

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento

Thiago Gnecco Bueno Gomez

**CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DO POLIMORFISMO Ala D2 DA
ENZIMA DESIODASE TIPO 2 (DIO2) E A FUNCIONALIDADE DE
INDIVÍDUOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO**

São Paulo

2017

**CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DO POLIMORFISMO Ala D2 DA
ENZIMA DESIODASE TIPO 2 (DIO2) E A FUNCIONALIDADE DE
INDIVÍDUOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Distúrbios do
Desenvolvimento da Universidade
Presbiteriana Mackenzie, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro

Linha de Pesquisa: Neurociência

São Paulo

2017

G633c Gomez, Thiago Gnecco Bueno

Correlação entre a presença do polimorfismo Ala D2 da enzima Desiodase tipo 2 (Dio2) e a funcionalidade de indivíduos com transtorno do espectro do autismo. / Thiago Gnecco Bueno Gomez. – 2017.

f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Distúrbio do Desenvolvimento) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2017.

Orientadora: Miriam Oliveira Ribeiro

Bibliografia: f. 31-46


THIAGO GNECCO BUENO GOMEZ

CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DO POLIMORFISMO A1a D2 DA
ENZIMA DESIODASE TIPO 2 (DIO2) E A FUNCIONALIDADE DE INDIVÍDUOS
COM TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Distúrbios do Desenvolvimento.

Aprovada em 07 de Fevereiro de 2012.

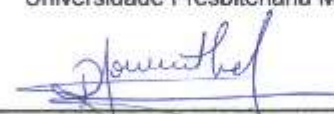
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Miriam Oliveira Ribeiro
Universidade Presbiteriana Mackenzie



Prof.ª Dr.ª Cristiane Silvestre de Paula
Universidade Presbiteriana Mackenzie



Prof.ª Dr.ª Rosane Lowenthal
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

RESUMO

A presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 em indivíduos homozigotos parece estar relacionada ao aumento do estresse oxidativo celular, embora não cause alterações fenotípicas, sugerindo a existência de mecanismos compensatórios. A hipótese de nosso estudo considerou a possibilidade de que em indivíduos com TEA os mecanismos compensatórios não sejam suficientes e a presença do polimorfismo possa levar a mudanças no comportamento desses pacientes. Para tanto, estudamos 97 indivíduos com diagnóstico de TEA e acompanhados no Centro de Atenção Integrada à Saúde Mental (CAISM). Todos os pacientes foram avaliados pela Escala de Comportamento Adaptativo de Vineland, 2ª edição e pelo *Autism Behavior Checklist* e foram genotipados para o polimorfismo Thr92Ala-D2 pela extração de DNA do epitélio bucal. Para todas as análises estatísticas, o teste ANOVA unidirecional com teste de Tukey foi utilizado para analisar os genótipos separadamente. Nossos resultados mostram que a presença de polimorfismo Thr92Ala-D2 em homozigotos melhora a funcionalidade de indivíduos autistas nos subdomínios de Comunicação, Linguagem, Atividades Diárias e Nível Adaptativo. Além disso, a presença do alelo 92Ala-D2 parece exercer um efeito dependente da dose, uma vez que quando presente na heterozigose o escore apresenta valores intermediários entre as pontuações dos indivíduos homozigóticos polimórficos (AA) e não polimórficos (TT). Os dados obtidos foram exatamente opostos à nossa hipótese inicial. A literatura descreve alterações nas vias da ubiquitinação e da neuregulina 1 em indivíduos típicos com o polimorfismo. Isso poderia explicar a melhora na funcionalidade dos autistas, já que essas duas vias podem estar envolvidas no fenótipo do TEA. Em conclusão, o presente estudo mostra que a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 em homozigose melhora a funcionalidade na comunicação, atividades diárias, aspectos sociais, nível geral de adaptação em indivíduos com TEA

Palavras-chaves: Transtorno do Espectro Autista, Polimorfismo Thr92Ala-D2, Funcionalidade.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HORMÔNIOS TIREOIDIANOS	1
1.2. TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO	5
1.3. POLIMORFISMO THR92ALA-D2	10
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVO	15
4. MÉTODOS	16
4.1. PARTICIPANTES	16
4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	16
4.3. PROCEDIMENTOS.....	16
4.3.1. Coleta, Armazenamento e Extração de DNA do Epitélio Bucal.....	16
4.3.2. Genotipagem.....	17
4.3.3. Instrumentos de Avaliação.....	17
4.3.3.1. <i>Autism Behavior Checklist</i> (ABC)	17
4.3.3.2. Escala de Comportamento Adaptativo de Vineland, 2ª edição	188
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. BIBLIOGRAFIA	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

Os Hormônios Tireoidianos (HT) exercem papel fundamental na regulação da taxa metabólica basal e são reconhecidos por controlar uma miríade de processos fisiológicos, tais como o crescimento, o desenvolvimento, e a taxa metabólica (TRONCONE, SHAPIRO e SATTA, 1992). Os HT são reconhecidamente essenciais para o crescimento e desenvolvimento de um organismo, tanto na fase embrionária como também após o nascimento (BIANCO, 2011). Estes hormônios sintetizados e secretados pela glândula tireóide são denominados T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina).

A tireóide secreta predominantemente T4 na circulação, cerca de 80%, porém o T4 é caracterizado por ser um pró-hormônio, ou seja, o T4 para se tornar ativo necessita ser transformado em T3 (hormônio ativo), hormônio capaz de se ligar ao seu receptor. Nos tecidos periféricos ocorre a transformação do T4 em T3 através da desiodação, que é um processo enzimático em que ocorre a remoção de um iodo do anel fenólico (posição 5'); ou em T3 reverso (rT3), onde há a remoção de um iodo do anel tirosínico (posição 5), o rT3 é uma forma inativa do T3, como o T2, ambas as formas inativas do T3 são necessárias para que ocorra uma regulação e equilíbrio da ação deste hormônio dentro da célula (CHOPRA, 1976; ST GERMAIN e GALTON, 1997).

O T3 age diretamente no núcleo de suas células-alvo através de ligação com o seu receptor nuclear (TR α ou TR β), regulando a taxa de transcrição de genes através da interação direta ou indireta com o complexo RNA polimerase II (RIBEIRO et al., 1998). A quantidade de receptores do hormônio tireoidiano no núcleo celular varia conforme a célula/tecido juntamente com os seus reguladores transcricionais, desta forma há uma alta variabilidade entre as suas combinações, o que mostra uma ação muito específica para cada tecido/célula (BRENT, 2012). Em estudos recentes foi demonstrado que os HT também possuem receptores que se encontram na membrana celular, como por exemplo no coração e veias, indicando a ação dos HT não somente para a regulação de transcrição gênica (DAVIS et al., 2010; DAVIS et al., 2001).

Durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), os HT exercem papel fundamental tanto no período embrionário quanto na fase neonatal, sua deficiência nestas fases de desenvolvimento resulta em conexões neurais temporariamente ou permanentemente suprimidas resultando em disfunções comportamentais e cerebrais (BERBEL et al., 2007). O T3 estimula a síntese de fatores de crescimento, como o *Nerve Growth Factor* (NGF) e o *Insuline-like Growth Factor* (IGF), fatores fundamentais na ativação dos processos de proliferação, sinaptogênese e mielinização neural (HERNANDEZ et al., 1998). Os HT também possuem grande participação quando interagem com outros fatores no desenvolvimento neural e cerebral, como a interação com o Receptor do Ácido Retinóico (RAR), o fator de transcrição COUP TF1 (do inglês, *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter 1*) e o ácido retinóico, podendo inibir a ação dos HT ou o bloqueio dos TR, inibindo a indução da expressão gênica (FLAMANT e SAMARUT, 1998; ANDERSON et al., 1998; LIU e BRENT, 2002; WESTON, BLUMBERG e UNDERHILL, 2003). O ácido retinóico (RA) é necessário para o desenvolvimento típico do cérebro dos mamíferos. A exposição prematura ao AR resulta em alta incidência de malformações congênitas, especialmente em estruturas derivadas do tubo neural (ROTHMAN, et. al. 1995). T3 e RA são conhecidos por regular o crescimento e a formação de sinapses neuronais *in vivo* e em cultura de células (PATEL et al. 1985).

Um certo número de genes responsivos pelo T3 foram identificados no cerebelo, incluindo calbindina, receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, proteína-2 das células de Purkinje (PCP-2), e a proteína básica da mielina, e partilham um padrão muito semelhante de expressão (OPPENHEIMER e SCHWARTZ, 1997). Indivíduos hipotireoideos têm atraso na expressão destes genes na vida pós-natal o que ocasiona má formação estrutural do cerebelo indicando que o período de expressão destes genes é essencial para o desenvolvimento típico (LIU e BRENT, 2002). Foi identificado um local no promotor do gene PCP-2 que se liga ao COUP-TF1 e, em estudos *in vitro* COUP-TF1 medeia a inibição da expressão de T3 (ANDERSON et al., 1998, OPPENHEIMER e SCHWARTZ, 1997). Estes estudos indicam que a COUP-TF1 modula a ação do T3 no cerebelo em desenvolvimento, principalmente exercendo uma ação inibitória (LIU e BRENT, 2002).

A desiodação do T4 ocorre através de enzimas denominadas desiodases, também conhecidas como iodotironinas monodesiodases. Estas enzimas foram identificadas e caracterizadas em três diferentes tipos: desiodase tipo 1 (D1), desiodase tipo 2 (D2) e desiodase tipo 3 (D3) (VISSER et al., 1982; KAPLAN et al., 1983; LEONARD e VISSER, 1986). As desiodases são codificadas por três diferentes genes (JAKOBS et al., 1997; HERNANDEZ et al., 1998; CELI et al., 1998) e possuem características catalíticas distintas (LEONARD e VISSER, 1986). Elas também se expressam em diferentes tecidos e sua ação nos HT geram produtos distintos.

A D1 tem sua expressão em humanos principalmente no fígado (BIANCO, 2004). Seu papel fisiológico não é claro e parece estar envolvida com a degradação do T4 na sua forma conjugada.

A expressão da D2 é maior na tireóide, músculos esquelético e cardíaco, tecido adiposo marrom, SNC e hipófise (SALVATORE et al., 1996; SALVATORE et al., 1996; CROTEAU et al., 1996), converte T4 em T3 e rT3 em T2, tendo maior afinidade com a T4 (LEONARD e KOEHRLE, 1996). Essa enzima gera os HT nos próprios tecidos onde é expressa e, portanto, possui importante papel na produção local de T3 para as células e também na produção de T3 circulante (KOEHRLE, 1999). Por outro lado, a D3 inativa T4 em T3r, limitando a sua ação biológica e tem maior presença no SNC e pele (KAPLAN et al., 1983; HUANG et al., 1985; CROUTEAU et al., 1995).

A atividade da D2 sofre influência de alguns mecanismos já descritos na literatura, dentre eles podemos citar o sistema ubiquitina-proteossoma, reação na qual a proteína ubiquitina inativa a enzima D2 que será degradada nos proteossomas. Esta reação ocorre com auxílio de enzimas que participam na ligação da ubiquitina com a D2 e o seu transporte até o proteossoma para a sua degradação. Porém existem outras enzimas que podem desubiquitinar a D2, devolvendo a sua atividade enzimática. Estas enzimas são denominadas VDU1 e VDU2 (do inglês, *von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating 1 e 2*). Curcio-Morelli e colaboradores (2003) mostraram que a ação das enzimas VDU1 e VDU2 é regulada pela exposição ao frio via norepinefrina no Tecido Adiposo Marrom (BAT), resultando em aumento na meia vida da D2 e em uma maior concentração de T3 na célula (STEINSAPIR et al., 1998; GEREKEN et al., 2000;

KOMANDER et al., 2009). Além do BAT, foi observada a expressão de VDU1 nos tanicitos e astrócitos, ambos subtipos de células da glia, sugerindo a regulação da D2 por essa via em algumas áreas cerebrais (FEKETE et al., 2007).

Outro mecanismo que altera a atividade da D2 é o estresse do Retículo Endoplasmático (RE). Essa condição está associada ao sistema ubiquitina-proteossomo. O RE quando se encontra em estresse diminui a atividade da D2, porém não altera a transcrição do gene Dio2, que é responsável pela transcrição da D2 (SCHRÖDER, 2008; ARROJO e DRIGO et al., 2011).

Além disso, foi descrito que a sinalização nutricional por meio de um composto denominado kaempferol (KPF) influencia na atividade da D2, ou seja, o KPF que é um flavonóide encontrado principalmente nos vegetais ao ser ingerido no organismo atua em muitos sistemas biológicos, e neste estudo foi descrito a sua ação xenobiótica, em que o organismo reconhece essa substância como estranha, desta forma há um aumento de gasto energético perante a ativação de transcrição termogênica, o que também aumenta a atividade transcricional de certos genes, o que inclui o Dio2. Com o aumento da atividade deste gene através do KPF também foi observado um aumento da meia-vida da D2, e por tanto, um aumento na quantidade de T3 produzida (HOUTEN et al., 2006; da-SILVA et al., 2007).

Um tecido que depende amplamente da atividade da D2 no controle da sinalização dos HT, é o cérebro (ARROJO e DRIGO et al., 2013). A participação da D2, juntamente com a D3 neste órgão, resulta em um equilíbrio na produção do T3, fato reconhecido em estudos com camundongos nocautes para a D2 (D2KO). Esses estudos mostram que a ausência da D2 leva a uma redução de 25 a 50% na quantidade de T3 no cérebro quando comparado com camundongos normais (GALTON et al., 2007).

A D2 é expressa nas células da glia, mais precisamente em astrócitos e células ependimárias (RISKIND, 1987; TU, 1997; GUADANO-FERRAZ, 1997), enquanto que a D3 só é expressa nos neurônios (TU, 1999).

1.2. TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) tem início precoce, curso crônico, sendo caracterizado principalmente por um desvio no desenvolvimento da sociabilidade e padrões de comportamentos alterados (*American Psychiatric Association*, 2014). A apresentação clínica desse quadro é variável impactando em maior ou menor grau diversas áreas do desenvolvimento como comunicação, aprendizado, adaptação em atividades de vida diária e socialização. No caso de prejuízos de socialização, alguns indivíduos podem apresentar dificuldades graves de relacionamento social, enquanto outros indivíduos com TEA aceitam passivamente as interações sociais, mas não iniciam e apresentam dificuldade em mantê-la de forma típica (HATTIER e MATSON, 2012; KLIN, 2006). Compreender essa variabilidade nos quadros clínicos é um dos principais desafios para o diagnóstico, do prognóstico, e principalmente para o desenvolvimento de um plano terapêutico adequado para cada criança.

A primeira descrição sobre o Autismo foi feita pelo psiquiatra austríaco Leo Kanner em 1943, em seu trabalho intitulado "*Autistic disturbances of affective contact*". Neste trabalho, Kanner descreveu onze crianças que possuíam prejuízos nas áreas de interação social (incapacidade de se relacionarem com outras pessoas), comportamental (preocupação obsessiva pelo imutável - *sameness*) e de comunicação (distúrbios de linguagem), conjunto de características denominadas por Kanner como autismo infantil precoce (KANNER, 1971). Logo após Kanner, em 1944, o médico austríaco Asperger, descreveu em seu trabalho intitulado "*Die 'Autistischen Psychopathen' im Kindesalter*" (A psicopatia autista na infância) crianças com as mesmas características citadas por Kanner, porém essas crianças apresentavam um desenvolvimento típico de cognição e linguagem. Esta síndrome foi denominada posteriormente como Síndrome de Asperger, homenageando o caracterizador da mesma (HARRIS, 2016). Como já se sabe que não existe um único e definitivo marcador biológico entre as pessoas com TEA, o diagnóstico é clínico e deve ter como base os manuais de classificação internacionais que ajudam a uniformizar as definições. De forma geral, os principais manuais, DSM e CID, são bastante semelhantes, com diferenças sutis mais relacionadas aos títulos de

cada condição do que nos critérios classificatórios em si. Com o passar das décadas, esses manuais foram evoluindo, sendo que a versão mais atual do DSM, o DSM-V, lança pela primeira vez o termo TEA. A partir de então tem-se utilizado o termo TEA para descrever um grupo de indivíduos que apresenta precocemente anormalidades qualitativas abrangentes e com diferentes graus de comprometimento nas seguintes áreas do desenvolvimento: habilidades na comunicação social e padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses e atividades (*American Psychiatric Association, 2014*).

Assim, atualmente para o estabelecimento de critério diagnóstico de TEA, segundo o DSM-V, o sujeito em questão deve apresentar os seguintes sinais e sintomas: (a) déficits persistentes na interação e comunicação social em diversos contextos, tais como os indicadores de reciprocidade socioemocional, comportamentos comunicativos, déficits para desenvolver, manter e compreender relacionamentos; e (b) padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses ou atividades com prejuízos no funcionamento adaptativo, tais como: movimentos motores, falas estereotipadas ou repetitivas, insistência nas mesmas coisas, adesão inflexível às rotinas, respostas ritualísticas, interesses restritos e fixos e alterações sensoriais como hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais. Além disso, espera-se que: (i) os sintomas estejam presentes precocemente, antes dos oito anos de idade, mesmo que não se manifeste plenamente; (ii) os sintomas devem causar prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, profissional e outras áreas importantes da vida da pessoa; (iii) esses sintomas não podem ser melhor explicados devido à Deficiência Intelectual ou por atraso global do desenvolvimento (*American Psychiatric Association, 2014*).

Victor Lotter (1966), conduziu o primeiro estudo epidemiológico sobre o autismo na Inglaterra. Naquele momento, a prevalência foi de 4,5 autistas para 10.000 (KLIN, 2006). Desde então, dezenas de estudos de prevalência já foram concluídos ao redor do mundo. Ainda assim, existe um recorrente debate na literatura sobre a melhor estimativa da prevalência de TEA. Por outro lado, já há um consenso de que os TEA são muito mais frequentes do que se imaginava nas décadas de 1960 e 1970, quando os primeiros estudos foram realizados (FOMBONNE, 2009; ELSABBAGH et al., 2012). A última publicação, de 2014,

da série de estudos coordenados pelo renomado *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) mostrou uma prevalência de 14.7 por 1.000 (1 a cada 68) crianças afetadas por TEA nos Estados Unidos (taxa 30% maior que o estudo anterior publicado em 2012 com a mesma metodologia) (CDC, 2014). Contudo, os dados americanos do CDC têm descrito taxas mais elevadas que as obtidas pela maioria dos outros estudos conduzidos nos Estados Unidos e em outras regiões do mundo. Assim, levando em conta os resultados mais recentes apresentados em estudos confiáveis de revisão sistemática, atualmente estima-se que a prevalência mundial média de TEA esteja entre 0,60 e 0,76%, ou seja, aproximadamente um caso a cada 160/132 pessoas, sem grandes variações desde a década de 1990 (BAXTER et al., 2015; FOMBONNE, 2009; WILLIAMS, 2005). A prevalência de TEA na maioria dos países de desenvolvimento baixo e médio é ainda desconhecida (OMS, 2013; BUESCHER, et al. 2014).

Este expressivo aumento nas taxas de TEA gerou grande polêmica sobre uma possível epidemia desse transtorno. Não há evidências suficientes para afirmações desse tipo, então os especialistas da área têm buscado evidências científicas para explicar o aumento desses índices. Entre as possíveis causas, destaca-se a adoção do conceito mais amplo do autismo, que agora é entendido como um espectro de condições, passando a ser denominado de TEA. Além da ampliação dos critérios de diagnósticos, autores têm destacado outros motivos para o aumento destas estimativas: (1) maior conscientização de clínicos e da comunidade sobre as manifestações do TEA; (2) melhor detecção de casos sem deficiência mental; (3) melhora nos serviços de atendimento, o que incentiva o diagnóstico, já que pais e profissionais encontram recursos para tratar/encaminhar esses indivíduos, e (5) aumento de estudos epidemiológicos populacionais (que contribuem para detecção de casos anteriormente não identificados em amostras baseadas exclusivamente em casos clínicos (RUTTER, 2005; WILLIAMS et al., 2006). Outro fator a ser considerado é que o melhor reconhecimento leva a uma mudança de diagnósticos: indivíduos antes classificados com deficiência intelectual ou transtorno de aprendizagem passaram a ser devidamente reconhecidos como no espectro autista (SHATTUCK, 2006). Apesar de todas as evidências atuais apontarem neste sentido, um real aumento nas taxas, ainda não pode ser totalmente descartada

porque o tema continua não estando completamente esgotado (FOMBONNE, 2009).

No Brasil ainda não existem dados epidemiológicos representativos do país acerca desse índice, sendo que um único estudo piloto concluído e publicado até o momento aponta para uma prevalência de 1:360 (2,7 por 1000), embora se tenha clareza de que esta estimativa esteja subestimada (PAULA et al., 2011). Mais recentemente foi realizado um estudo com amostra de 1.715 estudantes (6-16 anos) do ensino fundamental da rede pública de quatro municípios da região metropolitana de Goiânia, de Fortaleza, de Belo Horizonte e de Manaus. Com base em uma subescala para TEA do K-SADS-PL foi possível estabelecer uma taxa de 1% de prováveis casos de TEA (PARASMO, LOWENTHAL e PAULA; 2015), portanto mais realista e semelhante aos estudos internacionais. Os dois estudos nacionais alertam também para os baixos índices de detecção precoce e da falta de assistência para os indivíduos identificados nas pesquisas.

Estudos epidemiológicos também têm sido consistentes em comprovar:

(i) a distribuição de TEA por gênero se dá na ordem de uma menina para cada quatro meninos;

(ii) aproximadamente 60% das pessoas com TEA apresentam deficiência intelectual em algum nível;

(iii) a reincidência entre irmãos encontrar-se entre 3% e 19%; e entre gêmeos recorrência entre 50 e 95%, e para gêmeos dizigóticos entre 10 e 30% (GUPTA e STATE, 2006; SANDIN et al., 2014);

(iv) que os TEA ocorrem em todos os grupos raciais, étnicos e nos diferentes estratos socioeconômicos (ANAGNOSTOU et al., 2014; ELSABBAGH et al., 2012; OZONOFF et al., 2011; PAULA e RIBEIRO, 2011).

Existem evidências que fatores autoimunes, genéticos, inflamatórios, ambientais, e neurológicos podem contribuir para a patogênese do TEA (FOLSTEIN e ROSEN-SHEIDLEY, 2001; NELSON et al., 2001; VARGAS et al., 2005; GUPTA e STATE, 2006; CHEZ et al., 2007; PARDO e EBERHART, 2007; WIROJANAN et al., 2009). Dentre as possíveis influências ambientais que se

enquadram nos fatores para o desenvolvimento do TEA estão injúrias pré-natais ou perinatais, exposição à mercúrio e infecções virais persistentes que poderiam se iniciar dentro do útero e, em consequência, contribuir para alterações no SNC (WING e POTTER, 2002; LARSSON et al., 2005). As concentrações de marcadores inflamatórios no sangue e no líquido de indivíduos com TEA se apresentam elevadas (HEIJNEN e KAVELAARS, 2010).

Cerca de 10 a 15% dos casos de TEA estão associados à doenças de herança monogênicas como neurofibromatose, síndrome do X frágil e esclerose tuberculosa, porém em 7 a cada 10 indivíduos com TEA, o mecanismo etiológico é ainda desconhecido (VORSTMAN et al., 2006; SCHAAF et al., 2011).

Mesmo aparentando ser altamente hereditário, o envolvimento genético na etiologia do TEA é complexo, acredita-se que envolva muitos genes em diferentes cromossomos interagindo e com efeito moderado (SOLÍS-AÑEZ, 2007; DELGADO- LUENGO, 2007; HERNÁNDEZ, 2007; GESCHWIND, 2008).

Avanços na compreensão da genética do TEA foram impulsionados por descobertas de variações regionais no número de cópias de um gene decorrentes de novas mutações (mutações de novo), não vistas nos pais, é uma fonte significativa de variabilidade genética em seres humanos (SEBAT et al., 2004 apud GESCHWIND, 2008). Geschwind (2008) explica que novas mutações são formas de variação estrutural no genoma, em que há um ganho ou perda de uma região cromossômica grande de 1 kilobase (kb). A idade paterna foi associada com o aumento de mutações pontuais nas células da linhagem germinativa, o que contribui para uma maior porcentagem de novas mutações (CANTOR et al., 2007; REICHENBERG et al., 2006 apud GESCHWIND, 2008). Estes autores justificam que novas mutações podem ser particularmente acentuadas em filhos de pais mais velhos, que são um reservatório para tais eventos.

Assim, apesar da etiologia dos TEA ainda não estar totalmente estabelecida, há grande concordância na literatura de que é de base neurobiológica. Sabe-se também que é multicausal incluindo associações com alterações genéticas, acidentes pré-natais e perinatais, infecções, além de casos ligados a outras síndromes neurológicas (SHAW et al., 2014).

Além disso, há uma vasta literatura apontando que intervenções precoces, estruturadas e prolongadas tem melhor sucesso que as mais tardias (Bibby et al., 2002), por isso a identificação precoce deve ser o primeiro passo, podendo ser decisiva para o futuro de crianças com TEA.

1.3. POLIMORFISMO THR92ALA-D2

Por volta de 99,5% da sequência do DNA de qualquer indivíduo se comparado a outro indivíduo é a mesma (GOLDSTEIN e CAVALLERI, 2005). E esta pequena parcela de diferentes sequências são chamadas de polimorfismos que são, na verdade, variantes genéticas presentes em uma frequência maior que 1% na população. O polimorfismo genético é a variação genética na sequência de alelos, na sequência de bases nucleotídicas ou na estrutura cromossômica. Sua detecção no DNA humano vem mudando profundamente a forma de se estudar o genoma, já que polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos uma vez que são associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (BALASUBRAMANIAN, 2004; STRACHAN, 2002).

A presença de um polimorfismo pode afetar o fenótipo, implicando em mudança no código genético que determinará a função proteica, ou seja, altera a função normal da proteína. Por exemplo, pode modificar respostas imunológica e inflamatória frente a uma agressão bacteriana (KORNMAN, 1998). Os polimorfismos também estão sendo associados a quadros distintos como endometriose, lesão perirradicular, aterosclerose e hipertensão essencial humana (TAVARES, 2000; HOCQUETTE, 2007; SIQUEIRA, 2011; QUEIROZ, 2015).

O polimorfismo na alça de 18 aminoácidos, que resulta a substituição de uma threonina (Thr) por uma alanina (Ala) no codom 92, resultando na mudança do alanina, que foi chamado de Thr92AlaD2 (Bianco, et al 2002).

O polimorfismo Thr92Ala-D2 ocorre na alça do codom 92, que é responsável pela regulação da degradação através do proteassoma da D2, denominada ubiquitinação (Bianco, et al 2002). Dessa maneira, há menor

degradação da enzima com consequente aumento da meia vida da D2 (DENTICE et al., 2005; MCANINCH et al., 2015; WERNECK DE CASTRO et al., 2015). Apesar dessas alterações na D2, o tecido de indivíduos Thr92Ala-D2 é eutireoideo e os genes regulados pelo T3 não apresentam alterações, sugerindo que sua atividade catalítica não é alterada. Indivíduos homocigotos Ala92Ala demonstram menor atividade da D2 em alguns tecidos em comparação com Ala92Thr e Thr92Thr (GUO et al., 2004; MCANINCH et al. 2015).

Butler e colaboradores (2010) relataram que a homocigose para o alelo 92Ala-D2 está associada a uma menor secreção de T4 e T3 pela tireóide através de TSH em indivíduos saudáveis, indicativo de uma conversão inferior de T4 para T3. As observações de Torlontano e colaboradores (2008) relatam uma necessidade de doses mais elevadas de levotiroxina para suprimir os níveis de TSH em pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide para portadores do alelo 92Ala-D2. No entanto, não houve nenhuma diferença nos níveis de T4 entre os grupos de genótipos. Curiosamente, o alelo 92Ala-D2 foi associado com um aumento do risco da doença de Graves numa população russa (CHISTIYAKOV, SAVOST'ANOV e TURAKULOV, 2004). Por outro lado, em outra população também russa, a variante 92Ala foi indicada como mecanismo protetor em relação ao risco do desenvolvimento da doença de Graves, gravidade da doença, e a taxa de remissões em pacientes (BABENKO et al., 2012).

Panicker e colaboradores (2009) demonstraram que pacientes em terapia de reposição hormonal da tireóide, quando há presença do polimorfismo Thr92AlaD2 não respondem bem ao tratamento com T4, e se alcança uma melhor resposta utilizando terapia de reposição de T3-T4 combinados.

O polimorfismo D2-Thr92Ala foi associado também a uma diminuição do colo do fêmur e da densidade mineral do osso do quadril e vários marcadores de remodelação óssea em 154 pacientes tratados para carcinoma diferenciado de tireóide (HEEMSTRA, et al., 2010), indicando um papel da D2 na regulação da formação óssea.

O polimorfismo Thr92AlaD2 pode estar relacionado a um maior risco para a osteoartrite generalizada e um estudo aprofundado em três grandes grupos mostra que o haplótipo, incluindo o alelo de Thr92AlaD2 e o alelo principal do

polimorfismo D2-Orfa-Gly3Asp, foi igualmente associado com a osteoartrite (MEULENBELT et al., 2008). Bos e colaboradores (2012) demonstraram que existe uma menor expressão da D2 nas articulações afetadas por osteoartrite e que um desequilíbrio de alelos (diferença na expressão de alelos) em pacientes pode explicar a associação positiva entre o polimorfismo Thr92Ala-D2 e osteoartrite.

O efeito do polimorfismo Thr92Ala-D2 sobre os parâmetros lipídicos no soro foi avaliada em vários grupos diabéticos e não diabéticos, nenhuma associação entre HDL, LDL, colesterol total, ou os níveis de triglicerídeos e estado genótipo foram encontrados em qualquer um dos trabalhos que estudam essa relação (CANANI et al., 2005; MENTUCCIA et al., 2005; FLORITO et al., 2007; GARUP et al., 2007; DORA et al., 2010; ESTIVALET et al., 2011; PELTSVERGER et al., 2012).

O alelo 92Ala-D2 pode conferir uma diminuição do risco de cardiomiopatia relacionada à tireotoxicose (ou seja, hipertrofia do ventrículo esquerdo) em pacientes com doença de Graves, foi proposto um efeito protetor potencial desta variante genética contra mudanças induzidas pelo hipertireoidismo em tecido cardíaco (GRINEVA et al., 2009).

Estudos avaliando o polimorfismo Thr92AlaD2 nas desordens neurocognitivas demonstraram correlações positivas entre o polimorfismo e déficit cognitivo (GUO et al., 2004). Outros estudos encontraram maior frequência do polimorfismo em homozigose em pacientes esquizofrênicos do sexo masculino com respostas mais eficazes à antipsicóticos, história familiar desse transtorno (MANT et al., 1994; JÖNSSON et al., 1993; SCHARFETTER et al., 1999). Além disso, esse polimorfismo tem sido associado a alterações do quociente de inteligência associadas com a deficiência de iodo (GUO et al., 2004). Em uma população chinesa, He e colaboradores (2009) demonstram que as variantes Orfa-Gly3-D2 e a 92Ala-D2 estavam ligadas a um maior risco para o transtorno bipolar. Recentemente Colak (2013) encontrou uma associação entre a susceptibilidade do desenvolvimento de esquizofrenia e o polimorfismo Thr92AlaD2.

Curiosamente, a maioria dessas associações é independente dos níveis séricos de HT, o que destaca a importância da regulação local dos HT em tecidos periféricos.

Recentemente foi demonstrado que conjunto de genes que se encontra alterado no polimorfismo Thr92Ala-D2 leva à modificações no transcriptoma celular em cérebros humanos que são independentes da sinalização do hormônio tireoidiano, genes estes relacionados ao metabolismo mitocondrial, do Complexo de Golgi, no estresse oxidativo e apoptose (BIANCO e MCANINCH, 2013; MCANINCH et al., 2015). Apesar da D2 ser encontrada no retículo endoplasmático de indivíduos normais e indivíduos com o polimorfismo Thr92Ala-D2, apenas em indivíduos Thr92Ala-D2 a D2 é encontrada no Complexo de Golgi. Vale ressaltar que o Complexo de Golgi nesses indivíduos apresenta uma mudança estrutural importante que pode estar relacionada ao estresse nesta organela, e também há redução significativa na expressão do conjunto de genes envolvidos na via de sinalização do Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR) nas células que expressam a D2 com o polimorfismo Thr92Ala-D2, via esta que modula o desenvolvimento cognitivo. Prejuízos nessa via estão relacionados com a doença de Parkinson, esquizofrenia e Alzheimer (MCANINCH et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 em homozigose parece estar relacionada com o aumento no estresse oxidativo nas células destes indivíduos, embora não cause nenhuma alteração fenotípica, sugerindo a existência de mecanismos compensatórios. A hipótese do nosso estudo considera a possibilidade que em um indivíduo com TEA, os mecanismos compensatórios não sejam suficientes e a presença do polimorfismo possa levar à alterações no comportamento destes pacientes.

3. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo rastrear a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 em pacientes com TEA e avaliar se este polimorfismo pode influenciar no seu desempenho na interação e comunicação social, e testes de rastreio para comportamentos autísticos.

4. MÉTODOS

4.1. PARTICIPANTES

Os indivíduos participantes do estudo são pacientes com diagnóstico de TEA e em acompanhamento no Centro de Atenção Integrada à Saúde Mental (CAISM) – Vila Mariana (Santa Casa de São Paulo).

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi analisado e aprovado pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP 1.318.574). As documentações necessárias para a participação do indivíduo neste projeto se encontram em anexo (I-V). Todos os sujeitos participaram voluntariamente do projeto e receberam um termo de esclarecimento e consentimento por escrito que foi assinado pelos seus responsáveis. A instituição também recebeu e assinou o termo de consentimento esclarecido.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1. Coleta, Armazenamento e Extração de DNA do Epitélio Bucal

Foi coletado o epitélio bucal através do esfregaço da bochecha por *Swab*, segundo o protocolo do fabricante do kit de coleta e preservação de DNA bucal (*Norgen Biotek Corporation, Canadá*) durante as visitas dos participantes ao CAISM – Vila Mariana.

Logo após as coletas, os Swabs foram mantidos a uma temperatura de -20°C e depois conservados em temperatura -80°C até a extração do DNA.

Para a extração do DNA foi utilizado o kit de isolamento e extração de DNA (*Norgen Biotek Corporation, Canadá*) de acordo com o protocolo do próprio fabricante. Após a extração, o DNA foi armazenado a temperatura de -20°C.

4.3.2. Genotipagem

Para verificar a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 foi realizada a genotipagem através do DNA extraído. Para a técnica de genotipagem foi utilizado *TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays* para o polimorfismo Thr92Ala-D2 e o seu respectivo Master Mix (*TaqMan® Universal Master Mix II*, com UNG) da Thermo Fisher (EUA). Para o procedimento de genotipagem foi seguido o protocolo do próprio fabricante (*Thermo Fisher*), utilizando o equipamento *Applied Biosystems StepOne™* (*Thermo Fisher*, EUA) e identificando o genótipo como homocigoto para o polimorfismo Thr92AlaD2 (AA), homocigoto não-polimórfico (TT) e heterocigoto (TA).

4.3.3. Instrumentos de Avaliação

Todos os testes utilizados no presente estudo foram aplicados pela equipe de profissionais durante as consultas no CAISM - Vila Mariana. Os dados foram cedidos pela Prof. Dra. Rosane Lowenthal (Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo). Os resultados destes testes foram tabulados em um banco de dados utilizando o programa *IBM SPSS Statistics* versão 22.

4.3.3.1. *Autism Behavior Checklist* (ABC)

O *Autism Behavior Checklist* (ABC) é um teste utilizado para o rastreamento de comportamentos autísticos e contém 57 comportamentos atípicos listados para avaliação (KRUG et al., 1980). No Brasil, a lista foi traduzida, adaptada e pré-validada com o nome de Inventário de Comportamentos Autísticos (ICA) (MARTELETO e PEDROMÔNICO, 2005). A lista foi padronizada por meio da observação de professores para a triagem inicial de crianças suspeitas de TEA, sendo atualmente mais utilizada para os pais ou cuidadores. O ABC é mais utilizado durante o início do processo de diagnóstico em indivíduos suspeitos de terem TEA. O teste é organizado em cinco áreas: sensoriais, relacionais, imagem corporal, linguagem e interação social/autocuidado. Cada item é pontuado de 1 a 4 e determinado

estatisticamente de acordo com o grau de associação ao comportamento patológico. A pontuação para cada um dos cinco domínios é registrada resultando em pontuação parcial para cada domínio e posteriormente resulta em uma pontuação global. Caso a pontuação total atinja 68 pontos ou mais a criança apresenta suspeita de diagnóstico para o TEA (KRUG et al., 1980; KRUG et al., 1993); quando a pontuação total se encontra entre 54 e 67 a criança apresenta probabilidade moderada de diagnóstico de TEA; crianças que apresentam pontuação entre 47 e 53 são consideradas duvidosas para a classificação do TEA e escores abaixo de 47 indicam que a criança é típica. A lista tem sido amplamente utilizada em vários países, tanto na investigação quanto na prática clínica devido a facilidade de aplicação e o baixo custo.

4.3.3.2. Escala de Comportamento Adaptativo de Vineland, 2ª edição

A Escala de Comportamento Adaptativo de Vineland é um teste que avalia a comunicação, socialização, atividades diárias e habilidades motoras em seres humanos. Esta escala avalia os indivíduos com déficit intelectual, déficit de desenvolvimento, perturbações do Espectro Autista, perturbações de hiperatividade e déficit de atenção e doença de Parkinson/Alzheimer. Para indivíduos com TEA, essa escala tem sido utilizada com o objetivo de mensurar o comportamento adaptativo e a funcionalidade dos indivíduos (SPARROW; CICHETTI e BALLA, 2005; YANG, PAYNTER e GILMORE, 2016).

A edição utilizada no presente estudo avalia os domínios através de um escore final para cada domínio e os compara a um escore padrão da escala, resultando em um escore ponderado. Para tanto, o instrumento utiliza os escores obtidos na avaliação de cada domínio e subdomínio e este é convertido para a escala Vineland e então é comparado com as tabelas dadas pelo instrumento. A somatória das pontuações em cada domínio é então convertida à uma pontuação padrão, que será utilizada para obter o nível de comportamento adaptativo global perante a idade; o nível adaptativo; e a idade equivalente para cada domínio;

além disso com essa escala também é possível determinar os pontos fortes e fracos do indivíduo (SPARROW; CICCHETTI e BALLA, 2005).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises estatísticas foram utilizados o teste ANOVA de uma via com pós- teste de Tukey para analisar separadamente os genótipos.

5. RESULTADOS

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar se a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 interferia na funcionalidade dos pacientes com diagnóstico de TEA. Assim, inicialmente nós rastreamos a presença do polimorfismo nos 97 pacientes avaliados e encontramos as seguintes frequências: homocigóticos não polimórficos (TT) 22,7%, heterocigóticos (TA) 46,5% e homocigóticos polimórficos (AA) 30,8%. O primeiro achado importante foi o de que a frequência do polimorfismo em homocigose na população estudada está de acordo com os dados da literatura que descrevem sua frequência em outras populações (DORA et al., 2010).

A nossa hipótese inicial era a de que a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 poderia impactar negativamente na funcionalidade dos pacientes com diagnóstico de TEA. Para confirmar essa hipótese, nós comparamos os escores ponderados obtidos pelos testes utilizados nos três grupos encontrados: TT, TA e AA.

Inicialmente avaliamos os escores obtidos pela escala Vineland no domínio da comunicação (Fig. 1). Os resultados obtidos mostram que a presença do polimorfismo em homocigose melhora significativamente a comunicação receptiva quando comparados aos indivíduos selvagens TT, mas não nos subdomínios da comunicação expressiva e escrita e leitura. No entanto, no escore final do domínio da comunicação, a significância persiste mostrando que indivíduos AA apresentam melhor desempenho quando comparados aos selvagens. É importante salientar que embora não haja diferença estatística entre os grupos TT e AA quando comparados aos TA, há uma tendência de melhora neste grupo, sugerindo um efeito dose dependente do polimorfismo.

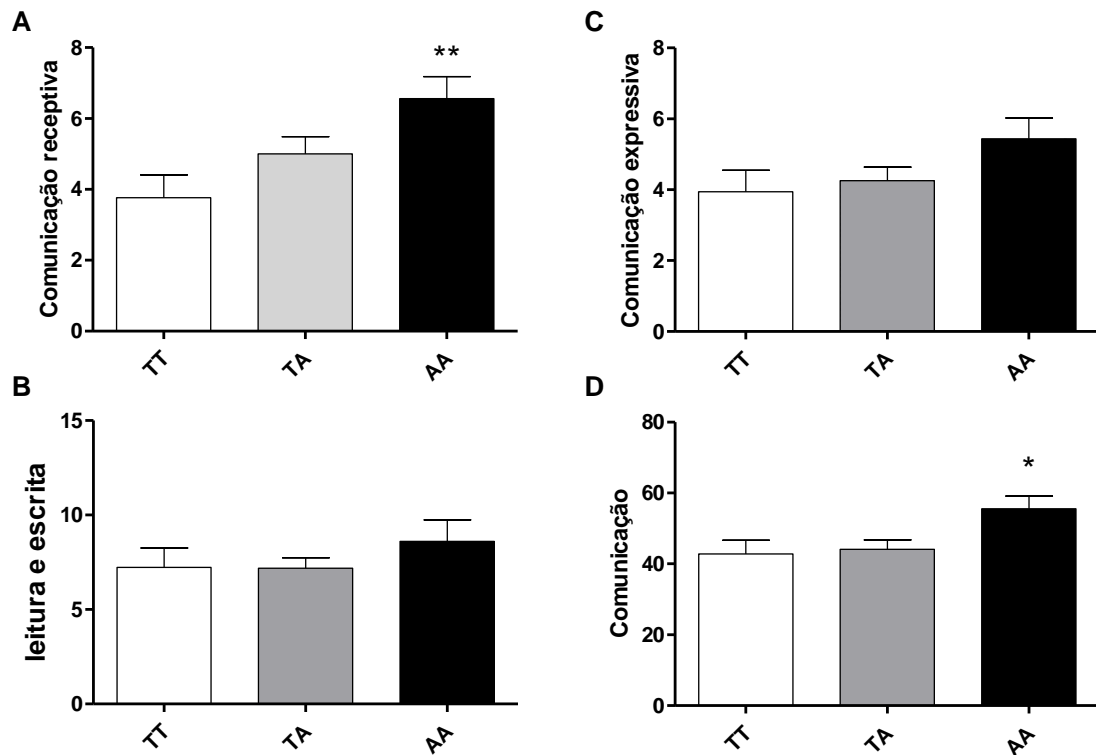


Figura 1: Escores ponderados obtidos pela Escala Vineland (2ª edição) avaliando os parâmetros de comunicação receptiva (A), de comunicação expressiva (B), leitura e escrita (C) e escore ponderado total da área de comunicação (D). Os grupos estudados são TT, indivíduos sem o polimorfismo Thr92Ala D2 (n=17); TA, indivíduos heterozigóticos (n=35); e AA, indivíduos homozigotos para o polimorfismo (n=23). A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Valores estão representados como média \pm EP. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$ vs TT.

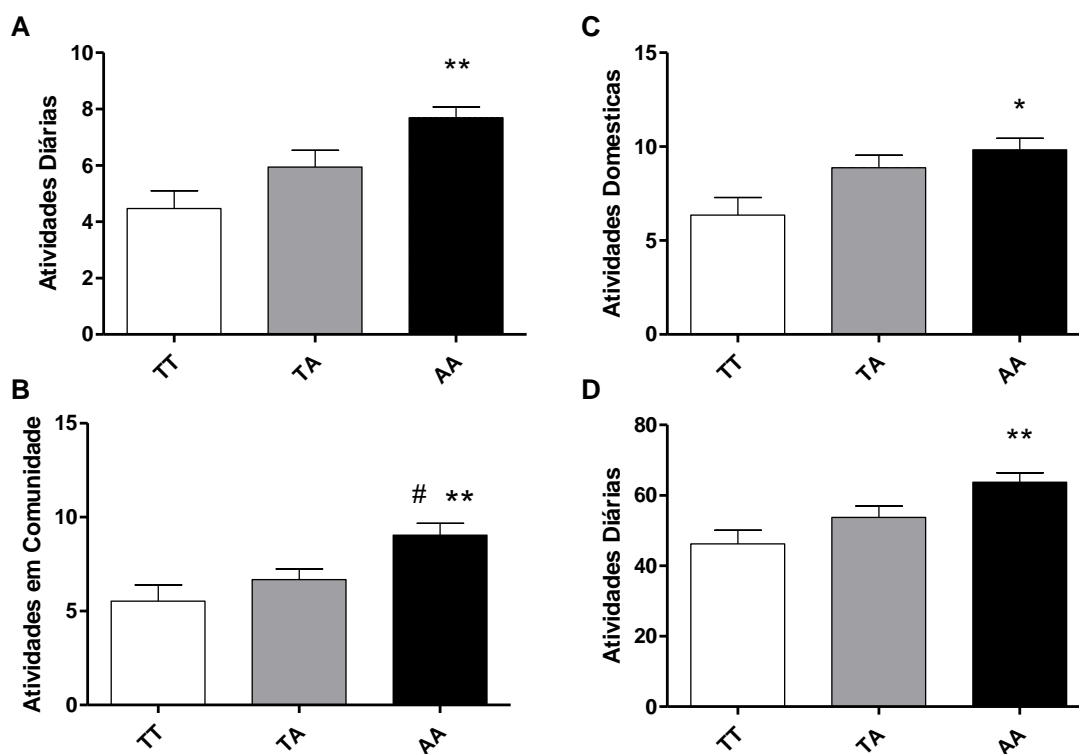


Figura 2: Escores ponderados obtidos pela Escala Vineland (2ª edição) avaliando os parâmetros de Atividades Diárias (A), de Atividades Domésticas (B), Atividades em comunidade (C) e escore ponderado total da área de Atividades Diárias (D). Os grupos estudados são TT, indivíduos sem o polimorfismo Thr92Ala D2 (n=17); TA, indivíduos heterozigóticos (n=35); e AA, indivíduos homozigotos para o polimorfismo (n=23). A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Valores estão representados como média \pm EP. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$ vs TT.

Na figura 2 estão agrupados os valores obtidos pela escala Vineland para o domínio das atividades diárias. A presença do polimorfismo em homozigote (AA) melhora os escores dos indivíduos com TEA nos três subdomínios, atividades diárias, domésticas e em comunidade, assim como o escore para o domínio de Atividades Diárias.

Ao compararmos os três genótipos, indivíduos homozigotos para o polimorfismo (AA) demonstram um melhor desenvolvimento na área de atividades diárias em relação ao fenótipo homozigoto não polimórfico (TT), mas não quando comparados aos indivíduos heterozigóticos (TA) (Figura 2-A). Para o subdomínio de atividades domésticas, o mesmo padrão apresentado nos domínios anteriores é observado. Como observa-se na figura 2-B, existe uma melhora nas performances de atividade doméstica por parte dos indivíduos heterozigóticos polimórficos (AA) em relação aos indivíduos monozigóticos

selvagens (TT), comparativamente aos indivíduos heterozigóticos (TA) não há diferença estatística. Já para o subdomínio de atividades em comunidade na figura 2-C, observa-se uma diferença do fenótipo homozigoto polimórfico (AA) com o indivíduo heterozigoto (TA) ($p < 0,05$) e quando comparado ao fenótipo homozigoto não polimórfico (TT), o indivíduo polimórfico homozigoto (AA) apresenta uma diferença também estatística ($p < 0,01$). No grande domínio das atividades diárias, não existe diferença estatística entre a performance do indivíduo heterozigótico (TA), porém quando comparados o grupo homozigoto não polimórfico (TT) e o grupo de indivíduos polimórficos homozigotos (AA), existe uma melhor performance na área de atividades diárias por parte dos indivíduos AA (Figura 2-D).

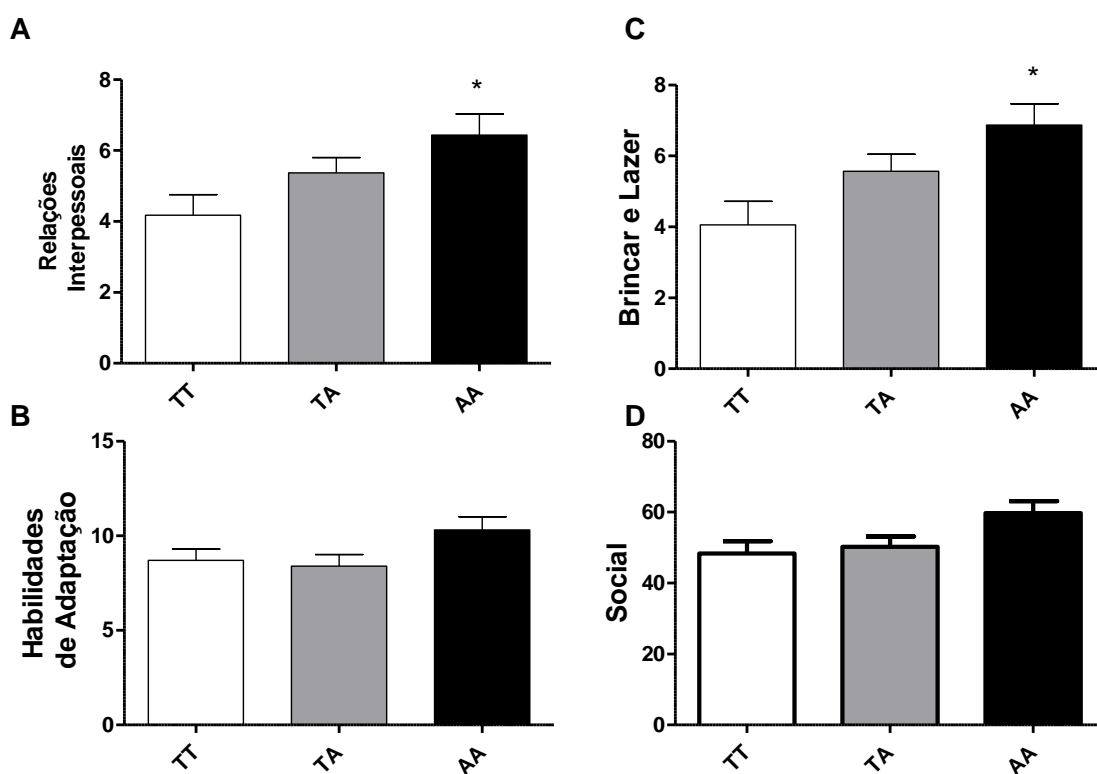


Figura 3: Escores ponderados obtidos pela Escala Vineland (2ª edição) avaliando os parâmetros de Relações Interpessoais (A), de Brincar e Lazer (B), Habilidades de Adaptação Social (C) e escore ponderado total da área Social (D). Os grupos estudados são TT, indivíduos sem o polimorfismo Thr92Ala D2 ($n=17$); TA, indivíduos heterozigóticos ($n=35$); e AA, indivíduos homozigotos para o polimorfismo ($n=23$). A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Valores estão representados como média \pm EP. * $p \leq 0.05$ vs TT.

No domínio social, na área de relações interpessoais podemos observar que o indivíduo homozigoto para o polimorfismo (AA) apresenta um melhor

desempenho ao compararmos com indivíduos homozigotos não polimórficos (TT), mas não quando comparamos com o grupo heterozigoto (TA) (Figura 3-A). No sub-domínio brincar e lazer, Figura 3-C existe diferença significativa entre o grupo polimórfico homozigoto (AA) quando comparado ao grupo homozigoto não polimórfico (TT), evidenciando uma melhor performance nesta área. No subdomínio habilidade de adaptação, a presença do polimorfismo não leva a qualquer alteração. Quando avaliamos o domínio social, o escore total obtido não apresenta diferença entre os grupos (Figura 3 - B e D).

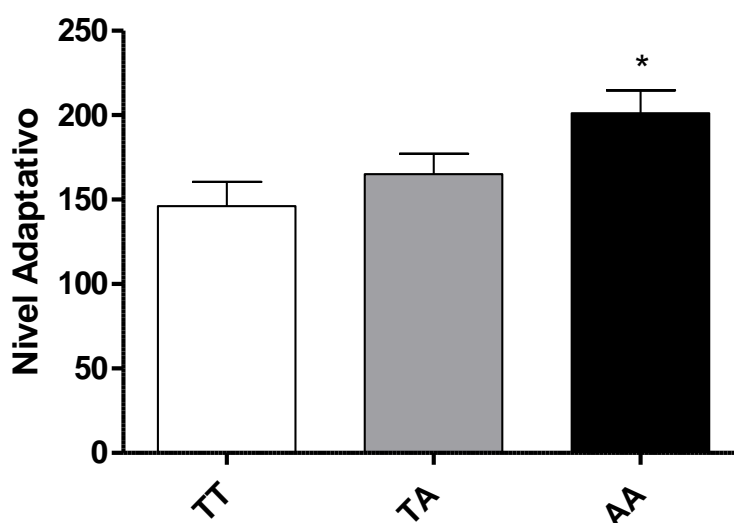


Figura 4: Escore ponderado obtido pela Escala Vineland (2ª edição) avaliando o Nível Adaptativo. Os grupos estudados são TT, indivíduos sem o polimorfismo Thr92Ala D2 (n=17); TA, indivíduos heterozigóticos (n=35); e AA, indivíduos homozigotos para o polimorfismo (n=23). A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Valores estão representados como média ±EP. * $p \leq 0.05$.

Na Figura 4 podemos observar que a pontuação final da Vineland mostra que a presença do polimorfismo em homozigose (AA) impacta positivamente os indivíduos com TEA quando comparados com os homozigotos não polimórficos (TT).

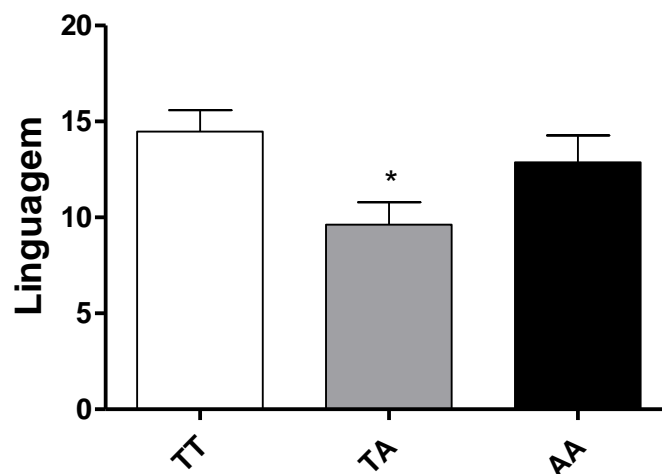


Figura 5: Escore total no domínio de linguagem para o teste Autistic Behaviour Checklist (ABC). Os grupos estudados são TT, indivíduos sem o polimorfismo Thr92Ala D2 (n=17); TA, indivíduos heterozigóticos (n=35); e AA, indivíduos homozigotos para o polimorfismo (n=23). A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Valores estão representados como média \pm EP. * $p \leq 0.05$.

Utilizamos o ABC para avaliar se a presença do polimorfismo poderia alterar os comportamentos nos autistas. Considerando os diversos comportamentos avaliados, apenas o domínio da linguagem apresentou significância quando presente em heterozigose (TA) quando comparado ao grupo não polimórfico TT. Em heterozigose o polimorfismo impacta negativamente a linguagem nos autistas (Figura 5).

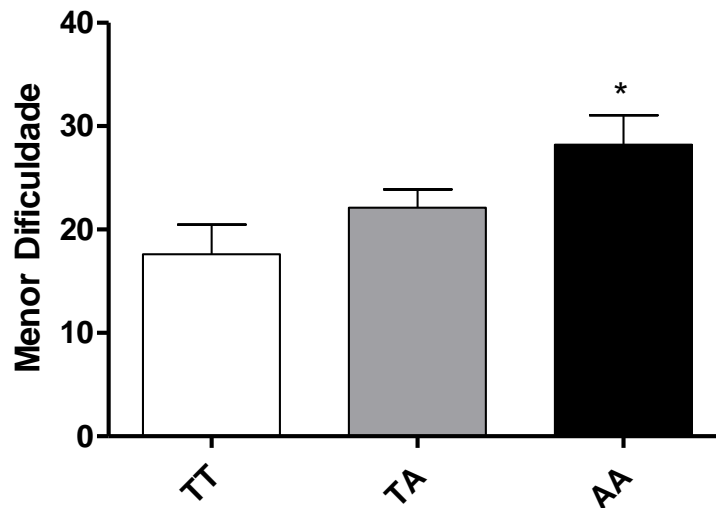


Figura 6: Escore total para o Questionário de Dificuldades Comunicativas (QDC), para área de menor dificuldade comunicativa. Os grupos estudados são TT, indivíduos sem o polimorfismo Thr92Ala D2 (n=17); TA, indivíduos heterozigóticos (n=35); e AA, indivíduos homozigotos para o polimorfismo (n=23). A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Valores estão representados como média ±EP. * $p \leq 0.05$.

Já no resultado obtido pelo QDC, podemos observar que no escore total para a área de menor dificuldade comunicativa, indivíduos homozigóticos para o polimorfismo (AA) tem menor dificuldade comparativamente aos indivíduos homozigotos não polimórficos (TT), porém não observamos diferença estatística quando comparamos o grupo heterozigoto (TA).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo verificar se a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 pode alterar o comportamento de indivíduos com TEA. Para tanto nós avaliamos a funcionalidade dos autistas nos domínios da comunicação, atividades diárias, aspectos sociais, nível adaptativo geral (Vineland 2º edição) e nas áreas de sensoriais, relacionais, imagem corporal, linguagem e interação social/autocuidado (ABC).

Os nossos resultados mostram que a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 em homozigose melhora a funcionalidade dos autistas nos subdomínios da Comunicação, Linguagem, Atividades Diárias e no Nível Adaptativo. Além disso, a presença do alelo 92Ala-D2 parece exercer um efeito dose-dependente, pois quando presente em heterozigose o escore apresenta valores intermediários entre os escores dos indivíduos em homozigose polimórfica (AA) e não polimórfica (TT).

Da mesma maneira, os resultados obtidos pelo CQD mostraram que os indivíduos com TEA que apresentam o polimorfismo em homozigose também têm menor dificuldade no domínio da comunicação.

Os dados obtidos se mostraram exatamente opostos à nossa hipótese inicial, o que é muito interessante uma vez que a presença do polimorfismo estressa a célula e esperávamos que o TEA somado ao estresse celular agisse de forma sinérgica piorando a funcionalidade dos pacientes.

Assim, levantamos hipóteses para tentar explicar quais seriam os possíveis mecanismos envolvidos na aparente melhora na funcionalidade dos indivíduos com TEA.

O estudo de McAninsh mostra que o polimorfismo leva a alterações em diversas vias metabólicas que têm sido descritas na literatura como implicadas no TEA. Uma dessas vias é a da Ubiquitina/proteossoma (UPS). A ubiquitinação é um processo celular que regula a expressão de diversas células. A ubiquitina marca proteínas para serem degradadas por um complexo multiproteico denominado proteossoma. A D2 é inativada por essa via com auxílio de enzimas que participam na ligação da ubiquitina com a D2 e o seu transporte até o

proteossoma para a sua degradação. Louros e Osterweil (2016) mostraram que proteínas ligases da ubiquitina, em específico a ligase E3A (UBE3A), participam da via UPS. Alterações na via das ligases podem levar à múltiplas mudanças patológicas típicas do TEA. Camundongos geneticamente modificados, com duplicações do gene que expressa a UBE3A exibem menor comportamento social e um repertório de comportamentos repetitivos (SMITH et al. 2011). Os mecanismos que podem influenciar esta situação não necessariamente resultam em uma alteração na quantidade das proteínas ligases, mas sim em um menor *turnover* proteico (LOUROS e OSTERWEIL, 2016). Os resultados do *microarray* em cérebros de indivíduos típicos, demonstram alterações na via da ubiquitinação em indivíduos com a presença do polimorfismo quando comparados a não polimórficos (MCANISHN et al., 2015). Essa alteração na ubiquitinação poderia ser a razão pela qual os indivíduos com TEA e com o polimorfismo Thr92Ala-D2 apresentam melhor desempenho funcional, ou seja, uma menor ativação da via de ubiquitinação poderia estar por trás da melhor interação social dos indivíduos com TEA e o polimorfismo.

Outra via metabólica importante que está alterada na presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 é a via da neuregulina. As neuregulinas (NRGs) pertencem a uma família de proteínas com função semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF) que ativa as tirosina-kinases associadas à membrana relacionadas com o receptor de EGF, conhecido como ErbB-1. Os primeiros estudos sobre as neuregulinas mostraram seu papel importante na proliferação das células de Schwann no sistema nervoso e na diferenciação, migração e sobrevivência de células satélites, células de Schwann e oligodendrócitos (LEMKE, 1996; BURDEN e YARDEN, 1997). Posteriormente, Li e colaboradores (2007) mostraram seu papel da sinalização mediada pelo ErbB-1 no hipocampo, região do cérebro fundamental para o aprendizado e a formação de memória.

Diversos estudos vêm demonstrando que alterações na via da neuregulina podem estar ligadas a alguns prejuízos sociais reconhecidamente presentes em transtornos globais do desenvolvimento (LEMKE et al., 2002). A via da neuregulina 1 mostra-se associada a formação dendrítica e alterações nessa via foram associadas à falta de inibição de pré-pulso, condição associada

à prejuízos sociais típicas em esquizofrenia e TEA (ROUSSOS et al., 2011; KOHL et al., 2014). Assim, é possível que alterações na via da neuregulina poderiam explicar a melhora na funcionalidade dos indivíduos com TEA e polimorfismo Thr92Ala-D2.

7. CONCLUSÃO

O polimorfismo Thr92Ala-D2 quando em homozigoze melhora a funcionalidade em comunicação, atividades diárias, aspectos sociais, nível adaptativo geral nos indivíduos com TEA.

8. BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, K. A. et al. Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β . **J. Biol. Chem.**, n. 273, p. 31880–31889, 1998.

ANAGNOSTOU, E. et al. Autism spectrum disorder: advances in evidence-based practice. **Canadian Medical Association Journal**, v.186, n. 7, p. 509-519, 2014.

ARROJO e DRIGO, R. et al. Endoplasmic reticulum stress decreases intracellular thyroid hormone activation via an eIF2a-mediated decrease in type 2 deiodinase synthesis. **Mol Endocrinol**. v. 25, p. 2065–2075, 2011.

ARROJO e DRIGO, R.; FONSECA, T. L.; WERNECK-DE-CASTRO, J. P. S.; BIANCO, A. C. Role of the Type 2 Iodothyronine Deiodinase (D2) in the Control of Thyroid Hormone Signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1830, p. 3956-3964, 2013.

ASPERGER H. 'Autistic Psychopathy' in childhood. (trans. U. Frith) In: Frith U. Autism and Asperger Syndrome. **Cambridge: Cambridge University Press**; 1944/1992. p. 37-62.

AUTRY, A. E. e MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological reviews**. v. 64, p. 238–258, 2012.

BABENKO O., KOVALCHUK I., METZ G. A. Epigenetic programming of neurodegenerative diseases by an adverse environment. **Brain Res**. v. 1444, p. 96–111, 2012.

BALASUBRAMANIAN, S. P.; COX, A.; BROWN, N. J.; REED, M. W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur J Surg Oncol**, v. 30, n. 6, p. 593-601, 2004.

BALESTRO, J. I. e FERNANDES, F. D. M. Questionário sobre dificuldades comunicativas percebidas por pais de crianças do espectro do autismo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 17, p. 279-286, 2012.

BAXTER, A. J., BRUGHA, T. S., ERSKINE, H. E., SCHEURER, R. W., VOS, T. e SCOTT, J. G. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. **Psychol. Med.** v. 45, p. 601–613, 2015.

BERBEL, P.; OBREGÓN, M. J.; BERNAL, J.; ESCOBAR DEL REY, F.; MORREALE DE ESCOBAR, G. Iodine supplementation during pregnancy: a public health challenge. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 9, p. 338-343, 2007.

BIANCO, A. C. SALVATORE, D. GEREBEN B., BERRY M. J, AND LARSEN P. R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 38–89, 2002.

BIANCO, A. C. Triplets! Unexpected structural similarity among the three enzymes that catalyze initiation and termination of thyroid hormone effects. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n.1, p.16-24, 2004.

BIANCO, A. C. Minireview: *cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling*. **Endocrinology**. v. 152, n. 9, p. 3306–11, 2011.

BIANCO, A. e MCANINCH, E. The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. **Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 1, p. 250–258, 2013.

BIBBY, P., EIKESETH, S., MARTIN, N. T., MUDFORD, O. C., & REEVES, D. Progress and outcomes for children with autism receiving parent-managed intensive interventions. **Research in Developmental Disabilities**, v. 23, p. 81–104, 2002.

BRENT, G.A. Mechanisms of thyroid hormone action. **J. Clin. Investig.** v. 122, 3035e3043, 2012.

BOS, S. D. et al. Increased type II deiodinase protein in OA-affected cartilage and allelic imbalance of OA risk polymorphism rs225014 at DIO2 in human OA joint tissues. **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 7, p. 1254-1258, 2012.

BUESCHER, A. V.; CIDAV, Z.; KNAPP, M. e MANDELL, D. S. Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721-728, 2014.

BURDEN, S. e YARDEN, Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signalling module in organogenesis and oncogenesis. **Neuron**. v. 18, p. 847–855, 1997.

CANANI LH et al. The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 90, p. 3472–3478, 2005.

CANTOR, R.M., YOON, J.L., FURR, J. e LAJONCHERE, C.M. **Mol. Psychiatry** v. 12, p. 419–421, 2007.

CELI, F. S. et al. Genomic characterization of the Coding Region of the Human Type II 5'-deiodinase Gene. **Molecular & Cellular Endocrinology**, v. 14, p. 49-52, 1998.

Center for Disease Control. Prevalence of autism spectrum disorder. Autism and Developmental Disabilities Monitoring network, United States, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summary**, v. 58, p. 1-14, 2009.

CHEZ, M.G, et al. Memantine as adjunctive therapy in children diagnosed with autistic spectrum disorders: an observation of initial clinical response and maintenance tolerability. *Journal of Child Neurology*. v.22, n.5, p.574-9, 2007.

CHISTIAKOV DA, SAVOST'ANOV KV & TURAKULOV RI. Screening of SNPs at 18 positional candidate genes, located within the GD-1 locus on chromosome 14q23–q32, for susceptibility to Graves' disease: a TDT study. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 83, p. 264–270, 2004.

COLAK, R.; KIM, T.; MICHAUT, M.; SUN, M.; IRIMIA, M.; BELLAY, J.; MYERS, C. L.; BLENCOWE, B. J.; KIM, P. M. Distinct types of disorder in the human proteome: functional implications for alternative splicing. **PLoS Comput Biol**, v. 9, n.4, 2013.

CROUTEAU, W.; WHITTEMORE, S. L.; SCHNEIDER, M. J.; ST. GERMAIN, D. L. Cloning and Expression of a cDNA for a Mammalian Type III Iodothyronine Deiodinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 16569-16575, 1995.

CROUTEAU, W.; DAVEY, J. C.; GALTON, V. A.; ST. GERMAIN, D. L. Cloning of the Mammalian Type II Iodothyronine Deiodinase. A Selenoprotein Differentially Expressed and Regulated in Human and Rat Brain and Other Tissues. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p. 405-417, 1996.

CURCIO-MORELLI, C.; ZAVACKI, A. M. et al. Deubiquitination of Type 2 Iodothyronine Deiodinase by von Hippel–Lindau Protein-interacting Deubiquitinating Enzymes Regulates Thyroid Hormone Activation. **Journal of Clinical Investigation**, n. 112, p. 189-196, 2003.

da-SILVA, W. S.; HARNEY, J. W. et al. The Small Polyphenolic Molecule Kaempferol Increases Cellular Energy Expenditure and Thyroid Hormone Activation. **Diabetes**, n. 56, p. 767-776, 2007.

DAVIS, P.J.; ZHOU, M.; DAVIS, F.B.; LANSING, L.; MOUSA, S.A.; LIN, HY. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. **Physiology & Behavior**., v.99, p. 237–239, 2010.

de RIJK, M. C.; ROCCA, W. A.; ANDERSON, D. W.; MELCON, M. O.; BRETELER, M. M.; MARAGANORE, D. M. A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Neurology**. v. 48, n. 5, p. 1277–81, 1997.

Dentice M, Bandyopadhyay A, Gereben B, Callebaut I, Christoffolete MA, Kim BW, Nissim S, Mornon JP, Zavacki AM, Zeold A, Capelo LP, Curcio-Morelli C,

Ribeiro R, Harney JW, Tabin CJ, Bianco AC. The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nat Cell Biol.* 2005;7(7):698–705

Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., ... Fombonne, E. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Research*, 5(3), 160-179

Estivalet AA, Leiria LB, Dora JM, Rheinheimer J, Boucas AP, et al. (2011) D2 Thr92Ala and PPARgamma2 Pro12Ala polymorphisms interact in the modulation of insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Obesity (Silver Spring)* 19: 825–832

Flamant F, Samarut J. Involvement of thyroid hormone and its alpha receptor in avian neurulation *Dev Biol.* 1998 May 1;197(1):1-11

Fletcher, G. J. O., Simpson, J. A., Thomas, G., & Giles, L. (1999). Ideals in intimate relationships. *Journal of Personality and Social Psychology*, 76, 72-89

Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric Research*, 65(6), 591-598.

Fiorito M, Torrente I, De Cosmo S, Guida V, Colosimo A, Prudente S, et al. Interaction of DIO2 T92A and PPARgamma2 P12A polymorphisms in the modulation of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:2889–95

FEKETE, C. et al. Expression patterns of WSB-1 and USP-33 underlie cell-specific posttranslational control of type 2 deiodinase in the rat brain. **Endocrinology**, v. 148, p. 4865-4874, 2007.

FOLSTEIN S.E., ROSEN-SHEIDLEY B (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. **Nat Rev Genet** 2:943–955. GALTON, V. A. et al. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology*, n. 148, v. 7, p. 3080-3088, 2007.

Grarup N, Andersen MK, Andreasen CH, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, et al. Studies of the common DIO2 Thr92Ala polymorphism and metabolic phenotypes in 7342 Danish white subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:363–6

GESCHWIND, Daniel H. Autism: Many Genes, Common Pathways?. **Cell**, v.35, n. 3, pub. 391-395, 2008

GEREBEN, B.; GONÇALVES, C.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R.; BIANCO, A. C. Selective Proteolysis of Human Type 2 Deiodinase: A Novel Ubiquitin-Proteasomal Mediated Mechanism for Regulation of Hormone Activation. *Molecular Endocrinology*, n. 14, p. 1697-1708, 2000

GOLDSTEIN, D B., CAVALLERI G. L. Understanding human diversity. **Nature**, v. 437, p.1241-1242, 2005.

GUADANO-FERRAZ, A.; OBREGON, M. J.; St GERMAIN, D. L.; BERNAL, J. The Type 2 Iodothyronine Deiodinase is Expressed Primarily in Glial Cells in the Neonatal Rat Brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 94, v. 19, p. 10391-10396, 1997.

GUO TW, ZHANG FC, YANG MS, et al. Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodinedeficient areas of China. **J Med Genet.** 2004;41(8):585–590.

GUPTA, A; STATE, M. Autismo: genética. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.28, p.29-38, 2006

HE B, LI J, WANG G, JU W, LU Y, SHI Y, HE L & ZHONG N 2009 Association of genetic polymorphisms in the type II deiodinase gene with bipolar disorder in a subset of Chinese population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 33 986-990.

Heemstra KA, Hoftijzer H, Van Der Deure WM, Peeters RP, Hamdy NA, Pereira A, Corssmit EP, Romijn JA, Visser TJ & Smit JW. The type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism is associated with increased bone turn-over and decreased femoral neck bone mineral density. **Journal of Bone and Mineral Research** 2010 25 1385–1391.

HERNANDEZ, A. et al. Localization of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase (*Dio3*) Gene to Human Chromosome 14q32 and Mouse Chromosome 12F1. *Genomics*, v. 53, p. 119-121, 1998.

HOUTEN, S. M.; WATANABE, M.; AUWERX, J. Endocrine Functions of Bile Acids. *EMBO Journal*, n. 25, p. 1419-1425, 2006.

HUANG, T. S.; CHAPRA, I. J.; BEREDO, A. Skin Is an Active Site for the Inner Ring Monodeiodination of Thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine. **Endocrinology**, v. 117, p. 2106, 1985.

JAKOBS, T. C. et al. Structure of the Human Type I Iodothyronine 5'-deiodinase Gene and Localization to Chromosome 1p32-p33. *Genomics*, v. 42, p. 361-363, 1997

Jessberger S., Toni N., Clemenson G. D. Jr., Ray J., Gage F. H. (2008). Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat. Neurosci.* 11, 888-893.

Johnson LN, Snape P, Martin JL, Acharya KR, Barford D, Oikonomakos NG Crystallographic binding studies on the allosteric inhibitor glucose-6-phosphate to T state glycogen phosphorylase b. *J Mol Biol* 232(1):253-67 1993

KANNER L. Autistic disturbances of affective contact. **Nerv Child.** 1943;2:217-50. (*Acta Paedopsychiatr.* 1968;35(4):100-36)

KAPLAN, M. M.; VISSER, T. J.; YASKOSKI, K. A.; LEONARD, J. L. Characteristics of Iodothyronine Tyrosyl Ring Deiodination by Rat Cerebral Cortical Microsomes. *Endocrinology*, v. 112, p. 35-42, 1983.

KLIN, Ami. Autismo e síndrome de Asperger: uma visão geral. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2006, vol.28, suppl.1, pp.s3-s11

Kohl K. D., Dearing M. D. (2014). Wild-caught rodents retain a majority of their natural gut microbiota upon entrance into captivity. *Environ. Microbiol. Rep.* 6 191–195

KOHRLE, J. Local activation and Inactivation of Thyroid Hormones: The Deiodinase Family. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 151, p. 103-119, 1999.

KOMANDER, D.; CLAGUE, M. J.; URBÉ, S. Breaking the Chains: Structure and Function of the Deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, n. 10, p. 550-563, 2009

KORNMAN KS, DI GIOVINE FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. **Ann Periodontol.** 1998; 3: 327-38.

KRUG DA, ARICK J, ALMOND P. Behavior checklist for identifying severely handicapped individuals with high levels of autistic behavior. **J Child Psychol Psychiatry.** 1980;21(3):221-9.

KRUG D, ARICK J, ALMOND P. Autism Behavior Checklist – ABC. In: Krug DA, Arick J, Almond P. Autism Screening Instrument for Educational Planning- **ASIEP-2.** Austin, Texas: PRO-ED; 1993.

LARSSON, H. et al. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *American Journal of Epidemiology.* v.161, p.916- 925, 2005

Lees A. J., Hardy J., Revesz T. Parkinson's disease. *The Lancet.*2009;373(9680):2055–2066.

Lemke G. Neuregulins in development. *Mol. Cell Neurosci.* 7, 247–262 (1996)

LEONARD, J.L. e VISSER, T. J. Biochemistry of deiodination. In: HENNEMANN, G. *Thyroid Hormone Metabolism.* Nova Iorque: Marcel Dekker, 1986. p. 128-229.

LEONARD, J. L. e KOEHRLE, J. Intracellular Pathways of Iodothyronine Metabolism. In: BRAVERMAN, L. E. e UTIGER, R. D. *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Filadélfia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. P. 125-161.

Li B, Woo RS, Malinow R. The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron*. 2007;54:583–597

Liu YY, Brent GA. 2002. A complex deoxyribonucleic acid response element in the rat Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV gene 5'-flanking region mediates thyroid hormone induction and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1 repression. *Mol Endocrinol*. 11:2439–2451

LOUROS S.R.; OSTERWEIL, E.K. Perturbed proteostasis in autism spectrum disorders *J Neurochem* 2016

Mant R, Williams J, Asherson P, Parfitt E, McGuffin P, Owen MJ (1994) The relationship between homozygosity at the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet* 54:21–26

McAninch EA, Jo S, Preite NZ, Farkas E, Mohacsik P, Fekete C, Egri P, Gereben B, Li

Y, Deng Y, Patti M-E, Zevenbergen C, Peeters RP, Mash DC, Bianco AC (2015) Prevalent Polymorphism in Thyroid Hormone-Activating Enzyme Leaves a Genetic Fingerprint That Underlies Associated Clinical Syndromes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (3):920-933

McAninch EA, Jo S, Preite NZ, Farkas E, Mohacsik P, Fekete C, Egri P, Gereben B, Li

Y, Deng Y, Patti M-E, Zevenbergen C, Peeters RP, Mash DC, Bianco AC (2015) Prevalent Polymorphism in Thyroid Hormone-Activating Enzyme Leaves a Genetic Fingerprint That Underlies Associated Clinical Syndromes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (3):920-933

McAninch EA, Jo S, Preite NZ, Farkas E, Mohacsik P, Fekete C, Egri P, Gereben B, Li Y, Deng Y, Patti M-E, Zevenbergen C, Peeters RP, Mash DC, Bianco AC (2015) Prevalent Polymorphism in Thyroid Hormone-Activating Enzyme Leaves a Genetic Fingerprint That Underlies Associated Clinical Syndromes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (3):920-933

MARTELETO MR, PEDROMÔNICO MR. Validity of Autism Behavior Checklist (ABC): preliminary study. **Rev Bras Psiquiatr.** 2005;27(4):295-301

McAninch EA, Jo S, Preite NZ, Farkas E, Mohacsik P, Fekete C, Egri P, Gereben B, Li Y, Deng Y, Patti M-E, Zevenbergen C, Peeters RP, Mash DC, Bianco AC (2015) Prevalent Polymorphism in Thyroid Hormone-Activating Enzyme Leaves a Genetic Fingerprint That Underlies Associated Clinical Syndromes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (3):920-933 2015

Mentuccia D., Proietti-Pannunzi L., Tanner K., Bacci V., Pollin T.I., Poehlman E.T., Shuldiner A.R., Celi F.S. Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor *Diabetes* 51:880-883 (2002)

Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk HJ, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1867–75.

NELSON,K; GREYHER, J; CROEN, L. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Annals of Neurology* v.49, p.597-606, 2001

OPPENHEIMER JH, SCHWARTZ HL Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* 18:462–475, 1997

Ohshima T., Hirasawa M., Tabata H., Mutoh T., Adachi T., Suzuki H., et al. . (2007). Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development* 134, 2273–2282

Ozonoff, S., Young, G., Carter, A. S., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L., et al. (2011). Recurrence risk for autism spectrum disorders: A baby siblings research consortium study. *Pediatrics*, 128(3), e488–e495

Panicker V, Saravanan P, Vaidya B, et al. Common variation in the DIO2 gene predicts baseline psychological well-being and response to combination thyroxine plus triiodothyronine therapy in hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1623–1629

Parasmo, B., Lowenthal, R., & Paula, C. S. (2015). Autism Spectrum Disorders: prevalence and service use in four Brazilian regions

Pardo C. A., Eberhart C. G. The neurobiology of autism. *Brain Pathology.* 2007;17(4):434–447

Paglini G. and Caceres A. (2001) The role of the Cdk5-P35 kinase in neuronal development. *Eur. J. Biochem.* 268, 1528–1533.

PATEL AJ, HUNT A, MEIER E. Effects of undernutrition and thyroid state on the ontogenic changes of D1, D2 and D3 brain specific proteins in rat cerebellum. *J Neurochem* 44:1581–1587, 1985

Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., and Tsai, L.H. (1999). *Nature* 402, 588–589

Paula CS, Ribeiro SH, Fombonne E, Mercadante MT. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study. *J Autism Dev Disord.* 2011;41(12):1738-42

Peltsverger MY, Butler PW, Alberobello AT, Smith S, Guevara Y, Dubaz OM, Luzon JA, Linderman J, Celi FS. The -258A/G (SNP rs12885300) polymorphism of the human type 2 deiodinase gene is associated with a shift in the pattern of secretion of thyroid hormones following a TRH-induced acute rise in TSH. *European journal of endocrinology/European Federation of Endocrine Societies.* 2012;166:839–845

Perito MES, Fortunato JJ. Marcadores Biológicos da Depressão: uma revisão sobre a expressão de fatores neurotróficos. *Revista Neurociências* 20 (4), 597-603 2012

RIBEIRO, R. C. J. et al. Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 53, p. 351-393, 1998

RISKIND, P. N.; KOLODNY, J. M.; LARSEN, P. R. The Regional Hypothalamic Distribution of Type II 5'-monodeiodinase in Euthyroid and Hypothyroid Rats. **Brain Research**, n. 420, v. 1, p. 194-198, 1987.

Role LW, Talmage DA. Neurobiology: new order for thought disorders. *Nature*. 2007;448:263–265

Ross H, Smith J. Training Parents to Mediate Sibling Disputes Affects Children's Negotiation and Conflict Understanding. *Child Dev*. 2007;78: 790–805

ROTHMAN KJ, MOORE LL, SINGER MR, NGUYEN US, MANNINO S, MILUNSKY, A Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 333:1369–1373, 1995

Roussos P, Giakoumaki SG, Georgakopoulos A, Robakis NK, Bitsios P. The CACNA1C and ANK3 risk alleles impact on affective personality traits and startle reactivity but not on cognition or gating in healthy males. *Bipolar disorders*. 2011;13:250–259

Rutter, M., 2005. Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning. *Acta Paediatr*. 94, 2–15

St Germain DL, Galton VA (1997) The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7: 655–668

SALVATORE, D.; BARTHA, T.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. Molecular Biological and Biochemical Characterization of the Human Type 2 Selenodeiodinase. *Endocrinology*, v. 137, p. 3308-3315, 1996.

Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *JAMA* 311, 1770–1777, doi: (2014)

SCHAAF CP., SABO A., SAKAI Y, et al. (2011) Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders. **Hum Mol Genet** 20:3366–3375

Scharfetter J, Chaudhry HR, Hornik K, Fuchs K, Sieghart W, Kasper S, Aschauer HN. "Dopamine D3 receptor gene polymorphism and response to clozapine in schizophrenic Pakistani patients". *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10:17-20. (1999)

SCHRÖDER, M. Endoplasmic Reticulum Stress Responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, n. 65, p. 862-894, 2008.

Shattuck PT. The contribution of diagnostic substitution to the growing administrative prevalence of autism in US special education. *Pediatrics.* 2006;117:1028–1037.

Shaw CA, Sheth S, Li D, Tomljenovic L. Etiology of autism spectrum disorders: Genes, environment, or both? *OA Autism* 2014 Jun 10;2(2):11

Smith JJ, Miller LR, Kreisberg R, Vazquez L, Wan Y, Aitchison JD. Environment-responsive transcription factors bind subtelomeric elements and regulate gene silencing. *Mol Syst Biol* 7:455 2011

SOLÍS-AÑEZ. Ernesto, DELGADO-LUEN-GO. Wilmer y HERNÁNDEZ. María Luisa. Autismo, cromosoma 15 y la hipótesis de disfunción GABAérgica. Revisión. 2007

Sparrow SS, Cicchetti VD, Balla AD. Vineland adaptive behavior scales. 2nd edition American Guidance Service; Circle Pines, MN: 2005.

Starkstein S, Gellar S, Parlier M, Payne L, Piven J. High rates of parkinsonism in adults with autism. *J Neurodev Disord.* 2015;7(1):29

STEINSAPIR, J.; HARNEY, J.; LARSEN, P. R. Type 2 Iodothyronine Deiodinase in Rat Pituitary Tumor Cells is Inactivated in Proteasomes. **Journal of Clinical Investigation**, n. 102, p. 1895-1899, 1998

STRACHAN T RA. **Genética molecular humana**. 2ª ed. Porto Alegre: Art Med; 2002.

Tarricone C, Xiao B, Justin N, Walker PA, Rittinger K, Gamblin SJ, Smerdon SJ
2001 The structural basis of Arfapatin-mediated cross-talk between Rac and Arf
signalling pathways. *Nature* 411(6834)

Tavares A. Polimorfismos dos genes do sistema renina angiotensina-aldosterona
e as moléstias cardiovasculares *Rev Bras Hipertens* 3: 237-42, 2000

TRONCONE L., SHAPIRO B., SATTI M.A., MONACO F., *Thyroid Diseases:
Basic Science, Pathology, Clinical and Laboratory Diagnoses. CRC Press, Boca
Raton, p. 145–154, 1992*

TU, H. M.; KIM, S. W.; SALVATORE, D.; BARTHA, T.; LEGRADI, G.; LARSEN,
P. R. et al. Regional Distribution of Type 2 Thyroxine Deiodinase Messenger
Ribonucleic Acid in Rat Hypothalamus and Pituitary and Its Regulation by Thyroid
Hormone. *Endocrinology*, n. 138, v. 8, p. 3359-3368, 1997.

TU, H. M.; LEGRADI, G.; BARTHA, T.; SALVATORE, D.; LECHAN, R. M.;
LARSEN, P. R. Regional Expression of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase
Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Central Nervous System and Its
Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology*, n. 140, v. 2, p. 784-790, 1999.

Vargas D. L., Nascimbene C., Krishnan C., Zimmerman A. W., and Pardo C. A.,
“Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with
autism,” *Annals of Neurology*, vol. 57, no. 1, pp. 67–81, 2005

VORSTMAN JA, MORCUS ME, DUIJFF SN, KLAASSEN PW, HEINEMAN-DE
BOER JA, BEEMER FA, SWAAB H, KAHN RS, VAN ENGELAND H., The
22q11.2 deletion in children: high rate of autistic disorders and early onset of
psychotic symptoms. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*. 2006;45:1104–
1113.

Werneck de Castro JP, Fonseca TL, Ueta CB, McAninch EA, Abdalla SM,
Wittmann G, et al. Differences in hypothalamic type 2 deiodinase ubiquitination
explain localized sensitivity to thyroxine. *J Clin Invest* (2015)

Weston, A. D., Blumberg, B. & Underhill, T. M. (2003) *J. Cell Biol.* 161,
223–228.

Williams, J.G., Higgins, J.P., Brayne, C.E., 2006. Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch. Dis. Child* 91, 8–15.

Wing L., Potter D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.*, 8 (2002), pp. 151–161

Wirdefeldt K, Weibull CE, Chen H, Kamel F, Lundholm C, Fang F, et al. Parkinson's disease and cancer: A register-based family study. *American journal of epidemiology*. 2014;179(1):85–94

WIROJANAN, J. et al. The efficacy of melatonin for sleep problems in children with autism, Fragile X syndrome, or autism and Fragile X syndrome. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, v.5, p.145– 150, 2009.

Woo, P. C., Chung, L. M., Teng, J. L., Tse, H., Pang, S. S., Lau, V. Y., Wong, V. W., Kam, K. L., Lau, S. K. & Yuen, K. Y. (2007). In silico analysis of 16S ribosomal RNA gene sequencing-based methods for identification of medically important anaerobic bacteria. *J Clin Pathol* 60, 576–579.

Yang S, Paynter JM, Gilmore L. Vineland Adaptive Behavior Scales: II profile of young children with autism spectrum disorder *Journal of autism and developmental disorders* 46 (1), 64-73 2016

Yoshii A., Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease *Developmental Neurobiology*, 70 (2010), pp. 304–322.