

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

ALYNA ARAÚJO E MARCONDES

EFEITO DO POLIMORFISMO THR92ALA DA ENZIMA DESIODASE TIPO 2
NO COMPORTAMENTO ADAPTATIVO DE INDIVÍDUOS COM
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

São Paulo

2018

ALYNA ARAÚJO E MARCONDES

EFEITO DO POLIMORFISMO THR92ALA DA ENZIMA DESIODASE TIPO 2
NO COMPORTAMENTO ADAPTATIVO DE INDIVÍDUOS COM
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

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

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Oliveira
Ribeiro

São Paulo

2018

M321e Marcondes, Ayna Araújo e.

Efeito do polimorfismo Thr92Ala da enzima desidase tipo 2 no comportamento adaptativo de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista / Ayna Araújo e Marcondes.

57 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Distúrbios do Desenvolvimento) –
Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2018.

Orientadora: Miriam Oliveira Ribeiro.

Referências bibliográficas: f. 50-57.

1. Polimorfismo Thr92Ala D2. 2. TEA. 3. Comportamento adaptativo. I. Ribeiro, Miriam Oliveira, *orientadora*. II. Título.

CDD 616.8982

ALYNA ARAÚJO E MARCONDES

EFEITO DO POLIMORFISMO THR92ALA DA ENZIMA DESIODASE TIPO 2
NO COMPORTAMENTO ADAPTATIVO DE INDIVÍDUOS COM
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA


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

Aprovada em 12 de dezembro de 2018.

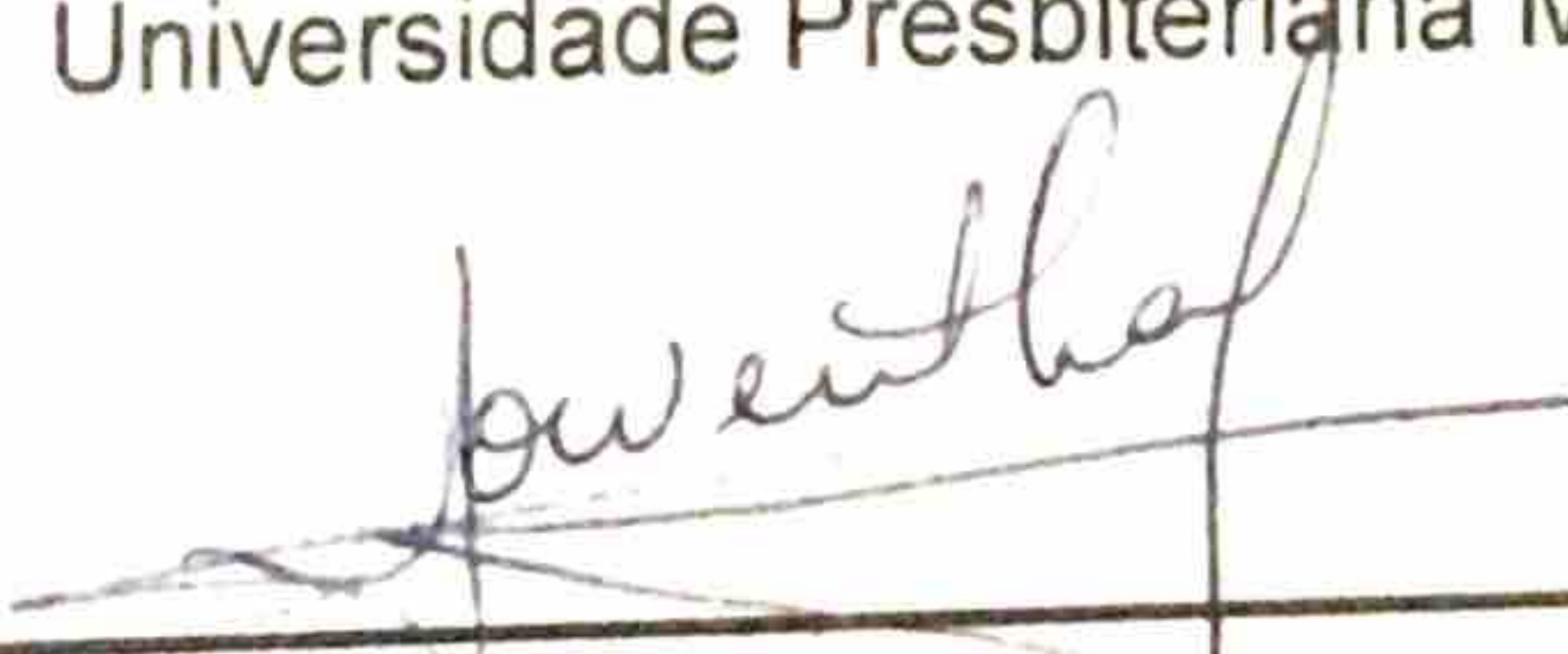
BANCA EXAMINADORA



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



Prof.ª Dr.ª Marina Monzani da Rocha
Universidade Presbiteriana Mackenzie



Profa. Dra. Rosane Lowenthal
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa (FCMSC)

Agradecimentos

Agradeço à Deus, a quem eu devo a minha vida e toda a jornada até aqui, por ter me dado essa oportunidade e me ajudado ao longo do caminho.

Aos meus pais por serem meus exemplos de dedicação e responsabilidade e por terem sido amor, apoio e incentivo desde a ideia inicial do mestrado.

Aos meus irmãos e cunhada, Thales, Yelaila e Natália, pela convivência mais próxima, por ouvirem minhas preocupações e entusiasmos, por apoiarem nos dias mais difíceis e compartilharem os momentos de distração.

À minha família e aos amigos que fizeram com que esse tempo fosse melhor, mais leve e mais divertido, dando mais significado a esses dois últimos anos.

À minha orientadora, professora Miriam, pelo incentivo nos momentos de dúvida, pelo conhecimento e tempo compartilhados comigo, pelo aprendizado e bom relacionamento cultivados ao longo do processo. Agradeço pela tranquilidade nos dias de insegurança e pela confiança.

Agradeço aos colegas do laboratório de Neurobiologia e Metabolismo Energético pela companhia nos dias de trabalho e pelas ajudas, comentários e sugestões que recebi, ainda que dividíssemos rotinas e projetos tão diferentes.

À Alice por ser parceira de laboratório, por me acompanhar em cada procedimento, me ensinando o que já havia aprendido e dividindo comigo a ansiedade na espera de cada resultado. À professora Ana Paula Pimentel Costa por compartilhar os conhecimentos e protocolos já utilizados em seu laboratório para que eu pudesse aplicar à minha pesquisa.

Agradeço ao CAISM, às famílias e pacientes que fizeram parte desse projeto, contribuindo não só para o meu trabalho, mas também para o avanço na construção do conhecimento acerca do Transtorno do Espectro Autista; à equipe de profissionais cujos trabalhos foram importantes para o desenvolvimento dessa pesquisa; à Dra. Rosane Lowenthal por em tão pouco tempo e em meio às demandas do serviço dividir comigo o resultado de anos de trabalho e dedicação ao cuidado e atenção aos pacientes com TEA; à Luciana por realizar as coletas de material biológico para a minha pesquisa, somando mais essa atividade ao seu trabalho diário.

À Universidade Presbiteriana Mackenzie e ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento pela excelência no ensino; aos professores pelas aulas, discussões e trocas de experiências; aos colegas pelo apoio, por dividirem os mesmos anseios, pela ajuda mútua, por compartilharem as dúvidas, os aprendizados e as conquistas.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Mato Grosso, para onde eu retorno ao final dessa etapa com o objetivo de aplicar e dividir o conhecimento adquirido, contribuindo para o enriquecimento dos serviços prestados.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco, à medida que vamos adquirindo conhecimento, instala-se a dúvida”

Johann Goethe

Resumo

O Thr92Ala é um polimorfismo da D2, enzima cuja principal função é converter T4 em T3, forma biologicamente ativa do hormônio tireoidiano. Esse polimorfismo tem sido relacionado a transtornos como Esquizofrenia, Depressão e Alzheimer, e foi demonstrado que em indivíduos homozigotos para o polimorfismo existe uma alteração no padrão de expressão de genes ligados aos processos neurodegenerativos e estresse oxidativo no Sistema Nervoso Central (SNC). Estudos com indivíduos com Transtorno do Espectro Autista (TEA) têm demonstrado que esses pacientes apresentam maior estresse oxidativo celular. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se pacientes com TEA que apresentavam o polimorfismo teriam piores resultados nas avaliações cognitivas e comportamentais quando comparados aos pacientes que não apresentavam o polimorfismo. Foram avaliados 132 pacientes com TEA atendidos em unidade de referência e foram avaliados os resultados obtidos no *Autism Behavior Checklist* (ABC), Escala Vineland de Comportamento adaptativo, testes de QI e em duas avaliações de *Autism Treatment Evaluation Checklist* (ATEC). Foi possível observar que os pacientes que expressavam o alelo polimórfico em homozigose tiveram melhor desempenho que os pacientes com genótipo selvagem nos seguintes parâmetros: Comunicação, Comunicação Receptiva, Atividades de vida diária e Autocuidado, e pacientes com genótipo selvagem e com piores resultados no ABC obtiveram melhora significativa nas habilidades de socialização avaliadas pela ATEC após a intervenção. Portanto, a presença do polimorfismo melhora o desempenho adaptativo dos indivíduos, mas parece prejudicar a resposta do paciente à terapia proposta. Mais estudos são necessários para aumentar a compreensão acerca do papel dessa enzima e os mecanismos pelos quais o polimorfismo altera o funcionamento do SNC, tanto para indivíduos de desenvolvimento típico quanto para aqueles com algum distúrbio do desenvolvimento.

Palavras-chave: Polimorfismo Thr92Ala D2, TEA, comportamento adaptativo

Abstract

Thr92Ala D2 it's the polymorphism of a thyroid hormone enzyme responsible to convert T4 in its active form, T3. This polymorphism has been related to Schizophrenia, Depression and Alzheimer's disease, and its been shown that in the presence of both polymorphic alleles there's a difference in the expression of genes relates to neurodegenerative process and oxidative stress in Central Nervous System (CNS). Studies with Autism Spectrum Disorder (ASD) patients has demonstrated that in this group, cells are more likely to present oxidative stress condition. The aim of this study was to evaluate whether ASD patients expressing Thr92Ala-D2 polymorphism would have poorer results at cognitive and behavioral tests when compared with patients without the polymorphism. Were assessed 132 ASD patients and the results of *Autism Behavior Checklist* (ABC), Vineland Scale of Adaptative Behavior, IQ and *Autism Treatment Evaluation Checklist* (ATEC). The analyses showed that patients expressing the polymorphism had better performances in Communication, Receptive Communication, Daily Living and Selfcare, although patients with wild genotyping and more critical ABC results had significative improvement of their social skills after interventions. Therefore, the existence of polymorphism improves adaptative performance in ASD patients, however the polymorphism seems to impair patient's response to therapies. More researches are necessary in order to improve the comprehension of enzyme's role and mechanisms underlying polymorphism's CNS fingerprint.

Key words: Thr92Ala-D2 polymorphism, ASD, adaptive behavior

Lista de Figuras

Figura 1 - Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (BRENT, 2012).....	14
Figura 2 - Transcrição gênica mediada por T3. RXR: retinoid x receptor; TRE: thyroid hormone response element (BRENT, 2012).....	15
Figura 3 - Desiodação mediada pelos diferentes tipos de desiodases e seus respectivos produtos (SPEK; FLIERS; BOELEN, 2017)	16
Figura 4 - Polimorfismo Thr92Ala Dio2. A: PCR-SSCP. B: Sequenciamento de DNA Dydeoxy. C: PCR-RFLP com Bsg-I. 1, Thr92 homozigoto; 2, heterozigoto; 3, Ala92 homozigoto (MENTUCCIA et al., 2002)	20
Figura 5 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes nas avaliações realizadas: (A) ABC, (B) QI, (C) Vineland, (D) ATEC inicial e (E) ATEC final. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). As análises estatísticas utilizadas foram ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para o ABC e a Vineland, e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para o QI, ATEC inicial e ATEC final. Não houve diferença significativa em nenhuma das análises.	38
Figura 6 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes no domínio (A) Comunicação e seus respectivos subdomínios: (B) Comunicação Receptiva, (C) Comunicação Expressiva e (D) Leitura e Escrita. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). As análises estatísticas utilizadas foram ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, exceto para o subdomínio Leitura e Escrita cuja análise foi feita utilizando Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * p<0,05 vs. TT e AT.	39
Figura 7 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes no domínio (A) Atividades Diárias e seus respectivos subdomínios: (A) Autocuidado, (B) Doméstico e (C) Comunidade. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). As análises estatísticas utilizadas foram ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey,	

exceto para o subdomínio Autocuidado cuja análise foi feita utilizando Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * $p < 0,05$ vs. TT. 40

Figura 8 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes no domínio (A) Socialização e seus respectivos subdomínios: (B) Relações Interpessoais, (C) Brincar e (D) Lazer e Habilidades de Adaptação. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). A análise estatística utilizada foi Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. 41

Figura 9 – Teste de correlação entre (A) o resultado do ABC e os resultados de QI e (B) o resultado do ABC e os resultados da Vineland, para cada um dos genótipos: selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). Foi feito teste de correlação com regressão linear e não houve resultado significativo estatisticamente para nenhuma das análises..... 42

Figura 10 – Teste de correlação entre o Δ ATEC e o resultado do ABC. (A) Grupo selvagem (TT), (B) Grupo heterozigoto (AT) e (C) Grupo polimórfico (AA). Os testes mostraram correlação significativa apenas em (A). $r=0,3778$ e $p=0,0302$ 42

Figura 11 – Teste de correlação entre o delta das 4 áreas da ATEC e o resultado do ABC dos pacientes do grupo selvagem (TT). (A) Δ Área 1 da ATEC; (B) Δ Área 2 da ATEC; (C) Δ Área 3 da ATEC; (D) Δ Área 4 da ATEC. Os testes mostraram correlação significativa apenas em (B). $r=-0,3995$ e $p=0,0130$ 43

Figura 12 – Teste de correlação entre o delta das 4 áreas da ATEC e o resultado do ABC dos pacientes do grupo heterozigoto (AT). (A) Δ Área 1 da ATEC; (B) Δ Área 2 da ATEC; (C) Δ Área 3 da ATEC; (D) Δ Área 4 da ATEC. Os testes mostraram ausência de correlação em todas as análises. 44

Figura 13 - Teste de correlação entre o delta das 4 áreas da ATEC e o resultado do ABC dos pacientes do grupo homozigoto polimórfico (AA). (A) Δ Área 1 da ATEC; (B) Δ Área 2 da ATEC; (C) Δ Área 3 da ATEC; (D) Δ Área 4 da ATEC. Os testes mostraram ausência de correlação em todas as análises. 44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização da amostra (n=132)	36
Tabela 2. Distribuição dos genótipos de acordo com probabilidade de diagnóstico de TEA, considerando a pontuação obtida no ABC	37
Tabela 3. Distribuição dos genótipos de acordo com o padrão de comunicação	37

Lista de Abreviaturas

A – Adenina

AA – Genótipo homocigoto polimórfico

ABC – *Autism Behavior Checklist*

Ala – Alanina

Asp – Aspartato

AT – Genótipo heterocigoto

ATEC – *Autism Treatment Evaluation Checklist*

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

D1 – Desiodase Tipo 1

D1KO – *knock-out* do gene da D1

D2 – Desiodase Tipo 2

D2KO – *knock-out* do gene da D2

D3 – Desiodase Tipo 3

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Endotelial

G – Guanina

Gly – Glicina

HT – Hormônio tireoidiano

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

QI – Quociente de Inteligência

SD – Síndrome de Down

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Polimorfismo de Único Nucleotídeo

SON – Teste não verbal de Inteligência Snijders-Oomen

T2 – Diiodotironina

T3 – Triiodotironina

T3-r – T3 reverso

T4 – Tiroxina

TEA – Transtorno do Espectro Autista

Thr – Treonina

TR – Receptor do Hormônio Tireoidiano

TRH – Hormônio Liberador de Tireotrofina

TSH – Hormônio Tireoestimulante

TT – Genótipo homocigoto selvagem

WAIS – Escala de Inteligência Weschler para Adultos

WISC – Escala de Inteligência Weschler para Crianças

Sumário

1. Introdução	14
1.1 Hormônios tireoidianos	14
1.2 Desiodases	16
1.3 Polimorfismo Thr92Ala-D2	19
1.4 Transtorno do Espectro Autista.....	24
2. Objetivo	27
3. Método	28
3.1 Aspectos Éticos.....	28
3.2 Local	28
3.3 População	28
3.4 Amostra.....	28
3.5 Protocolo de Atendimento do Ambulatório.....	29
3.6 Instrumentos de Avaliação.....	30
3.6.1 Autism Behavior Checklist (ABC).....	30
3.6.2 Autism Treatment Checklist (ATEC)	30
3.6.3 Teste não verbal de Inteligência Snijders-Oomen (SON)	31
3.6.4 Escalas de Inteligência Weschler	31
3.6.5 Escala Vineland de Comportamento Adaptativo.....	32
3.7 Procedimentos	33
3.7.1 Coleta de Material Biológico	33
3.7.2 Extração do DNA	33
3.7.3 Genotipagem	33
3.7.4 Avaliação da inteligência e do funcionamento adaptativo.....	34
3.7.5 Análise Estatística dos Dados	35
4. Resultados	36
5. Discussão	45
6. Conclusão	49
Referências Bibliográficas	50

1. Introdução

1.1 Hormônios tireoidianos

A tireoide é uma glândula cuja atividade é regulada pela tireotrofina (TSH), hormônio produzido e secretado pela adeno-hipófise que, por sua vez, é regulado pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), produzido no hipotálamo. Sob ação do TSH a tireoide produz e libera dois hormônios: 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina, T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3) (Figura 1). Os hormônios tireoidianos (HT) têm papel fundamental na regulação de uma miríade de processos fisiológicos. São essenciais tanto na fase embrionária, induzindo e atenuando a diferenciação celular, como após o nascimento. No Sistema Nervoso Central (SNC) apresentam ação importante regulando proliferação, diferenciação e migração neuronal, além da formação de sinapses e o processo de mielinização dos neurônios (para revisão ver CHAKER et al., 2017).

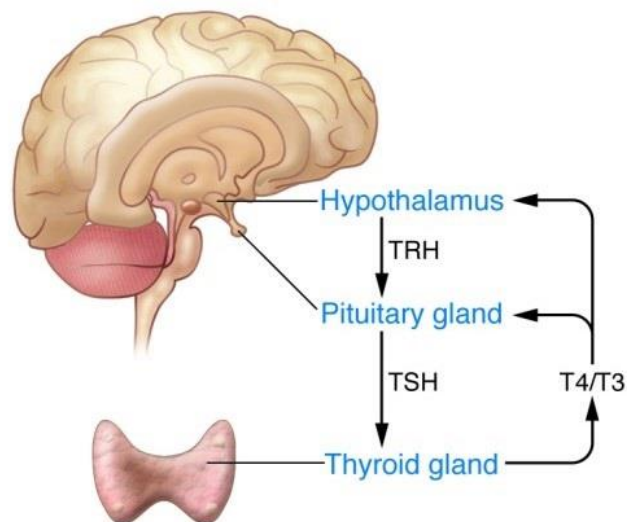


Figura 1 - Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (BRENT, 2012)

Cerca de 80% da produção tireoidiana corresponde ao T4, porém a forma biologicamente ativa do hormônio é o T3. O T4 é considerado um pró-hormônio e o T3 é capaz de se ligar a receptores nucleares (TR) regulando a transcrição gênica (para revisão ver BRENT, 2012). Sabe-se, entretanto, que

em concentrações elevadas pode ocorrer a ligação de T4 ao sítio do TR (para revisão ver GALTON, 2017). O processo de conversão de T4 em T3 é chamado de desiodação (para revisão ver DRIGO et al., 2013).

Inúmeros genes têm sua transcrição regulada pelo HT. O T3 promove a transcrição gênica ao se ligar ao sítio ativo do receptor, o TR, que se encontra nas regiões reguladoras dos genes. (Figura 2). O TR funciona como um fator de transcrição dependente de T3 de modo que quando o T3 se desliga do TR, a transcrição é interrompida (CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010; BRENT, 2012).

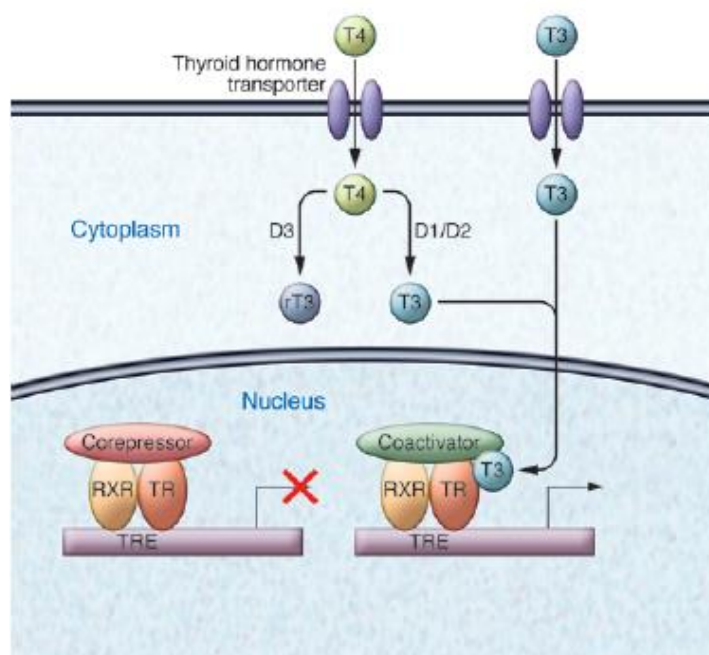


Figura 2 - Transcrição gênica mediada por T3. RXR: *retinoid x receptor*; TRE: *thyroid hormone response element* (BRENT, 2012)

1.2 Desiodases

Como o T3 é a forma biologicamente ativa, mas o T4 é a forma predominante sintetizada pela tiroide, a desiodação é importante para ativar o T4 a T3. Essa homeostase do hormônio tireoidiano é catalisada por enzimas chamadas de iodotironina desiodases tipo 1, tipo 2 e tipo 3 (D1, D2 e D3), cada uma atuando preferencialmente em determinado órgão ou sistema (BIANCO et al., 2002).

Além de ativar, a desiodação também promove a inativação do hormônio ao converter T3 em T2 (3,3'-diiodotironina) e T4 em T3 reverso (3,3',5'-triiiodotironina, T3-r) (Figura 3). Tanto a forma T2 quanto a forma T3-r são formas inativas e os respectivos processos de inativação são importantes para regular os níveis hormonais no organismo (CHOPRA, 1976; BIANCO et al., 2002).

As concentrações plasmáticas de T3 e T4 são constantes e os tecidos estão expostos às mesmas condições. Assim, é a disponibilidade e a atividade intracelular das desiodases, especialmente D2 e D3, que regulam a concentração de T3 nos tecidos. As atividades de D2 e D3 no interior da célula se ajustam às necessidades do tecido garantindo concentrações de T3 adequadas à atividade metabólica. Quanto maior a concentração de T3 intracelular, maior a formação do complexo nuclear TR-T3 e mais intensa é a regulação da transcrição gênica (BIANCO et al., 2002).

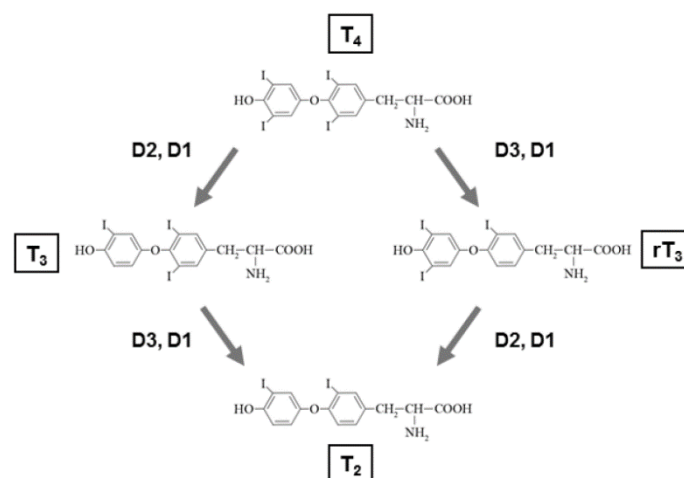


Figura 3 - Desiodação mediada pelos diferentes tipos de desiodases e seus respectivos produtos (SPEK; FLIERS; BOELEN, 2017)

A D1 foi a primeira das desidases a ser clonada e está presente, nos seres humanos, principalmente no fígado, rim, tireoide e hipófise e não está presente no SNC (BIANCO et al., 2002). Ela é responsável por converter T4 em T3 e T3 em T2. Seu papel na homeostase do HT ainda não é claro, mas parece ser importante na manutenção da concentração de iodo (SCHNEIDER et al., 2006). Estudo com ratos submetidos a *knock-out* do gene *Dio1* (D1KO) não mostrou alterações importantes no bem-estar geral, crescimento e reprodução desses animais, entretanto, os animais apresentavam menores concentrações de iodo inorgânico quando comparados aos animais selvagens (SCHNEIDER et al., 2006).

A D3 é a principal enzima de inativação hormonal, responsável por converter T4 em rT3 e T3 em T2. A presença da D3 é marcante em tecidos em desenvolvimento e tende a diminuir na medida em que esses tecidos amadurecem. Estudos de distribuição da D3 em ratos apontaram para a presença da enzima no SNC, pele e placenta. Nos seres humanos também foi observada a presença de D3 no fígado de fetos no início da vida embrionária. (BIANCO et al., 2002; BATES; GERMAIN; GALTON, 1999; RICHARD et al., 1998; BIANCO; CONCEIÇÃO, 2018).

Já a D2 está mais presente na tireoide, nos músculos esquelético e cardíaco, tecido adiposo, SNC e hipófise. É capaz de converter T4 em T3 e de converter rT3 em T2. Tem papel tanto na produção de T3 local quanto de T3 circulante (BIANCO et al., 2002).

A D2 é responsável pela maior parte de T3 circulante e tem sua atividade influenciada pelo sistema ubiquitina-proteossoma. A proteína ubiquitina se liga à enzima, inativando-a, e então a enzima ubiquitinada é degradada nos proteossomas. (BIANCO et al., 2002).

O gene *Dio2* está localizado no braço longo do cromossomo 14, na posição 14q24 (ARAKI et al., 1999). Schneider e colaboradores conduziram experimento com ratos *knock-out* do gene *Dio2* e demonstraram completa perda da atividade enzimática, porém sem surgimento de fenótipo importante que os diferenciasse dos animais selvagens. Foi observado aumento nas concentrações plasmáticas de T4 e TSH dos animais D2KO, sugerindo a

importância enzimática no processo de feedback e regulação do eixo hipófise-tireoide (SCHNEIDER et al., 2001).

Em outro estudo, a inativação local do Dio2 em astrócitos demonstrou a importância da D2 na sinalização cerebral, alterando o padrão de expressão de diversos genes, em comparação com os animais selvagens. A implicação dos genes impactados em processos ligados a humor e comportamento sugerem a relação da sinalização da D2 com transtornos ansiosos e depressivos (BOCCO et al., 2016).

Posteriormente, pesquisadores testaram a inativação local precoce do gene Dio2 em células do músculo esquelético, já que a miogênese é positivamente regulada pelo HT. Entretanto, os resultados mostraram que o fenótipo muscular dos animais experimentais não era notadamente diferente dos controles, sugerindo a existência de mecanismos de compensação que garantissem concentração adequada de T3 nas células (IGNACIO, et al., 2017).

Em 2002 foi descrita pela primeira vez a ocorrência de um polimorfismo no gene Dio2, o polimorfismo Thr92Ala. Os pesquisadores identificaram uma correlação positiva entre este polimorfismo e a resistência à insulina em pacientes diabéticos (MENTUCCIA et al., 2002). Assim como os estudos com inativação global ou local de um gene, os estudos de variações genéticas e suas implicações na atividade da proteína e funcionamento da célula, também podem auxiliar na compreensão do papel da D2 (MENTUCCIA et al., 2002).

1.3 Polimorfismo Thr92Ala-D2

Polimorfismos genéticos são alterações na sequência de um gene que se apresentam na população em frequência superior a 1% e que, em sua maioria, não determinam alterações estruturais ou funcionais nas proteínas (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Entretanto, alguns polimorfismos podem ser implicados na patogênese, susceptibilidade ou severidade de doenças, bem como na resposta do paciente aos tratamentos propostos (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Os polimorfismos podem ser causados pela deleção ou inserção de um ou mais nucleotídeos na sequência gênica, pela alteração no número de repetições de uma sequência de bases ou pela substituição de um único par de bases na cadeia de nucleotídeos, são os *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

A região codificadora do gene Dio2 é formada por dois éxons separados entre si por cerca de 7.4 kb (CELLI et al., 1998). Dois SNPs, localizados um em cada éxon, têm sido os principais polimorfismos alvos de estudos para compreensão do papel da D2: o Thr92Ala (rs225014) e o ORFa-Gly3Asp (rs12885300) (MEDICI et al., 2015).

O SNP ORFa-Gly3Asp é resultado da troca de uma Glicina (Gly) por um Aspartato (Asp) no terceiro códon e foi descrito primeiramente em 2005. Na ocasião, foi associado ao aumento da relação T3/T4, sugerindo aumento da atividade catalítica da enzima, entretanto, um estudo posterior não obteve o mesmo resultado (PEETERS et al., 2005; JONG et al., 2007). Assim, ainda não é clara a relevância fisiológica deste polimorfismo.

Já o polimorfismo Thr92Ala é um SNP causado pela troca de uma adenina (A) por uma guanina (G), na posição 274 das bases nitrogenadas, alterando a sequência gênica de ACA para GCA (Figura 4). No momento da transcrição, o códon 92 é alterado de TGT para CGT, o que leva à inserção do aminoácido alanina (Ala) onde deveria haver uma treonina (Thr) na sequência de aminoácidos da proteína (MENTUCCIA et al., 2002).

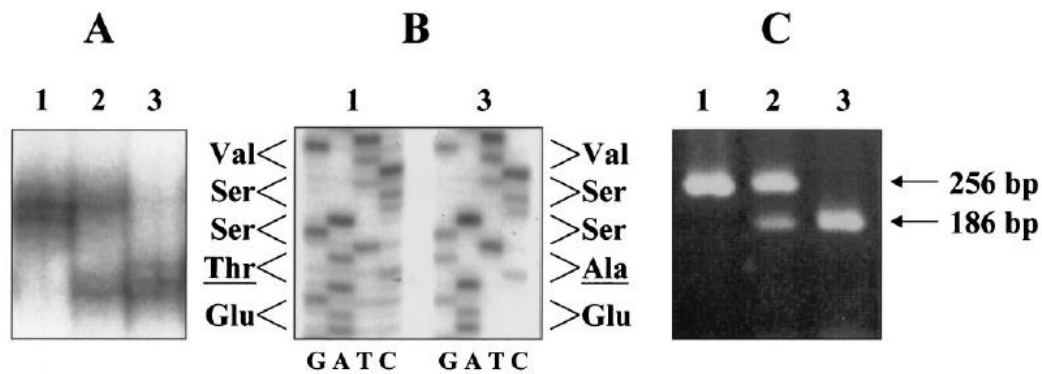


Figura 4 - Polimorfismo Thr92Ala Dio2. A: PCR-SSCP. B: Sequenciamento de DNA Dydeoxy. C: PCR-RFLP com Bsg-I. 1, Thr92 homozigoto; 2, heterozigoto; 3, Ala92 homozigoto (MENTUCCIA et al., 2002)

O polimorfismo Thr92Ala-D2 pode se apresentar nos indivíduos como homozigoto selvagem (TT), ou seja, ausência do alelo polimórfico, heterozigoto polimórfico (TA), apenas um alelo polimórfico, ou homozigoto polimórfico (AA), com os dois alelos polimórficos. A prevalência do polimorfismo varia entre 12% a 36% da população (DORA et al., 2010).

A princípio, não houve grande interesse pelos possíveis efeitos do polimorfismo Thr92Ala, pois ficou demonstrado que apesar de aumentar o tempo de meia vida da enzima essa variação não provocava alterações na atividade catalítica da D2 e os tecidos permaneciam eutireoideos (PEETERS et al., 2003).

Entretanto, novos estudos começaram a ser publicados mostrando correlações positivas entre a presença de variantes genéticas no gene Dio2 e alterações no funcionamento do SNC. Guo e colaboradores descreveram a existência de correlação positiva entre deficiência intelectual e a presença de polimorfismos da D2 em uma população vivendo em área com deficiência de iodo na China (GUO et al., 2004). Posteriormente, em 2014, Taylor e colaboradores, em um estudo com crianças entre 7 e 8 anos, mostraram correlação positiva entre a presença do polimorfismo e menores valores de QI.

Além disso, na China, He e colaboradores demonstraram correlação positiva entre a presença dos dois polimorfismos, Thr92Ala e ORFa-Gly3Asp, e o Transtorno Bipolar. A frequência dos alelos polimórficos AA foi significativamente maior nos pacientes quando comparados com indivíduos

saudáveis (HE et al., 2009). E um estudo com 290 pacientes que sofriam de esquizofrenia demonstrou que a presença do alelo Thr92Ala era significativamente maior nesses pacientes do que nos 198 indivíduos saudáveis que compunham o grupo controle (COLAK et al., 2013).

Por outro lado, em 2015, um estudo comparando a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 em pacientes com depressão e indivíduos saudáveis demonstrou que o alelo 92Ala era mais frequente nos participantes saudáveis (grupo controle), sugerindo que essa variante genética poderia servir como um marcador de menor risco para o desenvolvimento da depressão (GALECKA et al., 2015). E em 2017 um estudo mostrou a ausência da relação entre a presença do polimorfismo e o desempenho cognitivo em indivíduos típicos (WOUTERS et al., 2017).

Em 2015, McAninch e colaboradores, em estudo *post-mortem* com cérebros de indivíduos com e sem o polimorfismo Thr92Ala-D2 mostraram modificações importantes no transcriptoma celular entre os dois grupos (MCANINCH et al., 2015). Os pesquisadores constataram que células que expressam o alelo polimórfico em homozigose apresentam alteração no padrão de expressão de 81 genes gerando um quadro de aumento do estresse oxidativo celular, uma vez que se observa aumento da expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios e a apoptose, e diminuição da expressão de genes da via de sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR) (MCANINCH et al., 2015).

Além disso, McAninch et al. (2015) observaram em modelo celular alteração estrutural do Complexo de Golgi e deposição anormal da enzima polimórfica nas membranas desse aparato, o que pode ser apontado como causa do aumento do tempo de meia vida observado na enzima polimórfica, uma vez que o acesso dos proteossomas à enzima fica dificultado. Também foram observadas *in vitro* alterações na expressão de genes relacionados ao Complexo de Golgi e, após 24 horas de tratamento com antioxidante, a expressão desses genes foi normalizada, mostrando, mais uma vez, a relação entre o polimorfismo e o aumento do estresse oxidativo da célula. (MCANINCH et al., 2015).

Em uma população com Síndrome de Down (SD), a presença do polimorfismo foi positivamente correlacionada com a piora no comportamento adaptativo dos indivíduos. Pacientes com SD e homozigotos para o polimorfismo apresentaram resultados significativamente inferiores tanto na avaliação global do comportamento adaptativo, quanto nas avaliações de socialização, atividades domésticas, relações interpessoais e brincar e lazer (BATISTUZZO, 2017). A autora sugere que a redução da expressão de genes envolvidos na via de sinalização do EGFR, como descrito por McAninch e colaboradores (2015), poderia prejudicar ainda mais o funcionamento cognitivo desses pacientes, explicando as diferenças observadas (BATISTUZZO, 2017).

A via de sinalização do EGFR está envolvida em mecanismos compensadores de estresse oxidativo, promovendo a ativação de proteína quinase responsável pelo aumento da taxa de sobrevivência celular (WANG et al., 2000). Além disso, o EGF é importante durante o desenvolvimento neural, pois alterações na via de sinalização desse fator prejudicam o desenvolvimento cognitivo dos animais (FUTAMURA et al., 2003). Em humanos, o aumento plasmático da concentração de EGF foi relacionado com piora no desempenho cognitivo em pacientes com Alzheimer (MARKSTEINER et al., 2011) e Parkinson (PELLECCHIA et al., 2012).

Em outro estudo, McAninch e colaboradores (2018) compararam a prevalência do polimorfismo em grupos étnicos diferentes e demonstraram que a presença do polimorfismo era maior entre afro-americanos (43,9%) quando comparados com europeus-americanos (36,5%). Além disso, os pesquisadores demonstraram que para a população de afro-americanos a presença do polimorfismo estava associada a um aumento de 1,3 vezes no desenvolvimento de Alzheimer, entretanto essa relação não foi observada para o outro grupo. (MCANINCH et al., 2018).

Por outro lado, um estudo feito com indivíduos com Transtorno do Espectro Autista (TEA) mostrou que a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 melhorou os scores obtidos pelos pacientes na Escala Vineland de Comportamento Adaptativo (GOMEZ, 2017). Indivíduos com TEA com o polimorfismo apresentaram melhores resultados na avaliação global do

comportamento adaptativo e nas avaliações de comunicação, atividade de vida diária, relações interpessoais e brincar e lazer. O autor destacou o efeito dose dependente observado nos resultados e apontou prejuízos no mecanismo de ubiquitinação da enzima D2 polimórfica e alterações nas vias das neuregulinas (MCANINCH et al., 2015) como fatores que poderiam auxiliar na compreensão dos resultados observados. (GOMEZ, 2017).

1.4 Transtorno do Espectro Autista

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na comunicação e interação social e pela presença de padrões restritos e repetitivos de comportamento que não sejam explicados por outra condição ou deficiência. Os sintomas podem apresentar graus diferentes de gravidade em cada paciente, entretanto, para o diagnóstico é preciso que seja observado prejuízo clinicamente significativo em algum aspecto do funcionamento do indivíduo nas atividades diárias (APA, 2014).

Os critérios diagnósticos incluem déficits na reciprocidade emocional e nos comportamentos comunicativos não verbais utilizados para a interação social, déficits para manter e compreender relacionamentos, além da exigência da presença de pelo menos duas de quatro características: movimentos motores, uso de objetos ou fala estereotipados e repetitivos; insistência, inflexibilidade na adesão a rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal ou não verbal; foco ou intensidade anormais em interesses fixos e altamente restritos; hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente (APA, 2014).

O primeiro estudo epidemiológico, em 1966, apontava para uma prevalência de 4,5 autistas para cada 10000 crianças entre 8 e 10 anos de idade (LOTTER, 1966). Mais recentemente, Fombonne et al. (2016) encontraram, no México, uma taxa de prevalência de 0,87% de TEA, e o último estudo epidemiológico do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA apresentou uma taxa de 1,68% de TEA entre crianças com 8 anos de idade (BAIO et al., 2018).

Entretanto, Fombonne (2018) questiona os dados que apontam para um crescimento alarmante na prevalência do TEA, destacando, dentre outros fatores, a falta de padronização do diagnóstico, dos mecanismos de busca utilizados nas pesquisas e o fato de que a participação de famílias com crianças com TEA nesses estudos é maior que a das famílias de crianças típicas, o que leva a superestimar a prevalência do transtorno (FOMBONNE, 2018).

Em cerca de 20% dos casos de TEA é possível identificar uma causa genéticas (17%) ou ambiental (3%) para o transtorno. Dentre as causas genéticas estão incluídas anormalidades cromossômicas (ex. Síndrome de Down), doenças monogênicas (ex. Síndrome do X frágil), microdeleções ou microduplicações. Para as causas ambientais são aceitos como fatores de risco baixo peso ao nascer e prematuridade, aumento das idades materna e paterna e estresse materno durante a gestação. Entretanto, para a maioria dos casos de TEA (80%) estabelece-se o modelo de causa multifatorial que considera vulnerabilidade genética, fatores de risco perinatais e mecanismos epigenéticos (para revisão ver ZANOLLA et al., 2015).

Na Arábia Saudita, um estudo demonstrou aumento plasmático de tiorredoxina, proteína marcadora de estresse oxidativo, em pacientes com TEA com idades entre 3 e 15 anos, quando comparados a indivíduos sem o transtorno (EL-ANSARY, 2016). Na China, em estudo com crianças com TEA, os pesquisadores também identificaram aumento dos níveis séricos de tiorredoxina quando comparados com os resultados de crianças com desenvolvimento típico, e a concentração do marcador era diretamente proporcional à gravidade dos sintomas apresentados pelas crianças com TEA (ZHANG; GAO; ZHAO, 2015).

Além disso, o aumento do estresse oxidativo celular também é observado na inflamação, pois as células em processo inflamatório aumentam a produção de radicais livres no interior da célula (para revisão ver SÁNCHEZ; CALPENA; CLARES, 2015). No TEA, diferentes estudos comprovam o aumento de marcadores de inflamação (interleucinas e fatores de necrose tumoral), com aumento de respostas inflamatórias centrais e periféricas (para revisão ver SINISCALCO et al., 2018).

Assim, o perfil de aumento da exposição ao estresse oxidativo em pacientes com TEA mostra semelhanças com o padrão de expressão gênica observado no SNC de indivíduos com o alelo polimórfico Thr92Ala-D2 (MCANINCH et al., 2015; BIANCO; KIM, 2018).

Dessa maneira, a hipótese para o desenvolvimento desse trabalho foi a de que pacientes com TEA que apresentam o polimorfismo Thr92Ala-D2,

devido às alterações de funcionamento neurológico características do transtorno e devido ao aumento da exposição ao estresse oxidativo celular como fator de risco para o aumento de processos neurodegenerativos, estariam mais susceptíveis aos efeitos deletérios desse polimorfismo no funcionamento do SNC e apresentariam, portanto, quadros mais severos e de pior prognóstico.

2. Objetivo

Avaliar se há relação entre a presença do polimorfismo Thr92Ala da enzima desidase tipo 2 e a severidade dos sintomas e o prognóstico de indivíduos com TEA atendidos periodicamente por um serviço ambulatorial.

3. Método

3.1 Aspectos Éticos

Esse estudo foi submetido ao Comitê Nacional de Ética em Pesquisa e aprovado em 07 de junho de 2016 (CONEP 1.578.245). Todos os pacientes incluídos neste trabalho tiveram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por seus responsáveis.

3.2 Local

Este estudo foi realizado na Unidade de Referência em TEA – Prof. Dr. Marcos Tomanik Mercadante, do Centro de Atenção Integrado à Saúde Mental (CAISM), localizado em São Paulo capital. A Unidade conta com equipe multidisciplinar para atendimento ambulatorial dos pacientes composta por médicos psiquiatras e neurologistas, fonoaudiólogas, psicólogas, terapeutas ocupacionais, enfermeiros, auxiliares de enfermagem, nutricionista e fisioterapeuta. Todos os profissionais têm ampla experiência no atendimento em TEA.

3.3 População

Os participantes deste estudo eram pacientes com diagnóstico de TEA atendidos periodicamente na Unidade de Referência em TEA do CAISM.

3.4 Amostra

Inicialmente, foram incluídos nessa pesquisa 146 pacientes da Unidade de Referência citada. O critério para inclusão era ser um indivíduo com diagnóstico de TEA atendido no local de realização do estudo. Foram excluídos deste trabalho, pacientes com diagnóstico simultâneo de outras deficiências

físicas, intelectuais ou sensoriais que pudessem interferir no desempenho do participante nas avaliações utilizadas. Seis dos 146 pacientes preenchiam critérios de exclusão, sendo três com Síndrome de Down, um com Deficiência Visual, um com Deficiência Auditiva e um com Síndrome de Rett. Além disso, oito pacientes foram excluídos por falhas nos procedimentos de coleta e/ou extração de DNA que impossibilitaram o prosseguimento das análises. Dessa forma, o presente trabalho contou com a participação de 132 pacientes com TEA.

3.5 Protocolo de Atendimento do Ambulatório

Na Unidade de Referência, as intervenções são realizadas em grupos formados de acordo com as habilidades a serem trabalhadas: pré-requisitos sociais, habilidades sociais, pré-requisitos para comunicação, comunicação, atividades básicas de vida diária, atividades instrumentais, praxia de movimento, praxia de comunicação e comunicação alternativa.

São utilizadas diversas abordagens, entre elas: Método Denver de Intervenção Precoce (ESDM), Sistema de Comunicação por Troca de Figuras (PECS), Terapia Comportamental, entre outros. Em todos os atendimentos os grupos contam com profissionais de áreas diferentes e cada um contribui com sua expertise e sua especialidade.

Em média, os pacientes têm duas horas de intervenção por semana e, simultaneamente, seus familiares recebem orientações sobre como proceder em outros ambientes de acordo com as demandas individuais, totalizando, em média, quatro horas de atendimentos semanais.

O serviço de Fonoaudiologia da unidade estabelece o perfil de comunicação utilizado por cada paciente. Para isso, utiliza-se o seguinte critério: se o paciente falar pelo menos 6 palavras, funcionalmente, no momento da avaliação inicial, é considerado Verbal, caso contrário, é considerado Não Verbal.

3.6 Instrumentos de Avaliação

3.6.1 *Autism Behavior Checklist (ABC)*

Utilizado como instrumento de rastreio, é um questionário composto por 57 perguntas que descrevem comportamentos atípicos e cujas pontuações variam de 1 a 4 (1 para os comportamentos mais fracamente relacionados ao autismo e 4 para os comportamentos mais fortemente relacionados ao autismo). As questões se relacionam a cinco esferas do comportamento: Estímulo Sensorial, Relacionamento, Uso do corpo e objetos, Linguagem e Pessoal/Social. A soma determina a probabilidade do diagnóstico de TEA para aquele paciente, quanto maior a pontuação, maior a probabilidade do diagnóstico (KRUG; ARICK; ALMOND, 1980).

3.6.2 *Autism Treatment Checklist (ATEC)*

Instrumento que permite avaliar a resposta do paciente à intervenção proposta. Composto por 77 questões divididas em 4 áreas: Área I, Discurso, Linguagem e Comunicação (14); Área II, Sociabilidade (20); Área III, Consciência Cognitiva e Sensorial (18) e Área IV, Saúde, Físico e Comportamento (25) (MAHAPATRA et al., 2018). Desenvolvido em 1999 por Rimland e Edelson, as perguntas são respondidas preferencialmente pelo mesmo cuidador antes do início da intervenção e após um período de intervenção (MAHAPATRA et al., 2018).

Assim, é possível calcular a diferença (Δ ATEC) entre as pontuações obtidas após um período de intervenção (ATEC final) e aquelas obtidas na primeira avaliação (ATEC inicial), ou seja, Δ ATEC = ATEC final – ATEC inicial. Pontuações mais elevadas indicam maiores prejuízos, o que permite admitir que a melhora do paciente é verificada quando Δ ATEC < 0 (MAHAPATRA et al., 2018).

3.6.3 *Teste não verbal de Inteligência Snijders-Oomen (SON)*

Os testes SON, são testes que se propõem a avaliar a inteligência com foco na capacidade de aprendizado do indivíduo, ou seja, avalia a inteligência fluida (LAROS; JESUS; KARINO, 2013). A necessidade mínima de instruções verbais que podem ser substituídas por demonstrações, permite estimar o QI sem que o resultado seja subestimado devido à má compreensão das instruções verbais e pobreza de vocabulário (LAROS; JESUS; KARINO, 2013).

Em 2013, os pesquisadores Laros, Jesus e Karino publicaram o estudo de validação que confirmou a confiabilidade da versão SON-R 2^{1/2}-7 [a] para a avaliação das habilidades cognitivas de crianças brasileiras. Nessa versão, o teste pode ser usado para avaliar crianças com idades entre 2,5 e 7 anos e conta com quatro subtestes: Categorias, Situações, Mosaico e Padrões (LAROS; JESUS; KARINO, 2013).

O teste possui ainda uma versão que permite avaliar crianças e adultos com idades entre 6 e 40 anos, SON-R 6-40 (ALVES; LAROS, 2017). Essa versão tem sido estudada com o objetivo de validar seu uso no Brasil, já tendo sido publicado estudo em população local com deficiência intelectual (ALVES; LAROS, 2017).

3.6.4 *Escalas de Inteligência Weschler*

As Escalas Weschler para avaliação de inteligência são amplamente utilizadas no Brasil (FIGUEIREDO; PINHEIRO; NASCIMENTO, 1998) e são importantes para o processo de diagnóstico, permitindo análise completa e cuidadosa das habilidades cognitivas de crianças, adolescentes e adultos, de acordo com a versão do teste utilizada (FERNANDES LOPES et al., 2012).

O WISC III, Escala de Inteligência Weschler para Crianças, 3ª edição, publicada no Brasil em 2002, se propõe a avaliar a inteligência

de indivíduos entre 06 e 16 anos de idade (CRUZ, 2005). A quarta versão (WISC-IV) foi publicada nos EUA em 2003, e em 2013, no Brasil, trouxe adaptações em função de alterações no QI da população e para aprimorar o instrumento, com melhor qualidade psicométrica e simplificações na aplicação do teste (VIDAL; FIGUEIREDO; NASCIMENTO, 2011; MACEDO; MOTA; METTRAU, 2017).

Para a avaliação de adultos está disponível no Brasil a versão WAIS III, Escala de Inteligência Weschler para Adultos, 3ª edição, composta por 14 subtestes para avaliar pessoas com idades entre 16 e 89 anos (FERNANDES LOPES et al., 2012).

3.6.5 Escala Vineland de Comportamento Adaptativo

Instrumento que possibilita analisar as habilidades de crianças e adolescentes para lidar com as situações cotidianas. A avaliação se dá em três domínios, cada um composto por três subdomínios: Comunicação (Expressiva, Receptiva e Leitura e Escrita); Atividades de Vida Diária (Autocuidado, Doméstico e na Comunidade) e Social (Relações Interpessoais, Brincar e Lazer e Habilidades de Adaptação). Trata-se de uma entrevista semiestruturada composta por 577 questões a serem respondidas pelo principal cuidador da criança ou adolescente (SPARROW et al, 1984).

As respostas devem indicar se a criança se comporta conforme descrito pelo avaliador frequentemente, algumas vezes/parcialmente ou nunca. Além disso, o entrevistado pode responder que o paciente não teve oportunidade de expressar o comportamento indicado ou que ele não sabe se o comportamento está presente. De acordo com as normas indicadas no manual, a avaliação é corrigida para a idade da criança no momento da entrevista e são obtidos *scores* por domínio, subdomínio e *score* global, que permitem determinar o nível de desenvolvimento da criança em relação ao esperado para sua faixa etária (SPARROW et al, 1984).

3.7 Procedimentos

3.7.1 Coleta de Material Biológico

Para cada participante, com auxílio de *swab* estéril, foram coletadas células do epitélio bucal para posterior extração e análise do DNA. A coleta foi realizada pela enfermeira do ambulatório, de acordo com treinamento e seguindo os seguintes passos:

- inserir um *swab* estéril, de embalagem recém-aberta, na boca do paciente e friccioná-lo no fundo interno da bochecha, de ambos os lados da boca;
- transferir o *swab* para um tubo tipo eppendorf de 1,5 a 2,0 mL e cortar, com tesoura adequadamente higienizada com álcool 70%, o excedente da haste;
- fechar o tubo e armazenar à -6°C.

O material foi mantido em congelador à temperatura média de -6°C até o momento da extração do DNA.

3.7.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo padronizado de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl (ABRÃO et al., 2005). Foram excluídos das análises 8 pacientes para os quais o rendimento da extração do DNA foi baixo, impossibilitando o prosseguimento das análises.

3.7.3 Genotipagem

Foi realizada a genotipagem, a partir do DNA extraído, para determinar, para cada paciente, a presença do alelo polimórfico Thr92Ala-D2.

Para esse procedimento foi utilizado o kit *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), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Ao final desse processo os pacientes foram separados em três grupos para futuras comparações: homocigoto polimórfico (AA), homocigoto não polimórfico (TT) e heterocigoto (TA).

3.7.4 Avaliação da inteligência e do funcionamento adaptativo

Os instrumentos utilizados para a obtenção dos dados deste estudo foram aplicados pela equipe de profissionais da unidade de TEA do CAISM durante os atendimentos aos pacientes, de acordo com a rotina do serviço. Para as análises propostas, foram utilizados os dados dos seguintes instrumentos: *Autism Behavior Checklist* (ABC); *Autism Treatment Checklist* (ATEC), antes e depois das intervenções, e Escala Vineland de Comportamento Adaptativo. Quando disponíveis, foram utilizados também os resultados das avaliações de inteligência que, de acordo com as aptidões e idade dos pacientes, foram feitas com a utilização do SON, nas versões SON-R 2^{1/2}-7 [a] e SON-R 6-40, e Escalas de Inteligência Weschler, nas versões WISC III, WISC IV e WAIS III.

Os participantes desse estudo estiveram em terapia na Unidade por período que variou de 4 meses a 3 anos e 9 meses, com média de 2 anos e 6 meses de intervenção. O tempo de intervenção foi calculado de acordo com as datas da primeira e da última ATEC disponíveis.

No momento da coleta dos dados, para os 132 pacientes incluídos na pesquisa, foram obtidos 124 ABCs; 120 Vinelands; 127 ATECs iniciais; 115 ATECs finais, 110 ΔATEC, e 58 avaliações de QI (25 SON-R 2^{1/2}-7 [a]; 24 SON-R 6-40; 2 WISC III; 5 WISC IV; 2 WAIS). Para as análises posteriores a partir do QI, foi utilizado o QI total

fornecido por cada uma das escalas, como uma forma de uniformizar os dados obtidos a partir de instrumentos diferentes.

3.7.5 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prisma 7.05. Primeiramente foram feitas análises de estatística descritiva para a obtenção da distribuição do sexo entre os participantes, bem como do alelo polimórfico na amostra, da competência verbal e faixa etária dos participantes. Foi realizado teste de Qui-quadrado para avaliar se havia diferença entre os genótipos quanto a distribuição dos pacientes verbais e não verbais e quanto a distribuição da gravidade dos sintomas avaliados pelo ABC. Foi admitido como significativo um $p < 0,05$.

Em seguida, cada variável foi analisada quanto à característica de distribuição dos dados, tendo sido a normalidade testada pelo teste D'Agostino-Pearson. As médias obtidas por cada um dos grupos nas avaliações do ABC, Vineland, QI e ATECs foram comparadas utilizando ANOVA de uma via com pós teste de Tukey, para variáveis de distribuição normal, e teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, para variáveis cuja normalidade não foi identificada. De maneira semelhante, foram feitos testes de correlação de Pearson para amostras de distribuição normal e correlação de Spearman para as demais, tendo sido testadas as correlações entre o resultado do ABC e o QI, ABC e a Vineland e ABC e o Δ ATEC para cada um dos grupos.

4. Resultados

Este estudo contou com a participação de 132 pacientes com TEA caracterizados na Tabela 1. Os participantes apresentavam idades entre 5 e 37 anos, 52,3% eram verbais e 80,3% eram do sexo masculino. Em relação ao genótipo, 29,5% eram homozigotos para a forma selvagem do gene (TT), 46,2% dos participantes eram heterozigotos, apresentando um alelo polimórfico (AT) e 24,3%, apresentavam o alelo polimórfico em homozigose (AA).

Tabela 1 - Caracterização da amostra (n=132)

	n (%)
Sexo	
Masculino	106 (80,3)
Feminino	26 (19,7)
Comunicação	
Verbal	69 (52,3)
Não verbal	63 (47,7)
Genótipo	
Selvagem (TT)	39 (29,5)
Polimórfico heterozigoto (AT)	61 (46,2)
Polimórfico homozigoto (AA)	32 (24,3)
Idade (anos)	
5 a 11	69 (52,3)
12 a 17	49 (37,1)
18 ou mais	14 (10,6)

Com o objetivo de investigar se piores resultados obtidos no ABC se relacionavam à presença do polimorfismo, os participantes foram divididos em quatro grupos de acordo com critérios de probabilidade de confirmação do diagnóstico de TEA (baixa, leve, moderada e alta) estabelecidos pelo próprio instrumento. O resultado apresentado na Tabela 2 mostra que a distribuição dos pacientes mais e menos severos entre os três grupos de genótipos é

semelhante, mostrando que o resultado do ABC é independente da presença do polimorfismo.

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos de acordo com probabilidade de diagnóstico de TEA, considerando a pontuação obtida no ABC

	AA		AT		TT		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Baixa	8	26,67	14	25,0	8	21,05	30	24,19
Leve	2	6,67	5	8,93	2	5,26	9	7,26
Moderada	9	30,0	12	21,43	10	26,32	31	25,0
Alta	11	36,66	25	44,64	18	47,37	54	43,55

$p = 0,9400$

Em seguida, analisou-se a distribuição do genótipo entre os pacientes considerando os critérios fonoaudiológicos para classificação em Verbal e Não Verbal. A Tabela 3 evidencia uma distribuição equilibrada e ausência de diferença estatisticamente significativa, o que mostra que prejuízos na aquisição da fala não se relacionam com a presença do polimorfismo.

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos de acordo com o padrão de comunicação

	AA		AT		TT		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Verbal	19	59,38	29	47,54	21	53,85	69	52,3
Não Verbal	13	40,63	32	52,46	18	46,15	63	47,7

$p = 0,5398$

Posteriormente, foram comparadas as médias dos resultados obtidos no ABC, testes de QI, *score* total relativo da Vineland, ATEC inicial e ATEC final para cada grupo, com o objetivo de avaliar se havia diferença significativa entre as médias em função do genótipo dos pacientes. Os resultados estão apresentados nos gráficos da Figura 5.

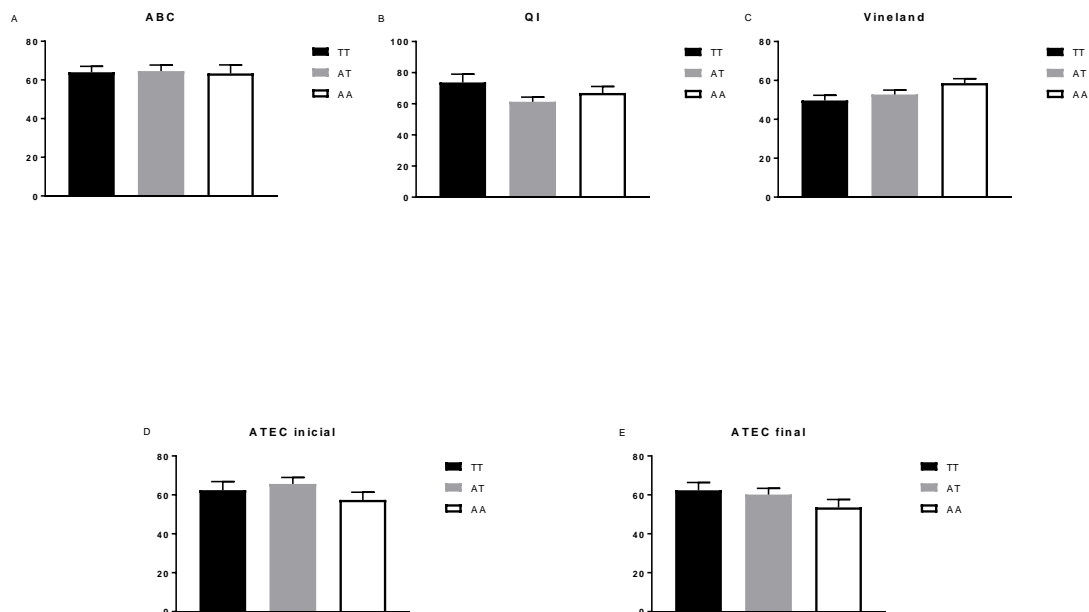


Figura 5 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes nas avaliações realizadas: (A) ABC, (B) QI, (C) Vineland, (D) ATEC inicial e (E) ATEC final. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). As análises estatísticas utilizadas foram ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para o ABC e a Vineland, e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para o QI, ATEC inicial e ATEC final. Não houve diferença significativa em nenhuma das análises.

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que o genótipo dos pacientes não impactou o desempenho nos testes analisados. Por outro lado, quando foram avaliados separadamente os domínios da escala Vineland e seus respectivos subdomínios, foram observadas diferenças entre os grupos, conforme apresentado nas figuras a seguir.

A Figura 6 mostra que pacientes com polimorfismo tiveram melhor desempenho nas habilidades de comunicação, especificamente Comunicação Receptiva, o que não é observado para as habilidades de Comunicação Expressiva ou de Leitura e Escrita.

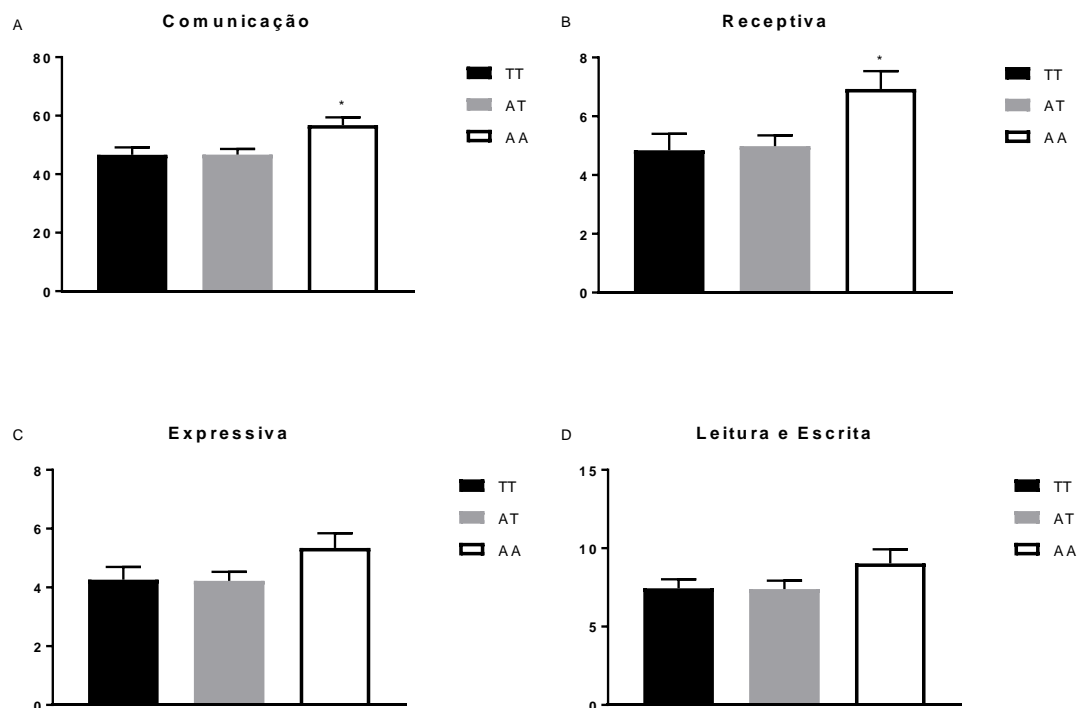


Figura 6 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes no domínio (A) Comunicação e seus respectivos subdomínios: (B) Comunicação Receptiva, (C) Comunicação Expressiva e (D) Leitura e Escrita. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). As análises estatísticas utilizadas foram ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, exceto para o subdomínio Leitura e Escrita cuja análise foi feita utilizando Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * $p \leq 0,05$ vs. TT e AT.

A análise do domínio Atividades Diárias e seus subdomínios (Figura 7) também mostra melhor desempenho dos pacientes que apresentavam o polimorfismo, esses pacientes obtiveram melhor resultado nas atividades de Autocuidado e melhor pontuação total deste domínio.

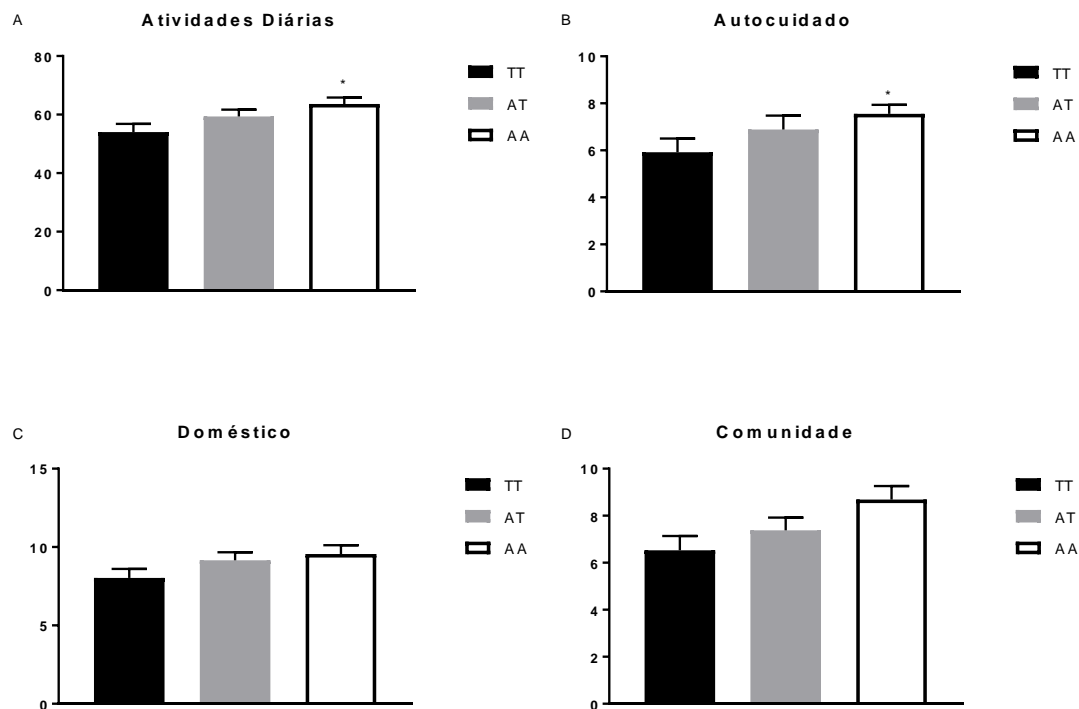


Figura 7 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes no domínio (A) Atividades Diárias e seus respectivos subdomínios: (A) Autocuidado, (B) Doméstico e (C) Comunidade. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). As análises estatísticas utilizadas foram ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, exceto para o subdomínio Autocuidado cuja análise foi feita utilizando Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * $p \leq 0,05$ vs. TT.

Finalizando as análises relativas aos domínios da escala Vineland, a Figura 8 mostra que para o domínio Socialização e seus respectivos subdomínios não houve diferença entre os resultados obtidos para cada grupo.

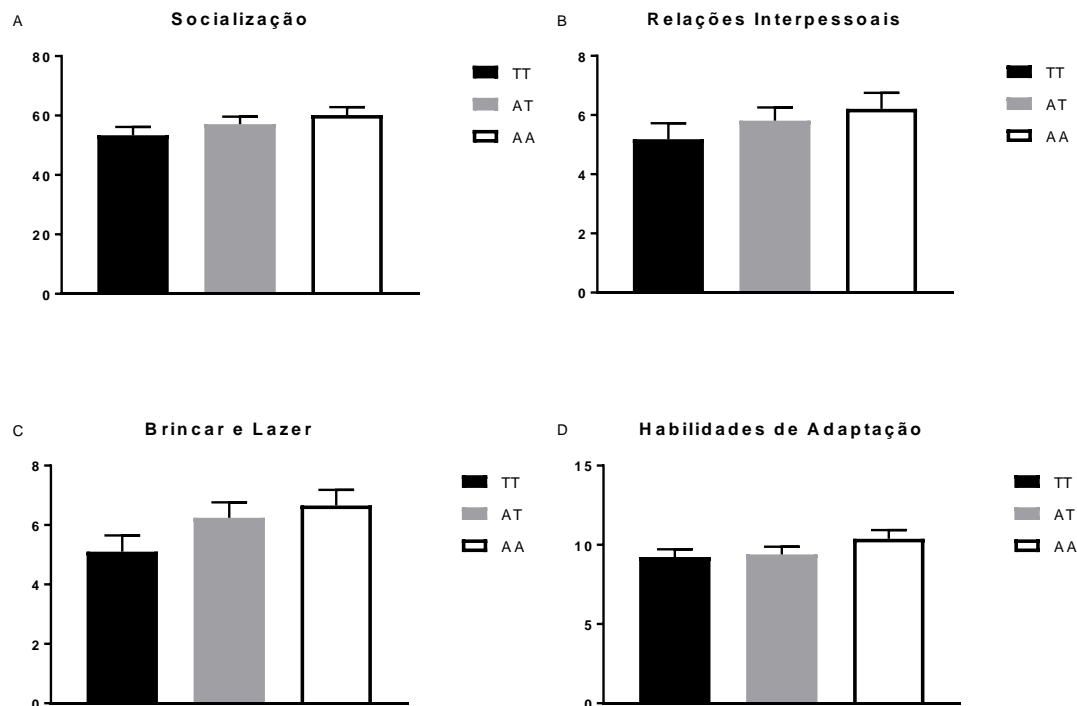


Figura 8 - Médias das pontuações obtidas pelos pacientes no domínio (A) Socialização e seus respectivos subdomínios: (B) Relações Interpessoais, (C) Brincar e (D) Lazer e Habilidades de Adaptação. Os pacientes estão divididos de acordo com os genótipos selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). A análise estatística utilizada foi Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Posteriormente, buscando identificar se piores resultados obtidos no ABC estariam relacionados a pior desempenho cognitivo ou pior nível de comportamento adaptativo, foram feitos testes de correlação para os diferentes grupos e os resultados mostraram que independente do genótipo do paciente, o resultado do ABC não apresenta relação com o desempenho dos pacientes nos testes de QI ou na Vineland (Figura 9).

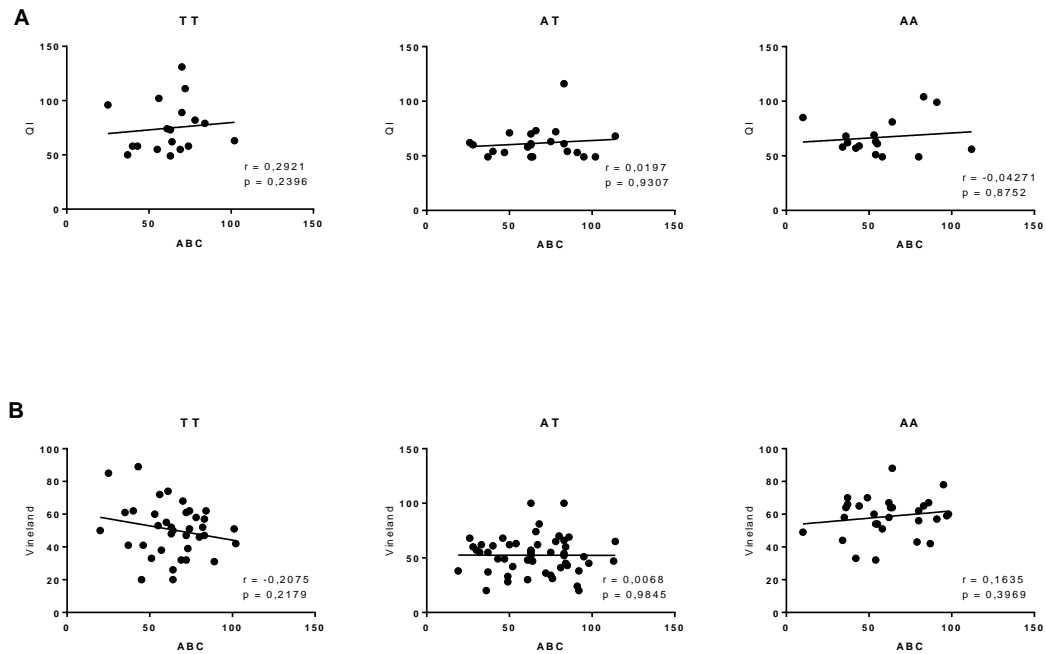


Figura 9 – Teste de correlação entre (A) o resultado do ABC e os resultados de QI e (B) o resultado do ABC e os resultados da Vineland, para cada um dos genótipos: selvagem (TT), heterozigoto (AT) e polimórfico (AA). Foi feito teste de correlação com regressão linear e não houve resultado significativo estatisticamente para nenhuma das análises.

Entretanto, ao buscar correlação entre o desempenho no ABC e a melhora do paciente frente à terapia proposta, foi possível observar que, os pacientes com genótipo selvagem (TT), quanto pior o resultado do ABC, maior a melhora apresentada após a intervenção (Figura 10). Essa correlação não foi encontrada nos grupos que apresentaram o polimorfismo em heterozigose (AT) ou homozigose (AA). Ou seja, neste cenário, a presença do polimorfismo parece atrapalhar a evolução dos pacientes frente à terapia empregada.

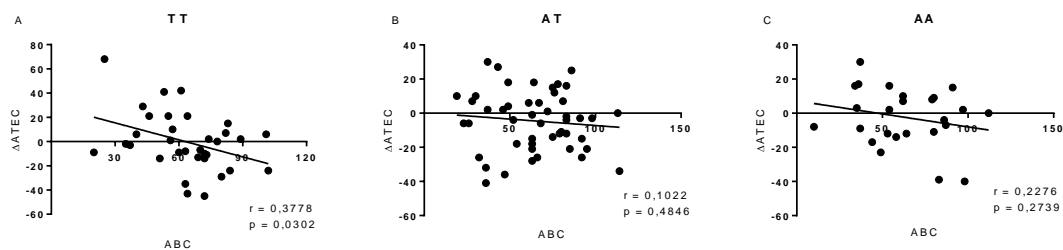


Figura 10 – Teste de correlação entre o Δ ATEC e o resultado do ABC. (A) Grupo selvagem (TT), (B) Grupo heterozigoto (AT) e (C) Grupo polimórfico (AA). Os testes mostraram correlação significativa apenas em (A). $r=0,3778$ e $p=0,0302$.

A partir deste resultado, buscando identificar quais dos componentes avaliados pela ATEC seriam responsáveis pela melhora observada nos pacientes com genótipo selvagem, foi realizada análise de correlação de cada uma das quatro áreas da ATEC com o resultado do ABC desses pacientes. Os resultados apresentados nos gráficos da Figura 11 mostram que, para os pacientes com genótipo selvagem, após a intervenção, quanto pior o ABC, melhores foram os ganhos na Área 2 da ATEC, que avalia a Sociabilidade do paciente. Não são observadas melhoras nas demais áreas de avaliação do instrumento: I Discurso linguagem e comunicação; III consciência cognitiva e sensorial e IV saúde física e comportamento.

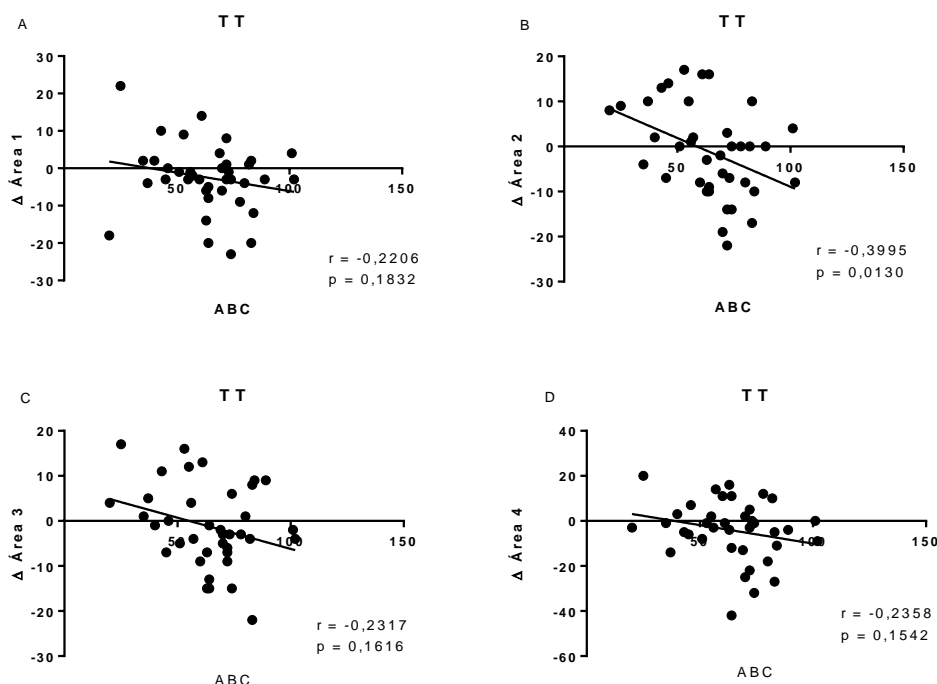


Figura 11 – Teste de correlação entre o delta das 4 áreas da ATEC e o resultado do ABC dos pacientes do grupo selvagem (TT). (A) ΔÁrea 1 da ATEC; (B) ΔÁrea 2 da ATEC; (C) ΔÁrea 3 da ATEC; (D) ΔÁrea 4 da ATEC. Os testes mostraram correlação significativa apenas em (B). $r=-0,3995$ e $p=0,0130$.

Por fim, as Figuras 12 e 13 mostram que para os outros dois genótipos, heterozigoto e homozigoto polimórfico, a pontuação no ABC não se relaciona com o desempenho dos pacientes antes e depois da intervenção.

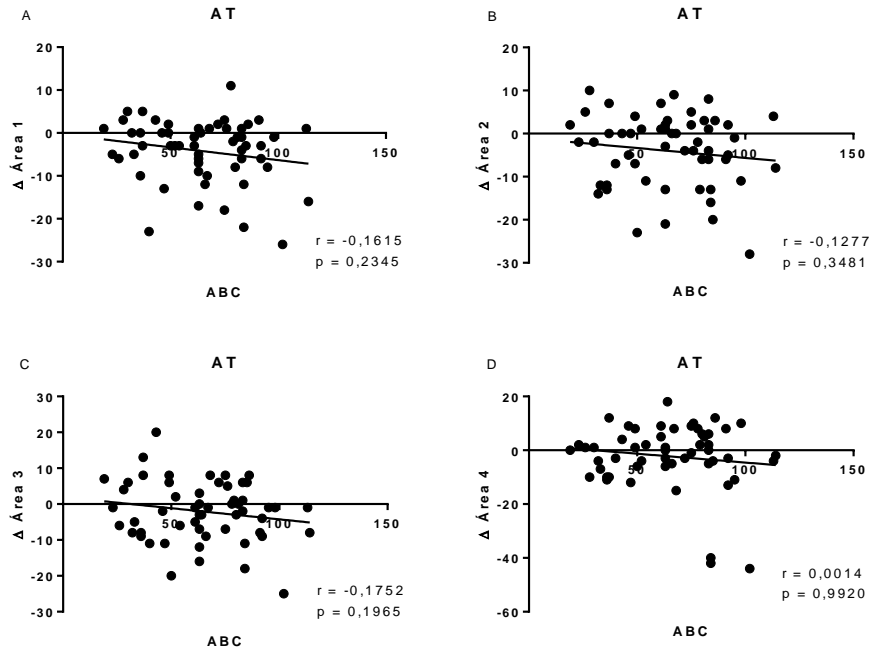


Figura 12 – Teste de correlação entre o delta das 4 áreas da ATEC e o resultado do ABC dos pacientes do grupo heterozigoto (AT). (A) Δ Área 1 da ATEC; (B) Δ Área 2 da ATEC; (C) Δ Área 3 da ATEC; (D) Δ Área 4 da ATEC. Os testes mostraram ausência de correlação em todas as análises.

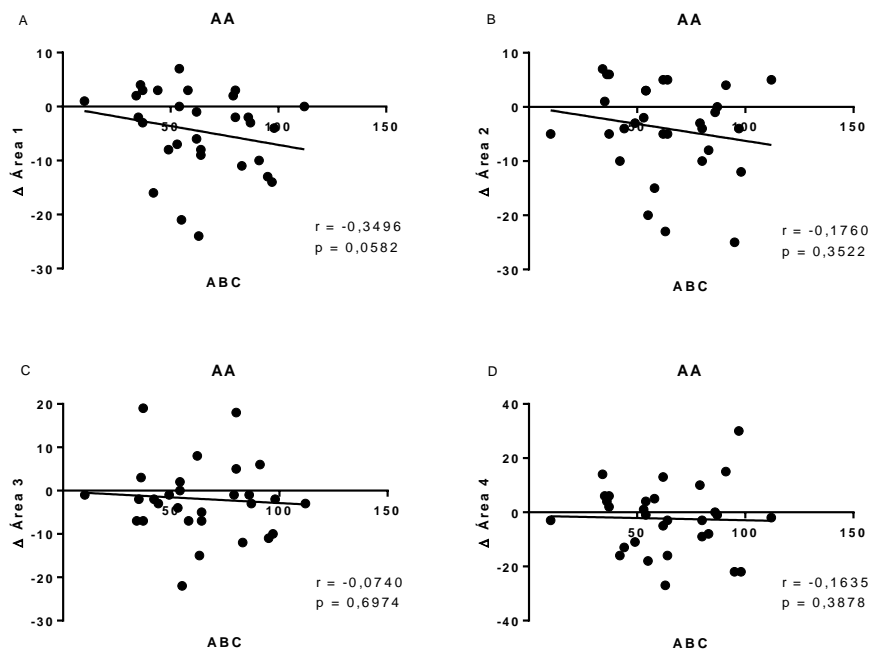


Figura 13 - Teste de correlação entre o delta das 4 áreas da ATEC e o resultado do ABC dos pacientes do grupo homozigoto polimórfico (AA). (A) Δ Área 1 da ATEC; (B) Δ Área 2 da ATEC; (C) Δ Área 3 da ATEC; (D) Δ Área 4 da ATEC. Os testes mostraram ausência de correlação em todas as análises.

5. Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar se a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 se relacionava com quadros mais severos e de piores prognósticos de TEA. A princípio, com a obtenção do genótipo de 132 paciente com TEA, foi possível estabelecer que a distribuição do alelo polimórfico na população estudada se assemelha aos dados da literatura (DORA et al., 2010) e não difere da observada em indivíduos com Síndrome de Down (BATISTUZZO, 2017) e de Williams-Beuren (CAPRA, 2016). Além disso, de acordo com o que é descrito para o TEA, a maioria dos participantes era do sexo masculino (FOMBONNE et al., 2016).

A hipótese para o desenvolvimento desse estudo foi a de que pacientes com TEA que apresentassem o polimorfismo teriam pior comportamento adaptativo, sintomas comportamentais mais severos e menor resposta às terapias propostas, tendo em vista o aumento de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e estado pró-inflamatório crônicos observados em pacientes com TEA (ZHANG; GAO; ZHAO, 2015; EL-ANSARY, 2016; SINISCALCO et al., 2018), somados aos achados de McAninch et al. (2015) que mostraram mecanismos moleculares comuns a doenças neurodegenerativas associados à presença do polimorfismo.

Entretanto, confirmando resultados obtidos anteriormente por Gomez (2017), observamos que os pacientes com o alelo polimórfico apresentaram melhor desempenho adaptativo em tarefas de Comunicação Receptiva, Autocuidado e Atividades de Vida Diária. O estudo anterior conseguiu observar também que indivíduos com TEA que apresentavam o polimorfismo tinham melhor nível adaptativo global e melhor desempenho em atividades diárias Domésticas, Relações Interpessoais e Brincar e Lazer (GOMEZ, 2017), porém esses resultados não foram observados no presente estudo. Tal diferença pode ser explicada pelo aumento do número de pacientes avaliados no nosso estudo em relação ao estudo anterior.

Ao contrário, em uma amostra de pacientes com Síndrome de Down, a presença do polimorfismo foi relacionada a piores níveis adaptativos globais e

a autora aponta mecanismos envolvidos no aumento do estresse oxidativo celular como provável causa do pior desempenho desses pacientes (BATISTUZZO, 2017).

O melhor desempenho observado em pacientes com TEA que apresentam o polimorfismo Thr92Ala parece não condizer com as alterações de funcionamento celular que estão presentes nesses pacientes. A presença do polimorfismo no SNC promove disfunção mitocondrial, alteração na expressão de genes de reparo do DNA, alterações na via de sinalização de fatores de crescimento, deposição anormal da enzima no complexo de Golgi e aumento do estresse oxidativo, favorecendo os processos neurodegenerativos (McAninch et al., 2015). Entretanto, o estudo de McAninch e colaboradores (2015) foi feito em cérebros de indivíduos adultos, enquanto 89,4% dos pacientes do presente estudo tem idade igual ou inferior a 17 anos. Portanto, uma possibilidade é que os prejuízos causados pelo estresse oxidativo e a ocorrência de processos neurodegenerativos ainda não estejam evidentes para a maioria dos participantes desta pesquisa.

Além disso, é válido ressaltar que indivíduos com TEA apresentam variações no funcionamento neurológico que ainda carecem de estudo para melhor compreensão (UDDIN; SUPEKAR; MENON, 2013) e as alterações causadas pelo polimorfismo no SNC foram descritas a partir de cérebros de indivíduos típicos (McAninch et al., 2015), de maneira que o TEA e suas implicações para o funcionamento do SNC se estabelecem como um fator complicador para o entendimento dos efeitos do polimorfismo na população deste estudo.

Os resultados deste estudo não permitiram relacionar a presença do polimorfismo com piores resultados de QI dos pacientes com TEA, entretanto, o número reduzido de avaliações de QI disponíveis no momento da coleta dos dados é um fator limitante para essa análise, pois apenas 43,9% (n = 58) dos pacientes tinham avaliação de inteligência. Em um estudo do polimorfismo Thr92Ala-D2 em pacientes com Síndrome Williams-Beuren (n = 63), Capra (2016) também não encontrou relação entre a presença do polimorfismo e o QI dos participantes da pesquisa.

Para indivíduos típicos, um estudo avaliou o desempenho cognitivo a partir do teste de fluidez de desenhos de Ruff e mostrou ausência de correlação entre a presença do polimorfismo Thr92Ala-D2 e os resultados obtidos em uma ampla amostra de adultos (WOUTERS et al., 2017).

Outro resultado interessante observado neste estudo foi o de que a ausência do alelo polimórfico se relacionou à melhora do paciente após início da terapia proposta, nos casos em que os sintomas eram inicialmente mais graves. Esse resultado sugere que a presença do polimorfismo pode atrapalhar o processo de aprendizagem do paciente com TEA no que diz respeito às habilidades de socialização.

Esse resultado, ao contrário dos anteriores, aponta para a existência de mecanismos subjacentes ao polimorfismo que dificultariam o aprendizado do paciente quando submetido às intervenções propostas. Nesse sentido, poderíamos trazer novamente as alterações moleculares relacionadas ao polimorfismo para explicar a dificuldade observada (McAninch et al, 2015). A via de sinalização do EGFR, cujos genes são menos expressos na presença do polimorfismo, está relacionada ao desempenho cognitivo de ratos, sendo que alterações dessa via provocadas no período neonatal são capazes de comprometer as habilidades sociais do animal na vida adulta (FUTAMURA et al., 2003).

Em pacientes com Alzheimer ou com comprometimento cognitivo leve, Marksteiner e colaboradores (2011) mostraram que os níveis de EGF se encontraram alterados, quando comparados com indivíduos saudáveis. O estudo ainda comparou os resultados obtidos para pacientes com depressão e os níveis de EGF se mantiveram normais, a não ser para os pacientes que tinham quadro depressivo associado a comprometimento cognitivo, para os quais as concentrações de EGF foram semelhantes às observadas dentre os indivíduos com comprometimento cognitivo leve (MARKSTEINER et al., 2011).

Em um estudo com pacientes idosos acometidos pelo mal de Parkinson, Pellecchia et al. (2012) demonstraram também a correlação entre aumento dos níveis plasmáticos de EGF e a piora no desempenho cognitivo desses pacientes quando comparados com um grupo controle saudável. De maneira

semelhante ao observado no Alzheimer, as vias de sinalização envolvidas na doença de Parkinson também são alteradas no SNC de pacientes que apresentam o polimorfismo Thr92Ala-D2 (McAninch et al., 2015).

É importante ressaltar que o polimorfismo Thr92Ala-D2 promove alterações no metabolismo da proteína amiloide, de maneira que é possível que exista um mecanismo neurodegenerativo por vias semelhantes às observadas na doença de Alzheimer ou ainda o mecanismo pode se dar por acúmulo da proteína alterada na célula, de maneira semelhante ao observado na doença de Huntington, visto que vias envolvidas nessa doença também estão alteradas na presença do polimorfismo (McAninch et al., 2015).

6. Conclusão

Os dados aqui apresentados permitem concluir que pacientes com Transtorno do Espectro Autista que expressam o polimorfismo Thr92Ala-D2 tem melhor nível adaptativo em atividades de Comunicação Receptiva e em atividades de Autocuidado quando comparados aos pacientes com TEA que não tem o polimorfismo.

Por outro lado, ao avaliar a evolução do paciente frente à terapia proposta, a presença do polimorfismo parece prejudicar o aprendizado dos pacientes, especialmente no que diz respeito às atividades de socialização.

Esses resultados parecem contraditórios, de maneira que mais estudos são necessários para compreender os mecanismos pelos quais o polimorfismo Thr92Ala da D2 altera o funcionamento do SNC em indivíduos típicos e em indivíduos com TEA ou outro distúrbio do desenvolvimento.

Referências Bibliográficas

ABRÃO, Milena Garcia et al. Padronização da Técnica de Extração de DNA de Células de Mucosa Oral Com NaCl: Aplicação no Estudo do Gene PROP1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.978-982, dez. 2005.

ALVES, Talita de Araújo; LAROS, Jacob Arie. Propriedades psicométricas do SON-R 6-40 em pessoas com deficiência intelectual. **Psicol. teor. prat.**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 151-163, ago. 2017.

APA, American Psychiatric Association. DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 948 p.

ARAKI, O. et al. Assignment of type II iodothyronine deiodinase gene (DI02) to human chromosome band 14q24.2-q24.3 by in situ hybridization. **Cytogenet Cell Genet**, [s.l.], v. 84, p.73-74, 1999.

BAIO, Jon et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR Surveillance Summaries**, Atlanta, v. 67, n. 6, p.1-23, abr. 2018.

BALASUBRAMANIAN, S.P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.593-601, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2004.04.001>.

BATES, Joanne M.; GERMAIN, Donald L. St.; GALTON, Valerie Anne. Expression Profiles of the Three Iodothyronine Deiodinases, D1, D2, and D3, in the Developing Rat. **Endocrinology**, [s.l.], v. 140, n. 2, p.844-851, 1999.

BATISTUZZO, Alice. **Correlação entre o polimorfismo Thr92Ala da enzima iodotironina desiodase tipo II e funções cognitivas na Síndrome de Down**. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Distúrbios do Desenvolvimento, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2017.

BIANCO, Antonio C. et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.38-89, fev. 2002.

BIANCO, Antonio C.; CONCEIÇÃO, Rodrigo R. da. The Deiodinase Trio and Thyroid Hormone Signaling. **Methods in Molecular Biology**, [s.l.], p.67-83, 2018. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7902-8_8.

BIANCO, Antonio C.; KIM, Brian S. Pathophysiological relevance of deiodinase polymorphism. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.341-346, out. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/med.0000000000000428>.

BOCCO, Barbara M. L. C. et al. Type 2 Deiodinase Disruption in Astrocytes Results in Anxiety-Depressive-Like Behavior in Male Mice. **Endocrinology**, [s.l.], v. 157, n. 9, p.3682-3695, set. 2016. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2016-1272>.

BRENT, Gregory A. Mechanisms of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 122, n. 9, p.3035-3043, 4 set. 2012. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci60047>.

CAPRA, Siriana Mansur. **Rastreamento do polimorfismo na enzima desidase tipo 2 (D2) em indivíduos com Síndrome de Williams-Beuren**. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Distúrbios do Desenvolvimento, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2016.

CELI, Fransesco S et al. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5'-deiodinase gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 1, n. 141, p.49-52, abr. 1998.

CHAKER, Layal et al. Hypothyroidism. **The Lancet**, [s.l.], v. 390, n. 10101, p.1550-1562, set. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30703-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30703-1).

CHENG, Sheue-yann; LEONARD, Jack L.; DAVIS, Paul J. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.139-170, abr. 2010. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2009-0007>.

CHOPRA, I J. An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3,3',5'-Triiodothyronine (reverse T3) in man. **Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 58, p.32-40, jul. 1976.

COLAK, A. et al. 1508 – Association study of the dio2 gene as a susceptibility candidate for schizophrenia in the turkish population; a case-control study. **European Psychiatry**, [s.l.], v. 28, p.1-8, jan. 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-9338\(13\)76526-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-9338(13)76526-x).

CRUZ, Maria Beatriz Zanarella. WISC III: Escala de Inteligência Wechsler para crianças: Manual. **Aval. psicol.**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 199-201, nov. 2005.

DORA, J. M. et al. Association of the type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism with type 2 diabetes: case-control study and meta-analysis. **European Journal of Endocrinology**, [s.l.], v. 163, n. 3, p.427-434, 21 jun. 2010. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/eje-10-0419>.

EL-ANSARY, Afaf. Data of multiple regressions analysis between selected biomarkers related to glutamate excitotoxicity and oxidative stress in Saudi autistic patients. **Data in Brief**, [s.l.], v. 7, p.111-116, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.02.025>.

FERNANDES LOPES, REGINA MARIA et al. Reflexões Teóricas e Práticas Sobre a Interpretação da Escala de Inteligência Wechsler para Adultos. **Act. Colom. Psicol.**, Bogotá, v. 15, n. 2, p. 109-118, Dec. 2012.

FIGUEIREDO, Vera L. M.; PINHEIRO, Sílvia; NASCIMENTO, Elizabeth do. Teste de inteligência WISC-III adaptando para a população brasileira. **Psicol. Esc. Educ. (Impr.)**, Campinas, v. 2, n. 2, p. 101-107, 1998.

FOMBONNE, Eric et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.1669-1685, 21 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>.

FOMBONNE, Eric. Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders. **Pediatric Research**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.591-598, dez. 2018.

FUTAMURA, T et al. Neonatal perturbation of neurotrophic signaling results in abnormal sensorimotor gating and social interaction in adults: implication for epidermal growth factor in cognitive development. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.19-29, jan. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001138>.

GALECKA, E et al. Association of the DIO2 gene single nucleotide polymorphisms with recurrent depressive disorder. **Acta Biocuímica Polonica**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.297-302, jun. 2015.

GALTON, Valerie Anne. The ups and downs of the thyroxine pro-hormone hypothesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 458, p.105-111, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.029>.

GOMEZ, Thiago Gnecco Bueno. **Correlação entre a presença do polimorfismo Ala D2 da enzima desidase tipo 2 (Dio2) e a funcionalidade de indivíduos com Transtorno do Espectro do Autismo**. 2017. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Distúrbios do Desenvolvimento, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2017.

GUO, T-W et al. Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. **Journal of Medical Genetics**, [s.l.], v. 41, n. 8, p.585-590, 1 ago. 2004. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2004.019190>.

HE, B et al. Association of genetic polymorphisms in the type II deiodinase gene with bipolar disorder in a subset of Chinese population. **Progress in Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.986-990, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.05.003>.

IGNACIO, Daniele L. et al. Early Developmental Disruption of Type 2 Deiodinase Pathway in Mouse Skeletal Muscle Does Not Impair Muscle Function. **Thyroid**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.577-586, abr. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2016.0392>.

JONG, Frank Jan de et al. The Association of Polymorphisms in the Type 1 and 2 Deiodinase Genes with Circulating Thyroid Hormone Parameters and Atrophy of the Medial Temporal Lobe. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 92, n. 2, p.636-640, fev. 2007. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-1331>.

KRUG, David A.; ARICK, Joel; ALMOND, Patricia. Behavior Checklist for Identifying Severely Handicapped Individuals with High Levels of Autistic Behavior. **J. Child Psychol. Psychiat.**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.221-229, jan. 1980

LAROS, Jacob Arie; JESUS, Girlene Ribeiro de; KARINO, Camila Akemi. Validação brasileira do teste não-verbal de inteligência SON-R 2½-7[a]. **Aval. psicol.**, Itatiba, v. 12, n. 2, p. 233-242, ago. 2013.

LOTTER, Victor. Epidemiology of autistic conditions in young children. **Social Psychiatry**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.124-135, dez. 1966. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00584048>.

MACEDO, Mariângela Miranda Ferreira; MOTA, Márcia Elia da; METTRAU, Marsyl Bulkool. WISC-IV: Evidências de Validade para Grupos Especiais de Superdotados” WISC-IV. **Revista Psicologia em Pesquisa**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.65-73, 19 jul. 2017. *Psicologia em Pesquisa*. <http://dx.doi.org/10.24879/2017001100100213>.

MAHAPATRA, Shreyas et al. Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) Norms: A “Growth Chart” for ATEC Score Changes as a Function of Age. **Children**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.25-37, 16 fev. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/children5020025>.

MARKSTEINER, Josef et al. Five out of 16 plasma signaling proteins are enhanced in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.539-540, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.011>.

MCANINCH, E A et al. A Common DIO2 Polymorphism and Alzheimer Disease Dementia in African and European Americans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 103, n. 5, p.1818-1826, 22 fev. 2018. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2017-01196>.

MCANINCH, E A. et al. Prevalent Polymorphism in Thyroid Hormone-Activating Enzyme Leaves a Genetic Fingerprint That Underlies Associated Clinical Syndromes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.920-933, mar. 2015. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2014-4092>.

MEDICI, Marco et al. Genetic Determination of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis: Where Do We Stand? **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 2,

p.214-244, abr. 2015. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2014-1081>.

MENTUCCIA, D. et al. 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 α -3-Adrenergic Receptor. **Diabetes**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.880-883, 1 mar. 2002. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.51.3.880>.

PEETERS, Robin P. et al. A new polymorphism in the type II deiodinase gene is associated with circulating thyroid hormone parameters. **American Journal of Physiology-endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 289, n. 1, p. E75-E81, jul. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00571.2004>.

PEETERS, Robin P. et al. Polymorphisms in Thyroid Hormone Pathway Genes Are Associated with Plasma TSH and Iodothyronine Levels in Healthy Subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.2880-2888, jun. 2003. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-021592>.

PELLECCHIA, Maria Teresa et al. Serum epidermal growth factor predicts cognitive functions in early, drug-naive Parkinson's disease patients. **Journal of Neurology**, [s.l.], v. 260, n. 2, p.438-444, 22 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-012-6648-6>.

RICHARD, Kerry et al. Ontogeny of Iodothyronine Deiodinases in Human Liver. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v. 83, n. 8, p.2868-2874, 1998.

SÁNCHEZ, Aroha; CALPENA, Ana; CLARES, Beatriz. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 8, p.16981-17004, 27 jul. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160816981>

SCHNEIDER, Mark J. et al. Targeted Disruption of the Type 1 Selenodeiodinase Gene (Dio1) Results in Marked Changes in Thyroid Hormone

Economy in Mice. **Endocrinology**, [s.l.], v. 147, n. 1, p.580-589, jan. 2006. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-0739>.

SCHNEIDER, Mark J. et al. Targeted Disruption of the Type 2 Selenodeiodinase Gene (DIO2) Results in a Phenotype of Pituitary Resistance to T4. **Molecular Endocrinology**, [s.l.], v. 12, n. 15, p.2137-2148, dez. 2001.

SINISCALCO, Dario et al. Inflammation and Neuro-Immune Dysregulations in Autism Spectrum Disorders. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.1-14, 4 jun. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph11020056>.

SPARROW, Sara S. et al. Vineland Adaptive Behavior Scales. 1984.

SPEK, Anne H. van Der; FLIERS, Eric; BOELEN, Anita. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 458, p.29-38, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.025>.

TAYLOR, Peter et al. Effect of low thyroid hormone bioavailability on childhood cognitive development: data from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children birth cohort. **The Lancet**, [s.l.], v. 383, p.100-100, fev. 2014. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60363-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60363-9).

UDDIN, Lucina Q.; SUPEKAR, Kaustubh; MENON, Vinod. Reconceptualizing functional brain connectivity in autism from a developmental perspective. **Frontiers In Human Neuroscience**, [s.l.], v. 7, p.1-11, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnhum.2013.00458>.

VIDAL, Francisco Antonio Soto; FIGUEIREDO, Vera Lúcia Marques de; NASCIMENTO, Elizabeth do. A quarta edição do WISC americano. **Aval. psicol.**, Itatiba, v. 10, n. 2, p. 205-207, ago. 2011.

WANG, Xiantao et al. Epidermal Growth Factor Receptor-dependent Akt Activation by Oxidative Stress Enhances Cell Survival. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 275, n. 19, p.14624-14631, 5 maio 2000. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.19.14624>.

WOUTERS, H J.C.M. et al. No Effect of the Thr92Ala Polymorphism of Deiodinase-2 on Thyroid Hormone Parameters, Health-Related Quality of Life,

and Cognitive Functioning in a Large Population-Based Cohort Study. **Thyroid**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.147-155, fev. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2016.0199>.

ZANOLLA, Thais Arbocese et al. Causas Genéticas, Epigenéticas e Ambientais do Transtorno do Espectro Autista. **Cadernos de Pós-graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, São Paulo, v. 15, n. 2, p.29-42, dez. 2015.

ZHANG, Qing-biao; GAO, Si-ju; ZHAO, Hong-xiang. Thioredoxin: A novel, independent diagnosis marker in children with autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s.l.], v. 40, p.92-96, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.007>.