

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE WEHMUTH

ANÁLISE MOLECULAR DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *SLC6A4* E
DRD4 EM PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA



CURITIBA

2016

MARIANE WEHMUTH

ANÁLISE MOLECULAR DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *SLC6A4* E
DRD4 EM PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Neurologia Pediátrica.

Orientador: Dr. Sérgio A. Antoniuk
Co-Orientadora: Dra. Lilian Pereira Ferrari

CURITIBA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS – SIBI/UFPR,
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – SD, BIBLIOTECÁRIA CRISTIANE SINIMBU
SANCHEZ CRB9/1848, COM OS DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR.

W413 Wehmuth, Mariane

Análise molecular dos polimorfismos dos genes SLC6A4 e DRD4 em pacientes com transtorno do espectro autista / Mariane Wehmuth. – Curitiba, 2016.

71 p.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antonio Antoniuk.

Coorientadora: Prof. Dra. Lilian Pereira Ferrari.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde.

Universidade Federal do Paraná.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Poliformismo genético. 3. Serotonina. 4. Dopamina. I. Antoniuk, Sergio Antonio. II. Ferrari, Lilian Paula. III. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WS 350

Parecer

A Banca Examinadora, instituída pelo colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após arguir a Mestranda

Mariane Wehmuth

em relação a sua Dissertação de Mestrado intitulada:

**“ANÁLISE MOLECULAR DOS POLIMORFISMOS DOS GENES
SLC6A4 E DRD4 EM PACIENTES COM TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA”**

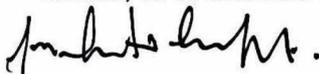
é de parecer favorável à *Aprovação* da acadêmica, habilitando-a ao título de

Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente,

Área de Concentração em *Neurologia Pediátrica.*

Área Específica *Medicina*

Curitiba, 16 de setembro de 2016



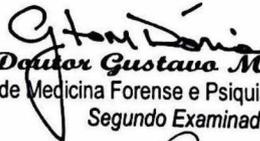
Professor Doutor Sérgio Antonio Antoniuk

Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná - UFPR - *Presidente da Banca Examinadora*



Professor Doutor Salmo Raskin

Professor Titular do Curso de Medicina da Faculdade Evangelica do Paraná; *Primeiro Examinador.*



Professor Doutor Gustavo Manoel Schier Doria

Professor Adjunto do Departamento de Medicina Forense e Psiquiatria da Universidade Federal do Paraná - UFPR. *Segundo Examinador.*



Professora Doutora Mônica Nunes Lima Cat

Professora Associado do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFPR

Dedico esta dissertação aos meus pacientes autistas que me apresentaram um cérebro novo e uma forma de enxergar o mundo completamente diferente.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Sérgio Antoniuk e Prof^a. Dra. Lilian Pereira Ferrari e à Prof^a. Dra. Mônica Lima pelo apoio em toda essa jornada e por todo o auxílio prestado.

A todos os mestres que participaram de minha formação, em especial Dr. Isac Bruck, Dr. Alcir Francisco da Silva e Dra. Lúcia Helena Coutinho dos Santos (*in memoriam*).

Às amigas Juliana Leandro Paes e Karine Bittencourt da Silva Alcantud que participaram diretamente de toda esta pesquisa, pelo trabalho, empenho e companhia em todos os momentos.

A toda equipe do CENEP pela parceria em todos esses anos.

Ao meu marido João, pelo apoio incondicional.

E meu agradecimento mais que especial aos meus queridos pacientes e suas famílias, que permitiram que esse trabalho se realizasse e que foram os verdadeiros responsáveis por moldar o meu conhecimento até aqui.

*"A única razão de eu não ser comum é que ninguém
além de mim me enxerga dessa forma."*

O Extraordinário
R. J. Palacio

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do desenvolvimento infantil caracterizado por comprometimento da comunicação social e comportamentos repetitivos e/ou interesses restritos. O TEA possui uma influência genética clara em sua etiologia, baseado no modelo de múltiplas variantes comuns (*multiple common variants*), que não seguem um modelo específico e nem um padrão mendeliano. As múltiplas variantes comuns ou polimorfismos são diferenças entre o DNA de indivíduos que estão presentes na população em uma frequência maior do que 1%. Entre elas estão os genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no metabolismo de neurotransmissores, como o *SLC6A4* e *DRD4*. A região 5-*HTTPL* do gene *SLC6A4* codifica uma proteína envolvida na neurotransmissão serotoninérgica, e seu polimorfismo pode alterar a quantidade de serotonina disponível na fenda sináptica para cada genótipo. O gene *DRD4* codifica o receptor de dopamina D4 e um dos seus polimorfismos envolve a sua sensibilidade à dopamina, alterando a ativação do córtex pré-frontal pelo circuito mesocortical. Ambos os polimorfismos citados podem estar envolvidos tanto na etiologia quanto em sintomas específicos do TEA. O objetivo deste trabalho é avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4* e seu efeito do ponto de vista clínico em pacientes com TEA, através da avaliação clínica de 53 pacientes entre 2 e 16 anos com diagnóstico de TEA do Ambulatório de Autismo do CENEP – Centro de Neuropediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sendo a pesquisa dos polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4*, realizados no laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL de janeiro de 2012 a dezembro de 2014. A genotipagem foi comparada com um grupo controle de 40 indivíduos saudáveis que foram pareados conforme o percentual étnico observado na população sul brasileira e, ainda, em gênero em relação ao grupo com TEA. Todas as amostras do grupo controle foram obtidas de banco de DNA. A comparação das frequências genotípicas e alélicas entre os dois grupos resultou em valores não significativos, o que indica que tanto os genótipos quanto os alelos se distribuem de forma semelhante entre estas populações. Quando comparados os polimorfismos com as características clínicas do grupo de pacientes com TEA, os pacientes heterozigotos para polimorfismo de 7 repetições para o gene *DRD4* apresentaram maior frequência de associação com epilepsia ($p = 0,01$) e quando agrupados com os homozigotos para 7 repetições observou-se nível de significância limítrofe ($p = 0,09$), com Risco Relativo (RR) para epilepsia de 3,5 (IC 95% = 0,95 a 13,08). Para os demais resultados, não houve diferença significativa entre os grupos com os diferentes polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4*. Embora a amostra com pelo menos um alelo para o polimorfismo de 7 repetições do gene *DRD4* seja pequena ($n = 17$), esse fato pode significar um fator de risco para epilepsia em pacientes com TEA. Porém, estudos com uma amostra maior são necessários para a confirmação deste dado.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista, Polimorfismos, Dopamina, Serotonina, Epilepsia

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impaired social communication and repetitive behaviors and/or restricted interests. ASD has a clear genetic influence on its etiology based on multiple common variants model, but there isn't a particular model or a Mendelian pattern for it. The multiple common variants or polymorphisms are differences between the DNA of individuals that are present in the general population in a frequency greater than 1%. Included on this model genes responsible for encoding proteins involved in neurotransmitter metabolism, such as *SLC6A4* and *DRD4*. 5-HTTLPL region of the *SLC6A4* gene encodes a protein involved in serotonergic neurotransmission, and its polymorphism can change the amount of serotonin available in the synaptic cleft for each genotype. The *DRD4* gene encoding the dopamine D4 receptor and one of its polymorphisms involves their sensitivity to dopamine by changing the activation of the prefrontal cortex by mesocortical circuit. Both cited polymorphisms may be involved on the etiology or specific symptoms of ASD. The aim of this research is to assess the prevalence of *SLC6A4* and *DRD4* polymorphisms and their clinical effect in patients with ASD, through the clinical evaluation of 53 patients between 2 and 16 years old with ASD at CENEP - Center for Pediatric Neurology of the Federal University of Parana (UFPR). The genetic research of *SLC6A4* and *DRD4* polymorphisms was performed in Genetics and Molecular Biology laboratory of the University Center of *Unibrasil* between January 2012 to December 2014. Genotyping was compared with a control group of 40 healthy subjects who were matched according to the ethnic percentage observed in the southern Brazilian population and also in gender in the group with ASD. All samples from the control group were obtained from DNA bank. The comparison of genotypic and allelic frequencies between the two groups indicates that both genotypes alleles are distributed similarly between these populations (ASD and control group). When comparing the polymorphisms with the clinical characteristics of the group of patients with ASD, the 7 repetition heterozygous for the *DRD4* gene showed a higher frequency of association with epilepsy ($P = 0.01$), when combined with those 7 repetition homozygous was observed a borderline significance ($p = 0.09$), with Relative Risk (RR) for epilepsy of 3.5 (95% CI = 0.95 to 13.08). For the other results, there was no significant difference between groups with different polymorphisms of *SLC6A4* and *DRD4* genes. Although the sample with heterozygous for the 7 repetition polymorphism of the *DRD4* gene is small ($n = 17$), this may mean a risk factor for epilepsy in patients with ASD. However, studies with larger samples are needed to confirm this finding.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, Polymorphisms , Dopamine, Serotonin, Epilepsy.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO TEA DE ACORDO COM O DSM V.....	18
QUADRO 2 – SÍNDROMES GENÉTICAS MAIS COMUMENTE ASSOCIADAS AO TEA.....	26
QUADRO 3 – DIVISÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME SUA AÇÃO PARA O GENE <i>SLC6A4</i>	38
QUADRO 4 – DIVISÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME FUNCIONALIDADE PARA O GENE <i>DRD4</i>	38
QUADRO 5 – CONDIÇÕES DA PCR NA AMPLIFICAÇÃO DO <i>HTTLPR</i>	39
QUADRO 6 – SEQUENCIA DOS PRIMERS E CONDIÇÕES DA PCR PARA O GENE <i>DRD4</i>	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXPRESSÃO DO GENE <i>SLC6A4</i> E SEUS ALELOS.....	30
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIMORFISMO DO GENE <i>DRD4</i>	33
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LIGAÇÃO DA DOPAMINA AO RECEPTOR D4 E SUA FORMA DE AÇÃO	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FREQUÊNCIA DE EEG NORMAIS E ALTERADOS EM PACIENTES COM E SEM EPILEPSIA.....	44
TABELA 2 – FREQUÊNCIA DE EXAMES DE IMAGEM NORMAIS E ALTERADOS EM PACIENTES COM E SEM EPILEPSIA	45
TABELA 3 – USO DE MEDICAÇÃO E CLASSE DE MEDICAMENTOS MAIS USADOS	45
TABELA 4 – NÍVEL DE COMPROMETIMENTO CONFORME A CLASSIFICAÇÃO DO DSM V	45
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DAS ESTRUTURAS TRIALÉLICA E BIALÉLICA DO <i>HTTLPR</i> DA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM TEA E CONTROLES	47
TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE <i>DRD4</i> OBSERVADAS NOS GRUPOS AMOSTRA E CONTROLE.....	48
TABELA 7 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA <i>DRD4</i> CONFORME FUNCIONALIDADE EM GRUPOS AMOSTRA E CONTROLE....	48
TABELA 8 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO <i>SLC6A4</i> DE ACORDO COM A EXPRESSÃO GÊNICA.....	49
TABELA 9 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO <i>DRD4</i> CONFORME FUNCIONALIDADE.....	49
TABELA 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA AMOSTRA.....	50

LISTA DE SIGLAS

- 5-HT – 5 Hidroxitriptamina (Serotonina)
- 5-HTT – *Serotonin Transporter* (Transportador de Serotonina)
- 5-HTTLPR – *Serotonin-Transporter-Linked Polymorphic Region* (Região do Polimorfismo ligado ao Transportador de Serotonina)
- ADDM – *Autism and Developmental Disabilities Monitoring* (Rede de Monitoramento de Autismo e Transtornos do Desenvolvimento)
- CENEP – Centro de Neuropediatria do Hospital de Clínicas da UFPR
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DRD4 – *D4 Dopamine Receptor* (Receptor de Dopamina D4)
- DSM – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais)
- EEG – Eletroencefalograma
- OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man* (Sistema Online de Herança Mendeliana Humana)
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- QI – Quociente de Inteligência
- RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo por fragmentos por enzimas de restrição)
- SLC6A4 – *Solute Carrier Family 6 Member 4* (
- SNC – Sistema Nervoso Central
- TDAH – Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
- TEA – Transtorno do Espectro Autista
- TID – Transtornos Invasivos do Desenvolvimento
- VNTR - *Variable Number Tandem Repeat* (Número Variável de Repetições em Tandem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS GERAIS	14
1.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 PANORAMA HISTÓRICO E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS ATUAIS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	15
2.2 EPIDEMIOLOGIA E PANORAMA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA NO BRASIL	19
2.3 COMPLEXIDADE FENOTÍPICA X COMPLEXIDADE GENÉTICA	20
2.3.1 A Diversidade da Características Clínicas Associadas ao Transtorno do Espectro Autista	21
2.3.2 Aspectos Genéticos do Transtorno do Espectro Autista	25
2.4 POLIMORFISMO DO GENE <i>SLC6A4</i>	28
2.5 POLIMORFISMO DO GENE <i>DRD4</i>	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	38
3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO.....	38
3.3 POPULAÇÃO FONTE	38
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	38
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	38
3.6 AMOSTRA	39
3.7 HIPÓTESE	39
3.8 VARIÁVEIS DO ESTUDO	39
3.9 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	41
3.9.1. Métodos dos Testes Genéticos.....	41
3.9.2 Método da Coleta de Dados Clínicos	43
3.10 REGISTRO E GERENCIAMENTO DE DADOS	44
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
3.12 ÉTICA EM PESQUISA	45

3.13 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA	45
3.14 FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS	45
4 RESULTADOS	46
4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA AMOSTRA.....	45
4.2 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DA AMOSTRA COMPARADA AO GRUPO CONTROLE	49
4.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA AMOSTRA EM RELAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS	51
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	69
ARTIGOS	91

1 INTRODUÇÃO

Desde as primeiras descrições feitas por Leo Kanner e Hans Asperger na década de 40, o Autismo se revelou um transtorno extremamente complexo, com uma base neurobiológica ainda não completamente compreendida, e as pesquisas nessa área tem evoluído nos últimos anos na mesma velocidade em que os novos números de casos têm sido diagnosticados. (KANNER, 1943; FRITH, 1991; VOLKMAR; REICHOW, 2013).

Explicar, do ponto de vista da neurobiologia, como uma única doença pode fazer com que algumas crianças não falem, não mantenham contato visual e passem a maior parte do tempo distraídas em suas estereotípias motoras, enquanto outras são verdadeiros gênios da astrofísica, ou prodigiosos músicos é um verdadeiro desafio. Essa ampla variedade de apresentação clínica e a dificuldade em encontrar um fator etiológico único ou de explicar a sua fisiopatologia têm impulsionado as pesquisas relacionadas ao Autismo em todo o mundo. (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; PAULA et al., 2011).

Além da busca por respostas relacionadas à sua etiologia, avanços nas pesquisas nos últimos anos interferiram também na classificação e nomenclatura do Autismo. A sua ampla apresentação fenotípica permitiu a mudança na nomenclatura atual para Transtorno do Espectro Autista (TEA), refletindo de forma direta a complexidade por trás desse transtorno. (APA – AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Quando se fala em etiologia do TEA, sabe-se que a influência da genética é clara, e diversos genes já foram apontados como possíveis candidatos, sendo que provavelmente mais de um deles está envolvido na gênese ou agravamento das características do TEA. Porém, a determinação dos genes envolvidos e sua correlação com o ambiente ainda não é completamente compreendida, e a falta de um biomarcador único torna ainda mais difícil a compreensão da fisiopatologia do TEA, interferindo diretamente na falta de um tratamento farmacológico específico e eficaz. (SCHWARTZMAN; ARAÚJO, 2011; VOINEAGU; YOO, 2007; GESHWING, 2011).

Do ponto de vista genético, o TEA se encaixa no modelo de múltiplas variantes comuns (*multiple common variants*), que quando combinadas, podem

ou não interagir entre si e se associam a fatores ambientais, tornando-o uma doença complexa, multifatorial, que não segue um modelo específico e nem um padrão mendeliano de herança monogênica. As múltiplas variantes comuns ou polimorfismos são diferenças entre o DNA de indivíduos, definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior do que 1%. Esses polimorfismos estão presentes em outras doenças complexas principalmente relacionadas ao neurodesenvolvimento e doenças psiquiátricas, porém, a forma como cada polimorfismo influencia no fenótipo dessas doenças ainda é um desafio e para o TEA não é diferente. (COSTA et al., 2007; GESCHWING, 2011).

Entre os polimorfismos relacionados à susceptibilidade ao TEA estão os dos genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no metabolismo de neurotransmissores, entre eles os polimorfismos dos genes *SLC6A4* (*Solute Carrier Family 6 Member 4*), também denominado SERT ou 5HTT (*Serotonin Transporter Protein*) e o *DRD4* (*D4 Dopamine Receptor*).

O gene *SLC6A4* codifica uma proteína envolvida na neurotransmissão serotoninérgica e um dos polimorfismos descritos em associação com o TEA ocorre na região 5-HTTLPR (*Serotonin-Transporter-Linked Polymorphic Region*), responsável por modular a resposta serotoninérgica. Em consequência, a concentração de serotonina na fenda sináptica pode ser diferente para cada genótipo, o que pode sustentar os mecanismos neurofisiológicos do TEA. (NAKAMURA et al., 2010; GUPTA; STATE, 2006).

Outro polimorfismo estudado em associação ao TEA é o do gene *DRD4*, localizado no cromossomo 11 (11p.15.5) que codifica o receptor de dopamina D4. O *DRD4* revela-se um dos genes mais variáveis do genoma, apresentando vários polimorfismos em sua extensão, e um dos polimorfismos envolve a sensibilidade do receptor D4 à dopamina, alterando a ativação do córtex pré-frontal pelo circuito mesocortical dopaminérgico, podendo estar envolvido na diminuição da quantidade de receptores de dopamina D4 em pacientes com TEA. (RODRIGUES, 2010; ARIAS; POPPEL, 2007; HOMBOE, 2011).

A investigação do papel da dopamina no TEA se intensificou após a observação do efeito positivo dos antipsicóticos (bloqueadores de dopamina) em aspectos como a hiperatividade e agressividade. Além disso, o polimorfismo do *DRD4* tem sido estudado como um potencial biomarcador para

gravidade de co-ocorrência de sintomas associados, entre eles o Transtorno Opositor Desafiante, o Transtorno Obsessivo Compulsivo e Ansiedade de Separação, além de maiores índices de problemas comportamentais e comportamentos repetitivos. (GADOW et al., 2010; NAKAMURA et al., 2010).

Apesar das associações já encontradas, o papel do polimorfismo dos genes *DRD4* e *SLC6A4* no TEA ainda não está completamente elucidado. Não estão diretamente ligados à etiologia do TEA de forma isolada, mas podem contribuir para a sua etiologia em associação com outros fatores e ainda acentuar comportamentos e sintomas específicos, bem como favorecer a presença de comorbidades no TEA. (GADOW et al., 2010; NAKAMURA et al., 2010).

Partindo da necessidade de uma maior compreensão da susceptibilidade genética ao TEA, este estudo propõe-se a analisar a presença e a influência dos polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4* em pacientes com TEA.

1.1 OBJETIVOS

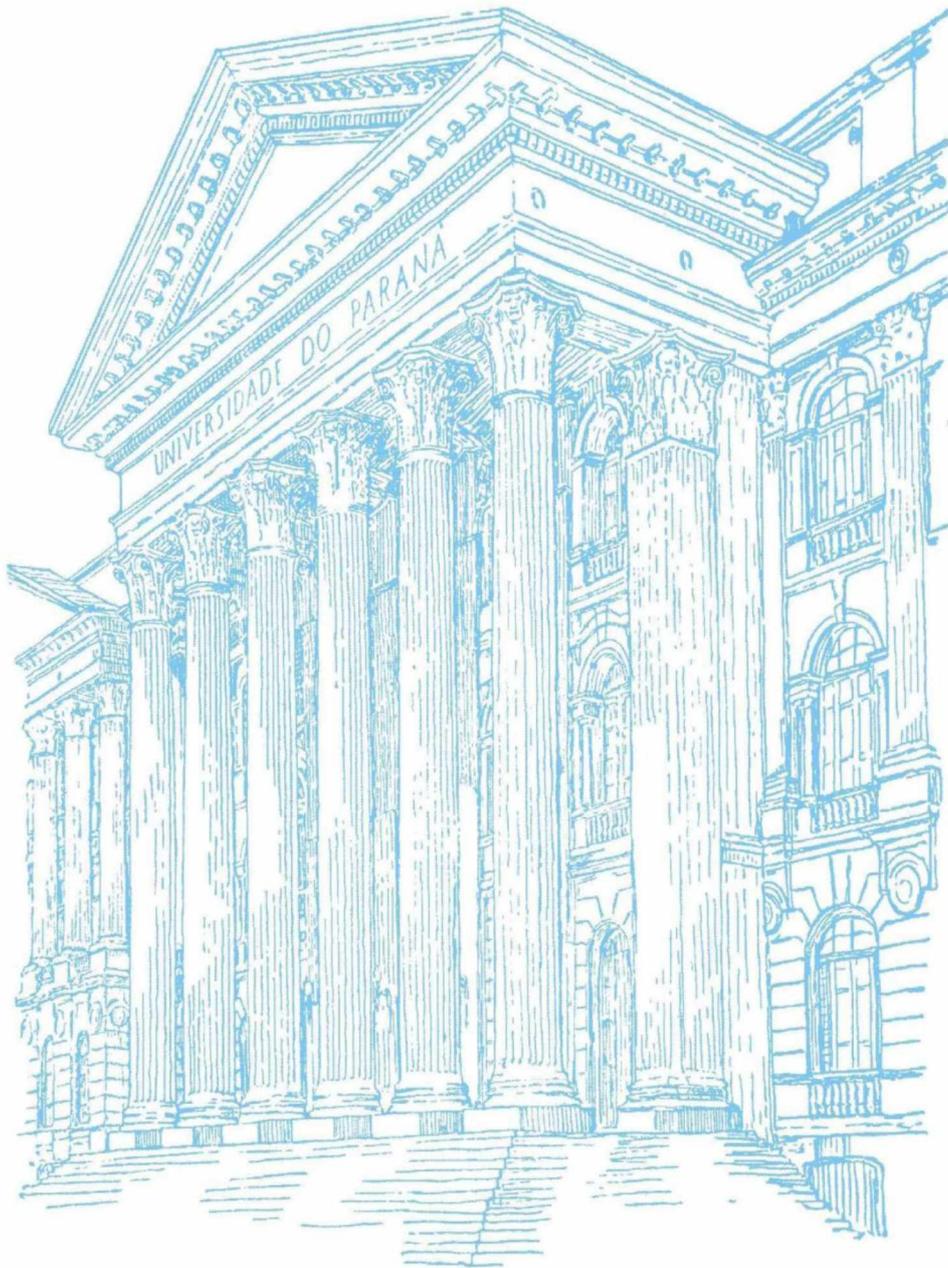
1.1.1 Objetivo Principal

Avaliar a frequência de polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4* e seu efeito do ponto de vista clínico em pacientes com TEA do Ambulatório de Autismo do CENEP – Centro de Neuropediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

1.1.2 Objetivos Secundários

- a) Descrever as características clínicas da amostra de pacientes diagnosticados com TEA;
- b) Caracterizar a frequência genotípica e alélica de polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4* nos pacientes com TEA;
- c) Estudar a possível associação entre os polimorfismos citados e o TEA

- d) Testar a associação dos polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4* em sintomas específicos do TEA e comorbidades individualmente.



2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PANORAMA HISTÓRICO E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS ATUAIS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Leo Kanner foi classicamente o primeiro a descrever o TEA através de um relato de onze casos intitulado “*Autistic Disturbance of Affective Contact*”¹, em 1943, no *Johns Hopkins Hospital*, nos Estados Unidos. Sua descrição possui uma riqueza de detalhes impressionante, o que torna esse relato tão importante do ponto de vista histórico. A sua descrição inclui crianças de dois a onze anos, sendo oito meninos e três meninas. Esses casos foram observados a partir de 1938, e apresentados como crianças com condições que diferiam de tudo o que já havia sido relatado, com fascinantes peculiaridades. (KANNER, 1943).

Em seu artigo, Kanner as descreve com diferenças individuais e distintos graus do “distúrbio”, porém suas características em comum permitiriam classificá-las em uma síndrome clínica específica. Muitas destas crianças haviam sido anteriormente diagnosticadas com deficiência intelectual ou esquizofrenia. (KANNER, 1943).

Na mesma época, em 1944, em Viena, Hans Asperger coincidentemente publicou um artigo descrevendo uma nova condição, utilizando o termo “*Autistic Psychopathy*”², porém, seu artigo recebeu menor notoriedade, principalmente por ter sido escrito e publicado em alemão. Asperger descreveu crianças que se pareciam com “pequenos adultos” e interessou-se particularmente pelas formas mais sutis e fascinantes de comprometimento em crianças com habilidades específicas. (FRITH, 1991). Posteriormente, em sua homenagem, a Síndrome de Asperger passou a fazer parte dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID) descritos na quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) até o início de 2013. (VOLKMAR; REICHOW, 2013).

¹ Distúrbio Autístico do Contato Afetivo (tradução livre)

² Psicopatia Autística (tradução livre)

Mesmo com descrições distintas, existe uma série de sobreposições entre os trabalhos de Kanner e Asperger, com diversos pontos de concordância entre si, entre eles a dificuldade de interação social, falha na comunicação, comportamentos estereotipados, interesses restritos e resistência a mudanças. Essas duas publicações foram de fundamental importância para delimitar os critérios atuais do que conhecemos como TEA. (FRITH, 1991).

No final da década de 70, com o surgimento de novos casos, e a divulgação do conhecimento sobre o assunto, o termo *Autismo* passou a ser amplamente utilizado, como doença do neurodesenvolvimento infantil, com prováveis bases neurológicas ainda não bem determinadas. Na época, o Autismo já era definido como comprometimento no desenvolvimento das habilidades sociais e de comunicação, associado à resistência a mudanças, estereotípias motoras e outras características comportamentais, iniciado nos primeiros anos de vida, e em grande parte associado à deficiência intelectual, e passou a fazer parte da classificação dos TID listados na terceira edição do DSM. (VOLKMAR; REICHOW, 2013).

Nos anos subsequentes, as mudanças na descrição e classificação do Autismo foram drásticas. Na época da elaboração da quarta edição do DSM, em 1994, já não era considerado uma doença rara e o número de relatos de casos havia atingido a marca de mais de 1000 pacientes em mais de 20 locais diferentes em todo o mundo. A definição dos critérios diagnósticos e da nova classificação baseou-se em análise de dados e revisão de literatura e incluíram novas subcategorias na classificação utilizada. Os TID foram subdivididos em: Autismo, Transtorno Desintegrativo da Infância, Síndrome de Asperger, Síndrome de Rett e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação e os critérios diagnósticos incluíam o comprometimento de três áreas específicas: comprometimento da comunicação, da socialização e interesses restritos ou comportamentos repetitivos. (APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

Já em 2013, as mudanças decorrentes de anos de revisão, por um comitê de Transtornos do Neurodesenvolvimento criado especificamente para essa finalidade, deram origem a quinta e atual edição do DSM. As mudanças atuais foram ainda mais polêmicas e trouxeram sérias implicações, como a mudança da nomenclatura de *Transtornos Invasivos do Desenvolvimento* para

Transtorno do Espectro Autista. Além da nomenclatura, as outras mudanças mais impactantes na nova classificação incluem a subdivisão em apenas duas áreas de comprometimento ao invés de três e a retirada das subdivisões: Autismo, Transtorno Desintegrativo da Infância, Síndrome de Asperger, Síndrome de Rett e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação. (APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O termo *Autismo*, ainda hoje, remete com frequência a imagem de pessoas com grave comprometimento de comunicação, e padrões rígidos de comportamento. Porém, cada vez mais crianças com diagnóstico de TEA estão frequentando escolas regulares e fazem parte da sociedade com uma vida mais próxima do normal, o que reflete a importância do conceito de *Espectro* da nomenclatura atual. (VOLKMAR; REICHOW, 2013).

Os critérios diagnósticos para o TEA, de acordo com o DSM V estão resumidos no Quadro 1. Para a realização do diagnóstico é necessário a presença dessas características, e deve haver prejuízos clinicamente relevantes no âmbito social, ocupacional ou outras importantes áreas de funcionamento. Os sintomas devem ter início precoce, e não podem ser explicados por outras doenças psiquiátricas. (APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Para indivíduos com um diagnóstico prévio pelo DSM-IV bem estabelecido de Autismo, Síndrome de Asperger ou Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação deve ser dado o diagnóstico de TEA. (APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Deve-se ainda especificar se os sintomas do TEA cursam com ou sem acompanhamento de prejuízo intelectual, com ou sem acompanhamento de prejuízo na linguagem, se são associados com uma condição médica ou genética conhecida ou fator ambiental e quais são. (APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A associação com outro transtorno mental, comportamental ou do neurodesenvolvimento e a presença de catatonia também devem ser referidas. (APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Além dessas características especificadas, pode ser acrescentada ao diagnóstico a classificação do paciente com TEA em graus de comprometimento que vão de 1 a 3, sendo o grau 1 o nível de

comprometimento mais leve, baseado na menor necessidade de apoio para realização de suas atividades, e o grau 3 o maior grau de comprometimento; com necessidade substancial de apoio. (APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

QUADRO 1 - CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO TEA DE ACORDO COM O DSM V.

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS:
A. Déficits persistentes em <i>comunicação social</i> e interação social em múltiplos contextos, incluindo déficits na reciprocidade social-emocional, nos comportamentos comunicativos não verbais, no desenvolvimento, manutenção e compreensão dos relacionamentos.
B. Padrões de <i>comportamento, interesses ou atividades restritos e repetitivos</i>, incluindo estereotípias motoras e de fala, adesão inflexível a rotinas, padrões ritualizados de comportamento, interesses fixos e altamente restritos, anormais em intensidade ou foco e hipo ou hiper-reatividade a estímulos sensoriais.
C. Os sintomas devem estar presentes no período inicial de desenvolvimento (mas podem não se manifestar completamente até as demandas sociais excederem as capacidades limitadas, ou podem estar mascarados por estratégias aprendidas posteriormente na vida).
D. Sintomas causam prejuízos clinicamente relevantes no social, ocupacional ou outras importantes áreas de funcionamento atual.
E. Tais distúrbios não são mais bem explicados por deficiência intelectual ou atraso no desenvolvimento global.
DEVE-SE ESPECIFICAR ASSOCIAÇÕES:
Com ou sem prejuízo intelectual
Com ou sem prejuízo de linguagem
Associado a uma condição médica ou genética conhecida ou fator ambiental
Associado com outro transtorno mental, comportamental ou do neurodesenvolvimento
Com catatonia
DEVE-SE ESPECIFICAR NÍVEL DE GRAVIDADE DO TEA
Nível 1 – Necessidade de pouco apoio
Nível 2 – Necessidade de apoio substancial
Nível 3 – Necessidade de apoio muito substancial

FONTE: ADAPTADO DE APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013.

O diagnóstico do TEA é clínico e baseado nos critérios supramencionados. A ausência de biomarcadores, como será discutido

adiante, dificulta a tarefa do diagnóstico precoce e preciso, assim como o rastreio de crianças em risco maior para desenvolvimento de TEA. Porém, uma avaliação detalhada da criança nos diversos ambientes em que está inserida e o uso de ferramentas de avaliação e de triagem permitem o avanço no diagnóstico da doença, o que, pelo menos em parte, é responsável pelo aumento exponencial de casos a cada ano. (SCHWARTZMAN; ARAÚJO, 2011).

2.2. EPIDEMIOLOGIA E O PANORAMA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA NO BRASIL

A prevalência do TEA cresce a cada ano e são vários os fatores responsáveis por esse crescimento. Dentre eles, está a provável associação com fatores genéticos, a maior disponibilidade de informação para a população e a ampliação dos critérios diagnósticos, que incluem pessoas com alta funcionalidade, que provavelmente eram subdiagnosticadas no passado. Causas ambientais também estão sendo extensamente investigadas, levando a diversas teorias, algumas plausíveis, outras comprovadamente sem associação com o TEA. (PARDO; EBERHARDT, 2007).

Desde 2000, foi estabelecido nos Estados Unidos a ADDM - *Autism and Developmental Disabilities Monitoring*, uma rede vinculada ao CDC – *Centers for Disease Control*, responsável pela coleta de dados, criada com o objetivo de estimar a prevalência do TEA no país. O primeiro levantamento desta rede contava com de 20 diferentes locais nos Estados Unidos, e entre os anos de 2000 e 2002, foi de 6,6 casos em cada 1000, ou seja, uma em cada 150 crianças com 8 anos de idade tinham o diagnóstico de TEA. Em 2008 esse número elevou-se para uma em cada 88 crianças. (CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2014).

Em 2014, de acordo com o último levantamento publicado, referente ao ano de 2010, foram avaliados dados de 363 mil crianças de 8 anos, de 11 diferentes estados americanos, equivalentes à 9% da população nessa faixa etária. A prevalência foi de 14,7 em cada 1000 crianças de 8 anos, ou seja, uma em cada 68. A diferença entre os gêneros foi de 4,5 meninos para uma menina. Destes, 31% foram classificadas com deficiência intelectual associada

(considerando QI abaixo de 70) e a média de idade do diagnóstico foi de 44 meses (CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2014).

Tanto no Brasil como nos outros países da América Latina, a prevalência do TEA não é documentada. Baseando a estimativa de prevalência nos números americanos e europeus (esses últimos em torno de 1% da população), estima-se que no Brasil mais de 1,5 milhões de brasileiros tenham o diagnóstico de TEA. (PAULA et al., 2011).

No Brasil, há apenas um estudo piloto, realizado na cidade de Atibaia, interior do estado de São Paulo em 2011, com 1470 crianças entre 7 e 12 anos, resultando numa prevalência de 0,3%. (PAULA et al., 2011).

O número de pesquisas no Brasil tem aumentado nos últimos anos, porém, estas ainda estão concentradas em poucas regiões do país, com pequenas amostras, refletindo a precariedade de investimentos em pesquisa no nosso país. O número de casos subdiagnosticados ainda é alto em todas as regiões do Brasil, e o diagnóstico ainda é muito tardio. Há escassez de centros especializados no diagnóstico, tratamento e pesquisa do TEA em todo o país, e a precariedade de acesso ao atendimento diminui as chances de um melhor prognóstico para esses pacientes. (PAULA et al., 2011; GOMES et al., 2015).

Recentemente, políticas públicas em defesa da pessoa com TEA foram criadas no país, incluindo a Lei Federal de número 12.764 de 2012, estabelecida como Lei de Proteção aos Direitos da Pessoa com TEA. Porém, ainda há muito que se desenvolver na prática a partir dessas políticas públicas. (BRASIL, Decreto-lei n. 12.764, de 27 de dezembro de 2012).

O TEA não pode mais ser considerado uma doença rara, os sistemas de saúde e educação necessitam ser preparados para lidar com essa realidade, e as pesquisas relacionadas ao TEA também devem ser estimuladas em nosso país. (PAULA et al., 2011).

2.3. COMPLEXIDADE FENOTÍPICA X COMPLEXIDADE GENÉTICA

Apesar de a etiologia do TEA ainda não ser completamente elucidada, a neurociência tem demonstrado que o TEA está associado a fatores genéticos e neurobiológicos e as pesquisas atuais buscam encontrar possíveis

biomarcadores que podem colaborar para sua investigação etiológica (SCHWARTZMAN; ARAÚJO, 2011; GESHWIND, 2011).

Como era de se esperar, com uma apresentação fenotípica tão variada do ponto de vista clínico, os fatores genéticos e neurobiológicos associados ao TEA também são extremamente complexos, motivo pela qual a busca por sua definição etiológica ainda persiste. (SCHWARTZMAN; ARAÚJO, 2011; VEENSTRA-VANDERWEELE; BLAKELY, 2012).

Diversos genes são cotados como possíveis candidatos à susceptibilidade ao TEA, com explicações, do ponto de vista neurobiológico, extremamente complexas, mas nenhum se mostrou ainda determinante de forma isolada. Diferentes mecanismos neurológicos também foram propostos como candidatos, incluindo alterações em circuitos neuronais específicos, neurotransmissores e vias de neuroplasticidade que envolvem ramificações neuronais e sinapses, já inclusive demonstradas *in vitro*, mas ainda não completamente elucidadas. (SCHWARTZMAN; ARAÚJO, 2011; GESHWIND, 2011; VEENSTRA-VANDERWEELE; BLAKELY, 2012; LEPPA et al, 2016, DE LA TORRE-UBIETA et al, 2016, WU et al, 2016).

Entre essa ampla gama de linhas de pesquisa da susceptibilidade ao TEA está a investigação genética de polimorfismos de genes associados à liberação de neurotransmissores, que podem estar associados à plasticidade neuronal no TEA e também serem co-participantes nas suas características clínicas variadas (SCHWARTZMAN; ARAÚJO, 2011).

2.3.1. A Diversidade de Características Clínicas Associadas ao Transtorno do Espectro Autista

Clinicamente, os pacientes com TEA apresentam características muito variadas. Além dos critérios diagnósticos de comprometimento da comunicação social, que pode variar em grau, e dos comportamentos repetitivos e interesses restritos que podem se apresentar em diferentes contextos, diversas outras características clínicas e comorbidades podem ou não estar presentes e em maior ou menor intensidade.

O DSM V tornou possível especificar a presença de comorbidades associadas. Porém, muitas vezes, a sobreposição de sintomas torna difícil uma diferenciação clara entre o que é devido ao TEA ou a outros transtornos neurológicos e psiquiátricos. (VON STEENSEL; BOGELS; BRUIN, 2013; VEENSTRA-VANDERWEELE; BLAKELY, 2012).

Essa sobreposição de sintomas está diretamente relacionada à possibilidade de as vias neurológicas e genéticas do TEA serem comuns para outros transtornos. Áreas do SNC específicas como o sistema límbico e lobo pré-frontal, além de polimorfismos de genes relacionados a neurotransmissores que serão discutidos na sequência, podem estar relacionados à fisiopatologia do TEA, mas também a outros transtornos e sintomas neuropsiquiátricos. (VON STEENSEL; BOGELS; BRUIN, 2013).

Portanto, definir sintomas específicos como comorbidades no TEA é extremamente difícil, pois mesmo em pacientes com linguagem preservada, a externalização de sentimentos está comprometida. Não é fácil detectar e reconhecê-las, pois estas podem ser mascaradas pelos próprios sintomas do TEA. (MAZZONE; RUTA; REALE, 2012).

Sintomas do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) são frequentemente notados em crianças com TEA. O índice de associação ao TEA é de 37% a 85%. Porém, é necessária uma avaliação criteriosa que permita diferenciar quando é comorbidade ou se os sintomas de desatenção e hiperatividade são apenas parte do fenótipo do TEA. Acredita-se que crianças em idade escolar com TEA associada ao TDAH como comorbidade apresentem mais problemas comportamentais do que crianças com apenas TEA, além de maiores problemas sociais e dificuldade nas suas funções adaptativas. (RAO; LANDA, 2014).

Sintomas de ansiedade também estão presentes em aproximadamente 50% dos pacientes com TEA, principalmente em adolescentes com comprometimento leve, o que prejudica o seu funcionamento. Os sintomas de ansiedade podem ser intensificados pelas hipersensibilidades sensoriais, pela dificuldade em entender os aspectos sociais das relações e regular as emoções, além da dificuldade de comunicação. É comum a associação com Transtorno Obsessivo-Compulsivo (17 a 37%), Ansiedade de Separação (9-38%), Fobias específicas (26-57%), Fobias Sociais (13-40%), Síndrome do

Pânico (2-25%) e Transtorno da Ansiedade Generalizada (15-35%). A ansiedade em pacientes com TEA pode dificultar as relações sociais; exacerbar as estereotípias e piorar problemas familiares. (UNG et al., 2013).

Em relação ao Transtorno Obsessivo-Compulsivo, é difícil diferenciar quando este é comorbidade ou se os sintomas são parte integral dos comportamentos repetitivos do TEA. Porém, ao comparar grupos de crianças com Transtorno Obsessivo-Compulsivo, TEA e desenvolvimento normal os sintomas são diferentes. No grupo de crianças com TEA, os sintomas mais frequentes foram de acumulação, organização e repetições. Já nas com Transtorno Obsessivo-Compulsivo, foi mais frequente a associação com sintomas relacionados à contaminação e obsessões por atos de checar. (MAZZONE; RUTA; REALE, 2012).

Do ponto de vista cognitivo, as habilidades podem ser variadas em diferentes áreas. Alguns pacientes, principalmente com TEA com maior comprometimento podem ter Deficiência Intelectual associada (cerca de 30%), enquanto alguns deles podem ter preservadas áreas de inteligência principalmente não-verbal. Aproximadamente 10% dos indivíduos com TEA podem apresentar habilidades incomuns, denominadas “ilhas de conhecimento” ou Síndrome de *Savant*. Essas habilidades excedem significativamente a capacidade intelectual global do indivíduo afetado em áreas específicas. Exemplos de domínios comuns incluem musicalidade, capacidade de desenho, memória extraordinária, cálculo de calendário, ou seja, a capacidade de nomear os dias da semana correspondente a datas, entre outras. A base neural dessas habilidades especiais é incompreendida, possivelmente está associada à diminuição de conectividade neuronal de longo alcance e aumento das conectividades em áreas mais localizadas. Muitos indivíduos com TEA também apresentam uma capacidade extraordinária de decifrar letras e números ou hiperlexia. (McPORTLAND; VOLKMAR, 2012).

Outra comorbidade importante a ser citada é a presença de associação com epilepsia. A co-ocorrência de TEA e epilepsia já está bem estabelecida, porém, as estimativas de prevalência variam muito, de 5 a 46%, enquanto que na população geral é de 0,7 a 1%. Essa variação ocorre pela grande multiplicidade amostral nos diferentes estudos. A associação de epilepsia em TEA já foi reportada com maior incidência em pacientes do gênero feminino,

com maior comprometimento cognitivo e com história de regressão do desenvolvimento, porém com achados contraditórios. (VISCIDI et al., 2013; TUCHMAN; RAPIN, 2002).

Com o objetivo de diminuir essa variabilidade amostral, um estudo de 2013 realizou o maior levantamento de casos de pacientes com TEA, comparando as características clínicas de pacientes com e sem epilepsia. A amostra reuniu 5815 pacientes nos EUA, dos quais 289 tinham associação com epilepsia. Foram identificadas neste estudo diversas correlações clínicas nos pacientes com epilepsia, entre eles a idade (quanto maior a idade, maior a frequência), piores níveis cognitivos, pior desenvolvimento de linguagem, história de regressão no desenvolvimento e sintomas mais graves de TEA. Porém, apenas a idade e as piores habilidades cognitivas foram fatores preditores independentes para a epilepsia. (VISCIDI et al., 2013).

A média de prevalência de epilepsia em crianças de 2 a 17 anos foi de 12,5%, sendo de menos de 10% em menores de 10 anos e cumulativa de 26,5% em adolescentes de até 17 anos. A média de escores de Quociente de Inteligência na amostra com epilepsia foi de 66,2. (VISCIDI et al., 2013).

A associação entre TEA e epilepsia pode ser explicada como ambas resultantes de alteração de conexões corticais e subcorticais em larga escala. Além disso, mecanismos moleculares e celulares também estão envolvidos, aumentando a epileptogênese e influenciando nas alterações comportamentais, de socialização e linguagem. Esses fatores podem ser influenciados diretamente por genes associados ao processo de desenvolvimento cerebral precoce e à liberação de neurotransmissores, influenciando no balanço inibitório-excitatório neuronal. (TUCHMAN; MOSHÉ; RAPIN, 2009; BERG; PLIOPLYS; TUCHMAN, 2011).

O TEA é uma doença extremamente complexa que envolve mecanismos diversos que alteram a circuitaria neuronal e a liberação de neurotransmissores em regiões específicas do SNC. Essas alterações possivelmente têm em grande parte uma influência genética e esses mecanismos serão descritos a seguir.

2.3.2. Aspectos genéticos do Transtorno do Espectro Autista

Identificar biomarcadores para o TEA tem sido um foco de pesquisa desde a sua descrição em 1940, mas até o momento, nenhum marcador demonstrou sensibilidade e especificidade suficientes para a associação clínica isolada com o TEA. (VOINEAGU; YOO, 2007).

Os biomarcadores são associados a características que podem ser efetivamente mensuradas e avaliadas como um indicador de um processo biológico normal ou patogênico. Marcadores de doenças incluem qualquer característica mensurável como uma variação de sequência de DNA ou alteração em exame de sangue ou imagem. Estes podem ser de risco, diagnóstico ou prognóstico. Para o TEA, devido a sua alta complexidade fenotípica, e por ser uma doença extremamente heterogênea, a identificação de biomarcadores ainda não foi possível. (VOINEAGU; YOO, 2007). A busca por um biomarcador genético tem sido extensivamente explorada por diversos estudos em várias partes do mundo. Identificar genes fortemente envolvidos na susceptibilidade ao TEA permitiria o diagnóstico precoce, a compreensão da fisiopatologia do transtorno e a busca por uma farmacoterapia eficaz. (VOINEAGU; YOO, 2007; GESHWIND, 2011).

Analisando os estudos de neuroimagem e neuropatologia, diversos destes apontam para a hipótese de que o TEA é um transtorno decorrente de alterações na organização neuronal-cortical, que leva a problemas no processamento de informações em diferentes locais no cérebro, incluindo a organização sináptica e dendrítica e as vias de conectividade cerebrais. (PARDO; EBERHARDT, 2007; VOINEAGU; YOO, 2007; MALONEY; RIEGER; DAUGHERTY, 2013).

Essas alterações neurobiológicas afetam o desenvolvimento das habilidades sociais e de comunicação nos primeiros anos de vida, e provavelmente são influenciados por fatores genéticos e ambientais. (GESCHWIND, 2011).

Do ponto de vista genético, diversos estudos apontam para uma natureza complexa do transtorno, envolvendo genes com provável associação com o desenvolvimento das vias moleculares e neuronais, que incluem a migração neuronal, organização cortical, formação sináptica e de dendritos, interferindo diretamente na plasticidade cerebral e explicam boa parte das

alterações encontradas em neuroimagem e neuropatologia (VOINEAGU e YOO, 2007; MALONEY, RIEGER e DAUGHERTY, 2013; GESCHWIND, 2011; LEPPA et al, 2016, DE LA TORRE-UBIETA et al, 2016, WU et al, 2016).

Três fatores principais sustentam a teoria de que o TEA está associado a fatores genéticos: a herdabilidade, o “fenótipo ampliado” e a associação com dezenas de síndromes genéticas conhecidas. (GESCHWIND, 2011).

A herdabilidade é a proporção da variância fenotípica que pode ser explicada por fatores herdados. É caracterizada pela frequência de concordância entre gêmeos mono e dizigóticos. A herdabilidade no TEA é alta, variando inicialmente de 80 a 92% em gêmeos monozigóticos. Uma vez que compartilham do mesmo DNA e do mesmo ambiente intrauterino, essa frequência aumentada reflete forte influência dos fatores genéticos. (GESCHWIND, 2011). Porém, estudo um atual estimou em 50% a herdabilidade em TEA, sugerindo que os fatores genéticos explicam metade do risco para desenvolver o transtorno, mesmo assim, esse valor ainda pode ser considerado alto. (SADIN et al., 2013). Além disso, em gêmeos dizigóticos assim como em irmãos e parentes de primeiro grau, o risco de recorrência do TEA é maior em relação à população em geral, cerca de 10 a 20 vezes, porém não se equipara à frequência em gêmeos monozigóticos. (GESCHWIND, 2011; COSTA, 2007).

Um recente estudo analisou quartetos de famílias com dois irmãos afetados e encontraram diferenças significativas em sintomas relacionados ao domínio social e de comunicação entre irmãos que carregavam diferentes mutações relevantes para o TEA. Entretanto, entre irmãos que compartilhavam da mesma mutação não houve diferença significativa. Isso se explica porque o padrão de herança de TEA pode ser devido a uma interação gene-gene, não restrito a poucos genes de maior efeito, e sim na sua interação para gerar o risco. (YUEN et al., 2015).

O termo “fenótipo ampliado” caracteriza a frequente presença de sintomas associados ao TEA, como problemas na comunicação social e comportamentos repetitivos em parentes de primeiro grau de pessoas com TEA. Entre eles, é comum principalmente a presença de atraso na linguagem em irmãos não-autistas. Esse é mais um fator que corrobora a hipótese genética da etiologia do TEA. (GESCHWIND, 2011).

Por fim, a grande associação de TEA com síndromes genéticas conhecidas, entre elas a síndrome do X-Frágil, Esclerose Tuberosa, síndrome de Angelman, Prader-Willi, Di George, entre dezenas de outras também evidenciam a influência genética do transtorno. As síndromes mais frequentemente associadas ao TEA estão listadas no Quadro 2. (VOINEAGU; YOO, 2007; MALONEY; RIEGER; DAUGHERTY, 2013; GESCHWIND, 2011).

QUADRO 2 - SÍNDROMES GENÉTICAS MAIS COMUMENTE ASSOCIADAS AO TEA.

SÍNDROME	GENE	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	FENÓTIPO
X-Frágil	FMR1	Epilepsia em 50-80% e Deficiência Intelectual 95%	Face alongada, macroorquidia, orelhas proeminentes
Esclerose Tuberosa	TSC1 e TSC 2	Rabdomiossarcoma cardíaco, displasias corticais, cistos renais, astrocitomas	Máculas hipopigmentadas em forma de folhas, fibromas, hamartomas de retina
Prade-Willi	15q11-13	Obesidade	Baixa estatura, mãos e pés pequenos, hipotonia
Angelman	15q11-13	Comprometimento importante linguagem em 90%	Hipopigmentação pele, olhos e cabelos, riso fácil, hipertelorismo ocular
DiGeorge	22qDS	Hipocalcemia, disgenesia renal, cardiopatia, imunodeficiência	Fenda palatina

FONTE: Adaptado de VOINEAGU; YOO, 2007; MALONEY; RIEGER; DAUGHERTY, 2013; GESCHWIND, 2011.

As causas genéticas identificadas, sindrômicas ou não, estão presentes em apenas 20% dos pacientes com TEA, e cada uma das alterações genéticas, mesmo as mais comuns, se tomadas individualmente representam menos de 1 a 2% dos casos. (VOINEAGU; YOO, 2013).

Nenhum gene específico foi identificado como determinante principal do TEA e diversas variantes comuns e raras foram associadas ao transtorno com diferentes níveis de evidência estatística. Esses genes são responsáveis por uma série de mecanismos moleculares que incluem: adesão celular, liberação de vesículas sinápticas e liberação e receptação de neurotransmissores. (GESCHWIND, 2011; LEPPA et al, 2016, DE LA TORRE-UBIETA et al, 2016, WU et al, 2016).

O TEA se encaixa no modelo de múltiplas variantes comuns (*multiple common variants*) que quando combinadas, podem ou não interagir entre si, e se associam a fatores ambientais tornando o TEA uma doença genética complexa, que não segue um modelo específico, nem um padrão mendeliano de herança monogênica (GESCHWIND, 2011).

As alterações genéticas encontradas no TEA podem ser citogenéticas, ou seja, translocações, inversões, deleções ou duplicações que podem levar à alterações funcionais através de mecanismos diversos. Pequenas deleções ou duplicações, as chamadas CNVs, do inglês, *Copy Number Variation* podem ser identificadas em até 10% dos casos de TEA, através do uso de técnicas chamadas de array de CGH (*Array Comparative Genomic Hybridization*). Está é a técnica de escolha para investigação genética clínica de pacientes com TEA. (GESCHWIND, 2011).

As múltiplas variantes comuns ou polimorfismos são diferenças entre o DNA de indivíduos, definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior do que 1%. Variantes de sequência de DNA que estão presentes em menos de 1% da população são denominadas variantes raras. Identificar polimorfismos e seu efeito em doenças complexas principalmente relacionadas ao neurodesenvolvimento e como cada polimorfismo influencia no fenótipo dessas doenças ainda é um desafio e para o TEA não é diferente. (COSTA et al., 2007).

Dentre os polimorfismos relacionados à susceptibilidade ao TEA estão os dos genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no metabolismo de neurotransmissores. (COSTA et al., 2007). Dois desses polimorfismos serão explorados na sequência, relacionados à serotonina e dopamina.

2.4. POLIMORFISMO DO GENE *SLC6A4*

Diversas evidências apontam para o importante papel do sistema serotoninérgico em doenças mentais em geral. Para o TEA, isso ocorre devido à capacidade de a serotonina modular o processo de desenvolvimento cerebral. Além disso, desde a década de 60, o primeiro biomarcador

identificado no TEA foi a hiperserotoninemia em crianças com TEA. (WIGGINS et al., 2013; KINAST et al., 2013; ZAFEIRIOU et al., 2009).

O sistema neurotransmissor serotoninérgico representa um candidato promissor para a associação com TEA. Em estudos neuroquímicos, o elevado nível de serotonina em amostras de sangue e urina é o achado mais consistente em pacientes autistas e o período de síntese elevada de serotonina que acontece no cérebro de crianças normais acima de cinco anos (capacidade de síntese 200% maior do que adultos) não parece acontecer em crianças autistas. (LONGO et al., 2009; JAISWAL et al, 2015; NYFFELER et al, 2014; HERVÁS et al, 2014; MEGUID et al, 2015).

Colaborando para a hipótese do sistema serotoninérgico influenciando no autismo, sabe-se que a serotonina é agente morfogenético e atua como agente de diferenciação no cérebro fetal. Outro achado é que em áreas límbicas do cérebro de pacientes autistas encontra-se rica inervação serotoninérgica e essas áreas estão envolvidas com a parte emocional, social, sensorial, inibição do comportamento, agressividade, sono e humor (LONGO et al, 2009).

A serotonina é um neurotransmissor essencial para o desenvolvimento cerebral, mesmo antes de sua função comportamental no cérebro maduro, e seu aumento durante o desenvolvimento é causa provável de perdas de terminais serotoninérgicos que podem levar à diminuição do volume hipocampal, diminuição da árvore dendrítica, e perda de conexões corticais. (COSTA et al., 2007; JAISWAL et al, 2015; NYFFELER et al, 2014; HERVÁS et al, 2014; MEGUID et al, 2015).

Além disso, a manipulação dos níveis de serotonina em cérebros animais em desenvolvimento induz mudanças anatômicas com manifestações comportamentais semelhantes ao TEA. (LONGO et al., 2009).

Em 2010, através de estudos de neuroimagem que os níveis de síntese de serotonina em crianças autistas entre 2 a 5 anos são significativamente mais baixos, e que existe uma redução dos transportadores de serotonina no córtex medial frontal e lobos temporais de autistas. Além disso, demonstrou a redução do transportador de serotonina no giro do cíngulo anterior e posterior de autistas, com maior comprometimento de habilidades de cognição social proporcional à magnitude dessa redução e a redução do transportador de

serotonina em regiões talâmicas associadas a comportamentos repetitivos e obsessivos. (NAKAMURA et al., 2010).

A capacidade de detectar polimorfismos no nível do DNA vem modificando os estudos na genética humana, e essa detecção tem permitido avaliar sequências de DNA que cause ou contribua para um fenótipo específico, principalmente em doenças humanas complexas, que envolvem fenótipos variados e interação entre gene e ambiente como no caso do TEA. (COSTA et al., 2007).

Os primeiros polimorfismos de DNA foram descritos na década de 70, a partir do surgimento de técnicas para isolar, cortar e sequenciar o DNA. A identificação de variações no DNA pode decorrer por diferentes mecanismos (COSTA, et al., 2007):

- Diferenças de tamanho por alteração na em sítios específicos por enzimas de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*);
- Variação no tamanho (número de pares de bases) dos fragmentos de restrição devido a um número variável de repetições em sequência, ou em *tandem*, os VNTR – *Variable Number of Tandem Repetition*;
- Diferenças em um único nucleotídeo (Adenina, Timina, Citosina ou Guanina), chamados de polimorfismos de base única (SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*). Os SNPs são numerosos e encontram-se distribuídos ao longo de todo o genoma, e estão presentes em uma frequência alélica mínima de 1 a 5% da população;

O gene *SLC6A4* (Solute Carrier Family 6 Member 4, registro OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man - 182138), também conhecido como SERT ou 5-HTT (*Serotonin Transporter*), codifica uma proteína envolvida na neurotransmissão serotoninérgica, está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q11.2), contém 14 éxons compreendendo mais de 35 kb que codificam uma proteína de 630 aminoácidos, e apresenta diversos polimorfismos descritos. (WIGGINS et al, 2013).

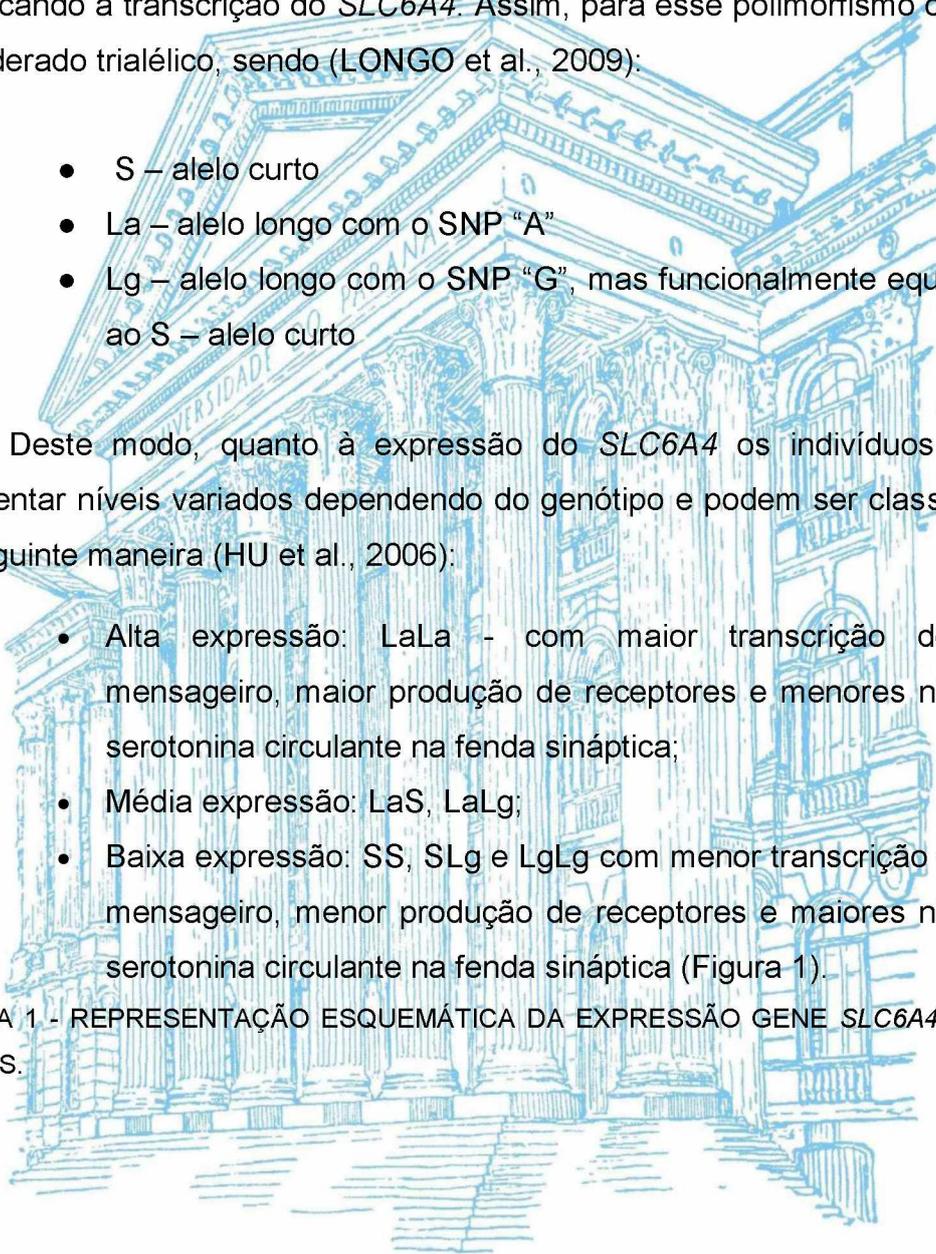
Um dos polimorfismos descritos no gene *SLC6A4* é composta por uma inserção-deleção de 44 pares de bases na sua região promotora (5-HTTLPR - 5-HTT *gene linked polymorphic region*). Esse polimorfismo foi inicialmente considerado funcionalmente bialélico, com um alelo curto (S) e um longo (L). Entretanto, um SNP (rs25531), no qual ocorre a troca de uma alanina (A) por uma guanina (G) foi detectado na região 5-HTTLPR e se mostrou funcional, modificando a transcrição do *SLC6A4*. Assim, para esse polimorfismo o gene é considerado trialélico, sendo (LONGO et al., 2009):

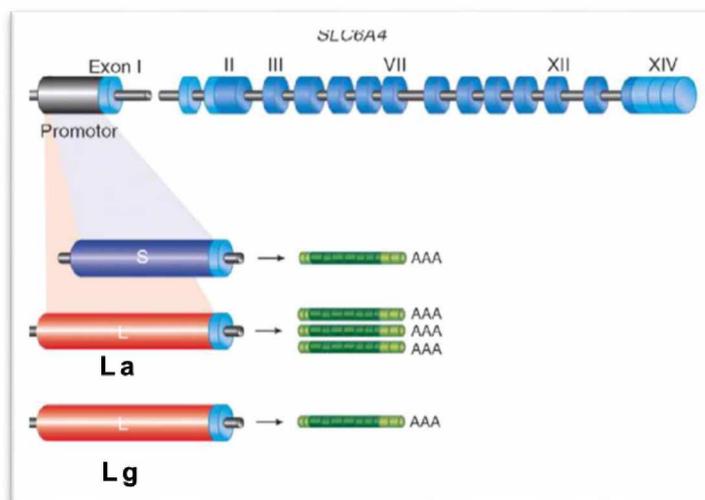
- S – alelo curto
- La – alelo longo com o SNP “A”
- Lg – alelo longo com o SNP “G”, mas funcionalmente equivalente ao S – alelo curto

Deste modo, quanto à expressão do *SLC6A4* os indivíduos podem apresentar níveis variados dependendo do genótipo e podem ser classificados da seguinte maneira (HU et al., 2006):

- Alta expressão: LaLa - com maior transcrição de RNA mensageiro, maior produção de receptores e menores níveis de serotonina circulante na fenda sináptica;
- Média expressão: LaS, LaLg;
- Baixa expressão: SS, SLg e LgLg com menor transcrição de RNA mensageiro, menor produção de receptores e maiores níveis de serotonina circulante na fenda sináptica (Figura 1).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXPRESSÃO GENE *SLC6A4* E SEUS ALELOS.





FONTE: Adaptado de LONGO, et al., 2009.

O polimorfismo na região 5-HTTLPR é amplamente utilizado em estudos de associação com o autismo (GUPTA;STATE, 2006), pois este apresenta grande capacidade de modular a resposta serotoninérgica, uma vez que, dependendo do alelo apresentado pelo indivíduo, a taxa de produção de RNA mensageiro do *SLC6A4* pode variar significativamente (HU et al., 2006). Em consequência, a concentração de serotonina na fenda sináptica pode ser diferente para cada genótipo, o que pode sustentar os mecanismos neurofisiológicos do autismo. (NAKAMURA et al., 2010).

Todavia os resultados dos estudos de associação da estrutura bialélica da região 5-HTTLPR com o TEA são controversos. Alguns estudos trazem a associação do alelo L com o autismo (DEVLIN et al., 2005; KLAUK; BENNER; POUSTKA, 1997; TORDJAMAN et al., 2001; YRMIYA et al., 2001), outros estudos trazem a associação do alelo S com o autismo (CONROY et al., 2004; COOK, 1997; KIM et al., 2002) e outros estudos não encontraram associação entre algum alelo do 5-HTTLPR com o autismo (LONGO et al., 2009).

Em 2009 foi publicado o primeiro estudo brasileiro envolvendo a estrutura trialélica do polimorfismo da região 5-HTTLPR relacionado com o autismo, onde foi descrita a associação do genótipo Longo com a variante “A” em homozigose (LaLa) e a instabilidade do humor nos pacientes com TEA (LONGO et al., 2009).

Apesar da forte evidência de associação do TEA com o sistema serotoninérgico, mais estudos são necessários para definir a associação desse

polimorfismo com o TEA, ou com sintomas e características clínicas associadas nesses indivíduos.

2. 5. POLIMORFISMO DO GENE *DRD4*

A dopamina foi identificada como neurotransmissor em 1959, e inicialmente seu envolvimento estava apenas associado ao controle motor, observado inicialmente na doença de Parkinson. Atualmente sabe-se que a dopamina possui um papel fundamental numa ampla gama de sintomas de doenças neurológicas e psiquiátricas, como a esquizofrenia e o TDAH, o abuso de substâncias, e também tem sido estudado seu papel no TEA (ARIAS; POPPEL, 2007).

A dopamina é a catecolamina mais abundante no cérebro de mamíferos, encontrada de modo circunscrito no SNC, onde exerce diferentes atividades, dentre elas o controle da atividade e motora, da cognição, das emoções, do reforço positivo, da resposta imune, motivação e atenção, bem como funções endócrinas. A execução de tais funções depende, além da ação de outros neurotransmissores, da expressão dos subtipos de receptores característicos e do local onde estes são expressos mais comumente sendo que, alterações no sistema dopaminérgico vêm sendo atribuídas a inúmeras doenças. (ROTHMOND; WEICKERT; WEBSER, 2012).

Os neurônios dopaminérgicos são encontrados principalmente na região mesodiencefálica, e incluem o sistema nigrostriatal (envolvido no controle motor voluntário), e o sistema mesolímbico e mesocortical, com projeções da área tegmentar ventral para amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. (ARIAS; POPPEL, 2007).

Os receptores de dopamina pertencem à família dos receptores que se acoplam a proteína G e foram, inicialmente, classificados em receptores de dopamina D1 e D2. Receptores D1 se ligam a proteína G resultando na ativação de adenililciclase e maior concentração de AMP cíclico intracelular, aumentando a atividade da proteína quinase A. Enquanto os receptores de dopamina D2 se ligam a proteína G inibindo a adenilciclase e conseqüentemente, diminuindo também a concentração de AMP cíclico intracelular e a atividade da proteína quinase A, além de serem responsáveis

pela supressão das correntes de Cálcio e ativação das correntes de Potássio. A atividade da proteína quinase A promove alterações na fosforilação de fatores de transcrição e na expressão de genes envolvidos na resposta à dopamina. (POLSEC et al., 2011).

Posteriormente, com os avanços da biologia molecular, foram identificados três outros receptores de dopamina, estes foram agrupados a D1 e D2 de acordo com a semelhança funcional. Aquele que se assemelha a D1 foi denominado D5, enquanto os demais foram chamados D3 e D4 e agrupados a D2. (GOODMAN et al., 2006; ROTHMOND, 2012; SOUZA et al., 2002).

As cinco proteínas receptoras estão distribuídas em regiões diferentes do SNC. Tanto D1 quanto D2 são bem distribuídos nos núcleos da base, atuando no controle motor. Já os receptores D2 (especificamente D3 e D4) são expressos em grande número no sistema límbico e córtex pré-frontal. (ARIAS; POPPEL, 2007).

Tais receptores possuem, em comum, sete domínios transmembrana ligados por três alças peptídicas intracelulares, bem como alças extracelulares, uma terminação amina extracelular e uma terminação carboxílica intracelular. Apesar da semelhança, a família de receptores de dopamina D2 apresenta a terminação carboxílica mais curta e a terceira alça intracelular mais longa, quando comparadas a D1 - o comprimento da terceira alça intracelular mostra-se fundamental à ligação na proteína G. (ROTHMOND; WEICKERT; WEBSER, 2012).

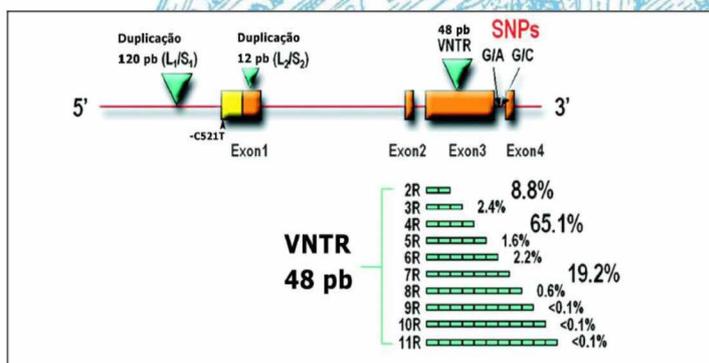
O receptor de dopamina D4 é codificado pelo gene *DRD4* (*D4 Dopamine Receptor*) composto por 4 éxons e localizado no cromossomo 11 (11p.15.5), com registro no OMIM número 126452. Este gene codifica uma proteína expressa principalmente no córtex pré-frontal, divisão cognitiva cingulada anterior e regiões límbicas, ambas áreas importantes na cognição, emoção e atenção. (RODRIGUES, 2010; POLSEC et al., 2011; MARQUEZ, 2006).

O *DRD4* revela-se um dos genes mais variáveis do genoma, apresentando vários polimorfismos em sua extensão. (RODRIGUES, 2010). Contudo, a literatura que o contempla está principalmente relacionada ao polimorfismo descrito em 1995, que descreve um número variável de repetições em tandem (VNTR) no terceiro éxon do gene citado, responsável

pela alteração do comprimento dos alelos de determinada região, que codifica uma porção correspondente à terceira alça intracelular do receptor de dopamina D4. (ASHGARI et al., 1995).

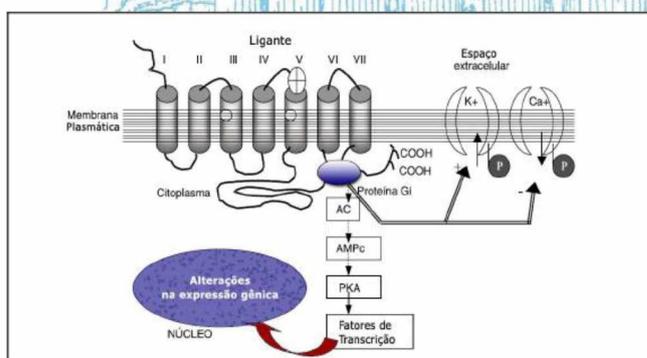
Na literatura encontram-se evidências de variações de 2 a 11 repetições da sequência, que contém 48 pares de base, estando a variação de 7 repetições (7R) associada, com maior significado funcional, a menor resposta à dopamina (Figuras 2 e 3), uma vez que tal mecanismo se dá pela interação do neurotransmissor com o receptor e posterior ativação da proteína G pela terceira alça intracelular. O VNTR, com sete repetições, aumenta o comprimento da terceira alça prejudicando a ativação da subunidade alfa-inibitória da proteína G. (RODRIGUES, 2010).

FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIMORFISMO DO GENE DRD4.



FONTE: Adaptado de RODRIGUES, 2010.

FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LIGAÇÃO DA DOPAMINA NO RECEPTOR D4 E SUA FORMA DE AÇÃO.



FONTE: Adaptado de RODRIGUES, 2010.

Com a menor sensibilidade do receptor à dopamina, a ativação do córtex pré-frontal torna-se menos facilitada pelo circuito mesocortical dopaminérgico. A menor efetividade proporcionada pelo polimorfismo pode estar relacionada, por exemplo, a diminuição da quantidade de receptores de dopamina D4 em pacientes com TEA, encontrada na avaliação da expressão de mRNA. (TAURINES et al., 2011).

O VNTR de 7 repetições presente no gene *DRD4* é associado a transtornos como esquizofrenia, Transtorno Opositor Desafiador, Ansiedade de Separação e comportamentos repetitivos em crianças autistas (GADOW et al., 2010), latência de resposta em múltiplas tarefas (SZESEKELI, 2010), níveis elevados de afeto negativo em crianças (HOMBOE et al., 2011), TDAH (AVALE et al., 2004), bem como maior risco de sintomas autistas em crianças e adolescentes com TDAH. (REIERSEN, 2011).

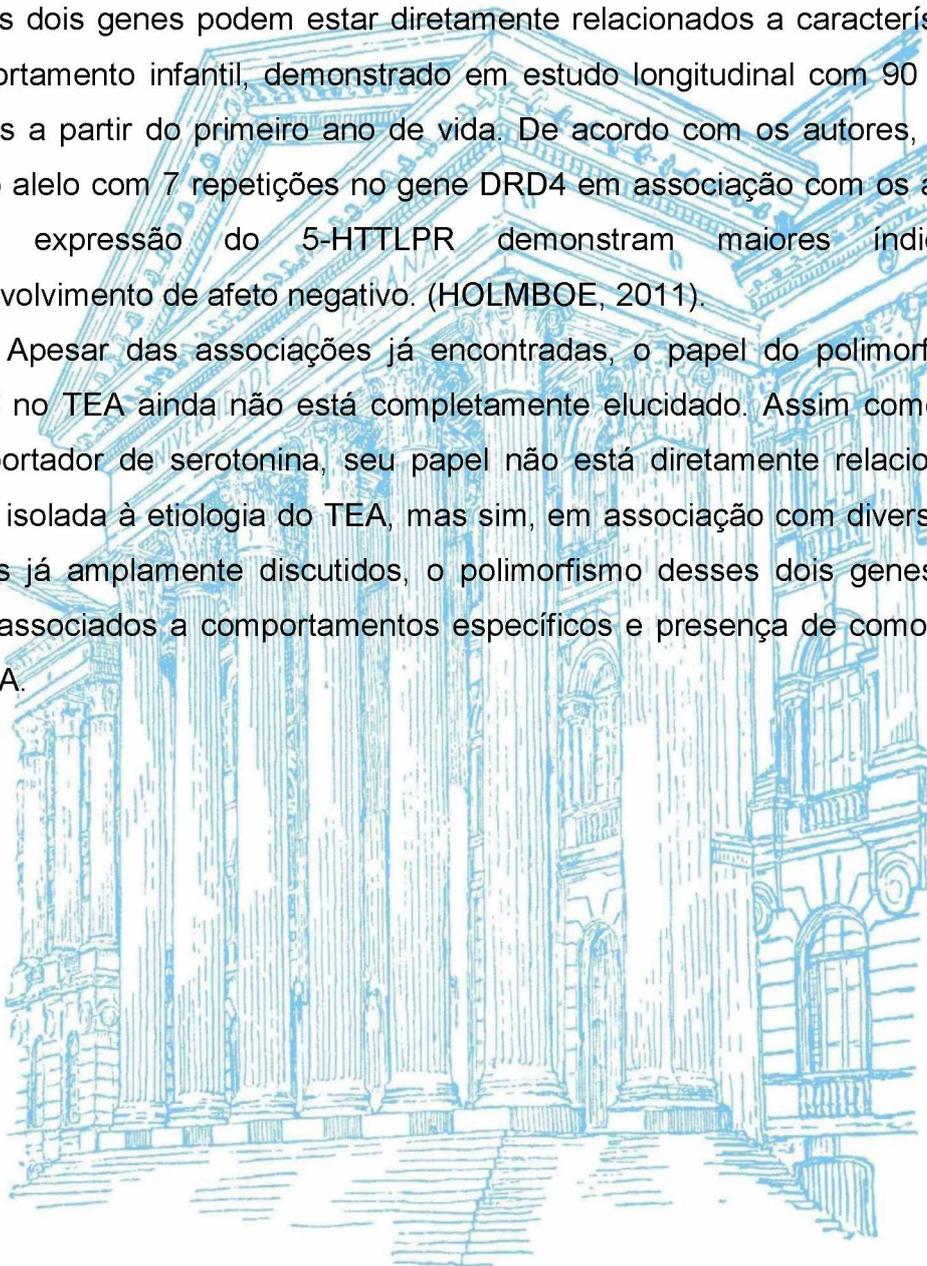
A investigação do papel da dopamina no TEA se intensificou após a observação do efeito positivo dos antipsicóticos (bloqueadores de dopamina) em aspectos como a hiperatividade e agressividade. Estudos mais recentes envolvendo neuroimagem demonstram também aumento do funcionamento do sistema dopaminérgico em pacientes autistas no córtex pré-frontal. A disfunção desse sistema pode ainda estar relacionada a comportamentos de agressividade e impulsividade em adultos com TEA. (NAKAMURA et al., 2010; REIERSEN, 2011 e TODOROV, 2013).

A resposta à dopamina no receptor D4 ocorre após a ativação da subunidade inibitória da proteína G, inativando a adenilciclase e determinando baixas concentrações de AMPcíclico no interior da célula. Com isso, há redução da proteína quinase A, alterações de fosforilação e de fatores de transcrição e alterações na expressão de genes envolvidos na resposta à dopamina. O VNTR de 48 pares de bases altera o tamanho da alça citoplasmática que interage diretamente com a subunidade inibitória. Com o alelo de 7 repetições, a potência inibitória da dopamina seria reduzida de duas a três vezes quando comparado ao de 4 repetições, tendo assim uma resposta reduzida à dopamina. Desta forma, o circuito mesocortical dopaminérgico se mostraria menos eficiente em facilitar a ativação do córtex pré-frontal. (RODRIGUES, 2010).

No TEA, o polimorfismo do DRD4 tem sido estudado como um potencial biomarcador para gravidade de co-ocorrência de sintomas associados, entre eles o Transtorno Opositor Desafiante, o Transtorno Obsessivo Compulsivo e Ansiedade de Separação, além de maiores índices de problemas comportamentais e comportamentos repetitivos. (GADOW et al., 2010).

Do mesmo modo que na população geral, a associação do polimorfismo desses dois genes podem estar diretamente relacionados a características do comportamento infantil, demonstrado em estudo longitudinal com 90 crianças hígdas a partir do primeiro ano de vida. De acordo com os autores, crianças com o alelo com 7 repetições no gene DRD4 em associação com os alelos de maior expressão do 5-HTTLPR demonstram maiores índices de desenvolvimento de afeto negativo. (HOLMBOE, 2011).

Apesar das associações já encontradas, o papel do polimorfismo do *DRD4* no TEA ainda não está completamente elucidado. Assim como para o transportador de serotonina, seu papel não está diretamente relacionado de forma isolada à etiologia do TEA, mas sim, em associação com diverso outros fatores já amplamente discutidos, o polimorfismo desses dois genes podem estar associados a comportamentos específicos e presença de comorbidades no TEA.



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

Estudo observacional analítico, transversal, de prevalência de polimorfismo dos genes *SLC6A4* e *DRD4* em pacientes com TEA, com coleta de dados prospectiva.

3.2. LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

Os sujeitos incluídos na pesquisa são pacientes do Ambulatório de Autismo do CENEP – Centro de Neuropediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, acompanhados de janeiro de 2012 a dezembro de 2014. Os testes genéticos foram realizados no laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL, neste mesmo período.

3.3. POPULAÇÃO FONTE

Pacientes em seguimento regular no Ambulatório de Autismo por pelo menos um ano, com consultas periódicas, com diagnóstico de TEA, entre 2 e 16 anos.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com diagnóstico de TEA idiopático;
- Concordância dos pais na participação do estudo;
- Seguimento regular por no mínimo um ano.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com exames genéticos, de imagem do sistema nervoso central ou distúrbios que caracterizassem diagnóstico de síndromes genéticas específicas associadas ao TEA;

3.6 AMOSTRA

Foram selecionados para participação e coletadas amostras de sangue inicialmente de 60 pacientes, destes, sete foram excluídos da análise clínica por abandonarem o seguimento. Deste modo, a amostra totalizou 53 pacientes na análise total (clínica e genética) e 60 pacientes na análise da genotipagem ao comparar grupo de estudo e grupo controle proveniente de banco de dados de DNA.

O Grupo Controle foi composto por 40 indivíduos saudáveis que foram pareados conforme o percentual étnico observado na população sul brasileira e, ainda, em gênero em relação ao grupo com TEA. Todas as amostras do grupo controle foram obtidas de banco de DNA. O critério de exclusão para este grupo consistiu na presença, ou histórico familiar, de doenças neurológicas de caráter genético ou não.

3.7 HIPÓTESE

Considerando a natureza associativa dos estudos transversais a variável polimorfismo dos genes *SLC6A4* e *DRD4* foi posicionada como variável independente e variável TEA e características clínicas como variável dependente, constituindo assim as hipóteses de estudo:

- H0: não há diferença na frequência dos alelos em pacientes com TEA nem relação com suas características clínicas
- H1: há diferença na frequência dos alelos em pacientes com TEA ou na associação com suas características clínicas

3.8 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis independentes foram consideradas os genótipos dos polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4* como descritos a seguir.

Os grupos foram divididos conforme a expressão gênica para o *SLC6A4* conforme descrição no Quadro 3. Os polimorfismos associados à maior expressão gênica resultam em maior quantidade de RNA mensageiro, consequentemente maior transcrição da proteína que configura o receptor de serotonina, e por sua vez, menores níveis de serotonina na fenda sináptica.

QUADRO 3: DIVISÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME SUA AÇÃO PARA O GENE *SLC6A4*.

GENÓTIPOS	EXPRESSION GÊNICA	RECAPTAÇÃO SEROTONINA	SEROTONINA FENDA SINÁPTICA
LaLa	Alta	Alta	Menos
SLa, LaLg	Média	Média	Média
SS, SLg, LgLg	Baixa	Baixa	Mais

FONTE: Adaptado de LONGO et al., 2009.

Para o *DRD4*, os genótipos foram divididos também quanto à sua funcionalidade, uma vez que alelo com 7 repetições faz o receptor D4 ter menor eficácia na ligação da dopamina e potência inibitória 2 a 3 vezes menor. Deste modo, foram divididos conforme demonstrado no Quadro 4.

QUADRO 4: DIVISÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME FUNCIONALIDADE PARA O GENE *DRD4*.

GENÓTIPOS	POTÊNCIA INIBITÓRIA NO D4
Não 7	Normal
Heterozigoto 7 repetições	Menor
Homozigoto 7 repetições	Muito menor

FONTE: Adaptado de RODRIGUES, 2010.

As variáveis dependentes analisadas foram a presença de TEA idiopático na análise de frequências na comparação com grupo controle e a presença das seguintes características clínicas e comorbidades associadas:

- Características específicas do TEA: estereotípias, inflexibilidade, alterações sensoriais;
- Características associadas: ansiedade, agitação psicomotora, agressividade, regressão no desenvolvimento;
- Especificações do TEA: comprometimento de linguagem e comprometimento cognitivo;
- Comorbidades: epilepsia
- Nível de comprometimento: nível 1,2 ou 3;
- Alterações em exames: Eletroencefalograma e exames de imagem (Tomografia ou Ressonância de crânio);
- Uso de medicações (mono e politerapia)

3.9 PROCEDIMENTOS DE ESTUDO

3.9.1 Métodos dos Testes Genéticos:

Foram coletados 5 ml de sangue venoso periférico de cada indivíduo da amostra em tubo com EDTA. As amostras de pacientes e controles foram submetidas à extração de DNA pelo método de LAHIRI e NUMBERGER (1991). Amplificou-se a região polimórfica ligada à região promotora do gene do transportador da serotonina por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores e soluções descritos por KAISER et al e programa de amplificação descrito na Quadro 5, perfazendo um total de 40 ciclos. (LAHIRI e NUMBERGER, 1991; KEISER et al., 2009).

QUADRO 5- CONDIÇÕES DA PCR NA AMPLIFICAÇÃO DO 5-HTTLPR.

Fase do ciclo	Temperatura	Tempo
---------------	-------------	-------

Desnaturação inicial	94°C	120 s
Desnaturação	95°C	30 s
Hibridação	62°C	30 s
Extensão	72°C	60 s
Extensão final	72°C	420 s

FONTE: Adaptado de LAHIRI; NUMBERGER, 1991; KEISER et al., 2009.

Essa reação amplifica parte da região *5-HTTLPR*, cujo fragmento pode resultar em dois tipos de alelos: longo (L) com 529 pb e curto (S) com 485 pb. Os produtos de PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em agarose 2,5% por 2 horas a 220V, e corado com brometo de etídeo.

O produto da PCR foi submetido à digestão enzimática pela técnica RFLP, utilizando a enzima *MspI*, conforme descrito por STEIN et al (2006), originando os seguintes fragmentos:

- La – 340, 62 e 127 pb
- Lg – 166, 174, 62 e 127 pb
- S – 296, 62 e 127 pb

Os tamanhos dos fragmentos do produto de PCR e da digestão enzimática foram estimados utilizando o programa NebCutter 2.0. Para obtenção e análise dos resultados trialélicos foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% dos produtos de digestão, utilizando-se 190V, 37mA, 7W por três horas de corrida. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídeo. A fotodocumentação tanto da corrida em agarose quanto da corrida de poliacrilamida foi realizada em transiluminador sob luz ultravioleta.

Para o gene *DRD4*, foi realizado o processo de genotipagem para definição do número de repetições da região de VNTR apresentado pelos indivíduos no terceiro éxon do gene *DRD4*. A sequência dos primers utilizados foi descrita inicialmente por LICHTER (1993) e posteriormente por GADOW (2010), já a amplificação, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), concorda com o protocolo sugerido por Gadow, ambos expostos no Quadro 6 (GADOW et al., 2010).

A análise dos genótipos, realizada após eletroforese em gel de agarose (concentração 2,5%) e coloração em brometo de etídeo, foi realizada em

transluminador UV por meio de comparação com o descrito por Lichter (1993), que observou variações alélicas de 2 a 11 repetições (LICHTER, 1993; GADOW et al., 2010).

QUADRO 6 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* E CONDIÇÕES DA PCR.

Sequência dos primers			
	forward 5'- GCGACTACGTGGTCTACTCG -3'		
	reverse 5'-AGGACCCTCATGGCCTTG		
Fases do Ciclo	Temperatura	Tempo de Duração	Número de Repetições
Desnaturação inicial	98°C	15 min	1
Ciclagem	Desnaturação	98°C	30 seg
	Anelamento	60°C	90 seg
	Extensão	72°C	60 seg
Extensão Final	72°C	10 min	1

FONTE: Adaptado de GADOW et al., 2010.

3.9.2 METODO DA COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Todos os pacientes incluídos na amostra foram avaliados e acompanhados pela pesquisadora (médica neuropediatra), por um período mínimo de um ano, no Ambulatório de Autismo do Hospital de Clínicas da UFPR. Esse período foi determinado com a finalidade de extrair dados mais fidedignos em relação às características clínicas da amostra. Os dados foram coletados conforme protocolo (ANEXO 1).

O diagnóstico de TEA foi revisado em todos os casos, baseados nos critérios do DSM V e foram realizados os questionários CARS (*Childhood Autism Rating Scale*) e ATA (Escala de Traços Autísticos), ANEXOS 2 e 3 (PEREIRA, 2007 e ASSUMPÇÃO JR, 1999).

Os dados foram classificados em:

- Características gerais da amostra: idade, idade do diagnóstico, terapias realizadas, tipo de escola que frequenta;
- Características familiares e gestacionais: idade dos pais, fatores de risco pré e pós-natais, histórico familiar de doenças neurológicas ou psiquiátricas;
- Características específicas do TEA: estereotípias, inflexibilidade, alterações sensoriais;
- Características associadas ao TEA: ansiedade, agitação psicomotora, agressividade, regressão no desenvolvimento;
- Especificações do TEA: comprometimento de linguagem e comprometimento cognitivo;
- Comorbidades: epilepsia
- Nível de comprometimento: nível 1,2 ou 3;
- Alterações em exames: Eletroencefalograma e exames de imagem (Tomografia ou Ressonância de crânio);
- Uso de medicações (mono e politerapia)

3.10 REGISTRO E GERENCIAMENTO DE DADOS

Os dados foram coletados através da análise de prontuário, consultas médicas, realização de questionários e aplicados em planilha digital.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas de tendência central e de dispersão estão expressas em médias e desvio padrão (média \pm DP) para as variáveis contínuas de distribuição simétrica e em medianas, valores mínimo e máximo (mediana, mínimo – máximo) para as de distribuição assimétrica.

A estimativa da diferença de variáveis contínuas de distribuição normal foi realizada pelo teste paramétrico, teste t de *Student* e Anova, enquanto que

para variáveis de distribuição assimétrica, o teste não-paramétrico, teste de Mann-Whitney e Anova de Kruskal-Wallis.

A estimativa de diferença entre variáveis categóricas foi realizada pelos testes exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson.

Para todos os testes foi considerado um nível mínimo de significância de 5% e poder de teste mínimo de 90%.

Para o cálculo das frequências genotípicas do grupo de estudo e grupo controle foi realizado o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.12 ÉTICA EM PESQUISA

Esta pesquisa foi aprovada em Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário Autônomo do Brasil - UNIBRASIL, conforme o parecer 002/2008, e aceitação por Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXOS 4 e 5).

3.13 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada considerando as medidas de proteção, minimização de riscos, confidencialidade, responsabilidade do pesquisador e da instituição, de acordo com o compromisso firmado com o Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Centro Universitário Autônomo do Brasil-UNIBRASIL na ocasião de submissão do projeto.

3.14 FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS

Esta pesquisa recebeu fomento do CNPq com concessão de bolsa à autora.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA AMOSTRA

Foram avaliados e acompanhados 53 pacientes com diagnóstico de TEA do Ambulatório de Autismo do CENEP – Centro de Neuropediatria do Hospital de Clínicas da UFPR. A idade variou de 4 a 16 anos com mediana de 7 anos. A mediana da idade do diagnóstico foi de 3 anos, variando de 1 a 12 anos.

Dos pacientes avaliados, 66% (35) frequentam escola regular, 32% (17) escola de educação especial, e um não frequenta escola. Apenas 13% realizam terapias para estimulação com uma carga horária semanal mínima de 5 horas, 45% realiza alguma terapia, porém de forma insuficiente (menos de 4 horas semanais) e 41% não realiza nenhuma terapia.

A média de idade dos pais no nascimento foi de 31,7 anos e das mães de 29,2. Há apenas um caso de consanguinidade entre os pais. Na amostra analisada, há 3 casos de acometimento de pares de irmãos, todos incluídos na amostra, sendo um dos pares gêmeos dizigóticos.

Em relação às condições médicas associadas, há: alergias em 5 casos, incluindo alergias alimentares e dermatite atópica (9,4%), fenda palatina em um caso e doença do refluxo gastro-esofágico em um caso.

Em relação aos fatores de risco pré e pós-natais, três pacientes apresentavam história de prematuridade (5,6%), em cinco casos, as mães apresentavam diagnóstico de doença psiquiátrica (9,4%) e apenas em três casos havia histórico de intercorrências na gestação (5,6%) (descolamento de placenta, Diabetes Mellitus tipo 1 e trombose).

Em relação às condições neurológicas associadas, a epilepsia foi diagnosticada em 7 pacientes (13,2%), todos eles com crises convulsivas controladas, e todos com crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas. Um paciente apresentou alteração no Eletroencefalograma (EEG) sem histórico nenhum sugestivo de crise convulsiva. Dos 53 pacientes, 41 (77,3%) realizaram EEG (Tabela 1).

TABELA 1: FREQUÊNCIA DE EEG NORMAIS E ALTERADOS EM PACIENTES COM E SEM EPILEPSIA.

EEG n=41	NORMAL n=36	ALTERADO n=5	ALTERAÇÃO
COM epilepsia (n=7)	3	4	AI* em área rolândica
SEM epilepsia (n=34)	33	1	AI* em área rolândica
Total	36	5	

* AI: Atividade Irritativa

FONTE: O autor (2016).

Dos 53 pacientes, 41 (77,3%) realizaram exames de imagem - tomografia ou ressonância de crânio com resultados descritos abaixo (Tabela 2) e 39 (73,1%) realizaram avaliação auditiva (BERA), todos normais.

TABELA 2: FREQUÊNCIA DE EXAMES DE IMAGEM NORMAIS E ALTERADOS EM PACIENTES COM E SEM EPILEPSIA.

Exames Imagem (n=41)	NORMAL	ALTERADO	ALTERAÇÃO
COM epilepsia (n=7)	6	1	Atraso Mielinização
SEM epilepsia (n=34)	32	1	Atraso Mielinização
Total	38	3	Leucomalácia Periventricular

FONTE: O autor (2016).

Dos 53 pacientes, 71% (38) fazem uso de algum tipo de medicação (tabela 3), seja em mono ou politerapia. As medicações da medicina alternativa incluem suplementos e fitoterápicos, em ambos os casos foram usados por conta dos pais.

TABELA 3: USO DE MEDICAÇÕES E CLASSES MEDICAMENTOS MAIS UTILIZADAS.

MEDICAÇÃO	n (38)	%
Monoterapia	23	60,5
Politerapia	15	39,5
Neurolépticos	33	86,8
DAE*	11	28,9
Melatonina	5	13,1
Metilfenidato	3	7,8
ISRS **	2	5,2
Medicina alternativa	2	5,2

* DAE: Drogas Antiepilépticas

** ISRS: Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

FONTE: O autor (2016).

Em relação ao desenvolvimento, em 18 casos (33,9%) houve regressão nos primeiros dois anos de vida, com predomínio de regressão de linguagem. O nível de desenvolvimento de acordo com a classificação do DSM está descrito na Tabela 4.

TABELA 4: NÍVEL DE COMPROMETIMENTO CONFORME A CLASSIFICAÇÃO DSM V.

NÍVEL DE COMPROMETIMENTO	n	%
Nível 1	26	49,1
Nível 2	11	20,7
Nível 3	16	30,2
Comprometimento Linguagem	27	50,9
Comprometimento Intelectual	25	47,2

FONTE: O autor (2016).

Os níveis de comprometimento de 1 a 3 são baseados na necessidade de apoio para comunicação social e nos comportamentos repetitivos, sendo o nível 1 o mais leve, com necessidade de pouco apoio, o nível 2 comprometimento moderado, com necessidade de apoio substancial, e o nível

3 o nível com maior comprometimento, com necessidade de apoio muito substancial, de acordo com DSM V.

O comprometimento de linguagem também foi avaliado conforme classificação do DSM V, considerado com comprometimento de linguagem os pacientes sem desenvolvimento de linguagem ou com discurso frasal, e sem comprometimento de linguagem os pacientes com fala com desenvolvimento de sentenças ou fluente. O comprometimento intelectual foi avaliado de forma subjetiva, pela impossibilidade de realização de testes formais, sendo esta uma variável de menor confiabilidade neste estudo.

Os resultados dos questionários obtiveram mediana de 25 para ATA (com linha de corte de 15 para diagnóstico de TEA) e média de 34,6 para CARS. A CARS possui corte da seguinte forma: pontuação de 15 a 30 – sem TEA, 30 a 36 quadro leve-moderado e 36 a 60 quadro grave.

4.2 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DA AMOSTRA COMPARADAS AO GRUPO CONTROLE

Foram realizadas genotipagens do 5-HTTLPR de 60 pacientes com TEA e 40 indivíduos controles, as frequências genóticas e alélicas foram calculadas e os resultados estão listados na Tabela 5. As populações de pacientes e controles estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na estrutura trialélica e bialélica com os valores de P do equilíbrio calculados pelo teste de Qui-Quadrado e dispostos na tabela 5, assim como os valores de P para a diferença entre os dois grupos.

TABELA 5: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA ESTRUTURA TRIALÉLICA E BIALÉLICA DO 5-HTTLPR DA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM TEA E CONTROLES.

ESTRUTURA TRIALÉLICA DO 5-HTTLPR

Genótipo	Pacientes n (%)	Controles n (%)
LaLa	14 (23,33)	13 (25,49)
SLa	30 (50,00)	20 (39,22)
LaLg	3 (5,00)	1 (1,96)

SLg	1 (1,67)	0 (0)
SS	12 (20,00)	17 (33,33)
Total	60 (100)	51 (100)
X ² do Equilíbrio	p=0,9268	p=0,3184
X ² da Diferença	p= 0,38	

FREQÜENCIA ALÉLICA

Alelos	Pacientes (%)	Controles (%)
La	61 (51)	47 (46)
S	55 (46)	54 (53)
Lg	4 (3)	1 (1)
Total	120 (100)	102 (100)
X ² da Diferença	p= 0, 3364	

Estrutura Bialélica do 5-HTTLPR

Genótipo	Pacientes n (%)	Controles n (%)
LL	17 (28,33)	14 (27,45)
SL	31 (51,66)	20 (39,22)
SS	12 (20,00)	17 (33,33)
Total	60 (100)	51 (100)
χ ²	p=0,9513	p= 0,3145
X ² da Diferença	p= 0, 2449	

FREQÜENCIA ALÉLICA

Alelo	Pacientes Frequência alélica (n)	Controles Frequência alélica (n)
L	0,54 (65)	0,47 (48)
S	0,46 (55)	0,53 (54)
Total	1,00 (120)	1,00 (102)

X² da Diferença p= 0, 2911

FONTE: O autor (2016).

Para o *DRD4*, foram realizadas a genotipagem de 58 pacientes com TEA e 40 do grupo controle. Foram encontrados neste estudo, alelos do gene

que variam entre 2 e 8 repetições em relação ao VNTR considerado. Conforme a caracterização genotípica dos grupos, pacientes e controles, estimou-se nas duas populações, as frequências alélicas e genotípicas, constando que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg com P descrito na Tabela 6.

TABELA 6: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE *DRD4* OBSERVADAS NOS GRUPOS AMOSTRA E CONTROLE.

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS <i>DRD4</i>				
Genótipo	n de pacientes (%)		n de Controles (%)	
2-2	0 (0)		1 (2,5)	
2-4	8 (13,8)		2 (5,0)	
2-7	1 (1,72)		1 (2,5)	
3-3	0 (0)		1 (2,5)	
3-4	2 (3,45)		3 (7,5)	
4-4	27 (46,55)		21 (52,5)	
4-5	1 (1,72)		0 (0)	
4-6	1 (1,72)		1 (2,5)	
4-7	13 (22,42)		7 (17,5)	
4-8	0 (0)		1 (2,5)	
7-7	5 (8,62)		2 (5)	
Total	58 (100)		40 (100)	
χ^2 Equilíbrio	p=0,7744		P=0,2043	
FREQUÊNCIAS ALÉLICAS				
Alelo	Alelos pacientes n (%)	Alelos controle n (%)	Frequência população observada	Frequência população mundial
2	9 (7,7)	5 (6,3)	7,14%	8,8%
3	2 (1,7)	5 (6,3)	3,57%	2,4%
4	79(68)	56 (70)	68,88%	65,1%
5	1 (0,9)	---	0,51%	1,6%
6	1 (0,9)	1 (1,2)	1,02%	2,2%
7	24 (20,7)	12 (15)	18,37%	19,2%
8	---	1 (1,2)	0,51%	0,6%
Total	116 (100)	80 (100)		

FONTE: O autor (2016).

A comparação das frequências genotípicas e alélicas do *DRD4* entre os dois grupos foi realizada agrupando-se os genótipos como disposto na Tabela 7, com P calculado pelo teste Qui-Quadrado. Os valores não significativos nas comparações entre os grupos indicam que os genótipos se distribuem de forma semelhante entre estas populações.

TABELA 7: FREQUÊNCIA GENOTÍPICA *DRD4* CONFORME FUNCIONALIDADE EM GRUPOS AMOSTRA E CONTROLE.

ALELOS	POTÊNCIA INIBITÓRIA DO D4	n (%)	Controle (%)
Não 7	Normal	39 (67)	30 (75)
Heterozigoto 7 repetições	Menor	14 (24)	8 (20)
Homozigoto 7 repetições	Muito menor	5 (9)	2 (5)
Total		58 (100)	40 (100)
X ² da Diferença		p= 0,6645	

FONTE: O autor (2016).

4.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA AMOSTRA EM RELAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Foram analisados nessa etapa 53 pacientes, excluídos os que não realizaram o devido seguimento ambulatorial para levantamento dos dados clínicos suficientes, comparando as características clínicas da amostra com a sua genotipagem.

As frequências alélicas foram divididas conforme sua expressão gênica e funcionalidade (Tabelas 8 e 9).

TABELA 8: FREQUÊNCIA GENOTÍPICA *SLC6A4* DE ACORDO COM A EXPRESSÃO GÊNICA.

LaLa	Alta	Alta	Menos	11	20,7
SLa, LaLg	Média	Média	Média	31	58,6
SS, SLg, LgLg	Baixa	Baixa	Mais	11	20,7

FONTE: O autor (2016).

TABELA 9: FREQUÊNCIA GENOTÍPICA *DRD4* CONFORME FUNCIONALIDADE.

Não 7	Normal	36	67,9
Heterozigoto 7 repetições	Menor	12	22,7
Homozigoto 7 repetições	Muito menor	5	9,4

FONTE: O autor (2016).

Os resultados da comparação dos genótipos com as características clínicas da amostra estão sumarizadas na Tabela 10.

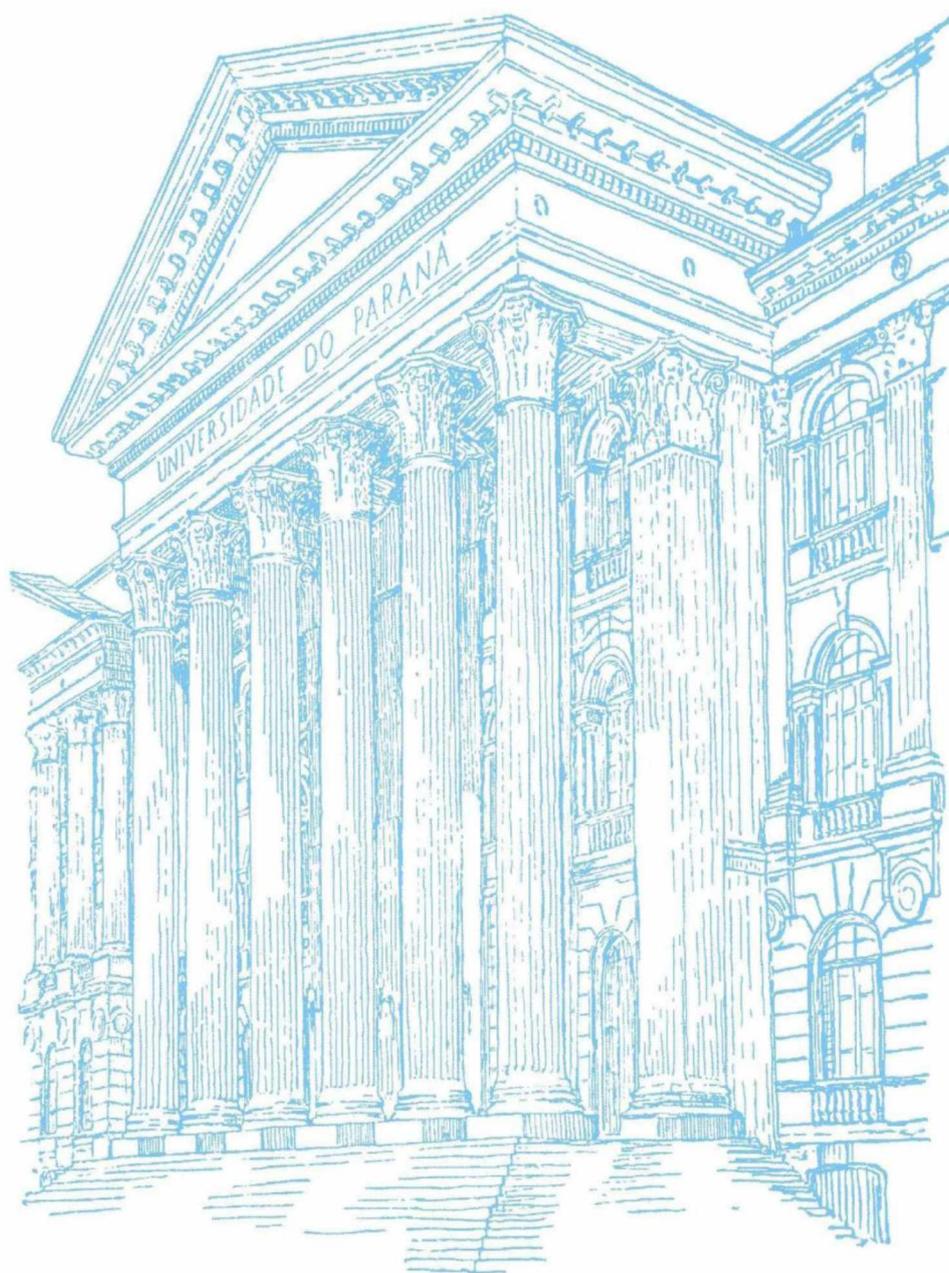


TABELA 10- RESULTADOS DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA AMOSTRA.

	Alta n(%) n=11	Média n(%) n=31	Baixa n (%) n=11	p	Não 7 n(%) n=36	Heterozigoto 7 n(%) n=12	Homozigoto 7 n(%) n=5	p
Estereotipias	5 (45,5)	9 (29)	6 (54,5)	0,51	16 (44,4)	3 (25)	1 (20%)	0,36
Inflexibilidade	1 (9,1)	9 (29)	2 (18,2)	0,53	9 (25)	2 (16,7)	1 (20)	0,81
Ansiedade	5 (45,5)	8 (25,8)	2 (18,2)	0,60	11 (30,6)	3 (25)	1 (20)	0,9
Agitação Psicomotora	5 (45,5)	7 (22,6)	3 (27,3)	0,47	11 (30,6)	2 (16,7)	2 (40)	0,81
Agressividade	2 (18,2)	2 (6,5)	1 (9,1)	0,80	4 (11,1)	1 (8,3)	0	0,90
Regressão	3 (27,3)	10 (32,2)	5 (45,5)	0,63	11 (30,6)	4 (33,3)	3 (60)	0,43
Nível 1	6 (54,5)	15 (48,4)	5 (45,5)	0,39	15 (41,7)	9 (75)	2 (40)	0,31
Nível 2	0	8 (25,8)	3 (27,7)	0,39	8 (22,2)	2 (16,7)	1 (20)	0,31
Nível 3	5 (45,5)	8 (25,8)	3 (27,7)	0,39	13 (36,1)	1 (8,3)	2 (40)	0,31
Comprometimento de Linguagem	5 (45,5)	14 (45,2)	5 (45,5)	0,99	18 (50)	3 (25)	3 (60)	0,25
Comprometimento Cognitivo	6 (54,5)	13 (41,2)	6 (54,5)	0,66	19 (52,8)	3 (25)	3 (60)	0,20
Epilepsia	2 (18,2)	4 (12,9)	2 (18,2)	0,86	3 (8,3)	2 (16,7)	3 (60)	0,01**

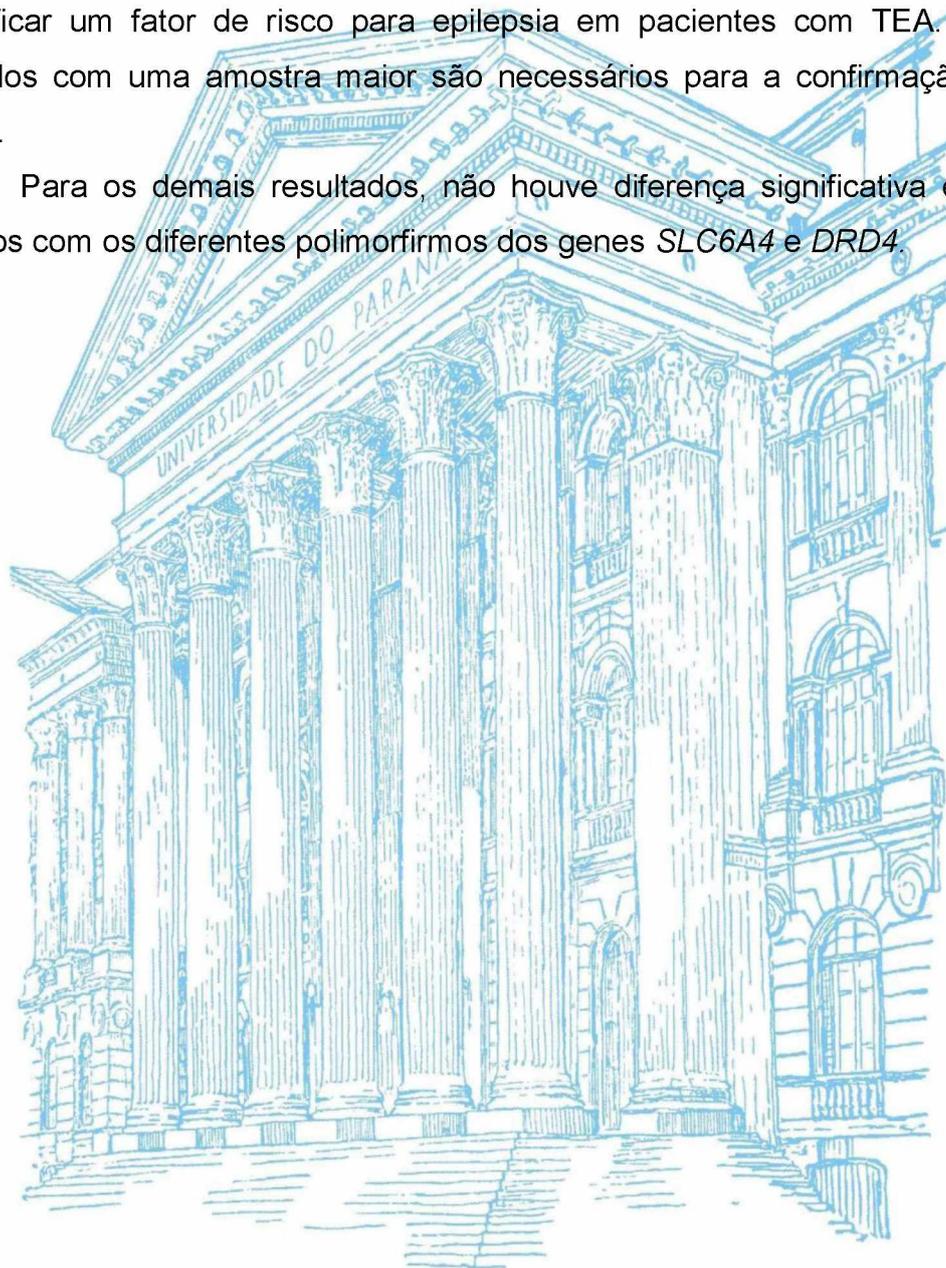
** Foi realizada a aplicação do teste do Qui-Quadrado sobre a amostra, com $P < 0,05$

FONTE: O autor (2016).



Os pacientes homocigotos para polimorfismo de 7 repetições para o gene *DRD4* apresentaram maior frequência de associação com epilepsia ($p = 0,01$). Quando agrupados com os heterocigotos para 7 repetições observou-se nível de significância limítrofe ($p = 0,09$), com Odds Ratio (OR) para epilepsia de 3,5 (IC 95% = 0,95 a 13,08). Embora a amostra seja pequena, com apenas 17 pacientes com pelo menos um alelo com 7 repetições, esse fato pode significar um fator de risco para epilepsia em pacientes com TEA. Porém, estudos com uma amostra maior são necessários para a confirmação deste dado.

Para os demais resultados, não houve diferença significativa entre os grupos com os diferentes polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4*.



5 DISCUSSÃO

No que se refere aos dados epidemiológicos, a mediana da idade do diagnóstico foi de 3 anos, variando de 1 a 12 anos, compatível com a média de idade de diagnóstico segundo levantamento Norte Americano, que é de 44 meses. (CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2014). Porém, a ampla variabilidade de idade de diagnóstico reflete a dificuldade de acesso dos pais uma assistência de qualidade para o diagnóstico de TEA.

A distribuição dos pacientes em escola regular ou especial é compatível com a distribuição dos níveis de comprometimento, uma vez que frequentam escola especial (32%) os pacientes com maior grau de dificuldade (nível 3 - 30,2%).

A frequência de realização de terapias é assombrosa. Para os padrões internacionais, preconiza-se a realização de no mínimo 25 horas semanais de terapias específicas voltadas para o TEA. (MAGLIONE et al., 2012). Mesmo sendo um serviço de referência, não houve possibilidade de acesso para condições mínimas de assistência em 86% dos casos. Isso reflete a precariedade de atendimento para pacientes com TEA pelo Sistema Único de Saúde no Brasil. (PAULA et al., 2011).

Em relação às condições médicas associadas e aos fatores de risco pré e pós-natais, os números foram muito variados e como grupo não podem ser comparados nesta amostra.

A epilepsia foi diagnosticada em 7 pacientes (13,2%), corroborando a literatura que descreve a média de prevalência de epilepsia em 12,5%, para crianças de 2 a 17 anos, sendo de menos de 10% em menores de 10 anos e cumulativa de 26,5% em adolescentes de até 17 anos (VISCIDI et al, 2013).

A alteração eletroencefalográfica comum a todos os pacientes com EEG alterado foi a Atividade Irritativa rolândica.

Todos os pacientes que apresentavam epilepsia estavam com crises convulsivas controladas, e todos apresentavam histórico de crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas.

Um paciente apresentou alteração no EEG sem histórico nenhum sugestivo de crise convulsiva.

A relação entre epilepsia, descargas epileptiformes sem crises clínicas e comprometimento de linguagem e TEA ainda não é bem compreendida. A documentação de anormalidades no EEG varia na literatura 10,3 a 72,4% dos pacientes com TEA, e anormalidades subclínicas no EEG variam de 6,1 a 31%. Suspeita-se ainda que a dificuldade de socialização, comportamentos agressivos e o comprometimento de linguagem dos pacientes com TEA podem estar relacionados a irritabilidade cortical e anormalidades estruturais em redes neuronais que poderiam ser responsáveis pelas duas situações. (McANDREW; WEINSTOCK, 2010).

As alterações presentes nos exames de imagem (tomografia ou ressonância de crânio) demonstraram atraso de mielinização em dois casos e leucomalácia periventricular em um caso. Essas alterações são inespecíficas, e não podem ser associadas isoladamente como fatores etiológicos. Os estudos que avaliam neuroimagem em TEA demonstram associação com alteração de desenvolvimento das vias moleculares e neuronais, que incluem a migração neuronal, organização cortical, formação sináptica e de dendritos, mas são estudos direcionados com técnicas de específicas. (VOINEAGU; YOO, 2007; MALONEY; RIEGER; DAUGHERTY, 2013; GESCHWIND, 2011). Os exames realizados nesta amostra foram exames de rotina.

As escalas aplicadas foram compatíveis com os níveis de gravidade da amostra. A CARS com média de 34,6 (quadro leve-moderado) e ATA com mediana de 22,9, confirmando diagnóstico de TEA.

Os resultados dos estudos de associação da estrutura bialélica da região 5-HTTLPR com o TEA são controversos. Alguns estudos trazem a associação do alelo L com o autismo (DEVLIN et al., 2005; KLAUK et al., 1997; TORDJAMAN et al., 2001; YRMIYA et al., 2001), outros estudos trazem a associação do alelo S com o autismo. (CONROY et al., 2004; COOK, 1997; KIM et al., 2002).

Na avaliação genética, a frequência de genótipos observados da estrutura trialélica do gene *SLC6A4* na população de pacientes foram comparados com o Grupo Controle não apresentando diferença estatisticamente significativa o que corrobora a distribuição igual ao da população sem TEA, não identificando associação entre algum alelo do *SLC6A4* com o autismo. (LONGO et al., 2009).

Um dos fatos que torna esses resultados contraditórios é o desconhecimento anterior da forma funcional trialélica do gene *SLC6A4*, o que contribuiu certamente para essas divergências. Recentemente foi publicado o primeiro estudo brasileiro envolvendo a estrutura trialélica do polimorfismo da região *5-HTTLPR* relacionado com o TEA, no qual foi descrita a associação do genótipo Longo com a variante “A” em homozigose (LaLa) e a instabilidade do humor nos pacientes com TEA. (LONGO et al., 2009). Este estudo também não demonstrou a associação de algum dos alelos em maior frequência nos casos de TEA. Deste modo, infere-se que o polimorfismo da região promotora do gene recaptador da serotonina, não está influenciando no TEA como um todo e sim em alguns sintomas que estão presentes no distúrbio, corroborando a proposta de herança multifatorial.

Os achados da pesquisa de LONGO (2009) demonstram significância entre o genótipo LaLa e a instabilidade de humor. Neste estudo, a instabilidade de humor não foi avaliada individualmente como sintoma pela difícil caracterização deste sintoma pouco objetivo nesta amostra.

Outro fato que pode estar colaborando na falta de associação de sintomas aos genótipos se deve ao tamanho amostral que influencia nos testes estatísticos diminuindo o poder destes.

Estudos mais aprofundados e com número amostral maior, devem ser realizados para confirmar ou refutar os resultados encontrados. Além disso, pesquisas da neurofisiologia do desenvolvimento cerebral e o papel da serotonina nos processos de formação deste devem atentar para o fato que a serotonina exerce influência em outros sistemas de neurotransmissores.

Na técnica de digestão enzimática aplicada para determinar o genótipo trialélico de pacientes e controles foi observado que em alguns indivíduos a enzima não cortava completamente em um dos sítios de restrição, de acordo com o manual da enzima, se esse sítio estiver metilado a enzima *MpsI* não é capaz de cortá-lo. Esse fato abre a discussão para que estudos posteriores analise-se o padrão de metilação da região promotora do gene em questão, pois, se for comprovado que o padrão de metilação altera a expressão do gene, pode ser que muitos indivíduos com genótipos que possuem o alelo La não estejam de fato expressando o 5-HTT no nível mencionado por HU et al. (2006), portanto, estudos epigenéticos serão fundamentais para elucidar

mecanismos moleculares do *SLC6A4* assim como a influência que vários outros genes pode estar exercendo para o evento molecular da expressão desta proteína.

Do mesmo modo, a distribuição relativamente semelhante dos alelos nos grupos de pacientes e controles para o *DRD4* era esperada neste trabalho, uma vez que a literatura propõe que haja relação do alelo de 7 repetições do *DRD4* com alguns sintomas específicos do TEA (GADOW et al., 2010) ou com comorbidades associadas (SZEKELY et al., 2010; AVALE et al., 2004). Entretanto, nesta amostra, não houve diferença significativa mesmo para sintomas específicos (estereotipias, ansiedade, agitação psicomotora, inflexibilidade ou agressividade). Esse fato pode estar relacionado à dificuldade de avaliação desses sintomas, pois a análise é subjetiva, e esses dados não foram quantificados de forma objetiva por questionários específicos para pesquisa de comorbidades, e em parte também pela dificuldade de análise pela heterogeneidade da amostra em relação ao grau de comprometimento e à baixa idade da amostra (mediana 7 anos). Outro fator fundamental que dificulta a análise é o tamanho amostral pequeno de pacientes com pelo menos um alelo com 7 repetições (n=17).

Porém, chama atenção o risco possível de maior associação de epilepsia em pacientes com TEA em pacientes com pelo menos um alelo com 7 repetições. A associação entre TEA e epilepsia pode ser explicada como ambas resultantes de alteração de conexões corticais e subcorticais em larga escala. Além disso, mecanismos moleculares e celulares também estão envolvidos, aumentando a epileptogênese e influenciando nas alterações comportamentais, de socialização e linguagem. Esses fatores podem ser influenciados diretamente por genes associados ao processo de desenvolvimento cerebral precoce e à liberação de neurotransmissores, influenciando no balanço inibitório-excitatório neuronal. (TUCHMAN; MOSHÉ; RAPIN, 2009).

Os receptores de dopamina D4 pertencem ao grupo de receptores da família D2, e são encontrados nos neurônios pós-sinápticos com função inibitória da atividade dopaminérgica, pela atuação sobre a proteína G. A atividade dos receptores que compõem este grupo, D2, D3 e D4, possui mecanismo semelhante, diferindo-se pela localização e afinidade à dopamina

(CHANG et al., 1996). A menor sensibilidade à dopamina do receptor D4, quando na presença do alelo 7R, possivelmente exerce influência sobre este mecanismo, diminuindo a capacidade de auto-regulação do sistema dopaminérgico (WANG et al., 2004).

Tradicionalmente, a ocorrência de epilepsia pode ser explicada pelo desequilíbrio entre neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA). Entretanto, diversos outros sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na epileptogênese, incluindo a dopamina e a serotonina. Diferentes tipos de receptores estão localizados nas terminações sinápticas GABAérgicas e glutamatérgicas de regiões neocorticais e hipocâmpais. O uso de ligantes específicos para diferentes subclasses de receptores de dopamina podem agir como pró-convulsivantes e anti-convulsivantes, e estudos animais demonstram que receptores com ação *D2-like* possuem efeito regulador de crises, como é o caso do D4 (THIPATHI; BOZZI, 2015; RUBINSTEIN et al., 2001). Deste modo, o polimorfismo do *DRD4* com 7 repetições, torna o receptor D4 menos funcional, diminuindo sua ação inibitória, podendo assim estar relacionado à maior associação de epilepsia e pacientes com TEA e alelos com 7 repetições. Porém, faz-se necessário uma amostra maior para confirmar este achado.

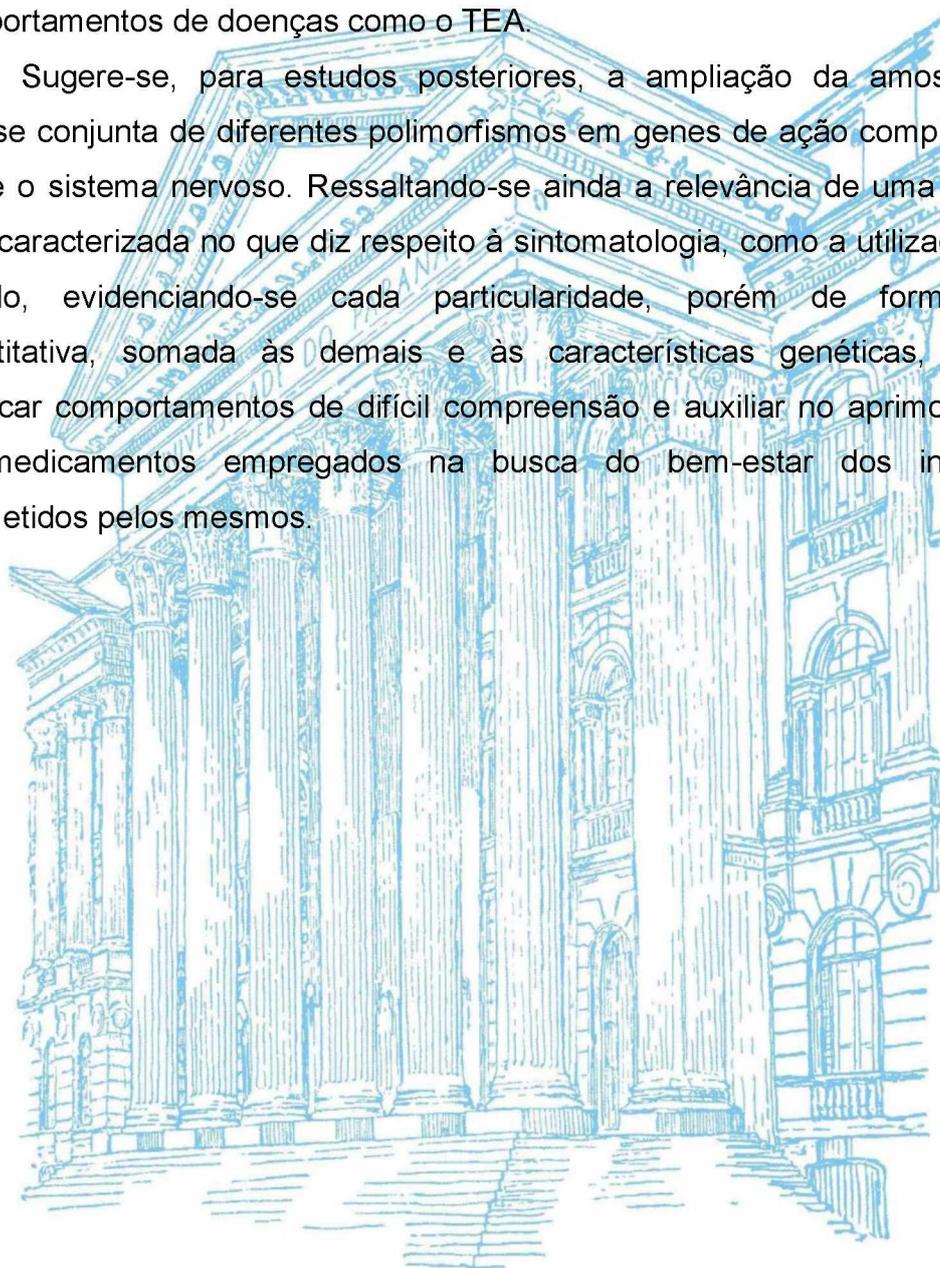
A análise proposta por Oliveira (1999) demonstra que, na deficiência de receptores D2, por exemplo, ocorre acúmulo de dopamina na fenda sináptica, o que gera, por mecanismo de *feed-back* negativo, uma redução ou até interrupção da formação e liberação de dopamina. Este quadro, por mecanismos ainda não esclarecidos, resulta na ativação de neurônios noradrenérgicos no lócus cêrulus e consequente liberação de noradrenalina. Tais constatações, além de reforçarem a ideia de atuação da dopamina em conjunto com os demais sistemas de neurotransmissores, remetem à possibilidade de processo análogo estar ocorrendo em indivíduos em que os receptores de dopamina D4 revelam-se menos sensíveis à atuação da dopamina (OLIVEIRA, 1999).

Assim como sugere Ptáček (2011), a limitação de estudos que buscam relacionar polimorfismos do gene *DRD4* a quaisquer sintomas está na falta de conexões com outros genes, a começar daqueles que fazem parte do próprio sistema dopaminérgico. O autor cita em seu trabalho pesquisas que sugerem que determinadas variantes do gene *DRD4* em ação conjunta à variantes do

gene *DAT1*, ambos pertencentes ao sistema dopaminérgico, possam estar relacionadas às controvérsias farmacogenéticas por exemplo. (PTACEK et al.; 2011).

Considerando o exposto e os resultados obtidos neste estudo, evidencia-se a necessidade de pesquisas que explorem diferentes genes e polimorfismos que possam, juntos, estar atuando sobre determinados comportamentos de doenças como o TEA.

Sugere-se, para estudos posteriores, a ampliação da amostra e a análise conjunta de diferentes polimorfismos em genes de ação complementar sobre o sistema nervoso. Ressaltando-se ainda a relevância de uma amostra bem caracterizada no que diz respeito à sintomatologia, como a utilizada neste estudo, evidenciando-se cada particularidade, porém de forma mais quantitativa, somada às demais e às características genéticas, possam justificar comportamentos de difícil compreensão e auxiliar no aprimoramento de medicamentos empregados na busca do bem-estar dos indivíduos acometidos pelos mesmos.



6 CONCLUSÕES

1. As características clínicas dos pacientes foram compatíveis com as características de grupos dos demais estudos da literatura, entre elas a média de idade de diagnóstico, grau de comprometimento e presença de comorbidades como a epilepsia. A presença de condições médicas ou gestacionais associadas não foi significativa. O que chama atenção na amostra é a precariedade de acesso às terapias, com uma carga horária muito inferior ao adequado conforme os padrões internacionais.
2. Neste estudo, a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *DRD4* em pacientes com TEA foi igual ao do grupo controle.
3. Como grupo, os polimorfismos estudados não foram significativamente mais frequentes em pacientes com TEA, não podendo portanto ser associados à uma maior susceptibilidade ao transtorno em si.
4. Do ponto de vista clínico, em pacientes com TEA, o polimorfismo do *SLC6A4* não se mostrou determinante em nenhuma de suas características clínicas e o polimorfismo do gene *DRD4* com a presença de alelos homozigotos para 7 repetições, que torna o receptor D4 de dopamina menos funcional, diminuindo seu poder inibitório, neste estudo foi associado a uma maior frequência de epilepsia em pacientes com TEA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APA – AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnóstico and Statistical Manual of Mental Disorders**. 4 ed Texto Revisado. (DSM – IV - TR). Arlington: American Psychiatric Publishing, 1994.

APA – AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnóstico and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5 ed. (DSM – V). Arlington: American Psychiatric Publishing, 2013.

ARIAS-CARRION, A.; POPPEL, E. Dopamine, Learning and Reward-Seeking Behavior. **Acta Neurobiol. EXP.**, Poland, v.67, v. 67: 481-488, 2007.

ASGHARI, V. *et al.* Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptors variants. **J Neurochemistry**, New York, v.3, p.1157-1165, 1995.

ASSUMPTÃO JR, F., *et al.* Escala de Avaliação de Traços Autísticos (ATA). **Arq. Neuropsiquiatr.**, Nashville, v.57, p. 23-29, 1999.

AVALE, M.E. *et al.* The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. **Mol. Psychiatry**, London, v. 9, p. 718-726, 2004.

BERG, A.T.; PLIOPLYS, S.; TUCHMAN, R. Risk and Correlates of Autism Spectrum Disorder in Children with Epilepsy: a Community-Based Study. **J Child Neurol**, Rochester, v. 26, p. 540–547, 2011.

BRASIL. Decreto-lei n. 12.764, de 27 de dezembro de 2012. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2012.

CARVALHEIRA, G.; VERGANI, N.; BRUNONI, D. Genética do Autismo. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v.26, p. 270-72, 2004.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. **MMWR - Morbidity And Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.63, 2014.

CHANG, F.M. *et al.* The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. **Hum Genet**, v. 98, p. 91-101, 1996.

CHUGANI, D.C. *et al.* Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. **Ann. Neurology**, Detroit, v.45, p. 287-295, 1999.

CONROY, J. *et al.* Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population. **Mol. Psychiatry**, London, v. 9, p. 587-593, 2004.

COOK, E.H.J. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. **Mol. Psychiatry**, London, v. 2, p. 247-250, 1997.

COSTA, A.P.P. *et al.* Estudo de Polimorfismos de DNA Associados à Distúrbios de Desenvolvimento. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, São Paulo, v.7, p. 113-121, 2007.

DEVLIN, B. *et al.* Autism and the serotonin transporter: the long and short of it, **Mol Psychiatry**, London, v.10, p. 1110-1116, 2005.

DE LA TORRE-UBIETA, L. *et al.* Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. **Nat Med**, v.22, 2016.

FRITH U. **Autism and Asperger Syndrome**, Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

GADIA, C.A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N.T. Autism and pervasive developmental disorders. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 83-94, 2004.

GADOW, K.D. *et al.* Parent-Child DRD4 Genotype as a Potential Biomarker for Oppositional, Anxiety, and Repetitive Behaviors in Children with Autism Spectrum Disorder. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, New York, v. 37, p. 1208-1214, 2010.

GESCHWIND, D.H. Genetics of Autism Spectrum Disorders. **Trends in Cognitive Science**, Los Angeles, v. 15, p. 409-416, 2011.

GOMES, P.T.M, *et al.* Autism in Brazil: a systematic review of family challenges and coping strategies. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 111-121, 2005.

GUPTA, A.R.; STATE, M.W. Autismo: genética. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 28, p. 29-38, 2006.

HERVÁS, A., *et al.* The involvement of serotonin polymorphism in autistic spectrum symptomatology. **J Mol Psychiatry**, v. 2, p. 1186- 1206, 2014.

HOLMBOE, K. *et al.* Dopamine D4 receptor and serotonin transporter gene effects on the longitudinal development of infant temperament. **Genes Brain Behav.**, London, v. 10, p. 513-522, 2011.

HU, X.Z. *et al.* Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. **The American Journal of Human Genetics**, Houston, v.78, p. 815-826, 2006.

JAISWAL, P. *et al.* SLC6A4 markers modulate platelet 5-HT level and specific behaviors of autism: a study from an Indian population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.2, p. 196-206, 2015.

KAISER, R. *et al.* Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizophrenoid

and residual subtypes of schizophrenia. **Mol Psychiatry**, London, v.6, p. 179-185, 2001.

KANNER, L. Autistic Disturbances of Affective Contact. **Nerv. Child.**, Baltimore, v.2, p.217-250, 1943.

KIM, S.J.; *et al.* Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. **Mol Psychiatry**, London, v.7, p. 278-88, 2002.

KINAST, K. *et al.* Genetic and pharmacological manipulation of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.7, p. 1-17, 2013.

KLAUCK, S.M.; BENNER, A.; POUSTKA, A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? **Human Molecular Genetics**, London, v. 6, p. 2233-2238, 1997.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v.19, p. 5444, 1991.

LEPPA, V.M. *et al.* Rare Inherited and De Novo CNVs Reveal Complex Contributions to ASD Risk in Multiplex Families. **Am J Hum Genetics**, v. 1, p. 540-554, 2016.

LICHTER, J.B. *et al.* A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene. **Human Molecular Genetics**, v. 6, p. 767-773, 1993.

LONGO, D. *et al.* Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. **Brain Research**, Philadelphia, v.1267, p. 9-17, 2009.

LONGO, D. **Influência de fatores genéticos e ambientais nos transtornos do espectro autista [tese livre docência]**. Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MALONEY, .S.E.; RIEGER, M.A.; DOUGHERTY, J.D. Identifying Essential Cell Types and Circuits in Autism Spectrum Disorders. **Int Ver Neurobiol**, Saint Lois, v. 113, p. 61-96, 2013.

MARQUES, F.Z.C. **Polimorfismos nos genes DAT1 e DRD4 e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) em adultos [tese de livre docência]**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MAZZONE, L.; RUTA, L.; REALE, L. Psychiatric Comorbidities in Asperger Syndrome and High Functioning Autism: Diagnostic Challenges. **Annals of General Psychiatry**, Rome, v.11, p. 1-6, 2012.

McANDREW, M.H.; WEINSTOCK, A. Autism Spectrum Disorder: Correlation Between Aberrant Behaviors, EEG Abnormalities and Seizures. **Neurol. International**, v. 2, p. 10-21, 2010.

McPARTLAND, J.; VOLKMAR, F.R. Autism and Related Disorders. **Clin. Neurol.**, New Haven, v.106, p. 1-18, 2012.

NAKAMURA, K. et al. Brain Serotonin and Dopamine Transporter Bindings in Adults With High-Functioning Autism. **Arch Gen Psychiatry**, Chicago, v.67, p. 59-68, 2010.

OLIVEIRA, I.R. Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. **Rev. Bras. Psiquiatria**, São Paulo, v. 22, p. 38-40, 2000.

OMIM - **Online Mendelian Inheritance in Man**. Disponível em <<http://www.omim.org/>>

PARDO, C.A.; EBERHARDT, C.G. The Neurobiology of Autism. **Brain Pathol**, Baltimore, v. 17, p. 434-447, 2007.

PAULA, C.S, *et al.* Autism in Brazil: Perspectives From Science and Society. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.57, p. 2-5, 2011.

PAULA, C.S, *et al.* Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. **J. Autism Dev. Disord.**, New Heaven, v.41, p. 1738–1742, 2011.

PEREIRA AM. **Autismo infantil: tradução e validação da CARS (Childhood Autism Rating Scale) para uso no Brasil [tese livre docência]**. Programa de Graduação de Ciências Médicas: Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

POLŠEK, D., *et al.* Recents developments in neuropathology of autism spectrum disorders. **Transl Neurosci**, v. 2, p. 256-264, 2011.

PREN, P; BOZZI, Y. The Role of Dopaminergic and Serotonergic Systems in Neurodevelopmental Disorders: a Focus on Epilepsy and Seizure Susceptibility. **Bioimpacts**, v.5, p.97-102, 2015.

PTÁČEK, R. *et al.* Dopamine D4 receptor gene DRD4 and its association with psychiatric disorders. **Med. Sci. Monit.**, v.17, p. 215-220, 2011.

RAO, P.A.; LANDA, R.J. Association Between Severity of Behavioral Phenotype and Comorbids Attention Deficit Hiperactivity Disorder Symptoms in Children with Autism Spectrum Disorders. **Autism**, Baltimore, v.18, p. 272-280, 2014.

REIERSEN, A.M.; TODOROV, A.A. Association between DRD4 genotype and Autistic Symptoms in DSM-IV ADHD. **J Can Acad Child Adolesc Psychiatry**, Montreal, v. 20, p.15-21, 2011.

RODRIGUES LT. **Receptor de dopamina D4: estudo da variabilidade e evolução em populações Ameríndias [tese de livre docência]**. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ROTHMOND, D.A.; WEICKERT, C.S.; WEBSTER, M.J. Developmental changes in human dopamine neurotransmission: cortical receptors and terminators. **BMC Neuroscience**, London, v. 13, p. 18-27, 2012.

RUBINSTEIN, M. *et al.* Dopamine D4 Receptor-Deficient Mice Display Cortical Hyperexcitability. **The Journal of Neuroscience**, v. 2, p. 3756-3763, 2001.

SANDIN S. *et al.* Autism and Mental Retardation Among Offspring Born After In Vitro Fertilization. **JAMA**, Chicago, v. 1, p.75-84, 2013.

SCHWARTZMAN, J.S.; ARAÚJO, C.A. **Transtornos do Espectro Do Autismo**. 1 ed. São Paulo: Editora Memmon, 2011.

SZEKELY, A. *et al.* Genetic factors of reaction time performance: DRD4 7-repeat allele associated with slower responses. **Genes, Brain and Behavior**, Bethesda, v. 10, p. 129-136, 2010.

TAURINES, R. *et al.* Altered mRNA expression of monoaminergic candidate genes in the blood of children with attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 12, p. 104-108, 2011.

THIPATHI, P.P., BOZZI, Y. The role of dopaminergic and serotonergic systems in neurodevelopmental disorders: a focus on epilepsy and seizure susceptibility. **Bioimpacts**, v.5, p. 97-102, 2015.

TORDJMAN, S. *et al.* Role of the serotonin transporter in the behavioral expression of autism. **Mol Psychiatry**, New Heaven, v.6, p. 434–439, 2001.

TUCHMAN, R.; MOSHE, S.L.; RAPIN, I. Convulsing Toward the Pathophysiology of Autism. **Brain Devel.**, New York, v.31, p. 95-103, 2009.

UNG, D. *et al.* Clinical Characteristics of High Functioning Youth with Autism Spectrum Disorder and Anxiety. **Neuropsychiatry**, London, v.3, p 2-8, 2013.

VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; BLAKELY, R.D. Networking in Autism: leveraging genetic, biomarker and model system findings in the search for new treatments. **Neuropsychopharmacology**, Belmont, v. 37, p. 196-212, 2012.

VISCIDI, E.W. *et al.* Clinical Characteristics of Children with Autism Spectrum Disorder and Co-occurring Epilepsy. **PLo One**, Boston, v.8, p. e67797-67808, 2013.

VOINEAGU, I.; YOO, H.J. Current Progress and Challenges in the Search for Autism Biomarkers. **Disease Markers**, New York, v.35, p. 55-65, 2013.

VOLKMAR, F.R.; REICHOW, B. Autism in DSM V: Progress and Challenges. **Molecular Autism**, London, v.4, p. 13-22, 2013.

VON STEENSEL, F.J.A.; BOGGELS, S.M.; BRUIN, E.I. Psychiatric Comorbidity in Children with Autism Spectrum Disorder: A Comparison with Children with ADHD. **J. Child Fam. Stud.**, Amsterda, v.22, p. 368-376, 2013.

WANG, E. *et al.* The Genetic Architecture of Selection at the Human Dopamine Receptor. **Am. J. Hum. Genet.**, v.74, p. 931-944, 2004.

WIGGINS, J.L. *et al.* The Impact of Serotonin Transporter Genotype on Default Network Connectivity in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder. **Neuroimage: Clinical**, Ann Arbor, v.2, p. 17-24, 2013.

WU, YE, *et al.* Genoma-wide, integrative analysis implicates microRNA dysregulation in autism spectrum disorder. **Nat Neurosci**, New York, v. 10, 2016.

YIRMIYA, N, *et al.* Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. **Am J Med Genet**, New York, v. 105, p. 381-386, 2001.

YUEN, R.K. *et al.* Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. **Nature Medicine**, Toronto, v.21, p. 185-191, 2015.

ZAFEIRIOU, DI; VERVERI, A; VARGIAMI, E. The Serotonergic System: Its role in pathogenesis and early developmental treatment of autism. **Curr Neuropharmacol**, Beijing, v.7, p.150-157, 2009.

