 and 16 years (Fleitlich-Bilyk & Goodman, 2004). We used the cutoff points established for the Brazilian population to categorize the screening for

inattention/hyperactivity problems (≥7) and total emotional/behavior difficulties (≥17). To test a hypothesis of a specificity effect, we created a variable with three categories, namely, "no other emotional/behavior difficulty," "inattention/hyperactivity problems," and "another emotional/behavior difficulty," and used the same models described above.

Ethics

The study protocol and all follow-ups of the 2004 Pelotas Birth Cohort Study were approved by the Medical Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, which is affiliated with the Brazilian National Commission for Research Ethics (CONEP). Written informed consent was obtained from the mothers or legal guardians of the adolescents. At the 11-year follow-up, adolescents also signed an informed consent form.

Results

Following the eligibility criteria, 111 participants (84 twins and 27 with syndromic cases) were excluded from this study. A total of 3,466 participants were included in the analysis, yielding a response rate of 86.05% for mental health outcomes at the 11-year follow-up among the 4,028 living and eligible participants. A total of 144 adolescents were diagnosed with ADHD using the DAWBA (4.0%). Approximately half of our sample were boys (51.7%) and were born by C-section (44.8%). The prevalence of low birth weight and prematurity was 8% and 13%, respectively. Mothers were mostly married (80.5%) and had White skin color (73.2%) and two or more children (60.4%). Although 26.8% of mothers smoked during pregnancy, few reported alcohol consumption during this period (3.2%). Approximately 25% of the mothers reported being depressed or nervous during pregnancy (Table 1). Children not included in the sample due to missing data were from poorer and less educated mothers. Mothers in the analyzed sample were older than those not included (35 years old, 13.9% vs. 9.6%, respectively) and less depressive than the nonrespondents (24.0% vs. 30.1%, respectively) (Table 1).

Sleep Variables Description

Table 2 presents the descriptive statistics for the sleep variables. As age increases, the mean for total sleep duration decreases, and the mean for nighttime sleep duration increases. Daytime sleep duration had an asymmetric distribution, and the median also decreased as age increased. The frequency of sleep problems decreased as age increased for the overall sample, except for restless sleep in the ADHD groups.

For the total sleep trajectories, data were used from 3,376 participants. Trajectories were constructed with quadratic models and showed an adequate average posterior probability (more than 70% for each trajectory; Supplemental Table S1). We obtained three groups, namely, longer sleepers (12.8%), typical sleepers (79.0%), and shorter sleepers (8.2%), and their differences seem to be more important at the beginning of life (Supplemental Figure S1). Family wealth index ($p = .014$), schooling ($p < .001$), depression during pregnancy ($p = .003$), smoking during pregnancy ($p = .016$), and other sleep variables (all p values <.05) were associated with the trajectory groups, thus making these groups more plausible.

Table 1. Comparison of Maternal and Birth-Related Characteristics Between 2004 Pelotas Birth Cohort Participants Included and Not Included in Analyses Due to Missing Data.

	Included (*n* = 3,466) % (95% CI)	Not included (*n* = 562) % (95% CI)
Wealth Index (quintile)		
1 (lower—poor)	20.3 [18.8, 21.8]	29.3 [25.0, 34.0]
2	19.0 [17.6, 20.5]	18.6 [15.0, 22.7]
3	20.2 [18.7, 21.7]	14.8 [11.6, 18.6]
4	21.0 [19.5, 22.6]	13.2 [10.2, 17.0]
5 (highest—richest)	19.5 [18.1, 21.0]	24.2 [20.2, 28.7]
Schooling (complete years)		
0	0.8 [0.5, 1.2]	1.6 [0.8, 3.1]
1-4	14.0 [12.9, 15.2]	17.1 [14.3, 20.2]
5-8	41.3 [39.6, 42.9]	40.3 [36.6, 44.2]
9+	43.9 [42.3, 45.6]	40.5 [36.7, 44.3]
Maternal age (complete years)		
<20	19.0 [17.8, 20.4]	18.7 [15.7, 22.1]
20-34	67.0 [65.4, 68.6]	71.7 [67.8, 75.3]
35	13.9 [12.8, 15.1]	9.6 [7.4, 12.3]
Single mother (yes)	15.5 [14.3, 16.7]	18.9 [15.8, 22.3]
Skin color		
White	73.2 [71.7, 74.7]	74.3 [70.6, 77.8]
Black	19.9 [18.6, 21.3]	18.9 [15.0, 21.4]
Other (Brown, Yellow, and Native)	6.8 [6.0, 7.7]	7.7 [5.7, 10.2]
Parity 2 children (yes)	60.2 [58.5, 61.8]	60.7 [56.6, 64.6]
Maternal nervous or depression symptoms in pregnancy (yes)	24.0 [22.6, 25.5]	30.1 [26.4, 34.0]
Smoking during pregnancy (yes)	26.8 [25.4, 28.3]	30.1 [26.4, 34.0]
Alcohol during pregnancy (yes)	3.2 [2.7, 3.9]	3.4 [2.2, 5.2]
C-section (yes)	44.8 [43.1, 46.4]	44.0 [40.0, 48.1]
Children sex, male	51.7 [50.0, 53.4]	52.5 [48.3, 56.6]
Low birth weight (yes)	7.9 [7.1, 8.9]	8.4 [6.3, 11.0]
Preterm birth (<37 weeks)	12.9 [11.8, 14.1]	12.1 [9.7, 15.1]

Note. CI = confidence interval.

Table 2. Sleep Variables for the Whole Sample of the 2004 Pelotas Birth Cohort (Pelotas, Brazil), Stratified According to ADHD Status at 11 Years of Age.

		Development and Well-Being Assessment	
	Whole sample	Non-ADHD	ADHD
Variable (*N*)	*M* (*SD*)	*M* (*SD*)	*M* (*SD*)
Total sleep duration (hours/24 hr)			
12 months (3,313)	11.58 (1.97)	11.59 (1.97)	11.38 (1.90)
24 months (3,320)	11.50 (1.45)	11.49 (1.45)	11.68 (1.60)
48 months (3,282)	10.64 (1.41)	10.63 (1.41)	10.70 (1.37)
Night sleep duration (hours/night) 12 months (3,319)	9.37 (1.53)	9.38 (1.53)	9.13 (1.43)
24 months (3,324)	9.93 (1.28)	9.92 (1.27)	10.12 (1.51)
48 months (287)	9.98 (1.34)	9.98 (1.33)	9.76 (1.42)
Daytime sleep duration (hours/day)[a] 12 months (3,346)	2.00 (0-12)	2.00 (1-3)	2.00 (1-3)
24 months (3,344)	1.50 (0-6)	2.50 (1-2)	2.50 (1-2)
48 months (3,336)	0.00 (0-6)	0.00 (0-1)	0.67 (0-2)
	n (%)	*n* (%)	*n* (%)
Difficulty going to sleep (yes)			
12 months (3,350)	1,123 (33.5)	1,081 (33.6)	42 (31.3)
24 months (3,346)	789 (23.6)	744 (23.2)	45 (33.8)
48 months (3,341)	707 (21.2)	671 (20.9)	36 (27.3)
Nightmares (yes)			
24 months (3,346)	440 (13.2)	416 (13.0)	24 (18.1)
48 months (3,341)	469 (14.0)	439 (13.7)	30 (22.7)
Restless sleep (yes)			
24 months (3,346)	1,177 (35.2)	1,126 (35.1)	51 (38.4)
48 months (3,343)	1,150 (34.4)	1,090 (34.0)	60 (45.5)

[a] Median and quartile range reported.

Total Sleep Duration Trajectories, Sleep Duration Variables, and ADHD

Total sleep duration trajectories were not associated with ADHD (Table 3). With respect to individual sleep duration variables, only longer daytime sleep duration at 48 months was associated with a higher odds of ADHD at 11 years old (odds ratio [OR] = 1.28, 95% confidence interval [CI] = [1.06, 1.53]). The other sleep duration variables were not associated with ADHD in the adjusted model (Table 4). The SDQ results also showed a lack of association for most of the sleep duration variables in the adjusted model. Only a marginal association was observed between short nighttime sleep at 48 months and inattention/hyperactivity problems (Supplemental Table S2).

Table 3. Association Between Early Life Total Sleep Duration Trajectory Groups and ADHD, as Assessed by the Development and Well-Being Assessment, at 11 Years of Age in the 2004 Pelotas Birth Cohort.

	ADHD	
	OR[a] (95% CI)	OR[b] (95% CI)
Total sleep duration trajectories		
Typical sleepers	1 (reference)	1 (ref)
Shorter sleepers	0.91 [0.47, 1.76]	0.66 [0.30, 1.47]
Longer sleepers	1.12 [0.68, 1.84]	1.01 [0.56, 1.82]

Note. OR = odds ratio; CI = confidence interval.

[a] Unadjusted analysis.

[b] Maternal and birth-related characteristics adjustment: family wealth index, maternal age, maternal schooling, maternal marital status, maternal skin color, parity, alcohol intake and smoking during pregnancy, maternal nervous or depression symptoms in pregnancy, gestational age, C-section, child sex, and birth weight.

Table 4. Association Between Sleep Variables and ADHD, as Assessed by the Development and Well-Being Assessment, at 11 Years of Age in the 2004 Pelotas Birth Cohort.

	ADHD	
	OR[a] (95% CI)	OR[b] (95% CI)
Total sleep duration		
12 months (hours/24 hr)	0.95 [0.87, 1.04]	0.97 [0.88, 1.07]
24 months (hours/24 hr)	1.09 [0.97, 1.23]	1.06 [0.93, 1.21]
48 months (hours/24 hr)	1.04 [0.91, 1.17]	1.08 [0.94, 1.24]
Night sleep duration		
12 months (hours/night)	0.90 [0.80, 1.01]	0.95 [0.83, 1.08]
24 months (hours/night)	1.13 [0.98, 1.29]	1.09 [0.94, 1.28]
48 months (hours/night)	0.87 [0.78, 1.01]	0.94 [0.81, 1.08]
Daytime sleep duration		
12 months (hours/day)	1.04 [0.92, 1.17]	1.03 [0.91, 1.18]
24 months (hours/day)	0.99 [0.82, 1.20]	0.97 [0.78, 1.20]
48 months (hours/day)	**1.30 [1.11, 1.52]**	**1.28 [1.06, 1.53]**
Difficulty going to sleep		
12 months (yes)	0.90 [0.62, 1.31]	0.81 [0.52, 1.25]
24 months (yes)	**1.70 [1.17, 2.45]**	**2.05 [1.34, 3.13]**

48 months (yes)	1.42 [0.96, 2.10]	1.33 [0.84, 2.09]
Nightmares		
24 months (yes)	1.48 [0.94, 2.33]	**1.71 [1.03, 2.84]**
48 months (yes)	**1.86 [1.22, 2.82]**	**1.68 [1.02, 2.79]**
Restless sleep		
24 months (yes)	1.15 [0.81, 1.65]	1.35 [0.89, 2.04]
48 months (yes)	**1.62 [1.14, 2.30]**	**1.58 [1.05, 2.37]**

Note. Bold highlighted the significant differences between groups. OR = odds ratio; CI = confidence interval.

[a] Unadjusted analysis.

[b] Maternal and birth-related characteristics adjustment: family wealth index, maternal age, maternal schooling, maternal marital status, maternal skin color, parity, alcohol intake and smoking during pregnancy, maternal nervous or depression symptoms in pregnancy, gestational age, C-section, child sex, and birth weight.

Sleep Problems and ADHD

Overall, most of the sleep problem variables were associated with ADHD after adjustment for covariates (Table 4). The risk of having ADHD was greater among those who presented difficulty in going to sleep at 24 months (OR = 2.05, 95% CI = [1.34, 3.13]), those who had restless sleep at 48 months (OR = 1.58, 95% CI = [1.05, 2.37]), and those who had nightmares at both 24 months (OR = 1.70, 95% CI = [1.28, 2.25]) and 48 months (OR = 1.60, 95% CI = [1.21, 2.12]) (Table 4). In the SDQ assessment, difficulty going to sleep at 24 months and having nightmares and restless sleep at both 24 and 48 months were associated with inattention/hyperactivity problems after adjustment for covariates (Supplemental Table S2).

Specificity Analysis

According to the DAWBA, 86.8% of the sample presented no psychopathology, while 9.2% had any other mental disorder (despite ADHD). The multinomial logistic regression showed that there was no association between sleep duration and other mental problems at any point after adjustment (Table 5 and Supplemental Table S3). On the contrary, sleep problem variables were associated with the presence of other mental issues in the adjusted model. Having difficulty going to sleep at the 24-month follow-up, having restless sleep at the same age, and having nightmares at the 24- and 48-month follow-ups were risk factors for having other mental disorders compared with typical development (Table 5). We also observed the association between having any other mental condition and difficulty going to sleep at 24 months and nightmares at 24 and 48 months, with respect to the SDQ outcome (Supplemental Table S4). The results observed for the ADHD group in the multinomial analyses were virtually the same as those found in the main analyses. They were omitted from the main text to facilitate the presentation of the data, but they are shown in Supplemental Table S4.

Table 5. Association Between Sleep Variables and Any Mental Disorders Other Than ADHD, as Evaluated by the DAWBA, at 11 Years of Age in the 2004 Pelotas Birth Cohort Using Multinomial Logistic Regression.

	Any other mental disorder	
	OR[a] (95% CI)	OR[b] (95% CI)
Total sleep trajectories[c]		
Shorter sleepers	1.31 [0.88, 1.95]	1.30 [0.83, 2.02]
Longer sleepers	1.10 [0.77, 1.55]	1.19 [0.81, 1.74]
Total sleep duration		
12 months (hours/24 hr)	0.98 [0.92, 1.04]	0.99 [0.92, 1.06]
24 months (hours/24 hr)	0.92 [0.85, 1.00]	0.94 [0.86, 1.03]
48 months (hours/24 hr)	0.99 [0.91, 1.08]	1.00 [0.91, 1.10]
Night sleep duration		
12 months (hours/night)	0.95 [0.88, 1.03]	0.98 [0.90, 1.07]
24 months (hours/night)	**0.89 [0.81, 0.98]**	0.92 [0.83, 1.02]
48 months (hours/night)	0.92 [0.84, 1.00]	0.96 [0.87, 1.06]
Daytime sleep duration		
12 months (hours/day)	1.02 [0.94, 1.11]	1.01 [0.92, 1.11]
24 months (hours/day)	1.03 [0.90, 1.17]	1.01 [0.88, 1.17]
48 months (hours/day)	1.16 [1.03, 1.30]	1.11 [0.97, 1.26]
Difficulty going to sleep		
12 months (yes)	**1.39 [1.09, 1.77]**	**1.33 [1.01, 1.74]**
24 months (yes)	**1.64 [1.27, 2.12]**	**1.63 [1.22, 2.18]**
48 months (yes)	**1.66 [1.28, 2.16]**	**1.47 [1.09, 1.99]**
Nightmares		
24 months (yes)	**1.87 [1.39, 2.53]**	**1.86 [1.32, 2.61]**
48 months (yes)	**1.69 [1.25, 2.278]**	**1.85 [1.32, 2.59]**
Restless sleep		
24 months (yes)	**1.38 [1.081, 1.752]**	**1.41 [1.07, 1.85]**
48 months (yes)	**1.46 [1.145, 1.854]**	1.32 [1.00, 1.73]

Note. DAWBA = Development and Well-Being Assessment; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

[a] Unadjusted analysis.

[b] Maternal and birth-related characteristics adjustment: family wealth index, maternal age, maternal schooling, maternal marital status, maternal skin color, parity, alcohol intake and smoking during pregnancy, maternal nervous or depression symptoms in pregnancy, gestational age, C-section, child sex, and birth weight; bold highlighted the significant differences between groups. The results including the ADHD group are shown in Supplemental Table S4.

Discussion

Our findings showed a consistent association between sleep problems at 24 and 48 months of age and ADHD in the beginning of adolescence. Regarding sleep duration variables, no consistent association was found with ADHD, although some variables at specific follow-up points were associated with ADHD after adjustment. The longterm sleep duration effect assessed using trajectories was also not associated with ADHD. We also showed that sleep problems may be common to different psychiatric disorders, not only to ADHD.

Our results suggest that sleep disturbances in early life may be more important for ADHD than sleep duration. The associations between ADHD and difficulty going to sleep (Armstrong et al., 2014; Craig, Weiss, Hudec, & Gibbins, 2017; Steinsbekk & Wichstrom, 2015), nightmares (Grünwald & Schlarb, 2017), and restless sleep

(Armstrong et al., 2014; Cortese et al., 2005; Sadeh, Pergamin, & Bar-Haim, 2006) have been reported in the literature, which is in accordance with our findings. On the contrary, several studies have suggested an important role of sleep duration in this disorder (Cassoff et al., 2012; Coogan & McGowan, 2017; Scott et al., 2013). We should highlight that our unadjusted analyses showed an association between total sleep duration and ADHD, as has been reported previously. However, most of the sleep duration associations were highly marginal and/or lost significance after adjustment for maternal and birth-related factors, suggesting that this association may result from confounding. This pattern was also observed when we tested the trajectories. The effect did not remain significant after the adjustment, indicating that the trajectories (longitudinal construct) are also not the most important factors in future ADHD. Indeed, although the literature shows the association between sleep duration and ADHD, most of the previous studies presented no adjusted analyses or utilized an insufficient/inadequate control method (Scott et al., 2013; Williams & Sciberras, 2016). Although we cannot rule out the potential role of unfavorable sleep–wake behavior or variability in sleep schedules, which have already been reported in ADHD (Craig et al., 2017; Scott et al., 2013; Thoma et al., 2018), for the few associations observed for shorter nocturnal and greater daytime sleep duration at 48 months, confounding seems to be an important issue in the current literature. Future studies should more thoroughly explore this issue to report adequate estimates.

The differential roles of sleep duration and problems with ADHD still need to be clarified in terms of mechanisms. The current hypotheses that explain the link between sleep issues and ADHD are mainly based on the impairment of the prefrontal cortex and frontal functions, dopamine neurotransmission, and circadian rhythm control (Cassoff et al., 2012; Um et al., 2017). An impact of sleep quality and duration on brain executive control and emotional information processing has already been observed (Sadeh et al., 2014; Um et al., 2017; Wright, Lowry, & LeBourgeois, 2012), which may explain the neurobehavioral, neurocognitive, and functional manifestations of ADHD symptomatology (Lunsford-Avery, Krystal, & Kollins, 2016; Mahone & Denckla, 2017; Pievsky & McGrath, 2018). Moreover, both executive functions and sleep are regulated by prefrontal cortex function and dopaminergic activity (Cassoff et al., 2012; Mahone & Denckla, 2017; Wright et al., 2012; Zee et al., 2013), providing a mechanism linking both traits. Impairment in synaptic plasticity, an increase in hippocampal oxidative stress, and the facilitation of neuronal loss were already observed in response to sleep deprivation, which affect neurocognitive function and provide similar symptomatology to ADHD (Um et al., 2017). Other sleep conditions, however, do not have a clear underlying pathway. Recently, genome-wide association studies have indicated that the genetic markers of insomnia and sleep duration are not the same (S. E. Jones et al., 2016), although a negative genetic correlation between the traits was observed (Jansen et al., 2018; Lane et al., 2017). In this sense, it is necessary to understand the biological pathways affected by sleep disturbances and sleep duration to comprehend their relationship with ADHD etiology.

The lack of specificity observed in our study of the effects of sleep problems on ADHD suggests that sleep problems could not be considered early markers or endophenotypes of ADHD as a unique mental condition and a means of early detection, as has been stated in the literature (Sadeh et al., 2014; Um et al., 2017; Williams & Sciberras, 2016). On the contrary, Williams and Sciberras (2016) highlighted that sleep problems in children with and without ADHD precede emotional dysregulation, and even though early sleep problems are not a specific marker of ADHD, treating these sleep problems may contribute to reduced attentional dysfunction and prevent ADHD as well as other mental conditions. Importantly, sleep problems are also reported in adults with ADHD (Díaz-Román et al., 2018), suggesting that the association observed here may be persistent across development. Therefore, we can consider sleep problems an important issue in ADHD, even when there is no specific effect observed. Detecting and treating precociously may be an important issue in preventing or attenuating ADHD symptoms.

Our results should be interpreted in the context of some limitations. First, we do not have data on sleep at 11 years and ADHD evaluation (or a *proxy*) at 48 months, making it impossible to test other hypotheses, such as the bidirectional relation, as other studies have mentioned (Gregory et al., 2017; Steinsbekk & Wichstrom, 2015), and the potential causality of sleep problems on ADHD. However, a clinical trial found that the effect of its intervention on ADHD symptoms was mediated through improved sleep problems in the intervention group (Hiscock et al., 2015), indicating that even when ADHD symptoms may bring forth sleep problems, sleep hygiene interventions may be an alternative/complementary treatment to ADHD. With respect to the trajectory, it is important to highlight that the trajectory of our longer trajectory group is longer compared with our own data (Nagin & Tremblay, 2005) but not compared with the recommended sleep time at 24 and 48 months. In other words, children in this group sleep more than the recommended amount only during the 12 months, and after this point, they sleep the recommended amount of time (Hirshkowitz et al., 2015). However, the observed sleep trajectory is very similar to the pattern reported by other studies in the sleep field (Bathory & Tomopoulos, 2017), indicating that there are persistent groups of shorter, longer, and typical sleepers, with the differences decreasing with increasing age, enhancing the reliability of our findings. Moreover, although there is a difference between respondents and nonrespondents, which may be considered a limitation, the response rate is high, and only a few differences were observed. Finally, both sleep and mental health outcomes are evaluated only by mothers' reports, which may have an impact on the prevalence, as caregivers' perceptions may affect their reports. However, in population-based studies, especially in this age range, parental reports are the most feasible. In addition, most of the studies also evaluated the exposure and outcome by maternal report, providing us with more comparability.

Nevertheless, we focused on sleep and ADHD data in a large population-based birth cohort in Brazil, including assessments at several time points during childhood and a high follow-up rate, which are study characteristics that are still lacking in the literature (Cortese, 2015; Cortese et al., 2005; Lunsford-Avery et al., 2016; Um et al., 2017). Moreover, we administered a comprehensively validated diagnosis instrument on all cohort participants to detect ADHD cases (Fleitlich-Bilyk & Goodman, 2004), which is an important addition to the current literature (Cortese et al., 2009; Díaz-Román et al., 2016). These points can be considered strengths of our data; no previous study has performed this type of comprehensive analysis. We used this robust methodology to explore the effect of each follow-up time point as well as the total sleep duration trajectory effect on ADHD. We also addressed possible maternal and child confounders, which have not been thoroughly studied previously. Furthermore, the specificity analysis adds important information to the literature.

Finally, our findings indicate that sleep problems in early life may be more important than sleep duration for the ADHD etiology. On the contrary, results of the specificity analyses suggest that sleep disturbances may be considered as a common early marker of psychiatric disorders in general and not only a marker of ADHD. This study shows that the relationship between sleep/circadian rhythms and ADHD may be more complex than previously shown by other empirical studies. Further research exploring temporality and sleep trajectories in the sleep–ADHD association as well as studies exploring the specificity of this relationship are still necessary to narrow this gap in the literature.

Authors' Note

This article is based on data from the study "Pelotas Birth Cohort, 2004" conducted by Postgraduate Program in Epidemiology at Universidade Federal de Pelotas, with the collaboration of the Brazilian Public Health Association (ABRASCO).

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article: M.X.C., A.M., I.S.S., and L.T.-R. are supported by the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development).

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The World Health Organization, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), Brazilian National Research Council (CNPq), Brazilian Ministry of Health, and Children's Pastorate supported previous phases of the study until 2009. The 11-year follow-up was supported by the Science and Technology Department/Brazilian Ministry of Health, with resources transferred through the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Grant Number 2400943/2013-1. This follow-up was also funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; Grant Number 2014/13864-6). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

References

American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed.). Washington, DC: Author.

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.

Armstrong, J. M., Ruttle, P. L., Klein, M. H., Essex, M. J., & Benca, R. M. (2014). Associations of child insomnia, sleep movement, and their persistence with mental health symptoms in childhood and adolescence. *Sleep, 37*, 901-909. doi:10.5665/sleep.3656

Barros, A. J., & Victora, C. G. (2005). A nationwide wealth score based on the 2000 Brazilian demographic census. *Revista de Saude Publica, 39*, 523-529.

Bathory, E., & Tomopoulos, S. (2017). Sleep regulation, physiology and development, sleep duration and patterns, and sleep hygiene in infants, toddlers, and preschool-age children. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, 47*, 29-42.

Brown, W. J., Wilkerson, A. K., Boyd, S. J., Dewey, D., Mesa, F., & Bunnell, B. E. (2018). A review of sleep disturbance in children and adolescents with anxiety. *Journal of Sleep Research, 27*(3), e12635. doi:10.1111/jsr.12635

Cassoff, J., Wiebe, S. T., & Gruber, R. (2012). Sleep patterns and the risk for ADHD: A review. *Nature and Science of Sleep, 4*, 73-80. doi:10.2147/NSS.S31269

Coogan, A. N., & McGowan, N. M. (2017). A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. *Attention Deficit and Hyperactivity Disorders, 9*, 129-147. doi:10.1007/s12402-016-0214-5

Cortese, S. (2015). Sleep and ADHD: What we know and what we do not know. *Sleep Medicine, 16*, 5-6.

Cortese, S., Faraone, S. V., Konofal, E., & Lecendreux, M. (2009). Sleep in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: Meta-analysis of subjective and objective studies. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 48*, 894-908.

Cortese, S., Konofal, E., Lecendreux, M., Arnulf, I., Mouren, M.-C., Darra, F., & Bernardina, B. D. (2005). Restless legs syndrome and attention-deficit/hyperactivity disorder: A review of the literature. *Sleep, 28*, 1007-1013.

Craig, S. G., Weiss, M. D., Hudec, K. L., & Gibbins, C. (2017). The functional impact of sleep disorders in children with ADHD. *Journal of Attention Disorders*. Advance online publication. doi:10.1177/1087054716685840

Díaz-Román, A., Hita-Yáñez, E., & Buela-Casal, G. (2016). Sleep characteristics in children with attention deficit hyperactivity disorder: Systematic review and meta-analyses. *Journal of Clinical Sleep Medicine, 12*, 747-756.

Díaz-Román, A., Mitchell, R., & Cortese, S. (2018). Sleep in adults with ADHD: Systematic review and meta-analysis of subjective and objective studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 89*, 61-71.

Fleitlich-Bilyk, B., & Goodman, R. (2004). Prevalence of child and adolescent psychiatric disorders in southeast Brazil. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 43*, 727-734. doi:10.1097/01.chi.0000120021.14101.ca

Goodman, R., Ford, T., Richards, H., Gatward, R., & Meltzer, H. (2000). The Development and Well-Being Assessment: Description and initial validation of an integrated assessment of child and adolescent psychopathology. *The Journal of Child Psychology and Psychiatry, 41*, 645-655.

Gregory, A. M., Agnew-Blais, J. C., Matthews, T., Moffitt, T. E., & Arseneault, L. (2017). ADHD and sleep quality: Longitudinal analyses from childhood to early adulthood in a twin cohort. *Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology,*

53, 284-294. doi:10.1080/15374416.2016.1183499

Grünwald, J., & Schlarb, A. A. (2017). Relationship between subtypes and symptoms of ADHD, insomnia, and nightmares in connection with quality of life in children. *Neuropsychiatric Disease and Treatment, 13*, 2341-2350. doi:10.2147/NDT.S118076

Hirshkowitz, M., Whiton, K., Albert, S. M., Alessi, C., Bruni, O., DonCarlos, L., . . . Adams Hillard, P. J. (2015). National Sleep Foundation's sleep time duration recommendations: Methodology and results summary. *Sleep Health, 1*, 40-43. doi:10.1016/j.sleh.2014.12.010

Hiscock, H., Sciberras, E., Mensah, F., Gerner, B., Efron, D., Khano, S., & Oberklaid, F. (2015). Impact of a behavioural sleep intervention on symptoms and sleep in children with attention deficit hyperactivity disorder, and parental mental health: Randomised controlled trial. *British Medical Journal, 350*, Article h68. doi:10.1136/bmj.h68

Hvolby, A. (2015). Associations of sleep disturbance with ADHD: Implications for treatment. *Attention Deficit and Hyperactivity Disorders, 7*, 1-18. doi:10.1007/s12402-014-0151-0

Jansen, P. R., Watanabe, K., Stringer, S., Skene, N., Bryois, J., Hammerschlag, A. R., . . . Posthuma, D. (2018). Genomewide analysis of insomnia (N = 1,331,010) identifies novel loci and functional pathways. *bioRxiv, 214973*. Retrieved from https://www.biorxiv.org/content/10.1101/214973v2

Jones, B. L., & Nagin, D. S. (2012). *A Stata plugin for estimating group-based trajectory models*. Retrieved from https://ssrc.indiana.edu/doc/wimdocs/2013-03-29_nagin_trajectory_stata-plugin-info.pdf

Jones, S. E., Tyrrell, J., Wood, A. R., Beaumont, R. N., Ruth, K. S., Tuke, M. A., . . . Weedon, M. N. (2016). Genomewide association analyses in 128,266 individuals identifies new morningness and sleep duration loci. *PLoS Genetics, 12*(8), e1006125. doi:10.1371/journal.pgen.1006125

Lane, J. M., Liang, J., Vlasac, I., Anderson, S. G., Bechtold, D. A., Bowden, J., . . . Saxena, R. (2017). Genome-wide association analyses of sleep disturbance traits identify new loci and highlight shared genetics with neuropsychiatric and metabolic traits. *Nature Genetics, 49*, 274-281. doi:10.1038/ng.3749

Lunsford-Avery, J. R., Krystal, A. D., & Kollins, S. H. (2016). Sleep disturbances in adolescents with ADHD: A systematic review and framework for future research. *Clinical Psychology Review, 50*, 159-174.

Mahone, E. M., & Denckla, M. B. (2017). Attention-deficit/hyperactivity disorder: A historical neuropsychological perspective. *Journal of the International Neuropsychological Society, 23*, 916-929. doi:10.1017/ S1355617717000807

Nagin, D. S. (2005). *Group-based modeling of development*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Nagin, D. S., & Tremblay, R. E. (2005). Developmental trajectory groups: Fact or a useful statistical fiction? *Criminology, 43*, 873-904.

Netsi, E., Santos, I. S., Stein, A., Barros, F. C., Barros, A. J. D., & Matijasevich, A. (2017). A different rhythm of life: Sleep patterns in the first 4 years of life and associated sociodemographic characteristics in a large Brazilian birth cohort. *Sleep Medicine, 37*, 77-87. doi:10.1016/ j.sleep.2017.06.001

O'Connor, T. G., Caprariello, P., Blackmore, E. R., Gregory, A. M., Glover, V., Fleming, P., & Team, A. S. (2007). Prenatal mood disturbance predicts sleep problems in infancy and toddlerhood. *Early Human Development, 83*, 451-458.

Pievsky, M. A., & McGrath, R. E. (2018). The neurocognitive profile of attention-deficit/hyperactivity disorder: A review of meta-analyses. *Archives of Clinical Neuropsychology: The Official Journal of the National Academy of Neuropsychologists, 33*, 143-157. doi:10.1093/arclin/acx055

Sadeh, A., Pergamin, L., & Bar-Haim, Y. (2006). Sleep in children with attention-deficit hyperactivity disorder: A metaanalysis of polysomnographic studies. *Sleep Medicine Reviews, 10*, 381-398.

Sadeh, A., Tikotzky, L., & Kahn, M. (2014). Sleep in infancy and childhood: Implications for emotional and behavioral difficulties in adolescence and beyond. *Current Opinion in Psychiatry, 27*, 453-459. doi:10.1097/ YCO.0000000000000109

Santos, I. S., Barros, A. J., Matijasevich, A., Domingues, M. R., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2011). Cohort profile: The 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *International Journal of Epidemiology, 40*, 1461-1468. doi:10.1093/ije/ dyq130

Santos, I. S., Barros, A. J., Matijasevich, A., Zanini, R., Chrestani Cesar, M. A., Camargo-Figuera, F. A., . . . Victora, C. G. (2014). Cohort profile update: 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *International Journal of Epidemiology, 43*, 1437-1437a-f. doi:10.1093/ije/dyu144

Santos, I. S., Bassani, D. G., Matijasevich, A., Halal, C. S., Del-Ponte, B., da Cruz, S. H., . . . Tovo-Rodrigues, L. (2016). Infant sleep hygiene counseling (sleep trial): Protocol of a randomized controlled trial. *BMC Psychiatry, 16*(1), Article 307.

Scott, N., Blair, P. S., Emond, A. M., Fleming, P. J., Humphreys, J. S., Henderson, J., & Gringras, P. (2013). Sleep patterns in children with ADHD: A population-based cohort study from birth to 11 years. *Journal of Sleep Research, 22*, 121-128. doi:10.1111/j.1365-2869.2012.01054.x

Steinsbekk, S., & Wichstrom, L. (2015). Stability of sleep disorders from preschool to first grade and their bidirectional relationship with psychiatric symptoms. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics, 36*, 243-251. doi:10.1097/DBP.0000000000000134

Thoma, V. K., Schulz-Zhecheva, Y., Oser, C., Fleischhaker, C., Biscaldi, M., & Klein, C. (2018). Media use, sleep quality, and ADHD symptoms in a community sample and a sample of ADHD patients aged 8 to 18 years. *Journal of Attention Disorders*. Advance online publication. doi:10.1177/1087054718802014

Tso, W., Chan, M., Ho, F. K., Rao, N., Li, A. M., Chan, K. L., . . . Van Voorhees, B. (2019). Early sleep deprivation and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatric Research, 85*, 449-455.

Um, Y. H., Hong, S.-C., & Jeong, J.-H. (2017). Sleep problems as predictors in attention-deficit hyperactivity disorder: Causal mechanisms, consequences and treatment. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience, 15*, 9-18. doi:10.9758/cpn.2017.15.1.9

Williams, K. E., & Sciberras, E. (2016). Sleep and self-regulation from birth to 7 years: A retrospective study of children with and without attention-deficit hyperactivity disorder at 8 to 9 years. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics, 37*, 385-394. doi:10.1097/DBP.0000000000000281

Wright, K. P., Jr., Lowry, C. A., & LeBourgeois, M. K. (2012). Circadian and wakefulness-sleep modulation of cognition in humans. *Frontiers in Molecular Neuroscience, 5*, Article 50.

Zee, P. C., Attarian, H., & Videnovic, A. (2013). Circadian rhythm abnormalities. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology, 19*(1 Sleep Disorders), 132-147.

ARTIGO 2

Artigo submetido em 5 de Outubro de 2020 em *The world Journal of Biological Psychiatry*. Primeira revisão recebida em 28 de Outubro de 2020 e enviada em 08 de Dezembro de 2020, aceito em 28 de Dezembro de 2020.

Sleep-related traits and attention-deficit/hyperactivity disorder comorbidity: shared genetic risk factors, molecular mechanisms, and causal effects

Authors

Marina Xavier Carpena[1], Carolina Bonilla[2,3], Alicia Matijasevich[1,2], Thais Martins-Silva[1], Julia P. Genro[4], Mara Helena Hutz[5], Luis Augusto Rohde[6], Luciana Tovo-Rodrigues [1]

Affiliations

[1] Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil;

[2] Department of Preventive Medicine, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

[3] Population Health Sciences, University of Bristol, Bristol, United Kingdom.

[4] Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,Porto Alegre, Brazil

[5] Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Genetics, Porto Alegre, Brazil

[6] Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Psychiatry, Child & Adolescent Psychiatry Unit,Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

Corresponding authors: Marina Xavier Carpena – marinacarpena_@hotmail.com; Luciana Tovo-Rodrigues – luciana.tovo@gmail.com

Abstract

Objectives: To evaluate the shared genetic components, common pathways and causal relationship between ADHD and sleep-related phenotypes

Methods: We used the largest genome-wide association summary statistics available for attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and various sleep-related phenotypes (insomnia, napping, daytime dozing, snoring, ease getting up, daytime sleepiness, sleep duration and chronotype). We estimated the genomic correlation using cross-trait linkage disequilibrium score regression (LDSR) and investigated the potential common mechanisms using gene-based crosstrait metanalyses and functional enrichment analyses. The causal effect was estimated using twosample Mendelian randomization (TSMR), using the inverse variance weighted method as the main estimator.

Results: A positive genomic correlation between insomnia, daytime napping, daytime dozing, snoring, daytime sleepiness, short and long sleep duration, and ADHD was observed. Insomnia, daytime sleepiness, and snoring shared genes with ADHD, that are involved in neurobiological functions and regulatory signaling pathways. The TSMR supported a causal effect of insomnia, daytime napping, and short sleep duration on ADHD, and of ADHD on long sleep duration and chronotype.

Conclusion: Comorbidity between sleep phenotypes and ADHD may be mediated by common genetic factors that play an important role in neuronal signaling pathways. A causal effect of sleep disturbances and short sleep duration on ADHD reinforced their role as predictors of ADHD.

Keywords: ADHD, genetics, sleep, circadian rhythm, Mendelian randomization

Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common and highly heritable neurodevelopmental disorders worldwide (Polanczyk et al. 2007; Banaschewski et al. 2017). Sleep disturbances and circadian disruption are common comorbid medical conditions that have been received increasing attention recently. Several studies have shown that individuals affected by ADHD present a higher prevalence of sleep and circadian disruptions than controls (Coogan and McGowan 2017; Um et al. 2017). In childhood, poor sleep quality is a frequent trait, which is present in ~55-75% of children with ADHD (Sung et al. 2008; Weiss and Salpekar 2010; Noble et al. 2012). In adults too, sleep problems are significantly associated with ADHD and are observed in 60-80% of adult individuals with ADHD (Gau et al. 2007; Yoon et al. 2012; DiazRoman et al. 2018). In addition, delayed sleep phase disorder, a circadian rhythm sleep-wake disorder, affects 73-78% of patients with ADHD in both childhood and adult life (Coogan and McGowan 2017; Bijlenga et al. 2019; Korman et al. 2020)

Although the relationship between ADHD and sleep-related phenotypes may emerge from a complex environmental and genetic context, the potential mechanisms underlying the comorbidity, as well as causal relationships, are still not completely understood. Core clock gene impairment may be linked both conditions. In mice, modulation of the expression of the *Clock* *Per1/2* and *c-Fos* genes in the brain under methylphenidate and atomoxetine (stimulant medicines regularly used in the treatment of ADHD) treatments was observed (O'Keeffe et al. 2012; Baird et al. 2013; Dela Pena et al. 2017), and in zebrafish, the *per1b-/-* mutation could reproduce an ADHD mimic behavior (Huang et al. 2015; Faraone et al. 2019). The alteration of the expression of these genes led to changes in the regulation of norepinephrine and dopamine, which are important neurotransmitters for both sleep regulation and ADHD symptomatology (Pagel et al. 2007; Wang et al. 2009; Konrad and Eickhoff 2010). In humans, expression and candidate-gene studies have supported the role of *CLOCK*, *PER2*, *BMAL1* and *CSNK1E* as potential links between sleep/circadian traits and ADHD (Brookes et al. 2006; Xu et al. 2010; Baird et al. 2012; Jeong et

al. 2014; Bonvicini et al. 2017; Carpena et al. 2019). However, to the best of our knowledge, a broader investigation of shared genetics from a genomic perspective has not been performed to date.

The direction of the association and whether there is a causal effect are unanswered questions and an important topic of debate in the field (Mehta et al. 2019). Sleep deprivation and sleep problems are known to mimic or aggravate ADHD symptoms, and to regulate emotion, cognition and behavior (Coogan and McGowan 2017; Um et al. 2017). In contrast, ADHD-like behaviors may also lead to altered sleep patterns (Katzman and Sternat 2014; Mehta et al. 2019). Early sleep disturbances predicting ADHD in future are supported by longitudinal evidence (Gregory and O'Connor 2002; Armstrong et al. 2014; Williams and Sciberras 2016; Tso et al. 2019; Carpena et al. 2020). In addition, the opposite direction, in which ADHD may precede sleep disturbances and sleep deprivation is also reported in the literature (Steinsbekk and Wichstrom 2015; Gregory et al. 2017; Shen, Luo, Chamberlain, et al. 2020). Thus, studies exploring causal relationships with different designs may contribute important evidence to better understand this relationship.

Evidence of genetic etiologies for ADHD and sleep-related traits has considerably increased in the last five years. Recent genome-wide association studies (GWAS) have reported novel genes associated with sleep and circadian phenotypes, in addition to some already uncovered genes, via candidate gene studies or animal models. Therefore, we were able to identify genomewide markers associated with insomnia (Lane et al. 2019) daytime dozing (Jansen et al. 2019) , daytime napping (Jansen et al. 2019), snoring (Jansen et al. 2019), ease getting up (Jansen et al. 2019), daytime sleepiness (Wang et al. 2019), chronotype (Jones et al. 2019), and sleep duration (Marinelli et al. 2016; Dashti et al. 2019). Likewise, a powerful GWAS study was recently published, describing the first top-hits for the ADHD disorder (Demontis et al. 2019).

Recent GWAS studies on sleep, circadian, and ADHD phenotypes have provided data to understand the potential shared genetic and molecular mechanisms between sleep disturbances and

ADHD, to dissect the possible differences in the association between specific sleep traits and ADHD and to investigate the causality and the direction of this association. In this study we used the genomic data of the largest GWAS to date of several sleep-related phenotypes (sleep disturbances, sleep duration and chronotype) and ADHD to evaluate the level of shared genetic factors between traits, to examine possible common pathways between them and to explore a possible causal relationship between the traits through a bidirectional two-sample Mendelian randomization approach (TSMR).

Methods

Datasets

In this original research, we used secondary information (aggregate data level based on summary statistics from published GWAS) as input for the analyses. We analyzed data (*i.e.*, summary statistics) of the largest available original studies published to date. All of them used subjective data collection measures using questionnaire. The overall study design and GWAS's sample size (of subjects and SNPS included) used are shown in Figure S1. The description and methodologic details of the studies included here are presented in Table S1. These studies were approved by local ethics committees and had obtained the required informed consent (detailed in previously published papers) (Sudlow et al. 2015; Marinelli et al. 2016; Dashti et al. 2019; Jansen et al. 2019; Jones et al. 2019; Lane et al. 2019; Middeldorp et al. 2019; Wang et al. 2019).

ADHD phenotype

We used data from 20,183 ADHD cases and 35,191 controls in total, including children and adults from the iPSYCH study and the 11 European studies belonging to the Psychiatric Genomic Consortium (PGC) (Demontis et al. 2019). A GWAS was conducted in each cohort using logistic regression, assuming additive genetic effects. Summary statistics of the results of the

ADHD GWAs meta-analysis of iPSYCH and the PGC samples are available on their websites (https://www.med.unc.edu/pgc/results-and-downloads and http://ipsych.au.dk/downloads/).

Sleep-related phenotypes

We used the most recent and largest publicly available summary association results for chronotype (Jones et al. 2019), sleep duration (Dashti et al. 2019), insomnia (Lane et al. 2019), daytime sleepiness (Wang et al. 2019), daytime napping (Jansen et al. 2019), daytime dozing (Jansen et al. 2019), ease getting up (Jansen et al. 2019), and snoring (Jansen et al. 2019) available on the UK Biobank (UKBB) website (https://www.ukbiobank.ac.uk/tag/gwas/) (Table S1). The UKBB is a national prospective cohort that recruited more than 500,000 men and women from across the United Kingdom, aged 40–69 years between 2006 and 2010, and collected data on selfreported sleep behavior that we use here. For chronotype analysis, 449,737 individuals with chronotype outcome and 403,195 individuals with morning person outcome (252,287 morning people *vs.* 150,908 evening people) were included (Jones et al. 2019). Sleep duration phenotypes (continuous and categorical variables) comprised 446,118 (Dashti et al. 2019) individuals. Data from 453,379 subjects reported were used for insomnia (Lane et al. 2019) The remaining phenotypes included the following: ease of getting up (N=385,949), daytime napping (N=386,577), daytime dozing (N=386,548), snoring (N=359,916) (Jansen et al. 2019) and daytime sleepiness (N=452,071) (Wang et al. 2019). We only used data of the UK Biobank participants' due to restrictions in the availability of 23andMe summary statistics for studies that used both (Jansen et al. 2019; Jones et al. 2019). Details regarding the samples and SNP quality control can be found in the UKBB documentation (Sudlow et al. 2015).

We also used a GWAS for sleep duration (as a continuous measure) in children (Marinelli et al. 2016), a result of a meta-analysis of 10,554 children of European ancestry, performed by the EArly Genetics and Life course Epidemiology (EAGLE) Consortium (Middeldorp et al. 2019).

Further descriptions of the studies and phenotypes included in this study are provided in the Supplementary Material (Table S1).

Statistical analysis

Quality control datasets

The datasets for ADHD and sleep-related phenotypes were filtered to include only those markers in autosomal chromosomes with (i) an imputation quality score (INFO) score ≥ 0.8, (ii) minor allele frequency (MAF) ≥ 0.01, and (iii) outside the major histocompatibility complex (MHC) region (chr6: 26-33M), according to the information available in each set of summary statistics. All analyzes, and the quality control processes are showen in Figure S1, where all final included samples are described considering our data processing before analysis.

Genetic correlation analysis

We performed cross-trait linkage disequilibrium score regression (LDSC) analysis to estimate the genetic correlation between sleep-related phenotypes and ADHD using qualitycontrolled summary statistics of the largest GWAS available for each phenotype. The method involves regressing summary result statistics from millions of genetic variants across the genome on a measure of each variant's ability to tag other variants locally (i.e. its 'LD score') (Zheng et al. 2016). LDSC is used to estimate the genetic correlation between two traits (ranging from −1 to 1). For the LD-regression, we used pre-computed LD scores based on European samples from the

1000 Genomes Project (phase 3 version 5) as a reference panel (Consortium 2015). The Benjamini and Hochberg False Discovery Rate (BH-FDR) was used to correct for multiple testing (Benjamini and Hochberg 1995; Benjamini and Hochberg 1997).

Gene-based cross-trait/disorder meta-analyses

For sleep-related phenotypes significantly correlated with ADHD in the cross-trait LDSC regression analysis, we performed gene-based cross-trait meta-analysis to uncover putative shared pathways between the phenotypes. For this analysis, we used the same quality-controlled datasets used for the LDSC regression analysis. We used MAGMA software (version v1.07b for Linux) to run a gene-level association analysis to investigate the association of each gene with each phenotype based on the p-values reported in the summary data (de Leeuw et al. 2015). A conservative Bonferroni correction was performed to account for multiple testing (dividing the significance p-value threshold of 0.05 by the number of genes included). First, variants were mapped to a gene if they were within 10kb upstream or downstream of the gene according to NCBI 37.3 gene definitions. Then, we performed gene-level association analysis to compute gene pvalues for each phenotype; thereafter, we ran the cross-trait meta-analyses of gene-level results (ADHD *vs.* sleep-related phenotypes). The weighted Stouffer's Z method was used to combine the Z-scores for each gene across cohorts, with weights set to the square root of the sample size each Z-score was based on (i.e., accounting for the fact that sample sizes vary per single-nucleotide polymorphism (SNP) – and thus per gene – within and between GWAS summary statistics). To identify strongly associated genes in the meta-analysis, we selected genes that showed an increase in their association p-value of at least one order of magnitude compared to the association p-values obtained for each of the individual phenotypes (i.e. ADHD and sleep phenotypes), as has been performed previously (Tables S2-S10) (Mota et al. 2020).

Gene-set enrichment analyses

To obtain insights into the putative biological mechanisms of shared genetic factors found in the previous analyses, we conducted pathway analyses using the MAGMA gene set implemented in the FUMA 1.3.6 (Watanabe et al. 2017) online tool (available at http://fuma.ctglab.nl). Enrichment of prioritized genes in biological pathways and functional categories were tested using

the hypergeometric test against gene sets obtained from MsigDB (Liberzon et al. 2011; Watanabe et al. 2017). A minimum of five genes were considered to characterize a gene set. The coding human genome was used as a reference set, and the BH-FDR correction was used to account for multiple testing.

Bidirectional two-sample mendelian randomization (TSMR) analysis

The instrumental variables (IVs) to run the TSMR analysis were selected as follows. We clumped the genetic variants available in the summary statistics of the phenotypes: ADHD (Demontis et al. 2019), sleep duration phenotypes (Dashti et al. 2019), insomnia (Lane et al. 2019), and daytime sleepiness (Wang et al. 2019). We used PLINK 1.9 software to conduct clumping (r^2 = 0.05, kb = 500, p1= $5x10^{-8}$, and p2 = 0.5). There were no SNPs associated with sleep duration in children (Marinelli et al. 2016); therefore we did not include it in our TSMR. For phenotypes that reported the results of a meta-analysis with the 23andMe sample, we opted to keep the reported top hits to ensure as much statistical power as possible. This criterion was applied to the phenotypes included in the study of Jansen *et al.* (2019) (napping, snoring, daytime dozing, ease getting up and sleep duration) as well as in that of Jones *et al.* (2019) (morning person and chronotype as a continuous variable).

TSMR analysis was performed using the R package MR-Base (Hemani et al. 2018) available at github.com/MRCIEU/TwoSampleMR). When the selected (index) genetic IV was not available in the outcome GWAS, we replaced it with a proxy variant (R^2> 0.80) when possible, using as a reference the European population from 1000 Genomes (phase 3 version 5)(Consortium 2015). Proxies for instruments were identified using the SNP Annotator (SNiPA) v3.2 and LD link tools (Arnold et al. 2015; Machiela and Chanock 2015).

We estimated the effect of sleep-related phenotypes on ADHD (and vice-versa) using the inverse variance weighted (IVW) estimator, which performs linear regression of the IV-outcome association estimates on the IV-exposure association estimates, weighted by the inverse of the

variance of the IV-outcome association estimates. The intercept of this regression was constrained to zero, which corresponds to the assumption that IVs can only affect the outcome through exposure or that horizontal pleiotropic effects are balanced (Burgess et al. 2013).

For sensitivity analyses, we used other MR methods that are more robust to horizontal pleiotropy than the IVW estimator: MR-Egger regression, penalized weighted median (PWM), and weighted mode-based estimator (MBE). The MR-Egger method is a valid test of directional or unbalanced pleiotropy (intercept p-value) and a consistent estimate of the true causal effect (Bowden et al. 2015). A generalized summary-data-based Mendelian randomization (GSMR) test was used as an additional sensitivity analysis to detect pleiotropic effects but was applied only on datasets that reported the effect allele frequency (Dashti et al. 2019; Lane et al. 2019). We used the platform Complex Trait Genetics Virtual Lab (CTG-VL, available on: https://vl.genoma.io/) to run the statistical package GSMR (Cuellar-Partida et al. 2019). This program implements a method that uses summary data from GWAS to distinguish causal or pleiotropic associations (Zhu et al. 2018). We also performed a leave-one-out analysis to identify potentially overly influential IVs by removing one genetic variant at a time and recalculating the IVW estimate.

Results

Genetic correlation analysis

The LDSC regression analyses indicated strong positive correlation between ADHD and the following traits: long sleep duration (r_g=0.384, se=0.046, P_{FDR}=3.7x10^{-16}), insomnia (r_g=0.368, se=0.036, P_{FDR}= 2.9x10^{-23}), short sleep duration (r_g=0.3318, se=0.0366, P_{FDR}=6.1x10^{-19}) , daytime dozing (r_g=0.296, se=0.058, P_{FDR}= 1.1x10^{-6}), daytime napping (Jansen: r_g=0.189, se=0.049, P_{FDR}=2.1x10^{-4}), snoring (Jansen *et al.*: r_g=0.166, se=0.036, P_{FDR}=8.5x10^{-6}) and daytime sleepiness (r_g=0.124, se=0.036, P_{FDR}=0.001) . A negative correlation between ADHD and sleep duration as a continuous variable was observed for both UKbiobank (r_g=-0.067, se=0.038, P_{FDR}=0.078) and

EAGLE samples (r_g=0.091, se=0.096, P_{FDR} =0.394). We did not observe significant correlation between ADHD and chronotype (r_g=0.015, se=0.030, P_{FDR}=0.607), morning person (r_g=-0.030, se=0.031, P_{FDR}=0.397), and ease of getting up (r_g=0.030, se=0.031, P_{FDR}=0.394) phenotypes (Figure 1).

---------- FIGURE 1 ----------

Gene-based cross-trait meta-analyses and functional enrichment analyses

The cross-trait meta-analyses showed that insomnia had the greatest number of shared genes with ADHD (44 genes), followed by daytime sleepiness (38 genes), snoring (33 genes), short sleep duration (32 genes), long sleep duration (14 genes), and napping (8 genes), whereas only two genes were shared with daytime dozing (*PCDH7*; *AMMECR1L*). The gene-set functional enrichment analysis showed significant enrichment at different levels and several shared pathways between phenotypes (Table 1). The genes associated with insomnia and ADHD were enriched in the receptor tyrosine kinase signaling (R-HSA-9006934, $P_{FDR}=3.5x10^{-2}$), synapse organization (GO:0050808, $P_{FDR}=1.5x10^{-2}$) and regulation of synapse structure and activity (GO:0050803, $P_{FDR}=3.1x10^{-2}$) pathways and presented a common regulation by *MIR125B* and *MIR125A* (microRNA targets, MsigDB c3, P_{FDR}=0.046). Shared genes between daytime sleepiness and ADHD were enriched in synapses (GO:0045202, $P_{FDR}=6.5x10^{-3}$) and the plasma membrane region (GO:0098590, $P_{FDR}=6.5x10^{-3}$; GO:0097060, P_{FDR}= 0.016), as well as cell body (GO:0044297 P_{FDR}=0.046). They also have a shared gene expression regulation mechanism involving *MIR200B*, *MIR200C* and *MIR429* (microRNA targets, MsigDB c3, P_{FDR}=0.024). Snoring and ADHD shared a group of genes enriched in neurogenesis processes (GO:0022008, $P_{FDR}=9.1x10^{-4}$), neuron differentiation (GO:0030182, $P_{FDR}=7.3x10^{-3}$), nervous system (GO:0007417, P_{FDR}=0.02) and head development (GO:0060322, P_{FDR}=0.03). For other phenotypes, no statistically significant functional enrichment was detected.

---------- TABLE 1 ----------

Bidirectional two-sample Mendelian randomization analysis

Sleep-related phenotypes as a cause of ADHD

The IVs used in this analysis are presented in Table S11. We found evidence of a causal effect of insomnia (β = 0.872, SE=0.373, p = 0.019), daytime napping (β = 0.350, SE=0.095, p < 0.001) and short sleep duration (β = 2.032, 0.788, p = 0.010) on ADHD using the IVW estimator. We obtained similar results for the PWM method. However, the results obtained by MR-Egger and MBE did not support causality. For short sleep duration, the MR Egger coefficient showed inverse trends for IVW and PWM (Figure S2). No evidence of pleiotropy was observed according to the MR Egger intercept test (Table S12) and the GSMR (Table S13) for any of the phenotypes. The leave-one-out analyses showed no disproportionate influence of any specific IV on the pooled IVW-estimated effect (see Figures S2-S11).

ADHD as a cause of sleep-related phenotypes

We found that ADHD susceptibility was causally associated with longer sleep duration (β = 0.012, SE=0.003, p < 0.001). In sensitivity analyses, we observed similar results for PWM (β = 0.012, SE=0.004, p = 0.005), but not for MR-Egger and MBE (Table 2). No evidence of pleiotropy according to the intercept MR Egger test (Table S12) and the GSMR analyses (Table S13) was observed.

Although we did not obtain any evidence of a causal effect of ADHD on chronotype using the IVW method, we detected an inverse association of these phenotypes using PWM (β = -0.049, SE=0.017, p = 0.004), MR Egger (β = -3.150, SE=0.119, p = 0.033) and MBE (β = -0.050, SE=0.020, p = 0.037). The MR Egger intercept test suggested the presence of pleiotropy acting on this association (intercept = 0.026, SE = 0.01, p = 0.043) (Table S12). We also found a negative

effect of ADHD on being a morning person (MR Egger β = -0.509, SE=0.204, p = 0.042, MBE β = -0.078, SE=0.032, p = 0.015) in the sensitivity analyses (Table 2). In this case, the evidence of pleiotropy was weaker (Table S12). Leave-one-out analyses showed no disproportionate influence of any specific IV on the pooled IVW-estimated effect for most phenotypes (see Figure S12-S19). However, in morning person (Figure S20) and chronotype (Figure S21), we observed that when we removed rs10262192, the IVW association became significant.

---------- TABLE 2 ----------

Discussion

In this study we showed that several sleep-related phenotypes, mainly sleep disturbances, and ADHD are genetically correlated, with potentially shared mechanisms, mostly involving neurodevelopment, neurogenesis, and synaptic organization. Our results were less consistent for phenotypes related to sleep duration, and we did not find any evidence of shared genetics or mechanisms with chronotype phenotypes. We also found evidence of a causal effect of insomnia, daytime napping, and short sleep duration on ADHD, and of ADHD on long sleep duration and being a morning person.

Our results suggest that long/short sleep duration, sleep disturbances (mostly insomnia), and ADHD have a shared inheritance, showing the strongest correlation coefficients. We found weaker coefficients for the correlation models between ADHD and daytime napping, snoring and daytime sleepiness (0.12-0.20). Although they are weaker, they are similar to previous findings reported for genomic correlation for ADHD and other traits (Demontis et al., 2019) as well as for sleep and other traits (Lane et al. 2017; Dashti et al. 2019; Wang et al. 2019). Earlier studies have reported an association between polymorphisms in core clock regulation genes and ADHD using candidate-gene study designs (Kissling et al. 2008; Xu et al. 2010; Baird et al. 2012; Kim et al. 2014; Carpena et al. 2019). The expression of different clock regulation genes has been associated

with ADHD in human and animal models(O'Keeffe et al. 2012; Baird et al. 2013; Dela Pena et al. 2017). Our results agree with the results of studies showing that both ADHD and sleep disturbances are linked to aberrant brain development (Shaw et al. 2012; Feinberg and Campbell 2013; Chen et al. 2015; Telzer et al. 2015; Shen, Luo, Jia, et al. 2020), display neuroanatomical similarities in subcortical and cortical areas (Hoogman et al. 2019; Hoogman 2020), and overlapping cortico-strial circuitry (Stoffers et al. 2014; Saletin et al. 2019; Samea et al. 2019; Wei et al. 2019). At the molecular level, we found evidence of a shared mechanism between ADHD and sleep disturbance, especially insomnia and daytime sleepiness. The group of genes that we found as being shared by sleep-deprivation-related phenotypes (insomnia and daytime sleepiness) and ADHD is associated with synapse structure, activity, organization and regulation. We also uncovered genes involved in the regulation of brain anatomical structure and size and neurodevelopmental function among those shared between snoring and ADHD. A neurobiological substrate linking ADHD and sleep disturbance, especially dyssomnia, was recently reported, showing neuroanatomical impairment using neuroimage data and suggesting a role of genes related to dopamine signaling and the circadian cycle (Shen, Luo, Chamberlain, et al. 2020), which corroborates our findings.

We found a group of miRNAs shared by sleep-deprivation-related phenotypes and ADHD that are involved in post-transcriptional gene silencing and are mostly expressed in brain regions, especially in the cortex and cerebellum (*MIR125A and MIR429*). These results highlight role of epigenetics in the relationship between both traits. The effect of sleep deprivation on the transcriptome and methylome has previously been studied using animal models and human subjects (Cirelli et al. 2004; Benedict et al. 2014; Massart et al. 2014; Cedernaes et al. 2015; Ventskovska et al. 2015; Skuladottir et al. 2016). Other studies have indicate that sleep deprivation induces notable changes in the brain transcriptome of rats, affecting protein synthesis, synaptic plasticity, and metabolism (Cirelli and Tononi 2000; Cirelli et al. 2004).

To date, there is no consensus regarding the direction of the sleep-ADHD association, despite evidence showing that sleep deprivation and sleep disturbances have known cognitive emotional and behavioral effects that mimic ADHD (Coogan and McGowan 2017; Mehta et al. 2019; Tso et al. 2019), and that early sleep disturbances are associated with an increased risk of ADHD later in life (Armstrong et al. 2014; Gregory et al. 2017; Peralta et al. 2017; Carpena et al. 2019; Tso et al. 2019). The TSMR analyses showed a causal effect of insomnia, daytime napping, and short sleep duration on ADHD. Interestingly, our findings corroborate the neuropsychologicalbiology theory of the prominent role of sleep, especially sleep deprivation as a predisposing factor to ADHD, probably through executive function deficits (for a review see references (Bush et al. 2005; Coogan and McGowan 2017; Pievsky and McGrath 2017; Um et al. 2017; Bijlenga et al. 2019)). Considering that sleep disturbances in children worsen executive functions, and this is an important characteristic of ADHD patients, we hypothesize that sleep problems may cause biochemical imbalances in executive function; therefore, sleep problems may predispose the individual to ADHD (Kidwell et al. 2017; Pievsky and McGrath 2017; Bijlenga et al. 2019; Saletin et al. 2019; Samea et al. 2019).

In contrast, we found a causal effect of ADHD on long sleep duration, and on the morning chronotype after accounting for pleiotropy. Longer sleep usually reflects improved, higher quality sleep, because of potentially increased sleep efficiency (Jones et al. 2019). However, it may also lead to poorer sleep quality, or greater sleep need, given the association with a larger number of sleep bouts and increased daytime napping, in addition to being a risk factor for cognitive dysfunction and other negative health outcomes (Dashti et al. 2019; Henry et al. 2019). It is possible that the ADHD symptomatology would provoke mental distress which may lead to longer hours of sleep . The causal effect of chronotype on mental health has been reported before (Jones et al. 2019). Here, we found that ADHD may be a causal factor for manifesting an evening chronotype, a direction consistent with that reported in observational studies (Coogan and McGowan 2017). Therefore, although our findings suggest a bidirectional association between

sleep and ADHD, as reported before (Steinsbekk and Wichstrom 2015; Gregory et al. 2017), additional studies should be undertaken to further explore this relationship.

Several observational studies have reported that sleep disturbances and short sleep duration are likely predisposing to ADHD (Steinsbekk and Wichstrom 2015; Williams and Sciberras 2016; Shen, Luo, Chamberlain, et al. 2020), while others have uncovered effects in the opposite direction (Scott et al. 2013; Armstrong et al. 2014; Gregory et al. 2017; Carpena et al. 2019). However, inferring causality in observational studies is problematic because of unmeasured confounding, reverse causality, and other unknown biases (Davey Smith and Ebrahim 2003; Zheng et al. 2017). MR is a method to infer causality that uses genetic variants robustly associated with an exposure variable as instruments to test the causal effects on an outcome variable. The advantages of using genetic variants underlying a trait include that they are unlikely to be associated with confounders, and that genotypes are randomly allocated and set at conception, thus considerably reducing the risk of bias introduced by confounding and reverse causation (Davey Smith and Ebrahim 2003; Lawlor et al. 2008; Davies et al. 2018). Using TSMR, we provided stronger evidence of a causal effect of sleep-deprivation-related phenotypes on ADHD as well as the effect of ADHD on long sleep duration and evening preferences.

Our results should be interpreted considering some limitations. The first concerns the potentially different genetic architecture of sleep duration between children and adults (Dashti et al. 2019) even when the GWAS selected were controlled for principal components of ancestry. To address this, we added to our study the only dataset, that we were aware of which included sleep information in children (Marinelli et al. 2016). Given the relatively small sample size of this study we were not able to make further inferences regarding the differences across the lifetime; therefore, the TSMR analysis should be interpreted with caution concerning the temporality of the phenotypes, although GWAS included control for age (Table S1). Second, our results are based on the majority of UKBB data information. Different datasets are desirable to test the consistency of the findings. However, the scarcity of studies examining sleep and/or ADHD makes it difficult to

replicate our results elsewhere. Third, the sleep characteristics used as outcome in the GWAS included in this study were self-reported, which may have led to a response bias (Sadeh et al. 2006; Cortese et al. 2009). However, we must highlight that this is an appropriate epidemiology data collection approach for large samples due to logistic and resource availability issues, and that selfreported sleep duration was consistent with accelerometer-estimated sleep duration in a large subsample of the UKBB (Dashti et al. 2019). Fourth, most of the GWAS used in our study did not exclude individuals taking sleep (Table S1) or ADHD medication. Sleep medication may have led to sleep phenocopies whereas ADHD stimulant and non-stimulant medication may affect sleep behavior and clock genes at a molecular level (Tomás et al. 2010; Baird et al. 2013; Hvolby 2015; Kidwell et al. 2015). Imbalances regarding the sex proportion in each sample might be a limitation of our analyses. Considering the aggregate data level used in our study, we were not able to perform specific analysis stratifying by sex. However, the GWAS estimates included here were adjusted for biological sex, which potentially minimized this limitation. The aggregate data level also limited us from addressing other important specific relations regarding the association between sleep traits and psychiatric comorbidity and ADHD subtypes (Díaz-Román et al. 2016; Diaz-Roman et al. 2018). Further studies addressing these points are required. Finally, pleiotropy is an important factor that would violate the exclusion-restriction assumption of Mendelian randomization (Davey Smith and Ebrahim 2003; Bowden et al. 2015). We implemented the MREgger regression test and GSMR analysis to address this limitation. No evidence of pleiotropy was observed in both tests for most analyses. However, a pleiotropic effect was detected on the association of ADHD with chronotype phenotypes.

To our knowledge, this is the first study to investigate the shared genetics and molecular mechanisms between ADHD and sleep-related traits and their causal relationship using a genomic approach. Our findings support a positive genomic correlation between ADHD and insomnia, daytime dozing, daytime sleepiness, snoring, napping, and short and long sleep duration and

suggest an important role of neurobiological functions, gene expression and protein synthesis. The causal analysis showed that sleep-deprivation-related phenotypes are likely to increase the risk for ADHD, although patients with ADHD may be longer sleepers and display an evening chronotype. Therefore, our results suggest that sleep traits and ADHD may be linked by a common genetic background and molecular mechanism as well as a causal relationship. These findings provide insights into ADHD diagnosis and potential treatment and indicate that sleep-deprivation-related phenotypes may act as important ADHD predictors or early markers.

Acknowledgment

We acknowledge with gratitude the financial support received for this work. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo no. 427524/2018-0). MXC, AM and LTR were supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CB was supported by a Universidade de São Paulo/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior fellowship (processo no. 88887.160006/2017-00). TMS has received support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES). Research projects conducted by MHH have been supported by CNPq. JPG has received support by the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul—FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul). We would also like to thank Guillermo Reales and Christian Loret de Mola for the support on data managing and Angélica Salatino-Oliveira for reviewing our final manuscript.We acknowledge with gratitude the financial support received for this work. We would also like to thank Guillermo Reales and Christian Loret de Mola for the support on data managing and Angélica Salatino-Oliveira for reviewing our final manuscript. We also would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Disclosure Statement

Financial arrangements: L.A.R. has been a member of the speakers' bureau/advisory board and/or acted as a consultant for Medice, Novartis and Shire in the last three years. He receives authorship royalties from Oxford Press and ArtMed. He has also received travel awards from Shire for his participation in the 2018 APA meeting. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last three years: Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. MXC, CB, AM, TMS, JPG, MHH and LTR have no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Non-financial disclosure: none

References

Armstrong JM, Ruttle PL, Klein MH, Essex MJ, Benca RM. 2014. Associations of child insomnia, sleep movement, and their persistence with mental health symptoms in childhood and adolescence. Sleep 37:901–909.

Arnold M, Raffler J, Pfeufer A, Suhre K, Kastenmüller G. 2015. SNiPA: an interactive, genetic variant-centered annotation browser. Bioinformatics [Internet] 31:1334–1336. Available from: http://files/3171/212127.html

Baird AL, Coogan AN, Kaufling J, Barrot M, Thome J. 2013. Daily methylphenidate and atomoxetine treatment impacts on clock gene protein expression in the mouse brain. Brain Res. [Internet] 1513:61–71. Available from: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.084877581567&doi=10.1016%2Fj.brainres.2013.03.038&partnerID=40&md5=6c23948df30767c d4cd9b9df0377932c

Baird AL, Coogan AN, Siddiqui A, Donev RM, Thome J. 2012. Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural,

endocrine and molecular levels. Mol. Psychiatry [Internet] 17:988–995. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105622

Banaschewski T, Becker K, Döpfner M, Holtmann M, Rösler M, Romanos M. 2017. Attentiondeficit/hyperactivity disorder: a current overview. Dtsch. Arztebl. Int. [Internet] 114:149. Available from: http://files/2964/PMC5378980.html

Benedict C, Cedernaes J, Giedraitis V, Nilsson EK, Hogenkamp PS, Vagesjö E, et al. 2014. Acute sleep deprivation increases serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and S100 calcium binding protein B (S-100B) in healthy young men. Sleep.

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B [Internet] 57:289–300. Available from: http://files/3220/Benjamini e Hochberg - 1995 - Controlling the false discovery rate a practical .pdf

Benjamini Y, Hochberg Y. 1997. Multiple hypotheses testing with weights. Scand. J. Stat. [Internet] 24:407–418. Available from: http://files/3223/1467-9469.html

Bijlenga D, Vollebregt MA, Kooij JJS, Arns M. 2019. The role of the circadian system in the etiology and pathophysiology of ADHD: time to redefine ADHD? ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord. [Internet] 11:5–19. Available from: http://files/3092/s12402-018-0271-z.html

Bonvicini C, Faraone S V, Scassellati C. 2017. Common and specific genes and peripheral biomarkers in children and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. World J. Biol. Psychiatry:1–21.

Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. 2015. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression. Int. J. Epidemiol. [Internet] 44:512–525. Available from: http://files/2905/754653.html

Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, et al. 2006. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. Mol. Psychiatry 11:934–953.

Burgess S, Butterworth A, Thompson SG. 2013. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data. Genet. Epidemiol. [Internet] 37:658–665. Available from: http://files/2906/gepi.html

Bush G, Valera EM, Seidman LJ. 2005. Functional Neuroimaging of AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder: A Review and Suggested Future Directions. Biol. Psychiatry

[Internet] 57:1273–1284. Available from: http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223(05)00111-3/abstract

Carpena MX, Hutz MH, Salatino-Oliveira A, Polanczyk G V, Zeni C, Schmitz M, et al. 2019. CLOCK Polymorphisms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further Evidence Linking Sleep and Circadian Disturbances and ADHD. Genes (Basel). [Internet] 10:88. Available from: http://files/3131/Carpena et al. - 2019 - CLOCK Polymorphisms in AttentionDeficitHyperacti.pdf

Carpena MX, Munhoz TN, Xavier MO, Rohde LA, Santos IS, Del-Ponte B, et al. 2020. The Role of Sleep Duration and Sleep Problems During Childhood in the Development of ADHD in Adolescence: Findings From a Population-Based Birth Cohort. J. Atten. Disord. [Internet] 24:590–600. Available from: http://files/3147/Carpena et al. - 2020 - The Role of Sleep Duration and Sleep Problems Duri.pdf

Cedernaes J, Osler ME, Voisin S, Broman JE, Vogel H, Dickson SL, et al. 2015. Acute sleep loss induces tissue-specific epigenetic and transcriptional alterations to circadian clock genes in men. J. Clin. Endocrinol. Metab.

Chen Q, Liang X, Lei Y, Li H. 2015. Electrophysiological difference between the representations of causal judgment and associative judgment in semantic memory. Acta Psychol. (Amst). 157:176–184.

Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G. 2004. Extensive and Divergent Effects of Sleep and Wakefulness on Brain Gene Expression. Neuron.

Cirelli C, Tononi G. 2000. Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. Brain Res.

Consortium 1000 Genomes Project. 2015. A global reference for human genetic variation. (Nature, editor.). Nature Publishing Group Available from: http://files/3159/nature15393.html

Coogan AN, McGowan NM. 2017. A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. Atten. Defic. Hyperact. Disord. [Internet]. Available from: http://files/3282/Coogan e McGowan - 2017 - A systematic review of circadian function, chronot.pdf

Cortese S, Faraone S V, Konofal E, Lecendreux M. 2009. Sleep in children with attentiondeficit/hyperactivity disorder: meta-analysis of subjective and objective studies. J. Am. Acad.

Child Adolesc. Psychiatry [Internet] 48:894–908. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890856709601453

Cuellar-Partida G, Lundberg M, Kho PF, D'Urso S, Gutierrez-Mondragon LF, Hwang L-D. 2019. Complex-Traits Genetics Virtual Lab: A community-driven web platform for post-GWAS analyses. bioRxiv [Internet]:518027. Available from: http://files/3183/Cuellar-Partida et al. - 2019 - Complex-Traits Genetics Virtual Lab A community-d.pdf

Dashti HS, Jones SE, Wood AR, Lane JM, Van Hees VT, Wang H, et al. 2019. Genome-wide association study identifies genetic loci for self-reported habitual sleep duration supported by accelerometer-derived estimates. Nat. Commun. [Internet] 10:1100. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-019-08917-4

Davey Smith G, Ebrahim S. 2003. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? Int. J. Epidemiol. [Internet] 32:1–22. Available from: http://files/2929/Davey Smith e Ebrahim - 2003 - 'Mendelian randomization' can genetic epidemiolog.pdf

Davies NM, Holmes M V., Davey Smith G. 2018. Reading Mendelian randomisation studies: A guide, glossary, and checklist for clinicians. BMJ.

Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, et al. 2019. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. Nat. Genet. [Internet] 51:63–75. Available from: http://files/3153/s41588-018-0269-7.html

Díaz-Román A, Hita-Yáñez E, Buela-Casal G. 2016. Sleep characteristics in children with attention deficit hyperactivity disorder: systematic review and meta-analyses. J. Clin. Sleep Med. [Internet] 12:747–756. Available from: http://jcsm.aasm.org/viewabstract.aspx?pid=30624

Diaz-Roman A, Mitchell R, Cortese S. 2018. Sleep in adults with ADHD: systematic review and meta-analysis of subjective and objective studies. Neurosci. Biobehav. Rev. [Internet] 89:61–71. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763418300137

Faraone S V., Po MD, Komolova M, Cortese S. 2019. Sleep-associated adverse events during methylphenidate treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: A meta-analysis. J. Clin. Psychiatry.

Feinberg I, Campbell IG. 2013. Longitudinal sleep EEG trajectories indicate complex patterns of adolescent brain maturation. Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 304:R296–R303.

Gau SSF, Kessler RC, Tseng W-L, Wu Y-Y, Chiu Y-N, Yeh C-B, et al. 2007. Association between sleep problems and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in young adults. Sleep [Internet] 30:195–201. Available from: http://files/3088/Gau et al. - 2007 - Association between sleep problems and symptoms of.pdf

Gregory AM, Agnew-Blais JC, Matthews T, Moffitt TE, Arseneault L. 2017. ADHD and Sleep Quality: Longitudinal Analyses From Childhood to Early Adulthood in a Twin Cohort. J. Clin. Child Adolesc. Psychol. 46:284–294.

Gregory AM, O'Connor TG. 2002. Sleep problems in childhood: A longitudinal study of developmental change and association with behavioral problems. J. Am. Acad. CHILD Adolesc. PSYCHIATRY 41.

Hemani G, Zheng J, Elsworth B, Wade KH, Haberland V, Baird D, et al. 2018. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome. Elife [Internet]

7:e34408. Available from: http://files/3177/Hemani et al. - 2018 - The MR-Base platform supports systematic causal in.pdf

Henry A, Katsoulis M, Masi S, Fatemifar G, Denaxas S, Acosta D, et al. 2019. The relationship between sleep duration, cognition and dementia: A Mendelian randomization study. Int. J. Epidemiol.

Hoogman M. 2020. Structural Connectivity in ADHD: Evidence From 2500 Individuals From the ENIGMA-ADHD Collaboration. Biol. Psychiatry [Internet] 87:S87. Available from: http://files/3237/abstract.html

Hoogman M, Muetzel R, Buitelaar J, Thompson PM, Faraone S, Shaw P, et al. 2019. 16. Brain Imaging of ADHD Across the Lifespan–Results of the Largest Study Worldwide From the Enigma ADHD Working Group. Biol. Psychiatry [Internet] 85:S6–S7. Available from: http://files/3238/abstract.html

Huang J, Zhong Z, Wang M, Chen X, Tan Y, Zhang S, et al. 2015. Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior. J. Neurosci. 35:2572–2587.

Hvolby A. 2015. Associations of sleep disturbance with ADHD: implications for treatment. ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord. [Internet] 7:1–18. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s12402-014-0151-0

Jansen PR, Watanabe K, Stringer S, Skene N, Bryois J, Hammerschlag AR, et al. 2019. Genomewide analysis of insomnia in 1,331,010 individuals identifies new risk loci and functional pathways. Nat. Genet. [Internet] 51:394. Available from: https://www.nature.com/articles/s41588018-0333-3

Jeong SH, Yu J-C, Lee CH, Choi K-S, Choi J-E, Kim SH, et al. 2014. Human CLOCK geneassociated attention deficit hyperactivity disorder-related features in healthy adults: quantitative association study using Wender Utah Rating Scale. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 264:71–

81.

Jones SE, Lane JM, Wood AR, Van Hees VT, Tyrrell J, Beaumont RN, et al. 2019. Genome-wide association analyses of chronotype in 697,828 individuals provides insights into circadian rhythms. Nat. Commun. [Internet] 10:343. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-018-08259-7

Katzman MA, Sternat T. 2014. A review of OROS methylphenidate (Concerta®) in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. CNS Drugs [Internet] 28:1005–1033. Available from: http://files/3144/s40263-014-0175-1.html

Kidwell KM, Van Dyk TR, Lundahl A, Nelson TD. 2015. Stimulant medications and sleep for youth with ADHD: a meta-analysis. Pediatrics [Internet] 136:1144–1153. Available from: http://files/3196/1144.html

Kidwell KM, Hankey M, Nelson JM, Espy KA, Nelson TD. 2017. Child Executive Control as a Moderator of the Longitudinal Association Between Sleep Problems and Subsequent AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder Symptoms. J. Pediatr. Psychol. 42:1144–1155.

Kim D-K, Rhee CS, Han DH, Won T-B, Kim D-Y, Kim J-W. 2014. Treatment of Allergic Rhinitis Is Associated with Improved Attention Performance in Children: The Allergic Rhinitis Cohort Study for Kids (ARCO-Kids). PLoS One 9.

Kissling C, Retz W, Wiemann S, Coogan AN, Clement RM, Hunnerkopf R, et al. 2008. A polymorphism at the 3'-untranslated region of the CLOCK gene is associated with adult attentiondeficit hyperactivity disorder. Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 147:333–338. Konrad K, Eickhoff SB. 2010. Is the ADHD brain wired differently? A review on structural and functional connectivity in attention deficit hyperactivity disorder. Hum. Brain Mapp. [Internet] 31:904–916. Available from: http://files/3104/hbm.html

Korman M, Palm D, Uzoni A, Faltraco F, Tucha O, Thome J, et al. 2020. ADHD 24/7: Circadian clock genes, chronotherapy and sleep/wake cycle insufficiencies in ADHD. World J. Biol. Psychiatry [Internet] 21:156–171. Available from:

https://doi.org/10.1080/15622975.2018.1523565

Lane JM, Jones SE, Dashti HS, Wood AR, Aragam KG, van Hees VT, et al. 2019. Biological and clinical insights from genetics of insomnia symptoms. Nat. Genet. [Internet] 51:387. Available from: https://www.nature.com/articles/s41588-019-0361-7

Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JAC, Timpson N, Smith GD. 2008. Mendelian randomization: Using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. Stat. Med.

de Leeuw CA, Mooij JM, Heskes T, Posthuma D. 2015. MAGMA: generalized gene-set analysis of GWAS data. PLoS Comput. Biol. [Internet] 11. Available from: http://files/3161/PMC4401657.html

Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. 2011. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. Bioinformatics [Internet] 27:1739–1740. Available from: http://files/3165/257711.html

Machiela MJ, Chanock SJ. 2015. LDlink: a web-based application for exploring populationspecific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. Bioinformatics [Internet] 31:3555–3557. Available from: http://files/3174/Machiela e Chanock - 2015 - LDlink a web-based application for exploring popu.pdf

Marinelli M, Pappa I, Bustamante M, Bonilla C, Bonilla C, Suarez A, et al. 2016. Heritability and genome-wide association analyses of sleep duration in children: the EAGLE consortium. Sleep [Internet] 39:1859–1869. Available from: http://files/2789/2708345.html

Massart R, Freyburger M, Suderman M, Paquet J, El Helou J, Belanger-Nelson E, et al. 2014. The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes. Transl. Psychiatry.

Mehta TR, Gurung P, Nene Y, Fayyaz M, Bollu PC. 2019. Sleep and ADHD: A review article. Curr. Dev. Disord. Reports [Internet] 6:228–234. Available from: https://doi.org/10.1007/s40474019-00178-6

Middeldorp CM, Felix JF, Mahajan A, consortium EaGLE (EAGLE), consortium EGG (EGG), McCarthy MI. 2019. The Early Growth Genetics (EGG) and EArly Genetics and Lifecourse Epidemiology (EAGLE) consortia: design, results and future prospects. Eur. J. Epidemiol. [Internet] 34:279–300. Available from: http://files/3216/Middeldorp et al. - 2019 - The Early Growth Genetics (EGG) and EArly Genetics.pdf

Mota NR, Poelmans G, Klein M, Torrico B, Fernàndez-Castillo N, Cormand B, et al. 2020. Crossdisorder genetic analyses implicate dopaminergic signaling as a biological link between AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder and obesity measures. Neuropsychopharmacology [Internet]:1–8. Available from: http://files/3163/s41386-019-0592-4.html

Noble GS, O'Laughlin L, Brubaker B. 2012. Attention deficit hyperactivity disorder and sleep disturbances: consideration of parental influence. Behav. Sleep Med. [Internet] 10:41–53. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15402002.2012.636274

O'Keeffe SM, Thome J, Coogan AN. 2012. The noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine phase-shifts the circadian clock in mice. Neuroscience 201:219–230.

Pagel JF, Forister N, Kwiatkowki C. 2007. Adolescent sleep disturbance and school performance: the confounding variable of socioeconomics. J. Clin. Sleep Med. 3:19–23.

Dela Pena IJI, Dela Pena I, de la Pena JB, Kim HJ, Sohn A, Shin CY, et al. 2017. Transcriptional profiling of SHR/NCrl prefrontal cortex shows hyperactivity-associated genes responsive to amphetamine challenge. Genes. Brain. Behav. 16:664–674.

Peralta GP, Forns J, Garcia de la Hera M, Gonzalez L, Guxens M, Lopez-Vicente M, et al. 2017. Sleeping, TV, Cognitively Stimulating Activities, Physical Activity, and ADHD Symptom Incidence in Children: A Prospective Study. J. Dev. Behav. Pediatr.

Pievsky MA, McGrath RE. 2017. The Neurocognitive Profile of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Review of Meta-Analyses. Arch. Clin. Neuropsychol. Off. J. Natl. Acad. Neuropsychol. [Internet]:1–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29106438

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 2007. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. Am. J. Psychiatry [Internet] 164:942–948. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17541055

Sadeh A, Pergamin L, Bar-Haim Y. 2006. Sleep in children with attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of polysomnographic studies. Sleep Med. Rev. [Internet] 10:381–398. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Yair_Bar-Haim/publication/6938567_Sleep_in_children_with_attentiondeficit_hyperactivity_disorder_A_metaanalysis_of_polysomnographic_studies/links/5a9e86daaca272e66bf7129d/Sleep-in-childrenwith-attention-deficit-hype

Saletin JM, Jackvony S, Rodriguez KA, Dickstein DP. 2019. A coordinate-based meta-analysis comparing brain activation between attention deficit hyperactivity disorder and total sleep deprivation. Sleep.

Samea F, Soluki S, Nejati V, Zarei M, Cortese S, Eickhoff SB, et al. 2019. Brain alterations in children/adolescents with ADHD revisited: A neuroimaging meta-analysis of 96 structural and functional studies. Neurosci. Biobehav. Rev. [Internet]. Available from: http://files/3102/S0149763418306626.html

Scott N, Blair PS, Emond AM, Fleming PJ, Humphreys JS, Henderson J, et al. 2013. Sleep patterns in children with ADHD: a population-based cohort study from birth to 11 years. J. Sleep Res. 22:121–128.

Shaw P, Malek M, Watson B, Sharp W, Evans A, Greenstein D. 2012. Development of cortical surface area and gyrification in attention-deficit/hyperactivity disorder. Biol. Psychiatry [Internet] 72:191–197. Available from: http://files/3227/Shaw et al. - 2012 - Development of cortical surface area and gyrificat.pdf

Shen C, Luo Q, Chamberlain SR, Morgan S, Romero-Garcia R, Du J, et al. 2020. What is the Link between Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Sleep Disturbance? A multimodal

examination of longitudinal relationships and brain structure using large-scale population-based cohorts. Biol. Psychiatry [Internet]. Available from: http://files/3211/S0006322320313810.html

Shen C, Luo Q, Jia T, Zhao Q, Desrivières S, Quinlan EB, et al. 2020. Neural Correlates of the Dual-Pathway Model for ADHD in Adolescents. Am. J. Psychiatry [Internet]:appi-ajp. Available from: http://files/3207/appi.ajp.2020.html

Skuladottir GV, Nilsson EK, Mwinyi J, Schiöth HB. 2016. One-night sleep deprivation induces changes in the DNA methylation and serum activity indices of stearoyl-CoA desaturase in young healthy men. Lipids Health Dis.

Steinsbekk S, Wichstrom L. 2015. Stability of Sleep Disorders From Preschool to First Grade and Their Bidirectional Relationship with Psychiatric Symptoms. J. Dev. Behav. Pediatr. 36:243–251.

Stoffers D, Altena E, van der Werf YD, Sanz-Arigita EJ, Voorn TA, Astill RG, et al. 2014. The caudate: a key node in the neuronal network imbalance of insomnia? Brain 137:610–620. Sudlow C, Gallacher J, Allen N, Beral V, Burton P, Danesh J, et al. 2015. UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age. PLoS Med. [Internet] 12. Available from: http://files/3213/PMC4380465.html

Sung V, Hiscock H, Sciberras E, Efron D. 2008. Sleep problems in children with attentiondeficit/hyperactivity disorder: prevalence and the effect on the child and family. Arch. Pediatr.

Adolesc. Med. [Internet] 162:336–342. Available from: https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/fullarticle/379359

Telzer EH, Goldenberg D, Fuligni AJ, Lieberman MD, Gálvan A. 2015. Sleep variability in adolescence is associated with altered brain development. Dev. Cogn. Neurosci. [Internet] 14:16–22. Available from: http://files/3231/S1878929315000547.html

Tomás MV, Aleu MP-G, Beseler BS, Benac MP, Pantoja JM, Pitarch IC. 2010. Methylphenidate and sleep: Results of a multicentre study on a population of children with attention deficit hyperactivity disorder. In: Vol. 73. pp. 78–83. Available from: http://files/3199/20605120.html

Tso W, Chan M, Ho FK, Rao N, Li AM, Chan KL, et al. 2019. Early sleep deprivation and attention-deficit/hyperactivity disorder. Pediatr. Res. [Internet] 85:449. Available from: https://www.nature.com/articles/s41390-019-0280-4

Um YH, Hong S-C, Jeong J-H. 2017. Sleep Problems as Predictors in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Causal Mechanisms, Consequences and Treatment. Clin. Psychopharmacol. Neurosci. [Internet] 15:9–18. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5290714/

Ventskovska O, Porkka-Heiskanen T, Karpova NN. 2015. Spontaneous sleep-wake cycle and sleep deprivation differently induce Bdnf1, Bdnf4 and Bdnf9a DNA methylation and transcripts levels in the basal forebrain and frontal cortex in rats. J. Sleep Res.

Wang H, Lane JM, Jones SE, Dashti HS, Ollila HM, Wood AR, et al. 2019. Genome-wide association analysis of self-reported daytime sleepiness identifies 42 loci that suggest biological subtypes. Nat. Commun. [Internet] 10:1–12. Available from: http://files/3151/s41467-019-114567.html

Wang L, Zhu C, He Y, Zang Y, Cao Q, Zhang H, et al. 2009. Altered small-world brain functional networks in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. Hum. Brain Mapp. [Internet] 30:638–649. Available from: http://files/3112/hbm.html

Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. 2017. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. Nat. Commun. [Internet] 8:1826. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-017-01261-5

Wei Y, Bresser T, Wassing R, Stoffers D, Van Someren EJW, Foster-Dingley JC. 2019. Brain structural connectivity network alterations in insomnia disorder reveal a central role of the right angular gyrus. NeuroImage Clin.

Weiss MD, Salpekar J. 2010. Sleep problems in the child with attention-deficit hyperactivity disorder. CNS Drugs [Internet] 24:811–828. Available from: https://link.springer.com/article/10.2165/11538990-000000000-00000

Williams KE, Sciberras E. 2016. Sleep and Self-Regulation from Birth to 7 Years: A Retrospective Study of Children with and Without Attention-Deficit Hyperactivity Disorder at 8 to 9 Years. J. Dev. Behav. Pediatr. 37:385–394.

Xu X, Breen G, Chen C-K, Huang Y-S, Wu Y-Y, Asherson P. 2010. Association study between a polymorphism at the 3'-untranslated region of CLOCK gene and attention deficit hyperactivity disorder. Behav. Brain Funct. 6:48.

Yoon SYR, Jain U, Shapiro C. 2012. Sleep in attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adults: past, present, and future. Sleep Med. Rev. [Internet] 16:371–388. Available from: http://files/3085/Yoon et al. - 2012 - Sleep in attention-deficithyperactivity disorder .pdf

Zheng J, Baird D, Borges M-C, Bowden J, Hemani G, Haycock P, et al. 2017. Recent developments in Mendelian randomization studies. Curr. Epidemiol. reports [Internet] 4:330–345. Available from: http://files/2927/s40471-017-0128-6.html

Zheng J, Haycock P, Hemani G, Elsworth B, Shihab H, Laurin C, et al. 2016. LD hub and MRbase: online platforms for preforming LD score regression and Mendelian randomization analysis using GWAS summary data. In: Vol. 46. p. 815. Available from: http://files/2903/UQ416385.html Zhu Z, Zheng Z, Zhang F, Wu Y, Trzaskowski M, Maier R, et al. 2018. Causal associations between risk factors and common diseases inferred from GWAS summary data. Nat. Commun. 9:1–12. Available from: http://files/3189/s41467 017 02317 2.html

Figure

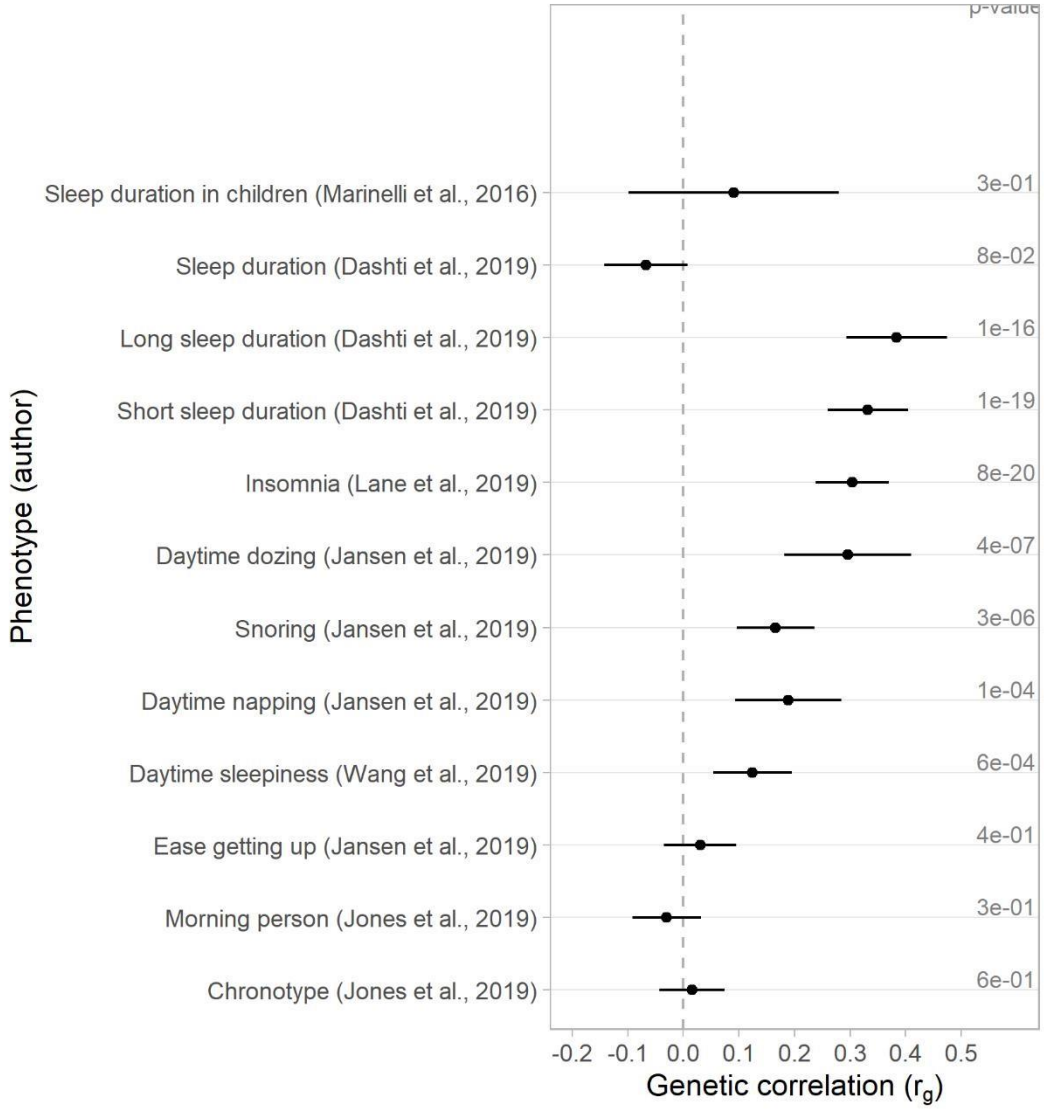


Figure 1. Forest plot depicting genetic correlations (r_g) between sleep-related traits and attention deficit/hyperactivity disorder (citation of the summary statistics used). Note: Bars represent 95% confidence intervals

Tables

Table 1. Functional enrichment analyses based on the functional annotations of genes shared by sleep-related phenotypes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) as a result of cross-trait metanalyses.

Gene Set/phenotype	P-value	P_{FDR}	genes
Insomnia (Lane et al., 2019)			
Reactome [39]			
SIGNALING BY RECEPTOR TYROSINE KINASES	$5.4x10^{-5}$	$3.5x10^{-2}$	*BDNF, LAMB2, MST1, MST1R, MEF2C, ITPR3, DNM1*
Gene Ontology (GO)			
SYNAPSE ORGANIZATION	$2.0x10^{-6}$	$1.5x10^{-2}$	*BDNF, LAMB2, BSN, AMIGO3, CAMKV, SEMA3F, MEF2C, SDK1*
REGULATION OF SYNAPSE STRUCTURE OR ACTIVITY	$8.5x10^{-6}$	$3.1x10^{-2}$	*BDNF, AMIGO3, CAMKV, SEMA3F, MEF2C, DNM1*
microRNA targets CTCAGGG MIR125B MIR125A	$6.2x10^{-4}$	$4.6x10^{-2}$	*DALRD3, BSN, IP6K1, TMEM161B, LIN28B*
Gene Ontology (GO)			
Daytime sleepiness (H. Wang et al., 2019)			
SYNAPSE	$2.9x10^{-5}$	$6.5x10^{-3}$	*DDN, PCDH17, MAPT, GRIK5, KCNJ3, CADM2, GPM6A, SDK1*
PLASMA MEMBRANE REGION	$3.2x10^{-5}$	$6.5x10^{-3}$	*DDN, PCDH17, MAPT, SOGA2, GRIK5, SLC3A1, KCNJ3, GPM6A*
SYNAPTIC MEMBRANE	$9.4x10^{-5}$	$1.6x10^{-2}$	*DDN, PCDH17, GRIK5, KCNJ3, GPM6A*
CELL BODY	$3.2x10^{-4}$	$4.6x10^{-2}$	*DDN, CRHR1, MAPT, GRIK5, GPM6A*
PROTEIN DOMAIN SPECIFIC BINDING *microRNA targets* CAGTATT MIR200B MIR200C MIR429			
Gene Ontology (GO)	$1.4x10^{-4}$	$2.4x10^{-2}$	*ESRRG, PLCL1, GPM6A, ZFPM2, HNRNPK*

Snoring (Jansen et al., 2019)

NEUROGENESIS	$1.2x10^{-7}$	$9.1x10^{-4}$	*DMRTA2, BDNF, SOX5, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3, ZNF521, DCLK2, CEP120, MET*
NEURON DIFFERENTIATION	$2.9x10^{-6}$	$7.3x10^{-3}$	*DMRTA2, BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3, ZNF521, DCLK2, MET*
REGULATION OF CELL MORPHOGENESIS INVOLVED IN DIFFERENTIATION	$8.0x10^{-6}$	$1.2x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3*
POSITIVE REGULATION OF CELL PROJECTION ORGANIZATION	$2.4x10^{-5}$	$1.8x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, MAPT, WNT3, CEP120*
CENTRAL NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	$2.8x10^{-5}$	$1.8x10^{-2}$	*DMRTA2, SEMA6D, CRHR1, MAPT, WNT3, DCLK2, CEP120*
REGULATION OF CELL PROJECTION ORGANIZATION	$3.2x10^{-5}$	$2.0x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3, CEP120*
CELL MORPHOGENESIS INVOLVED IN DIFFERENTIATION	$5.2x10^{-5}$	$2.7x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3, MET*
HEAD DEVELOPMENT	$7.0x10^{-5}$	$2.8x10^{-2}$	*DMRTA2, SEMA6D, CRHR1, WNT3, DCLK2, CEP120*
REGULATION OF CELL MORPHOGENESIS	$7.7x10^{-5}$	$3.0x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3*
REGULATION OF NEURON PROJECTION DEVELOPMENT	$8.6x10^{-5}$	$3.1x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3*
REGULATION OF ANATOMICAL STRUCTURE SIZE	$9.7x10^{-5}$	$3.1x10^{-2}$	*BDNF, SEMA6D, MAPT, WNT3, GPX1*
POSITIVE REGULATION OF CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION	$9.8x10^{-5}$	$3.1x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, MAPT, WNT3, GPX1, CEP120, MET*
POSITIVE REGULATION OF CELLULAR COMPONENT BIOGENESIS	$1.2x10^{-6}$	$3.5x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, MAPT, CEP120, MET*
POSITIVE REGULATION OF NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	$1.3x10^{-6}$	$3.6x10^{-2}$	*DMRTA2, BDNF, CUX2, MAPT, WNT3*
POSITIVE REGULATION OF CELL DEVELOPMENT	$1.4x10^{-6}$	$3.7x10^{-2}$	*DMRTA2, BDNF, CUX2, MAPT, WNT3*
REGULATION OF NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	$1.8x10^{-6}$	$4.2x10^{-2}$	*DMRTA2, BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3*
CELL MORPHOGENESIS INVOLVED IN NEURON DIFFERENTIATION	$1.9x10^{-6}$	$4.2x10^{-2}$	*BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3*
REGULATION OF CELL DEVELOPMENT	$2.0x10^{-6}$	$4.4x10^{-2}$	*DMRTA2, BDNF, CUX2, SEMA6D, MAPT, WNT3*

Table 2. Bidirectional two-sample Mendelian randomization analyses estimating the causal effect of sleep-related phenotypes on Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) risk and vice-versa.

			Method							
Exposure	**Outcome**	**n SNPs**	**IVW**		**Penalized weighted median**		**MR Egger**		**Weighted mode-based**	
			Beta(SE)	p	Beta(SE)	p	Beta(SE)	p	Beta(SE)	p
Insomnia (Lane et al., 2019)	**ADHD**	40	0.872 (0.373)	0.019	0.884 (0.367)	0.016	0.829 (1.329)	0.537	0.596 (0.569)	0.301
Snoring (Jansen et al., 2019)		30	0.096 (0.106)	0.366	0.106 (0.118)	0.371	0.838 (0.745)	0.27	0.075 (0.229)	0.746
Daytime napping (Jansen et al., 2019)		6	0.350 (0.095)	<0.001	0.293 (0.129)	0.023	0.062 (1.315)	0.964	0.263 (0.179)	0.202
Daytime sleepiness (Wang et al., 2019)		43	-0.17 (0.479)	0.722	-0.858 (0.501)	0.086	2.942 (2.206)	0.19	-0.98 (1.114)	0.384
Long sleep duration (Dashti et al., 2019)		11	-0.968 (1.277)	0.449	1.174 (1.522)	0.44	5.922 (5.35)	0.297	2.011 (2.579)	0.454
Short sleep duration (Dashti et al., 2019)		25	2.032 (0.788)	0.010	2.108 (0.726)	0.004	-1.281 (3.795)	0.739	2.092 (1.111)	0.072
Sleep duration (Jansen et al., 2019)		44	-0.104 (0.177)	0.560	-0.220 (0.208)	0.289	-0.196 (0.706)	0.782	-0.316 (0.332)	0.347

Ease getting up (Jansen et al., 2019)		62	-0.05 (0.199)	0.787	-0.350 (0.259)	0.176	-0.285 (0.5490)	0.606	-0.487 (0.396)	0.223 - 0.073 (0.127) 0.567 0.109 (0.124) 0.380
Morning person (Jones et al., 2019)		276	-0.017 (0.044)	0.706	-0.014 (0.049)	0.776				
Chronotype (Jones et al., 2019)		227	-0.010 (0.074)	0.891	-0.014 (0.083)	0.865	0.051 (0.221)	0.817	0.060 (0.214)	0.781
	Insomnia (Lane et al., 2019)	10	0.004 (0.017)	0.822	-0.01 (0.009)	0.298	-0.074 (0.08)	0.384	-0.014 (0.011)	0.229
	Snoring (Jansen et al., 2019)	10	-0.034 (0.034)	0.307	-0.018 (0.033)	0.584	-0.064 (0.171)	0.72	0.006 (0.052)	0.905
	Daytime napping (Jansen et al., 2019)	9	-0.015 (0.053)	0.775	-0.091 (0.061)	0.138	0.173 (0.258)	0.524	-0.119 (0.092)	0.23
ADHD	**Daytime sleepiness** (Wang et al., 2019)	10	0.003 (0.007)	0.679	-0.006 (0.006)	0.315	-0.05 (0.03)	0.139	-0.008 (0.008)	0.342
	Long sleep duration (Dashti et al., 2019)	10	0.012 (0.003)	<0.001	0.012 (0.004)	0.005	0.016 (0.014)	0.304	0.012 (0.006)	0.069
	Short sleep duration	10	0.011 (0.008)	0.147	0.008 (0.006)	0.216	-0.049 (0.031)	0.158	0.009 (0.007)	0.273

(Dashti et al., 2019)									
Sleep duration (Jansen et al., 2019)	10	-0.001 (0.022)	0.958	0.016 (0.016)	0.295	0.151 (0.093)	0.15	0.018 (0.02)	0.389
Ease getting up (Jansen et al., 2019)	9	0.005 (0.014)	0.712	0.011 (0.011)	0.311	-0.078 (0.061)	0.244	0.012 (0.015)	0.459
Morning person (Jones et al., 2019)	9	-0.06 (0.053)	0.267	-0.078 (0.032)	0.015	-0.509 (0.204)	0.042	-0.084 (0.040)	0.071
Chronotype (Jones et al., 2019)	9	-0.029 (0.032)	0.357	-0.049 (0.017)	0.004	-0.3150 (0.119)	0.033	-0.050 (0.020)	0.037

Note: SE= standard error

ARTIGO 3

Artigo a ser submetido à revista científica Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry (JAACAP). Normas da revista são apresentadas antes da versão que será submetida.

Individual Article Components

Cover letter and title page should be uploaded separately. The abstract, manuscript text, and tables must be in a single file. Any figures should be uploaded separately.

Cover Letter
A cover letter is required for all articles and should be uploaded as a separate file. This letter should outline the significance of the work and should refer to any other publications that utilize the same data set (see Divided Publication).

Title Page
Be sure that the information provided on the title page corresponds to information entered into the system upon submission. The title page should include the following sections:

Title:

The manuscript title should be concise and informative, as titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Titles should be less than 100 characters and a maximum of 15 words. A running title of less than 40 characters should also be included. Review articles should be titled according to the *Journal*'s preferred format, with the type of the review at the beginning of the title, followed by a colon. See Reviews.

Author names and affiliations:

Include the full names of all authors and their highest academic degree. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Include all authors' academic or professional affiliations written out in paragraph form (not footnoted) along with the corresponding author's complete contact information (name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Corresponding author:

Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of review, production, and publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author. Multiple corresponding authors are not allowed.

Acknowledgements:

Include an acknowledgement paragraph that includes any funding directly related to the content of the manuscript, any necessary attribution/credit information, and the name(s) of the study statistical expert(s), if applicable. Academic or professional affiliations and degree(s) must be included for any non-author individuals listed in the acknowledgement.

Presentation information (if applicable):

Example: This study was presented as an abstract at the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry's 60th Annual Meeting, Orlando, FL, October 22-27, 2013.

Key words:

A maximum of 5 key words should be included. For optimum discoverability, use MeSH vocabulary.

Abstract
Should begin on the second numbered page. The structured abstract for New Research and Review P should be a maximum of 250 words and must be formatted with sections entitled as

follows: **Objective, Method, Results, Conclusion.** In the case of Review Articles, the Method section should provide data sources and study selection (the number of articles reviewed and the selection process). Generally, abstracts should be written with complete sentences and use of active voice when possible. Abbreviations should be spelled out on their first usage. Abstracts should provide the context or background for the research and should state its purpose (distinguishing primary from secondary purposes), basic research design (including information about the setting, common demographic characteristics of the participants, number of participants, response and refusal rates, dropouts and losses, and matching characteristics in the case of a clinical trial, information on the intervention and how variables were measured), main findings (giving specific effect sizes, numerical differences, and their statistical significance, if possible), and principal conclusions (including their relation to the purpose of the study, study limitations, and study implications). The abstract should emphasize new and important aspects of the study or observations, note important limitations, and not overinterpret findings.

Graphical abstracts
A Graphical Abstract is a single, concise, pictorial, and visual summary of the main findings of the article. This is a figure that is specially designed for the purpose, which captures the content of the article for readers at a single glance. The Graphical Abstract will be displayed in online search result lists, the online contents list, and the online article, but will not (yet) appear in the article PDF file or print.

Author instructions
A Graphical Abstract should allow readers to quickly gain an understanding of the main take-home message of the paper and is intended to encourage browsing, promote interdisciplinary scholarship, and help readers identify more quickly which papers are most relevant to their research interests. Authors must provide an image that clearly represents the work described in the paper. Graphical Abstracts should be submitted as a separate file in Editorial Manager by selecting "Graphical Abstracts" from the drop-down list when uploading files. Ensure the file is either the original file type used to create it, a .gif, .tiff, or .jpeg. PDF and Word Document formats are not accepted by the publisher.

Specifications:
A Graphical Abstract should be a one-image file and should visualize one process or make one point clear. For ease of browsing, the Graphical Abstract should have a clear start and end, preferably "reading" from top to bottom or left to right. Try to reduce distracting and cluttering elements as much as possible.

Image size: Please provide an image with a minimum of 531 x 1328 pixels (hxw) using a minimum resolution of 300 dpi. If you are submitting a larger image then please use the same ratio (500 wide x 200 high). Please note that your image will be scaled proportionally to fit in the available window on ScienceDirect.

Font: Please use Helvetica or Arial font consistently with a large enough font size as the image will be reduced in size for the Table of Contents to fit a window of 200 pixels high. File type: preferred file types are TIFF, EPS, PDF, or MS Office files. No additional text, outline or synopsis should be included. Any text or label must be part of the image file. Please do not use unnecessary white space or a heading "Graphical Abstract" within the image file.

Introduction
Include the purpose of the study, a review of recent relevant literature, and an a priori hypothesis.

Method

The guiding principle of the Method section should be clarity about how and why a study was done in a particular way. The Method section should aim to be sufficiently detailed such that others with access to the data would be able to reproduce the results. Include the participants/patients and, if appropriate, include information on whether parts of these data have been published elsewhere; sampling frame, sampling, and recruitment strategies; and inclusion and exclusion criteria. Inclusion of determination of sample size (include power calculation). Authors of Review manuscripts are encouraged to describe the methods used for locating, selecting, extracting, and synthesizing data. Authors should make use of the appropriate reporting guidelines when drafting their manuscripts (see Reporting Guidelines). Peer reviewers are asked to refer to these checklists when evaluating these studies.

Include information about sample composition including demographic details. Use current and codable occupational categories, four educational attainment categories (without HS diploma, HS graduate without college education, some college education, degree from 4-year college or more), and five race/ethnicity categories (e.g., US Bureau of Census).

For measures, authors should describe variables measured and instruments used. Authors must provide sufficient information about rating scales and other measures so that readers can access them for their own use; unpublished instruments may be made available via supplemental material at the request of the editor.

If a manual-based treatment is used, authors must include information on how to obtain the manual. The online-only content feature may be used to provide access. For studies that involve testing, imaging, or other procedures, sufficient information should be given to allow other investigators to replicate the study.

When devices or software are mentioned, please provide the name of the manufacturer followed by city and state of the manufacturer's headquarters.

Describe all analyses with names of specific statistical tests used and how these correspond to the hypotheses postulated in the introduction. Justify and clearly reference the use of unusual statistical techniques. If multiple comparisons are unavoidable, use an appropriate adjustment to control type I error. State whether tests were one- or two-tailed. If replication was performed, indicate the methods for replication and whether the measures and methods used were identical to the original study.

Results

Provide summary statistics. When appropriate, report effect sizes and/or confidence intervals. If you use formal statistical testing, include information on the statistical test used, the value of the test statistic, degrees of freedom, and *p* values. One-sided testing should be justified.

Discussion

Include the clinical implications, limitations, and conclusions of the manuscripts findings, but do not use subheadings.

References

Citation in text. Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Do not cite references in the abstract. Citation of a reference as 'in press' indicates that the item has been accepted for publication. Unpublished results and personal

communications should not be included in the reference list, but may be mentioned in the text. *Reference list.* Indicate references by consecutive superscript Arabic numerals in the order in which they appear in the text. The numerals are to be used outside periods and commas; inside colons and semicolons. For further detail and examples, please refer to the AMA Manual of Style, 11th edition. If using a reference formatting tool, select JAMA as the output style. Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Sample reference to a journal publication:
1. Wang G, Hu FB, Mistry KB, et al. Association between maternal prepregnancy body mass index and plasma folate concentrations with child metabolic health. JAMA Pediatr. 2016;170(8):e160845. doi:10.1001/jamapediatrics.2016.0845.
Sample reference to a book or e-book:
2. Adkinson NF Jr, Bochner BS, Burks W, et al, eds. Middleton?s Allergy: Principles and Practice. 8th ed. Saunders; 2014.
3. Guyatt G, Rennie D, Meade MO, Cook DJ. Users? Guides to the Medical Literature: A Manual for Evidence-Based Clinical Practice. 3rd ed. McGraw-Hill Education; 2015. Accessed August 15, 2016. https://jamaevidence.mhmedical.com/book.aspx?bookID=847
Sample reference to a chapter in a book:
4. Boushey CJ. Application of research paradigms to nutrition practice. In: Coulston AM, Boushey CJ, Ferruzzi MG, eds. Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease. 3rd ed. Academic Press; 2013:99-105.

Data References. The *Journal* encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Tables and Figures
Number items consecutively in Arabic numerals per the order of citation in the text. If a table, figure, or any data therein have been previously published, a footnote must give full credit to the original source, and permission from the copyright holder to reproduce the material must be provided.

Tables should be cited in the text, numbered consecutively (i.e., Table 1, Table 2, Table 3) in the order of their mention, and include brief descriptions. Place tables after the reference list in the blinded manuscript file. Tables that constitute a single column are actually lists and should be included in the text as such. Table footnotes should use superscript lowercase letters rather than symbols.

The first table of all New Research submissions should describe the sociodemographic characteristics of the sample as well as descriptive information on key study variables.
See Diversity, Disparities, Minoritization, Inclusivity, Social Justice, and Health Equity, and Use of Inclusive Language sections above.

For review articles, including systematic reviews and meta-analyses, the table describing the included studies should include a column that summarizes each of the sociodemographic characteristics of each study as reported in the original research.

Figures should be cited in the text, numbered consecutively (i.e., Figure 1, Figure 2, Figure 3) in the order of their mention, and include brief descriptions. The preferred file format for figures and graphics is typically whatever program was used to create them, or alternatively, PowerPoint (e.g. charts or graphs created in Excel should be uploaded as .xml or .ppt files). Please upload high resolution (at least 300 dpi) versions of each figure individually (i.e., two figures should be uploaded separately as Figure 1 and Figure 2). Parts/panels in composite figures should be labeled with capital letters (A, B, C). Each figure should be consistent in color, size, and font, and be designed proportionally so that each item within it is to scale (particularly numbers, letters, and symbols) so it can later be sized as needed without loss of legibility or quality. Figure titles and legends should be included on a separate page in the manuscript file following the reference list and any tables, rather than in the figure file itself.

Color illustrations are accepted. Although the cost of color printing must be paid by the author, authors may choose, at no cost, for illustrations to be reproduced in black and white in the print journal and appear in color for the online version. Color illustrations are printed at a rate of $650 (US dollars) for the first figure and $100 for each additional figure. Authors may supply black-and-white versions of color figures for printing purposes.

Complete instructions for electronic artwork preparation and submission can be found here. Professional illustration services are available from Elsevier's Web Shop. *JAACAP* does not endorse any such services. Use of such services has no bearing on the editor's ultimate decision.

Supplemental Material

Authors may be invited to submit supplementary material to enhance their article's text. Supplementary material is made available in the online article but not published in print. Supplemental material should not be used for critical information. The main body of the manuscript should be scientifically complete and include all content required for another group to replicate the study and for readers to evaluate the main findings. All supplemental material may be posted exactly as it is received and should be submitted as intended for viewing. Thus, all supplementary figures and tables should have their legends/keys included in the relevant file. All supplementary information should be saved in a separate file(s), and denoted as such when uploading. Supplemental material must be called out in the manuscript text (e.g. "see Table S1, available online"), and the files should be labeled Table S1, Figure S1, Figure S2, etc. Supplemental text should be labeled and called out as Supplement 1, Supplement 2, etc. Any references cited in supplemental material should be included in a supplemental reference list. Permission from the copyright holder must be obtained for any supplementary material that has been previously published in print or online.

Multimedia

JAACAP accepts video material and animation sequences to support and enhance scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. To ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of the recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your

video data. For more detailed instructions, please review the video instruction pages. Note: Since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide descriptive text for the portions of the article that refer to this content. For any further information, please visit the Elsevier Support Center.

The effects of persistent sleep disturbances during early childhood over adolescent ADHD, and the mediating effect of attention-related executive functions: data from the 2004 Pelotas Birth Cohort

Carpena, Marina Xavier[12]; Matijasevich, Alicia[13]; Santos, Iná[1]; Barros, Aluísio[1]; Munhoz, Tiago[1]; Loret de Mola, Christian[124]; Tovo-Rodrigues, Luciana[1]

[1] Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

[2] Grupo de Pesquisa e Inovação em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil.

[3] Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, Brasil.

[4]Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, FURG, Rio Grande, RS, Brazil.

Acknowledge : The World Health Organization, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), Brazilian National Research Council (CNPq), Brazilian Ministry of Health, and Children's Pastorate supported previous phases of the study until 2009. The 11-year follow-up was supported by the Science and Technology Department/Brazilian Ministry of Health, with resources transferred through the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Grant Number 2400943/2013-1. This follow-up was also funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; Grant Number 2014/13864-6). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

Abstract

Objective: We aimed to investigate the effects of persistent sleep disturbances during early childhood over ADHD during the adolescence, and the potential attention-related executive functions mediating this effect.

Methods: We used data from the 2004 Pelotas Birth Cohort. Children's Sleep disturbances were reported by their mothers at 12, 24, and 48 months of age, whereas the Test-of-Everyday-Attention-for-Children (TEA-Ch) and the Development and Well Being Assessment (DAWBA) were applied at 11 years of age to evaluate attention-related executive functions and ADHD respectively. Persistent sleep problems were defined as reporting have two or more points of difficulty to sleep, nightmares, restless sleeps, and/or <10h/24h sleep duration. Logistic regression and mediation models were used, adjusting for maternal and child sociodemographic, behavior and health related variables.

Results: The highest prevalence of adolescent ADHD (15.4%) was on the group who reported having nightmares at 2,4 and 6 years. In adjusted models, we observed an odd of ADHD in the adolescence 2.26 higher in those who reported persistent nightmares (CI95% 1.33, 4.01) compared to those reported transitory or no nightmares. Persistent difficulty to sleep (OR=1.74 CI95% 1.13, 2.66) and restless sleep (OR=1.80, CI95% 1.23, 2.64) during childhood also increased ADHD odds at 11 years. No indirect effect through attention related executive functions was found using mediating models.

Conclusion: Persistent early sleep disturbances may increase odds of ADHD among adolescents and could be consider as early marker of such disorder, specially nightmares problems. However, differently than we hypothesized, these effects were not mediated by attention-related executive functions.

KEYWORDS: sleep disturbances, ADHD, attention, executive function, neurodevelopment disorders

Introduction

Approximately 2-7% of children and adolescents have Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) worldwide. [1,2] ADHD is considered a neurodevelopmental disorder characterized by impairing and persistent symptoms of inattention and/or hyperactivity/impulsivity. Significant impairment on education attainment and with dangerous behaviors such as substance use/abuse, crime enrolment, violence, and accidents had been associated with ADHD. [3,4] However, its etiology is still not completely understood which hinders prevention, early diagnoses, and appropriate treatment.

Sleep patterns were among endophenotypes or highest ADHD-comorbidity conditions, suggesting that sleep disturbances might be important predictors of ADHD.[5–10] However, few studies had evaluated this relationship throughout life, especially considering more than one-point evaluation. Armstrong et al. (2014) observed that persistent insomnia at both 4.5 and 9 years was associated with ADHD symptoms at 9 years, and persistency of abnormal sleep movements was associated with ADHD symptomatology at 9 and 18 years of age.[11] Likewise, moderate to severe sleep problems from 2 to 7 years of age were associated with hyperactivity/inattention symptoms at 8-9 years.[12] We have previously reported an important effect of early sleep problems on adolescent ADHD, but we did not test persistent sleep problems neither chronic sleep deprivation effects on ADHD. [10]

One of the few studies that found an association between sleep duration and ADHD through longitudinal perspective was conducted with the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) cohort. They found that a sleep duration reduction, from 3 to 5 years of age, and a shorter total sleep duration at 5, 6 and 9 years of age were associated with ADHD at ages 7-9 years.[13] Similarly, a Chinese population-based cohort study reported an association between early sleep deprivation and elevated risk of ADHD in middle childhood. [14] However, adjusted models missing mostly maternal important confounding variables. Moreover, no population-based

longitudinal prospective studies tested the persistent effect of sleep disturbances on ADHD in a low/middle income country, considering that the association might be different than in high income country.

The neurocognitive deficits observed following sleep loss are experienced almost universally, and includes impairments in attentional processing, executive functioning, non-declarative and declarative memory, as well as emotional regulation and sensory perception. [15–17] One of the hypotheses linking sleep and ADHD is based on the fact that sleep dysfunctions have an impact over neurocognitive functions related to executive control and emotional information processing, which are all regulated by the prefrontal cortex. [18–20] Executive function (EF) is an umbrella term of cognitive processes or skills (working memory, inhibition, mental set shifting), which are important for achieving goal-directed behaviors, thoughts, and emotions. Although there is an absence of consensus about what it is and what its components are, there is certain agreement that there are three interconnected core executive functions: inhibitory control, working memory and cognitive flexibility [21], which control one's attention, behavior, thoughts and/or emotions, and other mental processes involved in human thought, perception, memory and decision-making process. Although there is evidence indicating that the core symptoms of ADHD, such as inattention, impulsivity and impatience, are typical outcomes of sleep deprivation even in typical development [17], few studies have tested the role of executive functions on sleep ADHD association [22–24]. Empirical evidence for this hypothesis includes the results of a cohort conducted with school-age children [25], who identified a moderating role of executive function in the longitudinal association between sleep problems identified at 3 years of age and ADHD . Moreover, other studies had reported that sleep patterns were associated with ADHD even when controlling for attention, likewise attention traits were associated with ADHD after control for sleep-traits. [22–24]

Understanding and identifying early life ADHD predictors and potential pathways involved might provide insights about prevention and treatments. We found no population-based

study testing the mediating hypotheses of executive function on sleep disturbances-ADHD association. Thus, we aimed to answer the following: Is there a greater risk of persistent sleep disturbances between two and six years over ADHD in early adolescence? Are the persistent sleep disturbances effects on ADHD mediated by attention-related executive functions?

Methodology

The 2004 Pelotas Birth Cohort is a population-based longitudinal study conducted with hospital childbirths in the southern Brazilian city of Pelotas. In total 4,231 mothers agreed to participate in the study (>99.5% of all births in the city during that year). These mother-child dyads were followed when children had 12, 24, 48 months and at 6 and 11 years. Attrition rates were 94.3%, 93.5%, 92.0%, 90.0% and 86.6%, respectively. More details of the Cohort methodology could be found elsewhere [26,27]. For the current study, twin births and children with neurodevelopmental impairments due to genetic syndromes were excluded (n=111).

ADHD and inattention/hyperactivity symptoms at 11 years

Trained psychologists applied the Development and Well-Being Assessment (DAWBA) and the Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ) [28,29] to mothers and caregivers to assess ADHD and other mental health disorders at 11 years of age. We used the cut-off point established for the Brazilian population of the screening SDQ subscale to defined those who had inattention/hyperactivity symptoms (≥7). ADHD diagnosis was evaluated by a specific DAWBA section consisting of 31 closed- and open-ended questions. For the final classification, two independent and experienced mental health professionals assessed all responses. The diagnoses were conducted according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders[30] criteria. The SDQ and DAWBA were validated for the Brazilian population aged between 4 and 16 years. [31]

Attention-related executive functions at 11 years.

Trained psychologists applied a neuropsychological test battery designed to assess attention-related executive functions through a game-like test. [32] It uses cognitive tasks to measure three attention-related executive functions: attentional-control or inhibition (maintaining focus and inhibiting pre-potent responses), cognitive flexibility or attentional-switching (switching between information) and selective-attention (attending to target stimuli among distracters). Verbal- and motor-processing speed (speed at which the child can read out words or put them on paper, respectively) were also evaluated. The whole procedure for the test was standardized, and psychologists used a private and quiet room for the application protocol. The total testing duration was approximately one hour, with a brief period to rest between tasks as the examiner set up the next test. The specific tasks for each domain are described here.

Attentional control

The child was shown a trail made with the numbers 1 and 2 (with 24 numbers in total). In the 'Same World' task, he or she had to read out the numbers as quickly as possible (while the tester kept his or her finger next to each number in the trail until the child had read it correctly). The inhibition aspect of the 'Opposite Worlds' task was used to assess attentional-control executive functions. This is a basic form of 'Stroop' task, where the child is required to give a verbal response that contradicts the visual information given. The child was presented with a trail of digits and instructed to read out 'one' when presented with a 2 and 'two' when presented with a 1. The mean time taken to complete the 'Same World' task (time taken to read the trail of numbers) was taken as the measure of verbal-processing speed. Then mean time taken to complete the 'Opposite Worlds' task was taken as the measure of attentional-control. Higher reaction times indicate more impairment on attentional-control ability (considering verbal processing speed).

Attentional switching

The dual-attention task of 'SkySearch' subtest was used. The child initially selected pairs of spaceships from a task sheet containing matching and non-matching spaceships. The task was repeated but with the addition of another task: the child was also requested to count the number of noises played during the task. The difference in speed and accuracy when completing the task with and without the addition of noises was taken as an indication of switching. A higher score indicates more impairment on dual attention.

Selective attention

The baseline condition of the 'Sky Search' task was used, how fast and accurately the child selected pairs of spaceships from the task sheet containing matching and nonmatching spaceships (without the addition of the noises). In the test sheet, 20 (50%) of the spaceship pairs were identical. Reaction times in seconds to circle all the spaceship pairs and number of correct pairs circled were recorded. Motor-processing speed was assessed as the time and accuracy to circle the spaceships in the 'practice' Sky Search' task sheet with only identical pairs. As recommended in the manual, motor-processing reaction time was subtracted from the ability score to provide a final measure of selective attention. A higher score indicates more impairment on child´s selective attention (considering motor ability).

Sleep disturbances

Sleep disturbance variables were collected at the 2-, 4- and 6-years follow-ups of the 2004 Pelotas birth cohort participants. They were collected using the same question in all follow-ups: We evaluated difficulty going to sleep with the question "Does your child has trouble going to sleep?" (yes/no). Restless sleep was evaluated though the direct question "Does your child has restless sleep or move his/her legs during sleep? (yes/no) and nighmares/night terrors were assessed through the question: Does your child has nightmares/night terrors? (yes/no). All of them were questions referred to what usually happen.

These variables have been reported as good indicators of sleep disorders in infancy in previous studies.[10,33,34] In addition, mothers reported the total number of hours their children slept

during the whole day (24 hours) in the last two weeks, at the 1, 2 and 4years follow-ups. If the mother reported less than 10 hours sleep, we considered it as a pattern of sleep deprivation as used previously [35] and it was also considered a sleep problems proxy. We created a variable with four categories for each of the assessed sleep disturbances, based on the number of times each of the disturbances was reported. The categories were Never, 1-follow-up, 2 follow-ups, and always reporting the sleep disturbance. For the logistic regression and mediation analyses sleep disturbances variables were dichotomized. We joined the category never with 1 follow-up, and 2 follow-ups with always. The latter was considered as the category defining persistency of the sleep disturbance.

Potential confounding factors

Maternal schooling (complete years of formal education), maternal age (years), maternal marital status (single or married/living with someone), self-reported maternal skin color (White, Black, or Other—including Brown, Yellow, or Indigenous), gestational age, parity (number of previous live births or stillbirths, categorized as <2 and ≥2), maternal alcohol use and smoking (yes/no) during pregnancy, maternal reported nervous or depression symptoms during pregnancy (yes/no), child sex (male/female), birth weight (continuous variable), gestational age at birth (continuous variable) and breastfeeding (number of months the child breastfed), most of all collected at the cohort baseline, were used as covariates for adjustments. Continuous variables were maintained in their original form for regression models, and when we used these variables to describe our sample, we categorized them for a better comprehension.

Statistical analysis

We calculated means with their respective standard deviation (SD) for continuous variables and absolute and relative frequencies for categorical ones. We used oneway ANOVA to compare means between groups. For categorical variables we used Fisher exact test or the Chi-square heterogeneity test to compare proportions, and nonparametric Chi-square trend analysis when we

suspected a dose-response gradient. We used logistic regression models to evaluate the adjusted effect of sleep disturbances on ADHD and inattention/hyperactivity symptoms to obtain Odds Ratio (OR) as an effect measure.

To assess if executive functions were a mediator in the association between sleep disturbances and ADHD and inattention/hyperactivity symptoms, we adopted a counterfactual-based approach to mediation analysis.[36] In order to analyze the effect of each of our exposures and mediators, we defined independent models for each sleep disturbance (exposure), each domain of attention-related executive function (mediators), and ADHD and inattention/hyperactivity symptoms (outcomes).

We estimated the natural direct effect (NDE), natural indirect effect (NIE) and controlled direct effect (CDE), of each sleep disturbances (persistent difficulty to sleep, persistent restlessness, persistent night terrors, and persistent sleep deprivation) on ADHD and inattention/hyperactivity symptoms, using each mediator separately.

The NDE represents the effect of the exposure on the outcome that is not captured by the mediator, while the NIE estimates the effect that is captured. The sum of the NDE and NIE would represent the total casual effect, and the quotient of dividing the NIE by the total effect would represent the percentage of the effect that is captured by a mediator. The CDE would represent the effect of the exposure on the outcome if we were able to control the mediator (maintain constant or fixed at one level). To calculate this, we used the "paramed" module of the program STATA v.13.1. Standard errors for mediation analyses were calculated using boot strapping with 5000 simulations.

Ethics

The study protocol and all follow-ups of the 2004 Pelotas Birth Cohort Study were approved by the Medical Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, which is affiliated with the Brazilian National Commission for Research Ethics (*Comissão Nacional*

de Ética em Pesquisa). Written informed consent was obtained from the mothers or legal guardians of the adolescents. At the 11-year follow- up, adolescents also signed an informed consent form.

Results

At the 11 years follow-up, 3,159 individuals had information for sleep disturbance, ADHD and inattention/hyperactivity symptoms questions (75% of response of the cohort inception). About half of them were boys (51.5%). Mothers included in the analyses were mostly married (84.7%), had white skin color (73.0%) and two or more children (60.6%). Although 26.6% of mothers smoked during pregnancy, few reported alcohol consumption during this period (3.2%). Children with missing data were more frequently preterm (18.7% *vs* 13.1%) and low birthweight (16.0% *vs* 8.0%) than children included. Mothers included in the analyzed were mostly in the mid-range quintiles of wealth index, reported less frequently being single (19.7% *vs* 15.3%) and had lower frequency of depressive symptoms during pregnancy than the nonrespondents (24.0% *vs* 28.8%, respectively) (Table S1).

In our sample, 3.8% (N=121) were ADHD positive cases according to the DAWBA, and 15.4% (N=486) presented inattention/hyperactivity symptoms according to the SDQ assessment. Table 1 shows the sleep disturbances occurrence as well as the mean (SD) of each domain of attention related-EF. Of all sleep disturbances, restless was the most common and 9.7% of the Cohort responders reported it in all follow-ups. Almost 59% reported restless sleep at least once, whereas 45.4%, 28.0% and 25.0% reported having difficulty to sleep, nightmares and sleep deprivation in at least one follow-up, respectively.

The highest prevalence of ADHD was on the group who reported always having nightmares (15.4%) (Figure 1, and Table S2 shows the complementary data of p-value and proportions). Figure 1 also shows that the prevalence of ADHD tended to increase as the number

of follow-ups reporting nightmares did too (p=0.001). ADHD was also higher in those who reported restless sleep always (6.5%, p=0.010), and in those who reported difficulty going to sleep in two follow-ups (5.4%, p=0.042). When using the SDQ evaluation, we observed that inattention/hyperactivity symptoms were also more prevalent on those who reported having nightmares at all 2, 4 and 6 years old (38.5%). Inattention/hyperactivity symptoms tended to increase with the number of follow-ups reporting any sleep disturbances. Moreover, a statistical significance was found indicating that inattention/hyperactivity symptoms frequency was higher among those who reported sleep deprivation (all p-values <0.001). There were no cases of ADHD in the category of always having sleep deprivation. Logistic regression adjusted models confirmed that having persistent difficulties to going to sleep, restless sleep and nightmares increase the odds of ADHD and inattention/hyperactivity symptoms (Table 2). Moreover, having persistent sleep deprivation increased the odd to have elevated inattention/hyperactivity symptomatology.

Table 3 shows all mediation analysis models. The total effect, adjusted for potential confounders, showed a higher chance of ADHD in those reporting any sleep disturbance in two or more follow-ups vs less than two. However, the ORs NIE for all models was around 1, and 95%CIs included the reference. Therefore, there was no evidence supporting that the association between any sleep disturbance persistency and ADHD was mediated by the evaluated attention-related executive functions. Further, there was not an association between persistent sleep disturbances and executive functions, excepted for sleep deprivation (Table S3). Those who reported having sleep deprivation at two or three follow-ups had worst attention control and attention switching (greater times; mean and SD reported at Table S3).

Discussion

We observed that children reporting persistent sleep disturbances have considerable higher odds of ADHD and inattention/hyperactivity symptomatology at 11 years-old, even after adjusting

for maternal and child characteristics. Higher prevalence and greater odds of ADHD and inattention/hyperactivity symptomatology were found among those with persistent nightmares compared to those who reported transitory nightmares or no episodes. However, these associations were not mediated by attention related-executive functions.

Sleep problems are widely reported as associated to ADHD. [5,11,12,18,37,38] Sleep problems in childhood are a spectrum of a number of conditions, such as difficulty going to sleep either by bedtime refusal (e.g., resistance going to bed) or trouble initiating sleep (e.g., insomnia), sleep restless sleep or periodic limb movements in sleep (PLMS) disorder (i.e., repetitive jerking of the legs) among others. [37,39] Persistent difficulty going to sleep was associated in our study with adolescent ADHD, similarly to other studies findings [40] that reported a consistent association between ADHD and trouble initiating sleep or even insomnia diagnosis. [11,37] Armstrong et al (2014) also found an association between persistency of insomnia (both at 4.5 and 9 years old) and 9-year-old children ADHD[11], similar to our findings.

In this study, persistent restless sleep on childhood was associated with higher adolescent ADHD, corroborating findings reported by other investigators.[11,41,42] In crude analysis, we also observed an important increase of inattention/hyperactivity symptoms and ADHD occurrence between those children that experienced sleep deprivation in all follow-ups. in adjusted model, this was maintained for inattention/hyperactivity symptoms, similar to other studies.[43] However, it was not maintained for ADHD, probably due to a small prevalence.

Persistent nightmares were the most common sleep disturbance among ADHD cases in our sample, followed by restless and difficulty going to sleep. Nevertheless, nightmares were the rarest sleep problem event. We also found that the occurrence of ADHD was about 3-4 times higher among those reporting having nightmares in all follow-ups. Corroborating our findings, nightmares were previously reported as an ADHD predictor.[44] Interesting, a neurocognitive evidence based model proposed that normal dreaming serves as a fear extinction function, then

nightmares would reflect failures in emotion regulation. [45]ADHD is highly associated with emotion dysregulation [46], which may indicate that emotion regulation mechanisms might link nightmares and ADHD. Emotion regulation's role should be addressed in further studies to better understand the mechanisms involved in the association between nightmares and ADHD.

Taking all together, the persistency of early sleep disturbances (i.e. having two or more points on early lifespan) might predict adolescent ADHD. This finding is similar to what was found by Miano et al. (2019), who used objective measures as polysomnographic recordings [47]. Additionally, we observed an important effect of persistent night terrors on ADHD and inattention/hyperactivity symptomatology. Sleep is a high-level cognitive process associated with frontal lobe functioning. [17,19,42,48] Inadequate sleep may lead to attention and executive function deficits, impulsivity and difficulty in modulating emotions and results in tiredness and a worst daily performance. [19,49,50] Clinical observations and experimental approaches corroborate that sleep-deprived children have cognitive and behavioral impairments that mimic Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)[51], and a significant negative effect on sustained attention. [17] In addition, poor sleep (i.e., poor sleep quality and quantity) has adverse effects on alertness, mood, learning, emotional processing, and cognitive functioning. [17,52]

Our results did not suggest a mediating effect of attention-related executive functions in the association between sleep disturbances and ADHD, nor an association between persistent sleep disturbances during childhood and attention related-executive functions at 11 years old. Our findings are similar to previous research that indicated that sleep and executive functions deficits predicted ADHD in independent ways.[22,23,53] Other studies which had tested the association between sleep phenotypes and executive functions, had also reported no significant association between sleep and attention measures. [17,54] We cannot ignore that most of the well documented positive evidence is about acute sleep-deprivation effects. [15,17,55] However, we tested chronic sleep-deprivation, thus, probably both chronic and acute sleep-deprivation have different effects on

neurocognitive measures, similar to what have been found for other chronic and acute circadian dysfunctions. [56]

Our findings must be interpreted in light of some potential limitations. First, we had missing data for approximately 25% of our baseline sample. However, the individual with missing data were from poorer families and more frequently born from single and depressive mothers (*i.e.* were in a vulnerability situation). They would probably have more sleep problems, ADHD and health issues, and our findings would not be super estimated. Although both objective and subjective sleep measures have a good concordance [57], only self-reported sleep data was available in our study and it might impact our results. [58] However, misclassification errors in maternal report about child sleep disturbances were probably non-differential in exposed and non-exposed children, thus if present such bias may have worked in the direction of underestimating the study results. We did not measure other executive function domains and our evaluation was only performance based. Previous research has reported that sustained attention was correlated with other executive functions, such as inhibitory control, cognitive flexibility and running span [59]. Nevertheless, our findings were limited to attention-related interpretations and we had no intention to extrapolated to executive functions in general.

On the other hand, we tested a potential causal pathway between sleep affecting ADHD in a population-based birth cohort with 11 years of follow-ups. We used longitudinal data to analyze the speculative and explanatory ADHD etiology model, especially the influence of persistent sleep disturbances during the early childhood over adolescent ADHD. We had highlighted that reporting sleep problems, and particularly nightmares, at two or more points on childhood might be important markers of ADHD on adolescence. Although both persistent sleep disturbances and attention related-EFs are important early behavior markers for neurodevelopmental disorders, as was reported before [60], in our sample attention related-executive functions did not mediate the

relation between early persistent sleep disturbances and ADHD, suggesting that these variables possible act through independent mechanisms to increase vulnerability for this disorder.

References

1. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*. 2007;164(6):942-948. doi:10.1176/ajp.2007.164.6.942
2. Posner J, Polanczyk G V., Sonuga-Barke E. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. Published online 2020. doi:10.1016/S0140-6736(19)33004-1
3. Erskine HE, Ferrari AJ, Polanczyk G V., et al. The global burden of conduct disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder in 2010. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. Published online 2014. doi:10.1111/jcpp.12186
4. Sayal K, Prasad V, Daley D, Ford T, Coghill D. ADHD in children and young people: prevalence, care pathways, and service provision. *The Lancet Psychiatry*. 2018;5(2):175-186. doi:10.1016/S2215-0366(17)30167-0
5. Hvolby A. Associations of sleep disturbance with ADHD: implications for treatment. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord*. 2015;7(1):1-18. doi:10.1007/s12402-014-0151-0
6. Coogan AN, McGowan NM. A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord*. Published online 2017. doi:10.1007/s12402-016-0214-5
7. Um YH, Hong S-C, Jeong J-H. Sleep Problems as Predictors in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Causal Mechanisms, Consequences and Treatment. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017;15(1):9-18. doi:10.9758/cpn.2017.15.1.9
8. Becker SP. ADHD and sleep: recent advances and future directions. *Curr Opin Psychol*. 2020;34:50-56. doi:10.1016/j.copsyc.2019.09.006
9. Becker SP, Tamm L, Epstein JN, Beebe DW. Impact of sleep restriction on affective functioning in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. Published online 2020. doi:10.1111/jcpp.13235
10. Carpena MX, Munhoz TN, Xavier MO, et al. The Role of Sleep Duration and Sleep Problems During Childhood in the Development of ADHD in Adolescence: Findings From a Population-Based Birth Cohort. *J Atten Disord*. 2020;24(4):590-600. http://files/3147/Carpena et al. - 2020 - The Role of Sleep Duration and Sleep Problems Duri.pdf
11. Armstrong JM, Ruttle PL, Klein MH, Essex MJ, Benca RM. Associations of child insomnia, sleep movement, and their persistence with mental health symptoms in childhood and adolescence. *Sleep*. 2014;37(5):901-909. doi:10.5665/sleep.3656
12. Williams KE, Sciberras E. Sleep and Self-Regulation from Birth to 7 Years: A Retrospective Study of Children with and Without Attention-Deficit Hyperactivity Disorder at 8 to 9 Years. *J Dev Behav Pediatr*. 2016;37(5):385-394. doi:10.1097/DBP.0000000000000281
13. Scott N, Blair PS, Emond AM, et al. Sleep patterns in children with ADHD: a population-based cohort study from birth to 11 years. *J Sleep Res*. 2013;22(2):121-128. doi:10.1111/j.1365-2869.2012.01054.x
14. Tso W, Chan M, Ho FK, et al. Early sleep deprivation and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Res*. 2019;85(4):449. https://www.nature.com/articles/s41390-019-0280-4
15. Goel N, Rao H, Durmer JS, Dinges DF. Neurocognitive Consequences of Sleep Deprivation. *Semin Neurol*. 2009;29(4):320-339. doi:10.1055/s-0029-1237117
16. Ahmed A, Whitley CB, Cooksley R, et al. Neurocognitive and neuropsychiatric phenotypes associated with the mutation L238Q of the alpha-L-iduronidase gene in Hurler-Scheie syndrome. *Mol Genet Metab*. 2014;111(2):123-127. doi:10.1016/j.ymgme.2013.11.014
17. Lowe CJ, Safati A, Hall PA. The neurocognitive consequences of sleep restriction: A meta-

analytic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;80. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.07.010
18. Cassoff J, Wiebe ST, Gruber R. Sleep patterns and the risk for ADHD: a review. *Nat Sci Sleep*. 2012;4:73-80. doi:10.2147/NSS.S31269
19. Sadeh A, Tikotzky L, Kahn M. Sleep in infancy and childhood: implications for emotional and behavioral difficulties in adolescence and beyond. *Curr Opin Psychiatry*. 2014;27(6):453-459. doi:10.1097/YCO.0000000000000109
20. Saletin JM, Jackvony S, Rodriguez KA, Dickstein DP. A coordinate-based meta-analysis comparing brain activation between attention deficit hyperactivity disorder and total sleep deprivation. *Sleep*. 2019;42(3). doi:10.1093/sleep/zsy251
21. Diamond A. Executive functions. *Annu Rev Psychol*. Published online 2013. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143750
22. Bolden J, Gilmore-Kern JE, Fillauer JP. Associations among sleep problems, executive dysfunctions, and attention-deficit/hyperactivity disorder symptom domains in college students. *J Am Coll Heal*. 2019;67(4). doi:10.1080/07448481.2018.1481070
23. Knight FLC, Dimitriou D. Poor Sleep Has Negative Implications for Children With and Without ADHD, but in Different Ways. *Behav Sleep Med*. 2019;17(4). doi:10.1080/15402002.2017.1395335
24. Cremone-Caira A, Root H, Harvey EA, McDermott JM, Spencer RMC. Effects of Sleep Extension on Inhibitory Control in Children With ADHD: A Pilot Study. *J Atten Disord*. 2020;24(4). doi:10.1177/1087054719851575
25. Kidwell KM, Hankey M, Nelson JM, Espy KA, Nelson TD. Child Executive Control as a Moderator of the Longitudinal Association Between Sleep Problems and Subsequent Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms. *J Pediatr Psychol*. 2017;42(10):1144-1155. doi:10.1093/jpepsy/jsx071
26. Santos IS, Barros AJD, Matijasevich A, Domingues MR, Barros FC, Victora CG. Cohort Profile: The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *Int J Epidemiol*. 2011;40(6):1461-1468. doi:10.1093/ije/dyq130
27. Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, et al. Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *Int J Epidemiol*. 2014;43(5):1437-1437f. doi:10.1093/ije/dyu144
28. Goodman R, Ford T, Richards H, Gatward R, Meltzer H. The Development and Well-Being Assessment: description and initial validation of an integrated assessment of child and adolescent psychopathology. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. 2000;41(5):645-655. http://files/2868/Goodman et al. - 2000 - The Development and Well-Being Assessment descrip.pdf
29. Goodman R. Psychometric properties of the strengths and difficulties questionnaire. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2001;40(11):1337-1345. http://files/2871/S0890856709605438.html
30. Psychiatric AA. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub; 2013. http://files/1795/Association - 2013 - Diagnostic and statistical manual of mental disord.pdf
31. Fleitlich-Bilyk B, Goodman R. Prevalence of Child and Adolescent Psychiatric Disorders in Southeast Brazil. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004;43(6):727-734. doi:10.1097/01.chi.0000120021.14101.ca
32. Manly T, Anderson V, Nimmo-Smith I, Turner A, Watson P, Robertson IH. The differential assessment of children's attention: The Test of Everyday Attention for Children (TEA-Ch), normative sample and ADHD performance. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. Published online 2001. doi:10.1111/1469-7610.00806
33. O'Connor TG, Caprariello P, Blackmore ER, et al. Prenatal mood disturbance predicts sleep problems in infancy and toddlerhood. *Early Hum Dev*. 2007;83(7):451-458.

http://files/2676/PMC2853892.html
34. Netsi E, Santos IS, Stein A, Barros FC, Barros AJD, Matijasevich A. A different rhythm of life: sleep patterns in the first 4 years of life and associated sociodemographic characteristics in a large Brazilian birth cohort. *Sleep Med*. 2017;37:77-87. doi:10.1016/j.sleep.2017.06.001
35. Halal CSE, Matijasevich A, Howe LD, Santos IS, Barros FC, Nunes ML. Short sleep duration in the first years of life and obesity/overweight at age 4 years: a birth cohort study. *J Pediatr*. 2016;168:99-103. http://files/2861/S0022347615011488.html
36. VanderWeele T. *Explanation in Causal Inference: Methods for Mediation and Interaction*. Oxford University Press; 2015. http://files/2918/books.html
37. Steinsbekk S, Wichstrom L. Stability of Sleep Disorders From Preschool to First Grade and Their Bidirectional Relationship with Psychiatric Symptoms. *J Dev Behav Pediatr*. 2015;36(4):243-251. doi:10.1097/DBP.0000000000000134
38. Gregory AM, Agnew-Blais JC, Matthews T, Moffitt TE, Arseneault L. ADHD and Sleep Quality: Longitudinal Analyses From Childhood to Early Adulthood in a Twin Cohort. *J Clin Child Adolesc Psychol*. 2017;46(2):284-294. doi:10.1080/15374416.2016.1183499
39. Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian rhythm abnormalities. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2013;19(1 Sleep Disorders):132. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654533/
40. Craig SG, Weiss MD, Hudec KL, Gibbins C. The functional impact of sleep disorders in children with ADHD. *J Atten Disord*. Published online 2017:1087054716685840. https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1087054716685840
41. Cortese S, Konofal E, Lecendreux M, et al. Restless legs syndrome and attention-deficit/hyperactivity disorder: a review of the literature. *Sleep*. 2005;28(8):1007-1013. https://academic.oup.com/sleep/article-pdf/28/8/1007/13662977/sleep-28-8-1007.pdf
42. Sadeh A, Pergamin L, Bar-Haim Y. Sleep in children with attention-deficit hyperactivity disorder: A meta-analysis of polysomnographic studies. *Sleep Med Rev*. Published online 2006. doi:10.1016/j.smrv.2006.03.004
43. Lee SH, Kim HB, Lee KW. Association between sleep duration and attention-deficit hyperactivity disorder: A systematic review and meta-analysis of observational studies☆. *J Affect Disord*. 2019;256. doi:10.1016/j.jad.2019.05.071
44. Grünwald J, Schlarb AA. Relationship between subtypes and symptoms of ADHD, insomnia, and nightmares in connection with quality of life in children. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017;13:2341-2350. doi:10.2147/NDT.S118076
45. Levin R, Nielsen T. Nightmares, bad dreams, and emotion dysregulation: A review and new neurocognitive model of dreaming. *Curr Dir Psychol Sci*. Published online 2009. doi:10.1111/j.1467-8721.2009.01614.x
46. Graziano PA, Garcia A. Attention-deficit hyperactivity disorder and children's emotion dysregulation: A meta-analysis. *Clin Psychol Rev*. Published online 2016. doi:10.1016/j.cpr.2016.04.011
47. Miano S, Amato N, Foderaro G, et al. Sleep phenotypes in attention deficit hyperactivity disorder. *Sleep Med*. 2019;60. doi:10.1016/j.sleep.2018.08.026
48. Stoffers D, Altena E, van der Werf YD, et al. The caudate: a key node in the neuronal network imbalance of insomnia? *Brain*. 2014;137(2):610-620.
49. Paruthi S, Brooks LJ, D'Ambrosio C, et al. Recommended amount of sleep for pediatric populations: a consensus statement of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2016;12(06):785-786.
50. Maski KP, Kotagal S, Kothare S V. The Science of Sleep: Ontogeny, Phylogeny, and More. In: *Sleep in Childhood Neurological Disorders*. EBSCO Publishing : eBook Collection (EBSCOhost); 2018:1-26.

51. Touchette E, Cote SM, Petit D, et al. Short Nighttime Sleep-Duration and Hyperactivity Trajectories in Early Childhood. *Pediatrics*. 2009;124(5):E985-E993. doi:10.1542/peds.2008-2005
52. El-Sheikh M, Buckhalt JA, Keller PS, Granger DA. Children's Objective and Subjective Sleep Disruptions: Links With Afternoon Cortisol Levels. *Heal Psychol*. Published online 2008. doi:10.1037/0278-6133.27.1.26
53. Cremone-Caira A, Buirkle J, Gilbert R, Nayudu N, Faja S. Relations between caregiver-report of sleep and executive function problems in children with autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Res Dev Disabil*. Published online 2019. doi:10.1016/j.ridd.2019.103464
54. Santisteban JA, Brown TG, Ouimet MC, Gruber R. Cumulative mild partial sleep deprivation negatively impacts working memory capacity but not sustained attention, response inhibition, or decision making: a randomized controlled trial. *Sleep Heal*. Published online 2019. doi:10.1016/j.sleh.2018.09.007
55. van der Meer D, Hoekstra PJ, van Donkelaar M, et al. Predicting attention-deficit/hyperactivity disorder severity from psychosocial stress and stress-response genes: a random forest regression approach. *Transl Psychiatry*. 2017;7(6):e1145. doi:10.1038/tp.2017.114
56. Tavares P de S, Carpena MX, Carone CM de M, Del-Ponte B, Santos IS, Tovo-Rodrigues L. Is social jetlag similar to travel-induced jetlag? Results of a validation study. *Chronobiol Int*. 2020;37(4):542-551. https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07420528.2020.1712413
57. Dashti HS, Jones SE, Wood AR, et al. Genome-wide association study identifies genetic loci for self-reported habitual sleep duration supported by accelerometer-derived estimates. *Nat Commun*. 2019;10(1):1100. https://www.nature.com/articles/s41467-019-08917-4
58. Díaz-Román A, Hita-Yáñez E, Buela-Casal G. Sleep characteristics in children with attention deficit hyperactivity disorder: systematic review and meta-analyses. *J Clin Sleep Med*. 2016;12(05):747-756. http://jcsm.aasm.org/viewabstract.aspx?pid=30624
59. Rey AE, Guignard-Perret A, Imler-Weber F, Garcia-Larrea L, Mazza S. Improving sleep, cognitive functioning and academic performance with sleep education at school in children. *Learn Instr*. Published online 2020. doi:10.1016/j.learninstruc.2019.101270
60. Micai M, Fulceri F, Caruso A, Guzzetta A, Gila L, Scattoni ML. Early behavioral markers for neurodevelopmental disorders in the first 3 years of life: An overview of systematic reviews. *Neurosci Biobehav Rev*. Published online 2020. doi:10.1016/j.neubiorev.2020.06.027

Tables

Table 1. Early sleep disturbances occurrence and mean (standard deviation) of attentionrelated executive function's domain among included participants of the 2004 Pelotas Birth Cohort participants

	N	%
Difficulty to sleep		
None	1722	54.6
1 follow-up	883	28.0
2 follow-ups	404	12.8
Always	147	4.7
Restless		
None	1301	41.2
1 follow-up	953	30.2
2 follow-ups	595	18.9
Always	307	9.7
Night terrors		
None	2270	72.0
1 follow-up	675	21.4
2 follow-ups	183	5.8
Always	26	0.8
Sleep deprivation		
None	2354	75.0
1 follow-up	643	20.5
2 follow-ups	118	3.8
Always	24	0.75
	N	Mean of time (minutes) (SD)
Attentional control	3088	6.83 (4.53)
Attentional switching	3121	5.19 (2.840)
Selective attention	3103	8.69 (2.02)

Table 2. Adjusted association between persistent sleep disturbances and ADHD and inattention/hyperactivity symptomatology at 11 Years of Age in the 2004 Pelotas Birth Cohort

	ADHD		**High inattention/hyperactivity symptoms**	
	OR*	CI95%	OR*	CI95%
Persistent difficulty to sleep	1.74	1.13; 2.66	1.55	1.22; 1.97
Persistent restless sleep	1.80	1.23; 2.64	1.95	1.58; 2.40
Persistent nightmares	2.26	1.33; 4.01	1.99	1.42; 2.78
Persistent sleep deprivation	1.14	0.52; 2.52	1.83	1.24; 2.71

* adjusted by maternal and birth-related characteristics adjustment: family wealth index, maternal age, maternal schooling, maternal marital status, maternal skin color, parity, alcohol intake and smoking during pregnancy, maternal nervous or depression symptoms in pregnancy, gestational age, child sex, and birth weight.

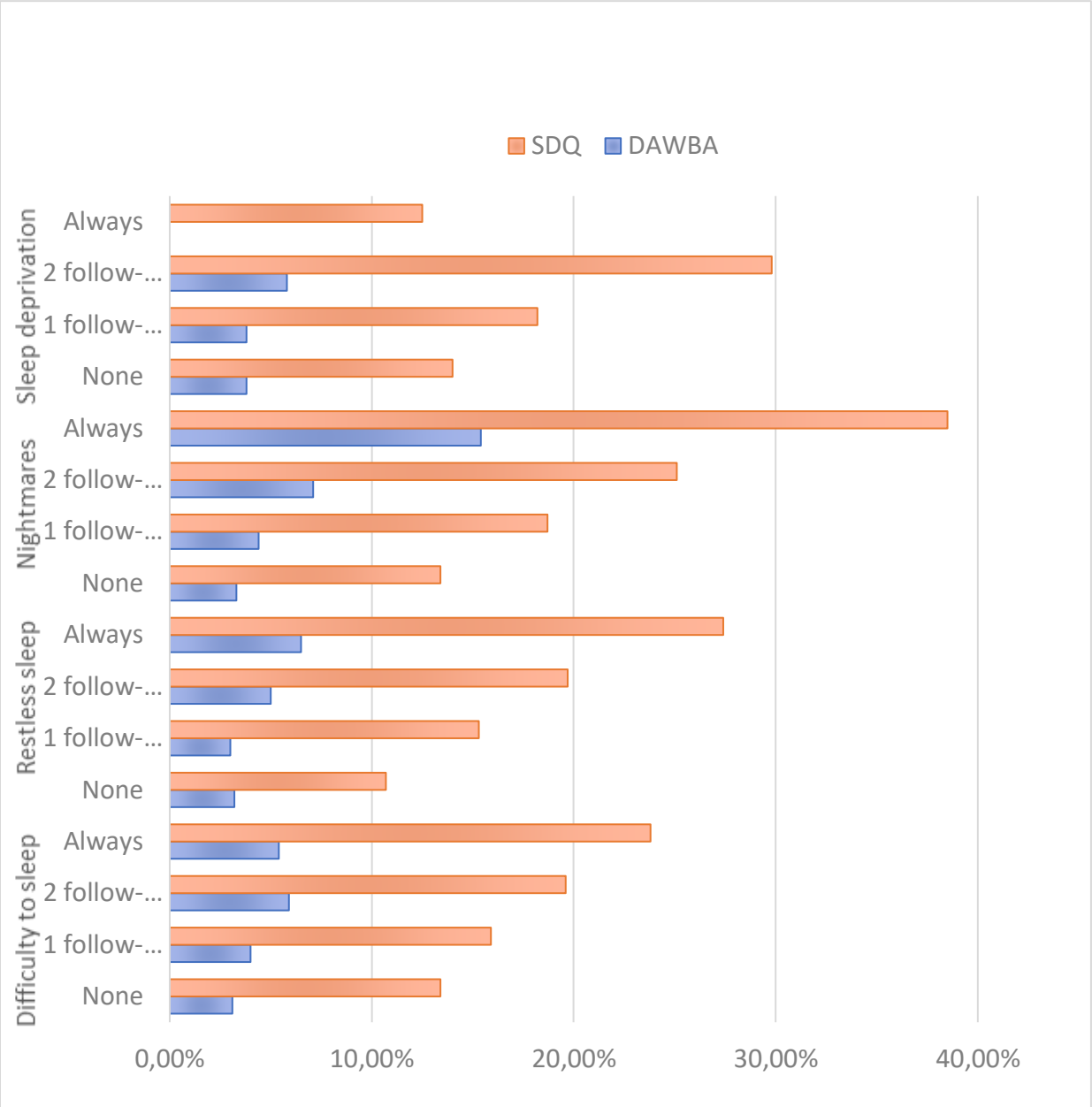


Figure 1. Prevalence of ADHD (assessed by DAWBA) and inattention/hyperactivity symptomatology (SDQ) according sleep disturbances report.

Table 3. Mediation models to evaluate the total, natural direct (NDE), controlled direct (CDE) and natural indirect (NIE) effects of persistent sleep disturbances on ADHD (DAWBA) and inattention/hyperactivity symptoms (SDQ) through attention-related executive functions

	Attentional control				**Attentional switching**				**Selective attention**			
	OR_{DAWBA}	95%CI	OR_{SDQ}	95%CI	OR_{DAWBA}	95%CI	OR_{SDQ}	95%CI	OR_{DAWBA}	95%CI	OR_{SDQ}	95%CI
Persistent difficulty to sleep												
CDE	**1,75**	**(1,03-2,81)**	**1,51**	**(1,15-1,96)**	**1,79**	**(1,09-2,83)**	**1,53**	**(1,17-1,97)**	**1,78**	**(1,06-2,79)**	**1,47**	**(1,13-1,89)**
NDE	**1,78**	**(1,08-2,74)**	**1,52**	**(1,16-1,95)**	**1,7**	**(1,01-2,63)**	**1,49**	**(1,13-1,89)**	**1,76**	**(1,05-2,74)**	**1,46**	**(1,10-1,87)**
NIE	0,99	(0,93-1,02)	0,99	(0,96-1,02)	1,00	(0,99-1,03)	1,00	(0,98-1,01)	1,00	(0,96-1,01)	1,00	(0,97-1,01)
Total	**1,77**	**(1,07-2,72)**	**1,51**	**(1,16-1,94)**	**1,7**	**(1,01-2,64)**	**1,49**	**(1,13-1,88)**	**1,75**	**(1,04-2,71)**	**1,46**	**(1,10-1,85)**
Persistent Restlessness												
CDE	**1,95**	**(1,22-2,99)**	**2,03**	**(1,61-2,53)**	**1,91**	**(1,23-2,92)**	**2,01**	**(1,58-2,48)**	**1,83**	**(1,17-2,79)**	**2,03**	**(1,60-2,52)**
NDE	**1,90**	**(1,21-2,86)**	**2,01**	**(1,60-2,50)**	**1,91**	**(1,23-2,87)**	**2,06**	**(1,61-2,56)**	**1,86**	**(1,19-2,80)**	**2,01**	**(1,58-2,48)**
NIE	0,99	(0,95-1,01)	0,99	(0,97-1,00)	0,98	(0,95-1,00)	0,98	(0,95-1,00)	0,99	(0,96-1,01)	1,00	(0,98-1,00)
Total	**1,89**	**(1,21-2,83)**	**1,99**	**(1,58-2,48)**	**1,88**	**(1,21-2,83)**	**2,03**	**(1,59-2,51)**	**1,85**	**(1,19-2,78)**	**2,01**	**(1,58-2,48)**
Persistent Night terrors												
CDE	**2,54**	**(1,28-4,53)**	**1,92**	**(1,33-2,73)**	**2,24**	**(1,04-3,94)**	**1,85**	**(1,26-2,61)**	**2,15**	**(1,02-3,80)**	**1,85**	**(1,28-2,61)**
NDE	**2,44**	**(1,22-4,08)**	**2,02**	**(1,40-2,84)**	**2,3**	**(1,08-3,94)**	**1,94**	**(1,32-2,76)**	**2,33**	**(1,08-4,13)**	**1,87**	**(1,26-2,69)**
NIE	1,01	(0,98-1,15)	0,98	(0,90-1,03)	1,01	(0,97-1,11)	1,01	(0,96-1,10)	1,01	(0,93-1,10)	1,00	(0,96-1,06)

Total	**2,46**	**(1,23-4,12)**	**1,98**	**(1,37-2,79)**	**2,33**	**(1,10-3,98)**	**1,97**	**(1,34-2,82)**	**2,35**	**(1,08-4,14)**	**1,87**	**(1,26-2,68)**
					Persistent sleep deprivation							
CDE	0,66	(0,14-1,62)	**1,7**	**(1,07-2,59)**	1,05	(0,32-2,24)	**1,79**	**(1,15-2,69)**	0,41	(0,00-1,19)	**1,73**	**(1,12-2,64)**
NDE	0,75	(0,17-1,71)	**1,76**	**(1,09-2,59)**	1,06	(0,32-2,21)	**1,79**	**(1,15-2,64)**	0,58	(0,05-1,59)	**1,8**	**(1,12-2,73)**
NIE	1,08	(0,98-1,40)	1,05	(0,99-1,20)	1,06	(0,98-1,22)	1,04	(0,99-1,17)	1,06	(0,90-1,45)	1,02	(0,97-1,14)
Total	0,81	(0,18-1,85)	**1,84**	**(1,14-2,76)**	1,12	(0,35-2,33)	**1,86**	**(1,19-2,72)**	0,62	(0,06-1,63)	**1,83**	**(1,14-2,79)**

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Comparison of maternal and birth-related characteristics between 2004 Pelotas Birth Cohort participants included and not included in the present analyses.

	Included (N= 3,159)	**Not included** (N=1,072)
	% (95%CI)	**% (95%CI)**
Wealth Index (quintile)		
1º (lower – poor)	19.6 (18.1-21.2)	29.0 (25.8-32.5)
2º	18.7 (17.3-20.3)	20.0 (17.2-23.1)
3º	20.6 (19.1-22.2)	15.3 (12.8-18.1)
4º	21.4 (19.9-23.1)	14.4 (12.0-17.2)
5º (highest – richest)	19.6 (18.1-21.2)	21.4 (18.5-24.5)
Schooling (complete years)		
0	0.8 (0.6-1.3)	1.5 (0.8-2.5)
1-4	13.8 (12.7-15.1)	16.8 (14.7-19.2)
5-8	41.1 (39.4-42.9)	42.0 (39.1-45.0)
9+	44.2 (42.4-45.9)	39.6 (36.7-42.6)
Maternal age (complete years)		
<20	18.6 (17.2-20.0)	19.9 (17.6-22.4)
20-34	67.2 (65.5-68.8)	69.5 (66.7-72.2)
≥35	14.3 (13.1-15.5)	10.6 (8.9-12.6)
Single mother (yes)	15.3 (14.0-16.6)	19.7 (17.4-22.2)
White Skin color	73.0 (71.4-74.5)	73.1 (70.3-75.7)
Parity ≥2 children (yes)	60.6 (58.8-62.2)	60.8 (57.8-63.7)
Maternal nervous or depression symptoms in pregnancy (yes)	24.0 (22.5-25.5)	28.2 (25.5-30.9)
Smoking during pregnancy (yes)	26.6 (25.1-28.2)	30.1 (27.4-32.9)
Alcohol during pregnancy (yes)	3.2 (2.6-3.8)	3.7 (2.8-5.1)
Children Sex, male	51.5 (49.9-53.3)	52.9 (49.9-55.9)
Low birthweight (yes)	8.0 (7.1-9.0)	16.0 (13.9-18.4)
Preterm birth (<37w)	13.1 (12.0-14.3)	18.7 (16.5-21.2)

Table S2. Description of sleep disturbances and attention-related executive functions according to Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and Inattention/hyperactivity symptoms

	ADHD		**Presence of inattention /hyperactivity symptoms**	
	N	%	N	%
Difficulty to sleep	p=0.042*		p<0.001**	
None	54	3.1%	231	13.4%
1 follow-up	35	4.0%	140	15.9%
2 follow-ups	24	5.9%	79	19.6%
Always	8	5.4%	35	23.8%
Restless	p=0.010*		p<0.001**	
None	42	3.2%	139	10.7%
1 follow-up	29	3.0%	146	15.3%
2 follow-ups	30	5.0%	117	19.7%
Always	20	6.5%	84	27.4%
Night terrors	p=0.001**		p<0.001**	
None	74	3.3%	304	13.4%
1 follow-up	30	4.4%	126	18.7%
2 follow-ups	13	7.1%	46	25.1%
Always	4	15.4%	10	38.5%
Short sleep duration	p=0.617+		p<0.001*	
None	91	3.8%	338	14.0%
1 follow-up	25	3.8%	120	18.2%
2 follow-ups	7	5.8%	36	29.8%
Always	0	0.0%	3	12.5%
	Beta***	p	Beta***	p
Attentional control	0.0047(0.002 - 0.008)	0.001	0.007(0.005 - 0.010)	<0.001
Attentional switching	0.013(0.009 - 0.018)	<0.001	0.015(0.011 - 0.020)	<0.001
Selective attention	0.0016(0.001 - 0.002)	<0.001	0.001(0.001 - 0.002)	<0.001

Note: * p-value from chi-square test; ** p-value from trend test; **oneway ANOVA ; + Fishers Exact test

Table S3. Description of sleep disturbances according attention-related executive function evaluation among 2004 Pelotas Birth Cohort

	Attentional control		Attentional switching		Selective attention	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Difficulty to sleep	p=0.566+		p=0.915+		p=0.822+	
None	6.9	4.5	5.2	2.9	8.8	21.1
1 follow-up	6.8	4.6	5.2	2.7	8.9	20.3
2 follow-ups	6.6	4.4	5.1	2.7	7.8	16.4
Always	7.1	4.8	5.3	3.1	8.3	17.9
Restless	p=0.389+		p=0.279+		p=0.461+	
None	6.8	4.5	5.3	2.8	8.6	20.9
1 follow-up	7.0	4.7	5.2	3.0	9.2	21.6
2 follow-ups	6.6	4.5	5.0	2.5	8.7	18.9
Always	6.8	4.3	5.1	3.0	7.1	13.4
Night terrors	p=0.569+		p=0.465+		p=0.924+	
None	6.9	4.5	5.2	2.8	8.7	20.3
1 follow-up	6.6	4.5	5.2	2.8	8.5	19.5
2 follow-ups	6.8	4.5	5.4	3.2	9.2	21.6
Always	6.5	3.8	5.8	3.5	11.0	19.7
Short sleep duration	p=0.012+		p=0.002+		p=0.349+	
None	6.7	4.6	5.1	2.7	8.4	19.8
1 follow-up	6.9	4.4	5.3	2.9	9.3	21.0
2 follow-ups	8.0	4.5	5.9	3.5	11.4	23.5
Always	5.7	4.7	6.4	5.0	7.2	11.0

ARTIGO 4.

Carpena, M. X., Hutz, M. H., Salatino-Oliveira, A., Polanczyk, G. V., Zeni, C., Schmitz, M., ... & Tovo-Rodrigues, L. (2019). CLOCK Polymorphisms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further Evidence Linking Sleep and Circadian Disturbances and ADHD. *Genes*, *10*(2), 88.

Artigo aceito em 22 de Janeiro de 2019 e publicado no dia 28 de Janeiro de 2019.

CLOCK Polymorphisms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further Evidence Linking Sleep and Circadian Disturbances and ADHD

Marina Xavier Carpena [1], Mara H. Hutz [2], Angélica Salatino-Oliveira [2], Guilherme V. Polanczyk [3], Cristian Zeni [4], Marcelo Schmitz [5], Rodrigo Chazan [6], Julia P. Genro [7], Luis Augusto Rohde [5], Luciana Tovo-Rodrigues [1,*]

1 Federal University of Pelotas, Post-graduate Program in Epidemiology, Pelotas 96020-220, Brazil; marinacarpena_@hotmail.com
2 Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Genetics , Porto Alegre 915010-970, Brazil; mara.hutz@ufrgs.br (M.H.H), geli.oliveira@gmail.com (A.S.-O.)
3 Universidade de Sao Paulo, Faculdade de Medicina FMUSP, Department of Psychiatry, Sao Paulo 05403-903, Brasil; gvp@usp.br
4 University of Texas Health Sciences Center at Houston, Texas 75457, TX, USA; cpzeni@gmail.com
5 Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Psychiatry, Child & Adolescent Psychiatry Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-007, Brazil; maschmitz@hcpa.edu.br (M.S.), lrohde@terra.com.br (L.A.R.)
6 Federal University of Rio Grande do Sul, Post-graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, Porto Alegre 90035-007, Brazil; rchazan@yahoo.com
7 Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre 90050-170, Brazil; juliagenro@hotmail.com
* Correspondence: luciana.tovo@gmail.com; Tel.: +55-53-32841300 Received: 1 November 2018; Accepted: 22 January 2019; Published: 28 January 2019.

Abstract: Circadian and sleep disorders, short sleep duration, and evening chronotype are often present in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *CLOCK*, considered the master gene in the circadian rhythm, has been explored by few studies. Understanding the relationship between ADHD and *CLOCK* may provide additional information to understand the correlation between ADHD and sleep problems. In this study, we aimed to explore the association between ADHD and *CLOCK*, using several genetic markers to comprehensively cover the gene extension. A total of 259 ADHD children and their parents from a Brazilian clinical sample were genotyped for eight single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CLOCK* locus. We tested the individual markers and the haplotype effects using binary logistic regression. Binary logistic and linear regressions considering ADHD symptoms among ADHD cases were conducted as secondary analysis. As main result, the analysis showed a risk effect of the G-A-T-G-G-C-G-A (rs534654, rs1801260, rs6855837, rs34897046, rs11931061, rs3817444, rs4864548, rs726967) haplotype on ADHD. A suggestive association between ADHD and rs534654 was observed. The results suggest that the genetic susceptibility to circadian rhythm attributed to the *CLOCK* gene may play an important role on ADHD.

Keywords: *CLOCK* gene; ADHD; circadian rhythm; sleep problem; inattention symptoms; genetic; complex diseases; Latin America

1. Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common neurodevelopment disorders during childhood and adolescence, affecting ~5% of people at this age worldwide [1]. ADHD core symptoms, characterized by inattention, hyperactivity, and impulsivity, are associated with cognitive impairments. A high prevalence of comorbidities is reported, making ADHD a complex and heterogeneous phenotype [2]. Sleep/circadian rhythm problems are among the medical conditions associated with ADHD that have recently received attention. Individuals affected by ADHD more often present with circadian and sleep disorders, are short sleepers, and frequently present evening chronotype [3–5]. For example, 55–75% of parents reported sleep quality changes in their children with ADHD [6–8].

The circadian rhythm comprises a regulation underlying a 24 hour-physiological cycle, including metabolism, body temperature, hormone secretion, and sleep/wake patterns in mammals, and it is especially important for sleep behavior [9,10]. It is also controlled by a complex system of molecular regulation with a master precursor, located in the suprachiasmatic nucleus (NSQ) of the anterior hypothalamus. *CLOCK* is one of the most important genes of the endogenous master clock system. The main function of this gene relies on the transcription activation of downstream core clock genes and on the promotion of rhythmic chromatin opening, also regulating DNA accessibility of other transcription factors [11]. In humans, the *CLOCK* gene has already been associated with the evening chronotype as well as with some circadian and sleep disorders, such as delayed sleep phase syndrome [11].

Animal experiments concerning the *CLOCK* gene provide putative mechanistic links between circadian/sleep disorder and ADHD pathophysiology [12–15]. An important role of *CLOCK* in neuronal function, mainly in dopamine output regulation, has been demonstrated [13,16]. Furthermore, methylphenidate and atomoxetine, two drugs efficacious to treat ADHD, induced modification in CLOCK as well as in other circadian genes' expression, providing additional evidence linking circadian system regulation and ADHD [12,14,15].

The nature of the association between sleep and circadian problems and ADHD is unclear [3]. An understanding of the role of relevant molecular mechanisms for the association between both phenotypes may provide important information to predict ADHD or sleep problems. Few candidate gene studies in humans have explored such mechanisms, and the CLOCK gene has been the most investigated [11,17–19]. All studies investigating the association between the CLOCK gene and ADHD focused only on one genetic variant: The 3'UTR rs1801260 SNP. Only one study has evaluated several variants and observed a haplotype effect [17]. A risk effect of the T allele on the ADHD phenotype was consistent among these studies [11,17–19].

The association studies between *CLOCK* and ADHD described above used European and/or Asian samples. Population genetic structure, allele frequency, and heritability could vary across populations around the world [20], stressing the need for replication studies in order to clarify gene function in the phenotype. For instance, in other psychiatric disorders, where the *CLOCK* gene is more explored, ancestry seems to be an important factor in understanding the mixed results. The association direction and magnitude seem to be highly impacted considering ancestry [11]. To the best of our knowledge, the association between the *CLOCK* gene and ADHD has never been explored in admixed populations, especially from Latin America. Therefore, we aimed to explore the association between the *CLOCK* gene and ADHD, using several genetic markers to comprehensively cover the gene extension in Brazilian patients with ADHD.

2. Material and Methods

2.1. Sample

A sample of 259 Brazilian probands with ADHD and their parents were enrolled in this study. The probands were recruited at the ADHD Outpatient Program (ProDAH) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). ADHD was diagnosed according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) criteria [21]. The assessment process followed a previously reported threestage protocol [22], including the application of semi-structured diagnostic interviews (Schudule for Affective Disorders and Schizophrenia for Scholl Aged Children Present and Lifetime Version - KSADSPL) by trained research assistants, and clinical assessments by experienced child psychiatrists. The Swanson, Nolan, and Pelham Scale-Version IV (SNAP-IV) was rated by child psychiatrists blinded to genotype to assess symptom severity. This scale is made up of nine items both in the inattention and hyperactive/impulsivity symptom domains and the wording is based on DSM-IV. Each SNAP-IV item is rated on a scale from absence of (score = 0) to severe symptoms (score = 3). This scale has been frequently used [22–24] and recently validated and is considered as a reliable scale in a Brazilian sample [25].

2.2. DNA and Genotyping

Blood samples were collected from probands and their parents. DNA was extracted from lymphocytes by standard procedures [26]. DNA from all samples was quantified by spectrophotometry using NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Infinium PsychArray-24 BeadChip, an array developed for studies focused on psychiatric predisposition and risk, was used to genotype both children and parents, in a total of ~593,260 markers. Quality control and imputation were done using the Rapid Imputation Consortium Pipeline (Ricopili), a pipeline developed and used by the Psychiatric Genome Consortium (PGC, available at https://github.com/Nealelab/ricopili), which covers both individual and markers quality control (QC). The filters used before imputation refer to Hardy–Weinberg equilibrium (HWE)-*p*-value < 1×10^{-6} calculated from founders and exclusion of invariant variants.

The Brazilian sample comes from a population of essentially European ancestry with little evidence of African or Native American admixture. The Principal Component Analysis considering genotyped markers shows an overlap between the Brazilian samples and the European population from 1000 Genomes Project (Figure S1). Additional markers were imputed using 1000 Genomes Project European population phase 3 as a reference panel. After imputation, we obtained a total of 11,799,192 variants.

For the secondary analysis considering symptoms' severity (see 2.5. Secondary Analyses section), an adjustment for the Principal Components to control for population stratification was done. The Principal Components Analysis was carried out considering all genotyped and imputed markers using the following filters: Missing rate of 0.1, a quality INFO higher than 0.8, and HWE *p*-value higher than 1×10^{-6}.

2.3. Genetic Markers

In order to examine the *CLOCK* gene extension, markers included in the Infinium PsychArray-24 BeadChip inside the *CLOCK* gene and those 10kb upstream and downstream the gene with valid genotype in more than 90% of the sample were included in the analysis. In total, eight genotyped single nucleotide polymorphisms (SNPs) were included.

2.4. Statistical Analysis

For the 259 trio data, we applied a case-pseudo control design, which is an alternative procedure to the genotype transmission/disequilibrium test in which the pseudo control is created with the nontransmitted alleles from the parents [27]. Allele and genotypic frequencies were estimated by counting in children. Hardy-Weinberg was estimated by X^2 test, implemented in PLINK 1.9 software [28,29].

In order to estimate the effect of individual markers, binary logistic regression was performed using an additive genetic model. The estimates are given through the odds ratio (OR), 95% confidence interval, and *p*-value. These analyses were performed using PLINK 1.9 [28]. The *p*-value for multiple tests was estimated by Type 1 Error Calculator GEC [30], a Java-based application developed to address multiple-testing issue with dependent SNPs. Based on linkage disequilibrium, it provides the independent

number of tests or redundancy degree in a set of dependent SNPs as well as the *p*-value thresholds to declare significant SNPs for association in a set of dependent p-values. For our set of markers, a total of six effective number of markers was detected. According to GEC, the *p*-value threshold for significance was set at 0.0081 and, suggestive, at 0.0162. Since pseudo controls are perfectly matched to each case, no covariates were used in the association analysis.

Linkage disequilibrium and visualization were done by Haploview [31]. Haplotype analyses were performed using UNPHASED 3.1.7 software [32]. The global and individual tests for haplotypes are reported. The first is a global, or omnibus, test of whether any haplotypes are associated, estimated by a likelihood ratio test. The *p*-value is the probability of observing a likelihood ratio statistic at least as large as this one, if the null hypothesis was true. Then, the estimated haplotype effects against the reference are reported by OR and their 95% confidence interval. For the haplotype analyses only, haplotypes with a frequency higher that 0.01 were considered.

2.5. Secondary Analyses

As a secondary analysis, we explored the symptomatology of hyperactivity/impulsivity, inattention and total ADHD in patients (obtained from KSADS-PL). Symptom data was available for 221 subjects. To analyze this data, two regressions were considered: Binary logistic and linear regressions. First, the symptoms were categorized using the percentile 50%. Since we identified that from this percentile, the symptom number showed a greater difference, we were able to split the sample into higher and lower scores (Table S1). The cut-off used for inattention was 9, for hyperactivity/impulsivity, 8, and for global ADHD, 14 symptoms. Alternatively, a linear regression was performed using the number of symptoms as the outcome. These analyses were adjusted for sex, age, and genomic ancestry, using the first five principal components described above.

2.6. In Silico Functionality Analysis

In order to provide further information about the putative function of each marker included in this study, we used the regulatory information provided by Regulome DB HaploReg v4.1 [33], those general annotated in Varian Effect Predictor (VEP) [34] and Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) [35]. The assembly GRCh37 and RefSeq NM_004898.3 were used as a reference. HaploReg [33] is a tool for exploring annotations of the noncoding genome in variants. Information on the chromatin state and protein binding annotation from the Roadmap Epigenomics and ENCODE projects are functional evidence integrated in this dataset. RegulomeDB [36] is a database of SNPs with known and predicted regulatory elements integrating data from GEO, the ENCODE project, and published literature in the intergenic regions of the *H. sapiens* genome. It attributes a score for functionality, which varies from 1 to 6 and the lower the value, the higher the probability of impact in a regulatory site. VEP determines the effect of variants (SNPs, insertions, deletions, CNVs, or structural variants) on genes, transcripts, and protein sequences, as well as regulatory regions. The CADD v1.4 provides a measure of variant deleteriousness namely the normalized score, PHRED, with higher values indicating that a variant is more likely to have deleterious effects [35].

2.7. Research Ethics

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Project identification code 45210715.1.0000.5327) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The parents provided written informed consent and probands provided verbal assent to participate.

3. Results

Table 1 shows the demographic and health characteristics of the probands included in the study. Most children were boys (76.4%), almost half were diagnosed with ADHD combined subtype (47.1%), and 83.4% had white skin color. The mean age was 10.42 years old (range: 4–17).

Table 1. Sample characterization according to demographic variables and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) presentations.

	Variable N	N (%) Mean (Standard Deviation, SD)
Age(years), mean (SD)	259	10.42 (3.2)
IQ, mean (SD)	255	93.52 (13.1)
Gender, N male (%)	259	198 (76.4)
Skin color	259	
White, N (%)		216(83.4)
Brown or Black, N (%)		43 (16.6)
ADHD presentations	259	
Inattentive, N (%)		114(44.0)
Hyperactive, N (%)		13 (5.0)
Combined, N (%)		122 (47.1)
Subthreshold N (%)		10 (3.9)
Comorbid Conditions Conduct Disorders, N (%)	258	36 (13.9)
Opossitional Defiant Disorders, N (%)	258	92 (35.5)
Mood disorders, N (%)	241	23 (8.9)
Anxiety disorders, N (%)	241	72 (27.8)

The results for the association analysis considering the eight markers included in the study are shown in Table 2. None of the markers reached the significance level considering multiple tests correction. A suggestive association emerged from rs534654, with the A as the risk allele (OR = 1.54; IC95% = 1.11–2.12).

Table 2. Effect of allele frequency and Hardy-Weinberg deviation statistics in ADHD cases, and binary logistic regression association estimates considering ADHD cases and pseudo control design (N = 259 cases and 259 pseudo controls).

SNP	Location	Position Regarding *CLOCK* Gene	EA	RA	FREQ EA*	HWE (*p*value)	OR (95% CI)	*p*
rs534654	56290220	3848 bp downstream	A	G	0.226	0.593	1.54 (1.11–2.12)	0.010
rs1801260	56301369	exon 23 (3'UTR)	G	A	0.253	0.252	0.87 (0.66–1.15)	0.329
rs6855837	56319244	exon 15	T	G	0.048	0.456	1.96 (0.99–3.86)	0.054
rs34897046	56325365	exon 10	C	G	0.029	0.188	0.79 (0.40–1.56)	0.492
rs11931061	56338793	intron 7	G	A	0.402	0.120	1.180 (0.92–1.51)	0.188
rs3817444	56375981	intron 2	A	C	0.344	0.075	1.059 (0.82–1.36)	0.655
rs4864548	56413803	727 bp upstream	A	G	0.344	0.681	0.911 (0.71–1.18)	0.473
rs726967	56421713	8637 pb upstream	T	A	0.334	0.094	1.068 (0.83–1.37)	0.608

* The allele frequency and HWE are presented for cases (probands) only; EA: Effect allele for the present study; RA: Reference allele for the present study; FREQ EA: Effect allele frequency; HWE: HardyWeinberg Equilibrium; SNP: Single nucleotide polymorphism; OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval; GRCh37: Genome reference assembly. Alleles considering the forward strand as reference. The allele frequency in the European, African, and American populations form 1000 Genome Project are shown in the Table S2.

Figure 1 shows the linkage disequilibrium pattern in the *CLOCK* locus. High pairwise D' values were observed, and all SNPs were in a single block. The global association test suggested a significant effect for at least one haplotype ($p = 0.027$). The individual haplotype effect showed that G-A-T-G-G-CG-A was considered as a risk genetic factor for ADHD (OR = 2.15, IC95% = 1.04; 4.43) (Table 3).

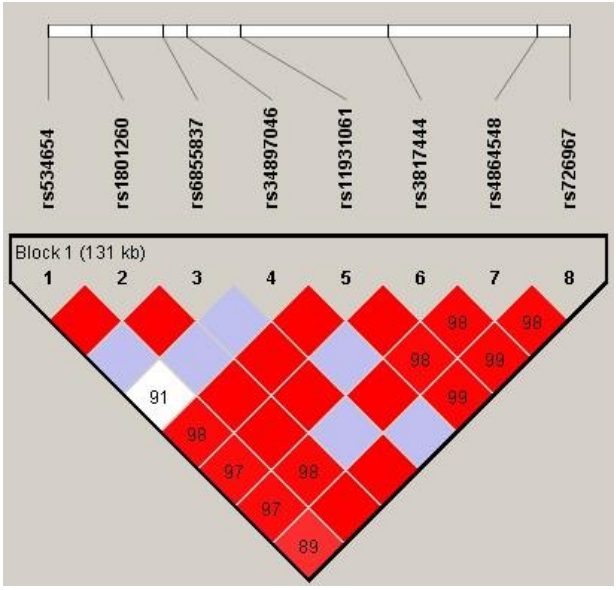


Figure 1. Linkage disequilibrium for the *CLOCK* locus for familial data. The standard Haploview LD color scheme based on D′ and log of the likelihood odds ratio (LOD) is used and the value of 100 × D′ for each SNP pair is given in its respective tile unless D′ = 1. Color scheme: bright red: D′ = 1, LOD ≥ 2; blue: D′ = 1, LOD < 2, shades of pink/red: D′ < 1, LOD ≥ 2; white: D′ < 1, LOD < 2.

Table 3. Haplotype association analysis considering cases and pseudo control design (N = 259 cases and 259 pseudo controls).

Haplotype *	Haplotype Frequency **	OR (95% CI)
G-A-G-G-A-C-A-A	0.314	1
G-G-G-G-A-C-G-A	0.255	0.92 (0.66–1.27)
A-A-G-G-G-A-G-T	0.213	1.43 (1.00–2.07)
G-A-G-G-G-A-G-T	0.125	0.77 (0.52–1.15)
G-A-T-G-G-C-G-A	0.050	2.15 (1.04–4.43)
G-A-G-C-A-C-A-A	0.030	0.82 (0.40–1.66)
A-A-G-G-G-A-G-A	0.012	1.24 (0.37–4.14)

* Haplotype considering markers in the following order: rs534654, rs1801260, rs6855837, rs34897046, rs11931061, rs3817444, rs4864548, rs726967. Alleles considering the forward strand as the reference; ** Haplotype frequencies for cases.

3.1. Secondary Analysis

The logistic regression model for symptomatology showed that three SNPs were nominally associated with inattention symptoms: rs11931061 (risk allele G; OR = 1.561; CI95%: 1.046; 2.329), rs3817444 (risk allele A; OR = 1.60; CI95%: 1.06; 2.42), and rs726967 (risk allele T; OR = 1.57; CI95%: 1.03; 2.37) (Table 4). The last two were also marginally associated when linear regression was performed (Table S3). However, in general, the results were not consistent between both regression models.

Table 4. Results for secondary analysis exploring the association between *CLOCK* variants and inattention, hyperactivity, and total ADHD symptoms in the ADHD probands sample (N = 221).

		Inattention		**Hyperactivity**		**ADHD**	
SNP	EA	OR (95%CI95)	*p*	OR (95%CI95)	*p*	OR (95%CI95)	*p*
rs534654	A	1.53 (0.94–2.5)	0.088	1.157 (0.71–1.90)	0.565	1.16 (0.72; 1.88)	0.534
rs1801260	G	0.70 (0.45–1.10)	0.122	0.774 (0.49–1.22)	0.265	0.80 (0.52; 6.93)	0.309
rs6855837	T	1.51 (0.55–4.15)	0.424	2.654 (0.94–7.47)	0.064	2.37 (0.81; 6.93)	0.117
rs34897046	C	1.16 (0.39–3.43)	0.836	0.955 (0.32–2.89)	0.934	1.04 (0.36; 3.03)	0.936

rs11931061	G	1.56 (1.05–2.33)	0.029	1.289 (0.87–1.20)	0.210	1.469 (0.99; 2.17)	0.054
rs3817444	A	1.60 (1.06–2.42)	0.026	1.117 (0.74–1.68)	0.597	1.39 (0.93; 2.08)	0.107
rs4864548	A	0.84 (0.55–1.29)	0.433	0.954 (0.63–1.46)	0.829	0.816 (0.54; 1.23)	0.335
rs726967	T	1.57 (1.03–2.37)	0.035	1.096 (0.73–1.66)	0.663	1.38 (0.92; 2.07)	0.117

* Adjusted for five first principal component analysis (PCA), sex and age; binary logistic regression analysis. Cutoffs and sample-sizes: Inattention > = 9 symptoms (75 cases and 146 controls); Hyperactivity > = 8 symptoms (83 cases and 138 controls; global ADHD > = 14 symptoms (99 cases and 122 controls).

3.2. In Silico Functionality Analysis

In silico analyses were performed to predict the functionality of the *CLOCK* variants to better explore our results. According to HaploReg and RegulomeDB data, rs4864548 and rs1801260 are placed in regulatory sites (Table S4). rs4864548 is located at position 727 upstream of the gene. It was observed to be placed in the region of promoter marks in 23 tissues and enhancer marks in two tissues. It is also considered an eQTL for the *CLOCK* gene in several tissues (esophagus mucosa, lung, tibial nerve, skin, and thyroid). rs1801260 is a 3′ UTR variant placed in a site of interaction with CTCF, BATF, and STAT3 proteins. It is also an eQTL for *CLOCK*.

Considering the regulatory regions specific in brain tissue, both markers are placed in active domains of chromatin (Table S5). The active site (based on the Roadmap Epigenomics Consortium 25state mode) for rs4864548 is 2_PromU, which is present in all the available brain regions and developmental stages, and, for rs1801260, it is 11_TxEnh3, which is present only in adult brain regions.

According to CADD, the highest scores are observed for the coding variants (rs6855837, placed in exon 15, and rs34897046, placed in exon 10; Table S4). Both are missense variants. However, there was no strong suggestion of a damaging effect on protein by both predictions using PolyPhen and SIFT included in VEP.

Considering the rs534654 variant, histone promoter marks were identified in brain tissue; However, it has low probability of affecting regulatory function according to RegulomeDB and has low scores in CADD. Elusive functional regulatory function was observed for rs3817444 and rs726967, for which histone marks were observed in other tissues except the brain. The rs11931061 is placed in an intronic region and no potential functional impact can be inferred for this marker according to the tools used in this study (Table S4 and S5).

4. Discussion

In this study, we tested the association between the *CLOCK* gene and ADHD using family data. We included several genetic markers to comprehensively cover the gene extension. Our results point toward a haplotype risk effect of the gene on ADHD. Considering individual markers, a suggestive role of rs534654 on ADHD susceptibility was observed.

Several lines of evidence link the *CLOCK* gene with ADHD. First, the *CLOCK* gene has an important function in dopaminergic regulation as well as in neurocognitive function, both pathways linking wake/sleep patterns to ADHD etiology [13,16]. Second, the expression of genes involved in neuronal migration is regulated by *CLOCK*, and its dysregulation was reported to disrupt coexpressed gene networks implicated in neuropsychiatric disorders [37]. The literature has also reported that the circadian rhythm may play an essential role on the effect of ADHD treatment medication [4,38]. Finally, in humans, an association between the *CLOCK* gene and psychiatric disorders has already been reported [3,5]. For ADHD, only three studies showed an association of the rs1801260 T allele with ADHD [17–19].

We covered markers in a block of 131kb in the *CLOCK* gene loci, showing a high pairwise linkage disequilibrium. Our haplotypic analysis suggests that the *CLOCK* gene may play a role on ADHD. The haplotype, G-A-T-G-G-C-G-A (rs534654, rs1801260, rs6855837, rs34897046, rs11931061, rs3817444, rs4864548, rs726967), was associated with an increased ADHD risk. According to in sillico functionality analysis, many variants in this haplotype present a putative functional role, mainly rs4864548, rs1801260,

rs6855837, and rs34897046. None of the eight variants was significantly associated with ADHD when analyzed separately. The only study in the literature exploring haplotypes in ADHD observed that a single haplotype block, covering 73 kb (rs3805148 (A/C), rs12504300 (C/G), rs4864542 (C/G), and rs12649507 (A/G)), was associated with inattention symptoms [17].

Although the functional molecular role in vivo and in vitro presents compelling findings linking the gene with ADHD etiology, the mechanism through which sleep/circadian rhythms problems affect ADHD still needs to be elucidated. The most consolidated theory about the association between circadian rhythm and ADHD is that sleep deprivation and circadian disorders would lead to a deficit in pre-frontal cortex executive functions, which at the pathological level, would represent ADHD symptoms [3,39,40]. Our results of the markers were not robustly and consistently associated with specific ADHD symptoms. Further studies exploring the association with *CLOCK* and other clock genes and ADHD subtypes are needed.

The SNP rs534654 showed the strongest individual association signal in our study. However, this SNP did not survive to multiple test correction. This variant has never been tested in ADHD. It was already reported as nominally significantly associated with bipolar disorder in a genome-wide association study [41] and in a family based study [42]. It was also observed to interact with rs6442925 in the *BHLHB2* gene and rs1534891 in the *CSNK1E* gene in association with bipolar disorder.

Considering the markers with potential regulatory effects in the *CLOCK* gene, we were not able to find any study exploring the SNP rs4864548 in ADHD susceptibility. On the other hand, the studies concerning ADHD were mostly conducted with rs1801260. It is of note that we were not able to replicate the previous findings, which observed an association with rs1801260 (3111T/C). This polymorphism is located in an interaction site with miRNA-182 [43,44], an important region for mRNA stability, expression, and function [11]. Increasing evidence has shown that miRNA-182 may play a role in the regulation of synaptic protein synthesis in long-lasting plasticity, modulating synaptic plasticity [45], as well as maintaining neural physiological function and maturation [46,47]. Furthermore, miRNA-182 was associated with some neurological and psychiatric phenotypes, such as depression [46–49].

Kissling et al. (2008) and Xu et al. (2010) found a risk effect of the T allele of rs1801260 on ADHD in a clinical European adult sample and a clinical European and Asian child sample, respectively. Jeong et al.(2014) also observed that rs1801260 (T allele) was associated with ADHD scores in an Korean adult sample [17]. These three studies are all case-control designed with a gene-candidate approach. Although the direction of association in our analysis was consistent with the previous reported, we found no association between this variant and ADHD in this study. Despite the possible low power limitation, it is possible that other variants may be important in our sample, as suggested by haplotypic analysis [11].

Our results should be interpreted considering its limitations. The first is related to sample size. We studied a small clinical sample and our potential to find positive association was limited due to limited statistical power. However, it is important to note that the sample sizes of other studies involving the *CLOCK* gene and ADHD are comparable to ours [18,19]. Second, we lacked sleep/biological rhythm information. The inclusion of sleep habits/other circadian characteristic variables would benefit the analysis. It would be possible, for example, to explore mechanisms that may explain the association, such as a mediation effect of sleep patterns. Finally, working with admixed population may incur population stratification problems [27]. However, the family-based association design of our study is robust against stratification.

It is important to highlight that the *CLOCK* gene was neither associated with ADHD nor with chronotype, sleep duration, or sleep disorders in the most comprehensive and recent Genome-wide association studies (GWAS) [50–53]. Although we cannot discard that our findings might reflect spurious associations, some issues deserve to be mentioned. First, it is considered the master gene in the circadian rhythm and its function has been well studied in animal experiments [11]. Second, the *CLOCK* gene may be a peripheric gene of small effect on ADHD, involved in the regulation of core genes, as proposed by the omnigenic model of complex traits [54]. Then, even though it may play a role in ADHD,

GWASs may have small power to detect it as statistically significant. Also, considering the highly polygenic genetic architecture of ADHD, gene−gene interactions, gene−environment interactions, or gene−environment correlations may also be important to explain the ADHD heritability [7,55]. For *CLOCK*, the literature is scarce and studies aiming to explore it are needed. Additionally, it is possible that the *CLOCK* gene may be more related to a specific ADHD subtype, as our study suggests its relevance for inattention, and the use of global ADHD phenotypes would mask the *CLOCK* gene effect in this disorder.

To the best of the authors' knowledge, this is the first study to explore the relationship between several *CLOCK* gene polymorphisms and ADHD phenotypes in a non-European and non-Asian sample. Brazil is a country of continental proportions and unique populational admixture characteristics. The population has originated from a tri-ethnic parental populations (Native Americans, Africans, and Europeans), which resulted in one of the most admixed and heterogeneous populations in the world [56]. Within a country of continental size, like Brazil, population composition varies widely among regions, as may be generally expected from Brazilian history. More European influence is observed in the south, while the African contribution predominates in the northeast and the Amerindian in the north. Our sample from the south of Brazil was composed by a majority of European ancestry, presenting little evidence of African or Native American admixture [57–59]. Admixed populations are a challenge concerning genetic association studies. Several genetic factors, such as LD patterns and allele frequencies, may vary across populations [60], which have been previously presented for the *CLOCK* gene [11]. Furthermore, effect sizes may differ among populations, at least for some traits, and allelic heterogeneity could have an important impact on the generalizability potential of association results across populations. Failures in transferability findings for admixed Hispanics/Latinos have been clearly demonstrated for polygenic risk scores [60] Therefore, the differences between our findings to the previous ones reported may arise from that. The GWASs published to date were conducted in European ancestry population. Considering the populational and generalizability factors discussed above, one cannot exclude the possibility of *CLOCK* being important for these phenotypes in other population ancestries.

In conclusion, we provided additional evidence suggesting a putative role of *CLOCK* and circadian rhythm/sleep problems in ADHD. It is plausible to expect that the relation between sleep/circadian rhythm phenotypes and ADHD may arise from a polygenic complex mechanism involving several clock genes as well as different SNPs, besides the regulation through the *CLOCK* gene. Further studies, especially based on genome-wide approaches, are needed to clarify the role of *CLOCK*, other clock genes, and sleep phenotypes in ADHD clinical subtypes in different populations.

Supplementary Materials: Table S1: Symptoms distribution in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) probands sample (N = 221). Table S2. Allele frequency information for European, African and American continental populations for the *CLOCK* variants explored in this study (data collected from 1000 Genomes Project Phase 3). Table S3: Linear regression results considering the number of Inattention, Hyperactivity and Total Attention Deficit Hyperactivity Disorder symptoms in probands sample (N = 221). Table S4. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) functional information collected by online source (RegulomeDB, Haploreg v4.1, VEP and CADD v1.4). Table S5. Regulatory sites available for the eight SNPs in *CLOCK* locus in brain regions using HaploReg v4.1. Figure S1 PCA plot using genotyped markers (pre-imputation) for the Brazilian trio samples European, American, African and Asian genotype information from 1000 Genomes Project.

Author Contributions: M.X.C. and L.T.R. conceived and designed the study. M.X.C., L.T.R. and A.S.O. conducted statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript. A.S.O, J.P.G., L.A.R., G.V.P., C.Z., M.S., R.C. and M.H.H. revised critically the manuscript. L.A.R. and M.H.H. provided funding for the project. All co-authors provided critical feedback on the manuscript, suggested additional analyses and critical revisions, and edited the manuscript for clarity and precision. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Funding: This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)*—Finance Code 001". It was also supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflicts of Interest: L.A.R. has been a member of the speakers' bureau/advisory board and/or acted as a consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Medice, Novartis and Shire in the last three years. He receives authorship royalties from Oxford Press and ArtMed. He has also received travel awards from Shire for his participation in the 2018 APA meetings and from Novartis to take part of the 2016 AACAP meeting. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last three years: Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. GVP has served as a consultant to Shire, Teva, and Medice. He has received royalties from Editora Manole.

References

1. Polanczyk, G.V.; Willcutt, E.G.; Salum, G.A.; Kieling, C.; Rohde, L.A. ADHD prevalence estimates across three decades: An updated systematic review and meta-regression analysis. *Int. J. Epidemiol.* **2014**, *43*, 434–442. https://doi.org/10.1093/ije/dyt261
2. Banaschewski, T.; Becker, K.; Döpfner, M.; Holtmann, M.; Rösler, M.; Romanos, M. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2017**, *114*, 149–159. doi: 10.3238/arztebl.2017.0149
3. Um, Y.H.; Hong, S.-C.; Jeong, J.-H. Sleep problems as predictors in attention-deficit hyperactivity disorder: causal mechanisms, consequences and treatment. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **2017**, *15*, 9–18. doi: 10.9758/cpn.2017.15.1.9
4. Hvolby, A. Associations of sleep disturbance with ADHD: Implications for treatment. *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* **2015**, *7*, 1–18. https://doi.org/10.1007/s12402-014-0151-0
5. Coogan, A.N.; McGowan, N.M. A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. *Atten. DeficIT Hyperact. Disord.* **2017**, *9*, 129–147. https://doi.org/10.1007/s12402-016-0214-5
6. Weiss, M.D.; Salpekar, J. Sleep problems in the child with attention-deficit hyperactivity disorder. *CNS Drugs* **2010**, *24*, 811–828. https://doi.org/10.2165/11538990-000000000-00000
7. Noble, G.S.; O'Laughlin, L.; Brubaker, B. Attention deficit hyperactivity disorder and sleep disturbances: Consideration of parental influence. *Behav. Sleep Med.* **2012**, *10*, 41–53. doi: 10.1080/15402002.2012.636274
8. Sung, V.; Hiscock, H.; Sciberras, E.; Efron, D. Sleep problems in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: Prevalence and the effect on the child and family. *Arch. Pediatr. Adoles. Med.* **2008**, *162*, 336–342. doi:10.1001/archpedi.162.4.336
9. Dibner C.; Schibler U. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J. Intern. Med.* **2015**, *277*, 513–527. doi: 10.1111/joim.12347
10. Waddington Lamont, E.; Legault-Coutu, D.; Cermakian, N.; Boivin, D.B. The role of circadian clock genes in mental disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2007**, *9*, 333–342.
11. Schuch, J.B.; Genro, J.P.; Bastos, C.R.; Ghisleni, G.; Tovo-Rodrigues, L. The role of *CLOCK* gene in psychiatric disorders: Evidence from human and animal research. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **2017**, *177*, 181–198. doi: 10.1002/ajmg.b.32599
12. Dela Pena, I.J.I.; Dela Pena, I.; de la Pena, J.B.; Kim, H.J.; Sohn, A.; Shin, C.Y.; Han, D.H.; Kim, B.-N.; Ryu, J.H.; Cheong, J.H. Transcriptional profiling of SHR/NCrl prefrontal cortex shows hyperactivity-associated genes responsive to amphetamine challenge. *Genes Brain Behav.* **2017**, *16*, 664–674. doi: 10.1111/gbb.12388
13. Huang, J.; Zhong, Z.; Wang, M.; Chen, X.; Tan, Y.; Zhang, S.; He, W.; He, X.; Huang, G.; Lu, H.; et al. Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 2572–2587. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2551-14.2015.
14. Baird, A.L.; Coogan, A.N.; Kaufling, J.; Barrot, M.; Thome, J. Daily methylphenidate and atomoxetine treatment impacts on clock gene protein expression in the mouse brain. *Brain Res.* **2013**, *1513*, 61–71. doi: 10.1016/j.brainres.2013.03.038
15. O'Keeffe, S.M.; Thome, J.; Coogan, A.N. The noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine phase-shifts the circadian clock in mice. *Neuroscience* **2012**, *201*, 219–230. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.002.
16. McClung, C.A.; Sidiropoulou, K.; Vitaterna, M.; Takahashi, J.S.; White, F.J.; Cooper, D.C.; Nestler, E.J. Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the *Clock* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9377–9381. doi: 10.1073/pnas.0503584102

17. Jeong, S.H.; Yu, J.-C.; Lee, C.H.; Choi, K.-S.; Choi, J.-E.; Kim, S.H.; Joo, E.-J. Human *CLOCK* gene-associated attention deficit hyperactivity disorder-related features in healthy adults: Quantitative association study using Wender Utah Rating Scale. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **2014**, *264*, 71–81. doi: 10.1007/s00406-013-0443y
18. Kissling, C.; Retz, W.; Wiemann, S.; Coogan, A.N.; Clement, R.M.; Hunnerkopf, R.; Conner, A.C.; Freitag, C.M.; Rosler, M.; Thome, J. A polymorphism at the 3′-untranslated region of the *CLOCK* gene is associated with adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **2008**, *147*, 333– 338. doi: 10.1002/ajmg.b.30602
19. Xu, X.; Breen, G.; Chen, C.-K.; Huang, Y.-S.; Wu, Y.-Y.; Asherson, P. Association study between a polymorphism at the 3′-untranslated region of *CLOCK* gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Behav. Brain Funct.* **2010**, *6*, 48. doi: 10.1186/1744-9081-6-48.
20. Zheng, J.; Baird, D.; Borges, M.-C.; Bowden, J.; Hemani, G.; Haycock, P.; Evans, D.M.; Smith, G.D. Recent developments in Mendelian randomization studies. *Curr. Epidemiol. Rep.* **2017**, *4*, 330–345. doi: 10.1007/s40471017-0128-6
21. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed.; American Psychiatric Association: Washington, DC, USA, 1994; ISBN 978-0-89042-559-6.
22. Salatino-Oliveira, A.; Genro, J.P.; Chazan, R.; Zeni, C.; Schmitz, M.; Polanczyk, G.; Roman, T.; Rohde, L.A.; Hutz, M.H. Association study of *GIT1* gene with attention-deficit hyperactivity disorder in Brazilian children and adolescents. *Genes Brain Behav.* **2012**, *11*, 864–868. doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00835.x
23. Bruxel, E.M.; Salatino-Oliveira, A.; Akutagava-Martins, G.C.; Tovo-Rodrigues, L.; Genro, J.P.; Zeni, C.P.; Polanczyk, G.V.; Chazan, R.; Schmitz, M.; Arcos-Burgos, M. *LPHN3* and attention-deficit/hyperactivity disorder: A susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes Brain Behav.* **2015**, *14*, 419–427. doi: 10.1111/gbb.12224
24. Salatino-Oliveira, A.; Akutagava-Martins, G.C.; Bruxel, E.M.; Genro, J.P.; Polanczyk, G.V.; Zeni, C.; Kieling, C.; Karam, R.G.; Rovaris, D.L.; Contini, V. *NOS1* and *SNAP25* polymorphisms are associated with AttentionDeficit/Hyperactivity Disorder symptoms in adults but not in children. *J. Psychiatr. Res.* **2016**, *75*, 75–81. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.01.010
25. Costa, D.S.; de Paula, J.J.; Malloy-Diniz, L.F.; Romano-Silva, M.A.; Miranda, D.M. Parent SNAP-IV rating of attention-deficit/hyperactivity disorder: Accuracy in a clinical sample of ADHD, validity, and reliability in a Brazilian sample. *J. Pediatr.* **2018**, in press, doi:10.1016/j.jped.2018.06.014.
26. Lahiri, D.K.; Nurnberger, J.I., Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5444.
27. Schwender, H.; Taub, M.A.; Beaty, T.H.; Marazita, M.L.; Ruczinski, I. Rapid testing of SNPs and gene–environment interactions in case–parent trio data based on exact analytic parameter estimation. *Biometrics* **2012**, *68*, 766–773. doi: 10.1111/j.1541-0420.2011.01713.x
28. Chang, C.C.; Chow, C.C.; Tellier, L.C.; Vattikuti, S.; Purcell, S.M.; Lee, J.J. Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* **2015**, *4*, 7. doi: 10.1186/s13742-015-0047-8
29. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; De Bakker, P.I.; Daly, M.J. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 559–575. doi: 10.1086/519795
30. Li, M.-X.; Yeung, J.M.; Cherny, S.S.; Sham, P.C. Evaluating the effective numbers of independent tests and significant p-value thresholds in commercial genotyping arrays and public imputation reference datasets. *Hum. Genet.* **2012**, *131*, 747–756. doi: 10.1007/s00439-011-1118-2
31. Barrett, J.C.; Fry, B.; Maller, J.; Daly, M.J. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **2004**, *21*, 263–265. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457
32. Dudbridge, F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum. Hered.* **2008**, *66*, 87–98. doi: 10.1159/000119108.
33. Ward, L.D.; Kellis, M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *40*, D930–D934. doi: 10.1093/nar/gkr917
34. McLaren, W.; Gil, L.; Hunt, S.E.; Riat, H.S.; Ritchie, G.R.; Thormann, A.; Flicek, P.; Cunningham, F. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 122. doi: 10.1186/s13059-016-0974-4.

35. Rentzsch, P.; Witten, D.; Cooper, G.M.; Shendure, J.; Kircher, M. CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *47*, D886–D891. doi: 10.1093/nar/gky1016.
36. Boyle, A.P.; Hong, E.L.; Hariharan, M.; Cheng, Y.; Schaub, M.A.; Kasowski, M.; Karczewski, K.J.; Park, J.; Hitz, B.C.; Weng, S. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* **2012**, *22*, 1790–1797. doi: 10.1101/gr.137323.112.
37. Fontenot, M.R.; Berto, S.; Liu, Y.; Werthmann, G.; Douglas, C.; Usui, N.; Gleason, K.; Tamminga, C.A.; Takahashi, J.S.; Konopka, G. Novel transcriptional networks regulated by CLOCK in human neurons. *Genes Dev.* **2017**, doi:10.1101/gad.305813.117.
38. Coogan, A.N.; Baird, A.L.; Popa-Wagner, A.; Thome, J. Circadian rhythms and attention deficit hyperactivity disorder: The what, the when and the why. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *67*, 74–81. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.01.006.
39. Cassoff, J.; Wiebe, S.T.; Gruber, R. Sleep patterns and the risk for ADHD: A review. *Nat. Sci. Sleep* **2012**, *4*, 73–80. doi: 10.2147/NSS.S31269
40. Sadeh, A.; Tikotzky, L.; Kahn, M. Sleep in infancy and childhood: Implications for emotional and behavioral difficulties in adolescence and beyond. *Curr. Opin. Psychiatry* **2014**, *27*, 453–459. http://dx.doi.org/10.1097/YCO.0000000000000109
41. Consortium, W.T.C.C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature* **2007**, *447*, 661. doi: 10.1038/nature05911
42. Shi, J.; Wittke-Thompson, J.K.; Badner, J.A.; Hattori, E.; Potash, J.B.; Willour, V.L.; McMahon, F.J.; Gershon, E.S.; Liu, C. *Clock* genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **2008**, *147*, 1047–1055. doi: 10.1002/ajmg.b.30714.
43. Ozburn, A.R.; Purohit, K.; Parekh, P.K.; Kaplan, G.N.; Falcon, E.; Mukherjee, S.; Cates, H.M.; McClung, C.A. Functional implications of the *CLOCK* 3111T/C single-nucleotide polymorphism. *Front. Psychiatry* **2016**, *7*, 67. doi: 10.3389/fpsyt.2016.00067
44. Saus, E.; Soria, V.; Escaramís, G.; Vivarelli, F.; Crespo, J.M.; Kagerbauer, B.; Menchón, J.M.; Urretavizcaya, M.; Gratacòs, M.; Estivill, X. Genetic variants and abnormal processing of pre-miR-182, a circadian clock modulator, in major depression patients with late insomnia. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 4017–4025. doi: 10.1093/hmg/ddq316
45. Griggs, E.M.; Young, E.J.; Rumbaugh, G.; Miller, C.A. MicroRNA-182 regulates amygdala-dependent memory formation. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 1734–1740. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2873-12.2013
46. Wang, W.M.; Lu, G.; Su, X.W.; Lyu, H.; Poon, W.S. MicroRNA-182 regulates neurite outgrowth involving the PTEN/AKT pathway. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 96. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00096
47. Ye, Y.; Xu, H.; Su, X.; He, X. Role of microRNA in governing synaptic plasticity. *Neural Plast.* **2016**, *2016*, 4959523. http://dx.doi.org/10.1155/2016/4959523
48. Yuan, H.; Mischoulon, D.; Fava, M.; Otto, M.W. Circulating microRNAs as biomarkers for depression: Many candidates, few finalists. *J. Affect. Disord.* **2018**, *233*, 68–78. doi: 10.1016/j.jad.2017.06.058
49. Kohen, R.; Dobra, A.; Tracy, J.H.; Haugen, E. Transcriptome profiling of human hippocampus dentate gyrus granule cells in mental illness. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e366. doi: 10.1038/tp.2014.9
50. Jones, S.E.; Tyrrell, J.; Wood, A.R.; Beaumont, R.N.; Ruth, K.S.; Tuke, M.A.; Yaghootkar, H.; Hu, Y.; TederLaving, M.; Hayward, C.; et al. Genome-wide association analyses in 128,266 individuals identifies new morningness and sleep duration loci. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006125. doi: 10.1371/journal.pgen.1006125
51. Lane, J.M.; Liang, J.; Vlasac, I.; Anderson, S.G.; Bechtold, D.A.; Bowden, J.; Emsley, R.; Gill, S.; Little, M.A.; Luik, A.I.; et al. Genome-wide association analyses of sleep disturbance traits identify new loci and highlight shared genetics with neuropsychiatric and metabolic traits. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 274–281. doi: 10.1038/ng.3749
52. Hammerschlag, A.R.; Stringer, S.; de Leeuw, C.A.; Sniekers, S.; Taskesen, E.; Watanabe, K.; Blanken, T.F.; Dekker, K.; Te Lindert, B.H.; Wassing, R. Genome-wide association analysis of insomnia complaints identifies risk genes and genetic overlap with psychiatric and metabolic traits. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 1584. doi: 10.1038/ng.3888
53. Marinelli, M.; Pappa, I.; Bustamante, M.; Bonilla, C.; Bonilla, C.; Suarez, A.; Tiesler, C.M.; Vilor-Tejedor, N.; Zafarmand, M.H.; Alvarez-Pedrerol, M. Heritability and genome-wide association analyses of sleep duration in children: The EAGLE consortium. *Sleep* **2016**, *39*, 1859–1869. doi: 10.5665/sleep.6170

54. Boyle, E.A.; Li, Y.I.; Pritchard, J.K. An expanded view of complex traits: From polygenic to omnigenic. *Cell* **2017**, *169*, 1177–1186. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.038.
55. Faraone, S.V.; Larsson, H. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* **2018**, https://doi.org/10.1038/s41380-018-0070-0
56. Durso, D.F.; Bydlowski, S.P.; Hutz, M.H.; Suarez-Kurtz, G.; Magalhães, T.R.; Pena, S.D.J. Association of genetic variants with self-assessed color categories in Brazilians. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e83926. doi: 10.1371/journal.pone.0083926
57. Salzano, F.M.; Sans, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet. Mol. Biol.* **2014**, *37*, 151–170.
58. de Neves Manta, F.S.; Pereira, R.; Vianna, R.; de Araújo, A.R.B.; Gitaí, D.L.G.; da Silva, D.A.; de Vargas Wolfgramm, E.; da Mota Pontes, I.; Aguiar, J.I.; Moraes, M.O. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75145. doi: 10.1371/journal.pone.0075145.
59. Santos, N.P.; Ribeiro-Rodrigues, E.M.; Ribeiro-dos-Santos, Â.K.; Pereira, R.; Gusmão, L.; Amorim, A.; Guerreiro, J.F.; Zago, M.A.; Matte, C.; Hutz, M.H. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48–insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 184–190. doi: 10.1002/humu.21159
60. Grinde, K.E.; Qi, Q.; Thornton, T.A.; Liu, S.; Shadyab, A.H.; Chan, K.H.K.; Reiner, A.P.; Sofer, T. Generalizing genetic risk scores from europeans to Hispanics/Latinos. *bioRxiv* **2018**, 242404, doi:10.1101/242404.

SEÇÃO V. NOTA À IMPRENSA LOCAL

SONO E TRANSTORNO DO DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH): achados epidemiológicos e genéticos sobre sua relação

Nos estudos conduzidos pela aluna de doutorado em epidemiologia da UFPel, Marina Xavier Carpena, sob orientação das professoras Dra. Luciana Tovo Rodrigues e dra. Alícia Matijasevich, foram abordadas perguntas sobre a natureza e a relação existente entre duração de sono, problemas de sono e TDAH por meio da elaboração de quatro artigos científicos. Os resultados do primeiro artigo sugeriram que os problemas do sono podem ser preditores de TDAH, inclusive mais importantes do que a duração do sono ou as trajetórias de duração do sono na primeira infância. Contudo, uma análise de especificidade indicou também que estes problemas são marcadores precoces de outros transtornos mentais além do TDAH.

Os achados referentes ao segundo estudo sugeriram que a comorbidade entre os fenótipos do sono e TDAH possivelmente é devida a fatores genéticos comuns, com um papel importante nas vias de sinalização neuronal. O compartilhamento entre a suscetibilidade genética de ritmo circadiano (nesse caso atribuída ao gene *CLOCK*) e TDAH foi reforçada com os achados do quarto artigo, o qual foi desenvolvido como um material complementar ao proposto no projeto de tese. Além disso, o segundo artigo apresentou indícios de efeito causal de distúrbios do sono e curta duração do sono em TDAH, reforçando o papel desses fenótipos do sono como preditores ou marcadores precoces de TDAH. Por fim, no terceiro artigo, foi testado o efeito mediador de funções executivas na associação entre problemas de sono precoce e TDAH na adolescência e não foi identificado que esta seja uma via importante neste caminho causal.

Considerando estes achados, Marina Xavier Carpena e suas orientadoras sugerem que problemas de sono são importantes preditores para o transtorno, podendo ser fatores associados de maneira causal. Também indicam que duração de sono parece ter efeito quando se trata de curta duração de sono crônica e aparentemente funções executivas relacionadas a atenção não

são caminhos importantes nos quais passam os efeitos de problemas de sono ou curta duração de sono crônica. Uma das razões pela qual observa-se alta comorbidade entre os fenótipos também é o componente genético compartilhado entre eles que apresenta importante função na atividade neuroquímica de sinalização, concluem. O projeto colabora com informações importantes sobre a etiologia tanto do comportamento de sono quanto do TDAH, além de prover *insights* para seu tratamento.