

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular

Guilherme Luís Tyska Nunes

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO FOKI DO RECEPTOR DE VITAMINA D
(VDR) E O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Porto Alegre

2021

Guilherme Luís Tyska Nunes

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO FOKI DO RECEPTOR DE VITAMINA D
(VDR) E O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia
Molecular do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Periódico: Immunogenetics

Porto Alegre

2021

AGRADECIMENTOS

Aos melhores pais que eu poderia ter, por todo o amor e suporte que vocês me deram durante toda a minha vida. Amo vocês mais do que tudo. Sem vocês não seria nada.

Ao meu orientador José Artur (Zeca) e a todos do Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética (até aos que já não estão mais lá, mas sempre serão parte) por todos os ensinamentos, ajudas, conversas e cafés durante todo o tempo que fui IC. Vocês foram fundamentais para minha formação.

Aos meus amigos que o SF me deu, por me aguentar durante todos esses anos. Ficaram bravos por não aparecerem nas fotos da apresentação, mas tem um lugar enorme no meu coração.

À melhor barra da biotec (17/1) e a todos do curso de biotecnologia, por todas as risadas, festas, conversas, discussões que certamente tornaram o curso ainda melhor. Cada um de vocês é incrível e vai ter um sucesso enorme no futuro, tenho um orgulho enorme!

A todos que não estão em nenhuma dessas categorias, mas que ainda assim contribuíram de alguma forma nesses últimos anos. Muito obrigado!

SUMÁRIO

1 RESUMO.....	5
2 ABSTRACT.....	6
3 INTRODUÇÃO GERAL.....	7
3.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA).....	7
3.1.1 História e Nomenclatura	7
3.1.2 Componentes	8
3.1.3 Incidência Mundial e no Brasil	9
3.2 VITAMINA D	11
3.2.1 Síntese, Distribuição e Mecanismo de Ação.....	11
3.2.2 Importância	12
3.2.3 Deficiência de Vitamina D no Brasil e no Mundo	13
3.2.4 Vitamina D e TEA.....	14
3.3 RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR)	15
3.3.1 Funções.....	15
3.3.2 Variantes do gene	16
3.3.3 Variante FokI.....	16
4 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO IMMUNOGENETICS	18
5 DESENVOLVIMENTO GERAL.....	26
REFERÊNCIAS.....	30

1 RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno influenciado por fatores tanto genéticos quanto ambientais, mas as reais causas ainda não foram completamente elucidadas. A vitamina D parece ter algum papel na heterogeneidade do TEA, pois estudos mostraram níveis mais baixos de vitamina D em pessoas diagnosticadas com TEA em comparação a grupos controle, assim como em mulheres grávidas de crianças que viriam a desenvolver TEA em relação a outro grupo controle. A vitamina D atua no organismo principalmente através do calcitriol, sua forma ativa, que se liga com o Receptor de Vitamina D (VDR), atuando na homeostase do cálcio, regulação de citocinas e produção de peptídeos antimicrobianos. A variante FokI (rs2228570-C/T) causa uma alteração na atividade da proteína VDR: a proteína expressa pelo alelo F (C) possui maior atividade em relação a aquela expressa pelo alelo f (T). O objetivo desse trabalho foi analisar a variante FokI em pacientes com TEA, procurando uma possível associação com sintomatologia do TEA. A variante FokI do gene VDR foi avaliada em 149 crianças diagnosticadas com TEA. As amostras de DNA foram amplificadas por PCR, clivadas com a enzima FokI e genotipadas por eletroforese em gel de agarose 3%. A análise qui-quadrado foi utilizada para testar associações entre os genótipos e a sintomatologia. As frequências dos genótipos obtidos foram: 41,6% para F/F; 42,3% para F/f e 16,1% para f/f (distribuição em equilíbrio de Hardy-Weinberg). A presença de genótipos com o alelo f foi inicialmente associada com presença de convulsões ($p=0,024$; $pc=0,24$), ausência de ataques de pânico ($p=0,010$; $pc=0,10$) e ausência de comportamento autoagressivo ($p=0,032$; $pc=0,32$). Entretanto, as associações encontradas não permaneceram significantes após a correção de Bonferroni (pc). Novos estudos sobre o componente genético do TEA são essenciais para melhor entendimento do transtorno.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista, VDR, vitamina D, polimorfismo

2 ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a disorder influenced by both genetic and environmental components, but the real causes are still inconclusive. Vitamin D seems to have some role in ASD heterogeneity, with studies showing lower levels of vitamin D in ASD as compared to non-ASD individuals, as well as more vitamin D deficiency in mothers of ASD children during pregnancy as compared to non-ASD associated pregnancies. Vitamin D acts mostly through calcitriol, interacting with Vitamin D Receptor (VDR) and regulating calcium homeostasis, cytokine expression/repression, and antimicrobial peptides expression. The FokI variant (rs2228570-C/T) is known to alter VDR activity: the protein expressed by the F allele (C) has a higher activity as compared to the protein expressed by the f allele (T). This study aims to analyze the FokI variant in ASD patients, searching for an association with ASD symptomatology. The FokI variant of the VDR gene was genotyped in 149 individuals diagnosed with ASD. The DNA samples were amplified by PCR, cleaved by FokI enzyme, and genotyped by electrophoresis in a 3% agarose gel. The chi-squared analysis was used to test the association between genotypes and the symptoms. The genotype frequencies obtained were: 41.6% for F/F; 42.3% for F/f e 16.1% for f/f (the distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium). The f allele was initially associated with presence of convulsion ($p=0.024$; $pc=0.24$), absence of panic attacks ($p=0.010$; $pc=0.10$) and absence of auto-aggressive behavior ($p=0.032$; $pc=0.32$). However, these associations lost statistical significance after Bonferroni correction (pc). More studies about ASD genetics are needed to a better understanding of this disorder.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, VDR, vitamin D, polimorfism

3 INTRODUÇÃO GERAL

3.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) consiste em um conjunto de desordens caracterizadas principalmente por comportamentos repetitivos, estereotipados e restritos e comprometimento da interação social. Segundo a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), a versão mais atualizada até a publicação deste trabalho, o diagnóstico de TEA deve ser baseado em cinco pontos principais:

- A) Deficiências persistentes na comunicação social e interação social em muitos contextos (...):
(...)
- B) Padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses e atividades (...):
(...)
- C) Sintomas devem estar presentes na fase inicial do desenvolvimento (mas podem não se manifestar totalmente até que demandas sociais excedam as capacidades limitadas, ou podem ser mascarados por estratégias aprendidas em fases posteriores da vida).
- D) Sintomas causam prejuízo clinicamente significativo na área social, ocupacional, ou outras áreas importantes do funcionamento do indivíduo.
- E) Esses distúrbios não são melhor explicados por deficiência intelectual (Transtorno do Desenvolvimento Intelectual) ou Transtorno Global do Desenvolvimento. Deficiência Intelectual e Transtorno do Espectro Autista frequentemente coocorrem; para fazer diagnósticos de Transtorno do Espectro Autista e Deficiência Intelectual, a comunicação social deve estar abaixo do nível geral de desenvolvimento esperado. (CDC, 2016; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013, tradução nossa)

3.1.1 História e Nomenclatura

O TEA foi descrito pela primeira vez como uma condição própria em um artigo publicado em 1943 pelo pesquisador Leo Kanner. Nesse artigo, Kanner descreve onze crianças que apresentavam sintomas como falta de contato afetivo, comportamentos repetitivos e estereotipados, e ecolalia (sintoma que consiste na repetição automática de frases e sons ouvidos), classificando o transtorno observado como “distúrbios autistas congênitos de contato afetivo” (do inglês: *inborn autistic disturbances of affective contact*) (KANNER, 1943).

Mesmo após a publicação de Kanner, o termo autismo era utilizado apenas para certos casos de esquizofrenia que ocorriam em indivíduos em fase pré-

puberdade, inclusive sendo retratado nos dois primeiros DSMs (DSM-I e DSM-II), publicados em 1952 e 1968, respectivamente, desta forma. Somente na terceira edição (DSM-III), publicada em 1980, que o autismo passou a designar um transtorno próprio, separado da esquizofrenia e chamado de “autismo infantil”. Os principais sintomas incluíam deficiências de linguagem e da capacidade de responder a outras pessoas e ecolalia (HERMAN, 2019).

Em 1987, a versão revisada do DSM-III, chamada de DSM-III-R, foi publicada, tendo o termo “autismo infantil” sido alterado para “desordem autista”. Tal alteração classificou o autismo como uma pervasiva ausência de responsividade às outras pessoas (HERMAN, 2019). Em 1994, o DSM-IV, que posteriormente foi revisado em 2000 e relançado como DSM-IV-R, apresentava a divisão do TEA em subcategorias: Transtorno Autista, Síndrome de Asperger, Síndrome de Rett, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação (da sigla em inglês, PDD-NOS).

Por fim, em 2013, o DSM-V foi lançado, passando a englobar todas as subcategorias presentes no DSM-IV em um único termo: Transtorno do Espectro Autista (HERMAN, 2019), um único e altamente heterogêneo transtorno.

3.1.2 Componentes

Inúmeras causas têm sido correlacionadas com a manifestação de TEA. Sabe-se que o TEA possui um grande componente genético, identificado através de estudos envolvendo gêmeos univitelinos e bivitelinos, mostrando uma herdabilidade alta de 36 a 96% (RONALD; HOEKSTRA, 2011).

O sistema imune também parece ter um papel importante no TEA. Padrões de citocinas (compostos altamente importantes na regulação da resposta imune) parecem ser diferentes em pacientes com casos graves de TEA em comparação aos casos com menos severidade (AL-AYADHI; MOSTAFA, 2013), além da presença mais elevada de alergias (MEAD; ASHWOOD, 2015; MOSTAFA; AL-AYADHI, 2013) e de autoanticorpos anti-proteínas cerebrais (MAZUR-KOLECKA *et al.*, 2014; MEAD; ASHWOOD, 2015; MOSTAFA; AL-AYADHI, 2013) em crianças com TEA. Além disso, mães grávidas de crianças que posteriormente viriam a desenvolver TEA apresentaram níveis mais elevados de certas citocinas (IL-4, IL-5 e IFN- γ) em comparação a mães que viriam a ter filhos não diagnosticados com TEA (GOINES *et*

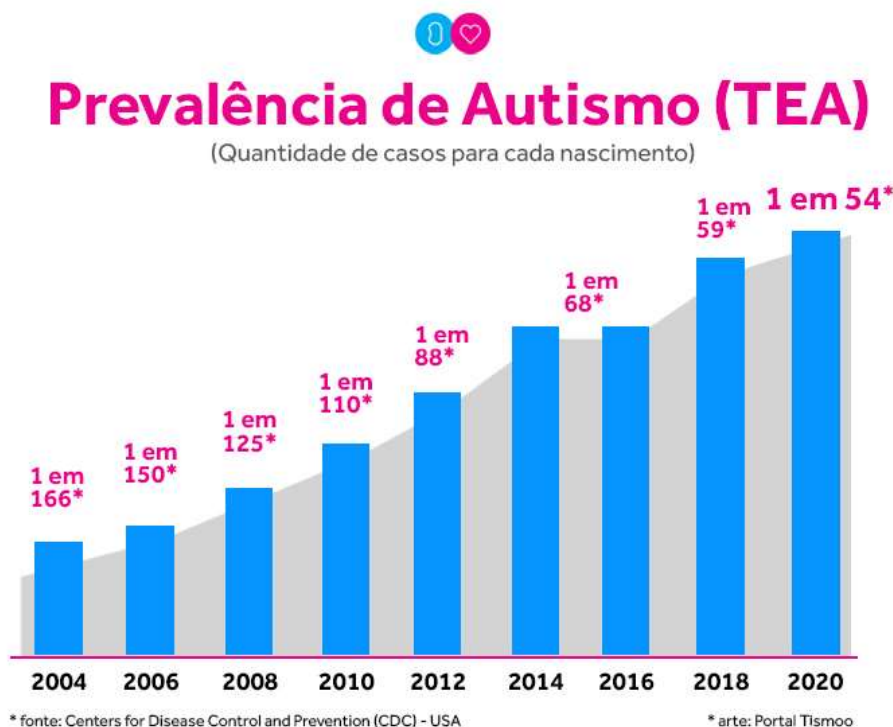
al., 2011; MEAD; ASHWOOD, 2015). Entretanto, ainda não é consenso se essas características são as responsáveis pela manifestação de TEA, consequências deste transtorno ou somente ocorrem ao acaso.

A vitamina D também tem sido um grande alvo de estudos no campo do TEA, visto na sua importância em inúmeras rotas do metabolismo (inclusive no sistema imune) e na alta frequência de pessoas na população em geral apresentando deficiência dessa vitamina.

3.1.3 Incidência Mundial e no Brasil

Segundo estimativas da Rede de Monitoramento de Autismo e Deficiências do Desenvolvimento (da sigla em inglês, ADDM) do CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos) coletadas em 2016 e publicadas em 2020, uma a cada 54 crianças são diagnosticadas com TEA nos Estados Unidos (MAENNER *et al*, 2020). Esse valor é quase três vezes maior do que os dados obtidos em 2000 (que mostravam a ocorrência de um caso a cada 150 crianças) (MAENNER *et al*, 2020). O aumento drástico na incidência provavelmente deve-se ao maior conhecimento tanto científico quanto pela população em geral sobre o transtorno, levando por consequência a um maior número de diagnósticos. Entretanto, ainda muito se discute sobre se esse aumento é totalmente fruto do acréscimo nos diagnósticos ou se fatores contemporâneos (como modificações nos hábitos alimentares, no estilo de vida, poluição) também exercem algum papel no aumento do número de casos.

Figura 1 – Prevalência do Transtorno do Espectro Autista nos EUA de 2004 até 2020



Fonte: MAENNER et al., 2020. Arte por Portal Tismoo.

Além disso, os dados mostram uma prevalência de TEA até quatro vezes maior em meninos que em meninas (MAENNER *et al.*, 2020). Essa alta diferença na prevalência ainda é muito estudada, trazendo possíveis cenários onde questões hormonais como diferenças na produção de testosterona são as responsáveis (BARON-COHEN, 2002; WERLING; GESCHWIND, 2013). Questões comportamentais e culturais – como a capacidade de cada pessoa “camuflar” os sintomas ao ser capaz de mimetizar o comportamento de outras pessoas (HULL *et al.*, 2019) – referentes a cada sexo podem contribuir para essa divergência (GREEN *et al.*, 2019). Apesar dessa aparente discrepância entre a incidência de TEA, o Transtorno parece atingir de forma semelhante ambos os sexos, não havendo diferença na gravidade (WERLING; GESCHWIND, 2013).

Já no Brasil, ainda poucos estudos analisaram a presença do TEA na população. Um estudo piloto estudou uma população de Atibaia, um município de São Paulo, e indicou a presença de uma pessoa com TEA a cada 367 pessoas (RIBEIRO, 2007). No entanto, seguindo as estimativas da ONU (em que 1% da população possui TEA), teríamos mais de dois milhões de pessoas apresentando TEA no Brasil. Com

isso, torna-se claro que é necessário a realização de mais estudos populacionais brasileiros para elucidar a real incidência de TEA.

3.2 VITAMINA D

O termo “Vitamina D” refere-se a um conjunto de compostos lipossolúveis com funções importantes na deposição óssea, manutenção de cálcio e fosfato, além de outras interações com componentes do sistema imune, mas muitas vezes é utilizado para designar o papel da forma ativa desse conjunto de moléculas, chamada de calcitriol.

3.2.1 Síntese, Distribuição e Mecanismo de Ação

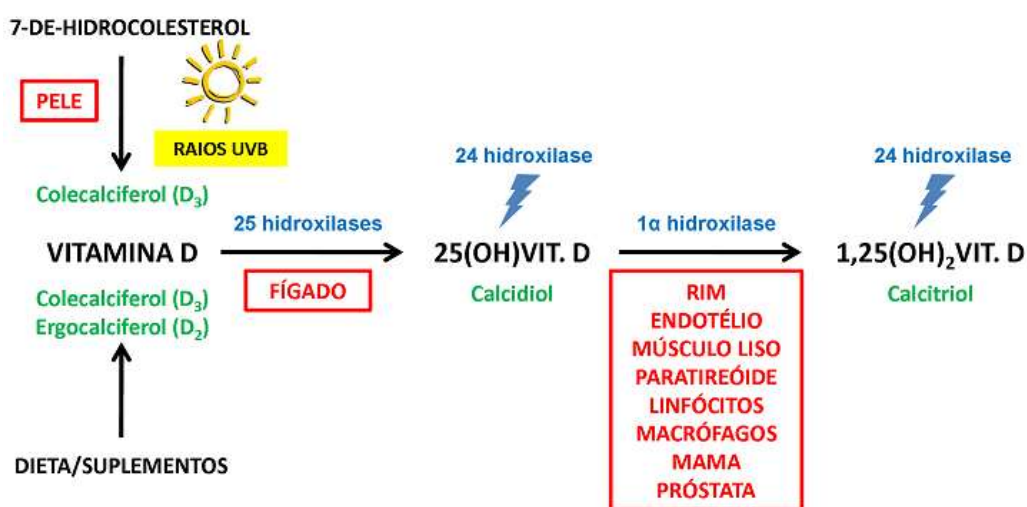
Fungos e alimentos de origem animal como peixes e ovos são as principais fontes alimentares de vitamina D (LIU, J., 2012). Entretanto, estima-se que 80-90% da vitamina D adquirida por um indivíduo seja sintetizada com auxílio do sol, mais especificamente pela ação da luz ultravioleta B (UVB).

Em humanos, o ciclo da vitamina D começa com a conversão da provitamina D (7-deidrocolesterol), presente na epiderme, na pré-vitamina D através de uma catálise fotolítica realizada pela radiação UVB, seguida pela isomerização térmica da pré-vitamina D que dá origem à vitamina D₃ (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; HOLICK, M. F. *et al.*, 1977). A vitamina D₃, por sua vez, ainda precisa ser metabolizada no fígado em calcidiol (25(OH)D₃) (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; HOLICK, Michael F., 1981) e posteriormente, distribuída pelo corpo, sendo o calcidiol metabolizado em calcitriol (1,25(OH)₂D₃) principalmente nos rins (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; FRASER; KODICEK, 1970) mas também em células de outros órgãos do corpo (HEWISON *et al.*, 2004), conforme a Figura 1.

O calcitriol é o composto ativo responsável pela maioria das funções desempenhadas pela vitamina D, desempenhando papel regulador em inúmeras células (HEWISON *et al.*, 2004). Após sua metabolização, a substância se liga ao Receptor de Vitamina D (VDR), e migra para o núcleo das células atuando na transcrição de uma grande variedade de genes (BOUILLON *et al.*, 2008; JURUTKA *et al.*, 2001; SCHUSTER, 2011). Essa ligação gera uma mudança conformacional no

VDR, o que leva a sua dimerização com proteínas receptoras de retinoide X (RXR). Este novo complexo é capaz de reconhecer e transcrever sequências específicas de DNA conhecidas como Elementos Responsivos à Vitamina D (também conhecidos pela sigla VDRE) (CHRISTAKOS *et al.*, 2016; WANG, T.-T. *et al.*, 2005). Estudos indicam que esse complexo é capaz de regular a transcrição de aproximadamente 900 genes (BOUILLON *et al.*, 2008; JURUTKA *et al.*, 2001; SCHUSTER, 2011).

Figura 2 – Metabolismo Inicial da Vitamina D



Fonte: Retirada do site www.sbn.org.br

3.2.2 Importância

A vitamina D tem um papel fundamental na regulação dos níveis de cálcio, permitindo sua absorção no intestino delgado assim como a manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo na corrente sanguínea. Com isso, a vitamina D tem um papel fundamental na formação óssea, através da mineralização dos ossos – juntamente com o paratormônio (KULIE *et al.*, 2009).

Além disso, a vitamina D tem uma importante função na proteção contra o câncer (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005), possuindo capacidades antiproliferativas (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005), detoxificação xenobiótica, e também desempenha um papel importante no sistema imune, através de sua ação anti-inflamatória (HAUSSLER *et al.*, 2013) e imunoregulatória sobre diversas células do sistema imune (PRIETL *et al.*, 2013).

3.2.3 Deficiência de Vitamina D no Brasil e no Mundo

A hipovitaminose D, também chamada de deficiência de vitamina D, é uma doença caracterizada pela presença de baixas quantidades de vitamina D. A principal forma de diagnóstico envolve a quantificação do nível sérico de 25(OH)D, sendo caracterizadas como hipovitaminose D, normalmente, quantidades inferiores a 20ng/mL. Em 2018, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia e a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial atualizaram suas recomendações, indicando a manutenção de níveis maiores que 20ng/mL para indivíduos saudáveis e níveis maiores de 30ng/mL para os grupos de risco (englobando idosos maiores de 60 anos, gestantes, portadores de doenças osteometabólicas, diabetes, neoplasias, entre outros) (FERREIRA *et al.*, 2017).

Em crianças, a deficiência de vitamina D é uma das principais causadoras de raquitismo, uma doença óssea caracterizada por retardo de crescimento e desenvolvimento motor, deformidades ósseas – principalmente nas pernas e coluna – e problemas de desenvolvimento dentais (CREO *et al.*, 2017). A doença afeta, em sua maioria, pessoas com pele mais escura, visto que essas pessoas possuem uma maior deposição de melanina (composto polimérico responsável pela proteção contra a radiação UV, que acaba atuando como um “competidor” para a produção de vitamina D). Além do raquitismo causado pela deficiência em vitamina D (chamado de raquitismo nutricional, que além da vitamina D pode ser causado pela deficiência em cálcio e fosfato), pode-se elencar também o chamado raquitismo genético, que é causado principalmente por mutações em genes da rota do cálcio, do fosfato e/ou da vitamina D.

O raquitismo se tornou bastante recorrente no mundo após o início da Revolução Industrial, devido ao aumento da emissão de poluentes atmosféricos. Dados indicam que a doença atingiu de 50 a 80% das crianças nascidas no norte da Europa durante o início da Revolução Industrial (HOCHBERG; HOCHBERG, 2019). Para contornar esse problema, muitos países autorizaram a produção e venda de produtos biofortificados com vitamina D, diminuindo drasticamente os casos de raquitismo.

Atualmente, estima-se que um bilhão de pessoas no mundo tenha deficiência dessa vitamina (HOLICK, Michael F., 2007; SIZAR *et al.*, 2021), tornando a deficiência de vitamina D um problema de saúde pública (VAN SCHOOR; LIPS, 2017). Apesar da exposição solar ser o principal mecanismo de aquisição de vitamina D, a prevalência de hipovitaminose D não está exclusivamente concentrada em países com baixa incidência solar, sendo importante considerar também outros fatores como as etnias encontradas na região (acarretando numa diferença na deposição de melanina e numa conseqüente potencial diferença na taxa de produção de vitamina D) e o nível de exposição solar da população em geral – altamente influenciado pelo estilo de vida que, na sociedade contemporânea, é majoritariamente caracterizado por várias horas de trabalho em ambientes com pouca ou nenhuma incidência solar). Além disso, eventos migratórios mais recentes também podem contribuir para a distribuição de pessoas com diferentes perfis de melanina em países de baixa incidência solar (CREO *et al.*, 2017; LIPS; DE JONGH, 2018).

Tal como no mundo, o Brasil apresenta grandes taxas de hipovitaminose D em sua população (PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2019; PETERS *et al.*, 2009). Segundo uma revisão de Pereira-Santos *et al.*, (2019), 28,16% da população apresenta deficiência (quantidades inferiores a 20ng/mL) de vitamina D enquanto 45,26% apresenta insuficiência de vitamina D (valores entre 20 e 32ng/mL).

3.2.4 Vitamina D e TEA

Estudos têm mostrado uma prevalência maior de deficiência em vitamina D em grupos de crianças com TEA em comparação com grupos-controle sem o transtorno (ALTUN *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2017; WANG, T. *et al.*, 2016). Inclusive, estudos populacionais analisaram a presença de TEA conforme as estações do ano, mostrando um maior nascimento de pessoas com TEA durante o inverno, além de uma maior presença de TEA em pessoas apresentando pele com tonalidade mais escura (CANNELL, 2008).

Além disso, o cálcio parece ter algum papel no TEA. A Síndrome de Timothy (uma síndrome genética com alta mortalidade, mas que apresenta traços semelhantes ao TEA em pacientes que sobrevivem) é causada por uma mutação em um receptor de cálcio (GARGUS, J. J., 2009; IMBRICI; CAMERINO; TRICARICO, 2013), além de certas mutações funcionais em genes relacionados ao metabolismo do cálcio já terem

sido descritas em pessoas com TEA (GARGUS, J.; IMTIAZ, 2008; GARGUS, J. J., 2009). Considerando a relação intrínseca entre vitamina D e cálcio, polimorfismos nos genes da via da Vitamina D podem afetar a homeostase do cálcio e consequentemente impactar a tipologia do TEA.

Apesar de várias evidências indicarem um possível impacto da vitamina D no TEA, o real papel desta molécula ainda não é completamente elucidado e mais estudos são necessários para compreender completamente as conexões entre TEA e vitamina D.

3.3 RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR)

3.3.1 Funções

Após a conversão dos intermediários da vitamina D na forma ativa, o calcitriol entra na célula ligado a ligantes de Vitamina D. No citoplasma, o calcitriol se liga ao Receptor de Vitamina D (VDR), uma proteína que sofre uma mudança de conformação ao se ligar com o calcitriol – fazendo com que esse complexo migre para o núcleo da célula. Ao adentrar o núcleo, o VDR ligado ao calcitriol se liga a uma proteína da classe RXR, aumentando sua afinidade com regiões específicas do DNA, chamadas de Elemento de Resposta à Vitamina D (VDRE). Esse complexo é capaz de recrutar uma série de fatores de transcrição secundários, podendo levar à transcrição ou inibição da região (CHRISTAKOS *et al.*, 2016; ORLOV *et al.*, 2012). Apesar de algumas ações serem desempenhadas pelo calcitriol somente, e outras apenas pelo VDR sem a necessidade da ligação, a maioria dos efeitos atribuídos à vitamina D são desempenhados através da ligação calcitriol-VDR (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005), mostrando a importância dessa proteína para o metabolismo como um todo.

A proteína VDR é majoritariamente expressa em células epiteliais do intestino, mas também em algumas células ósseas e em células do sistema imune (WANG, Y.; ZHU; DELUCA, 2012), além de já ter sido descrita em tecido cerebral (BIVONA *et al.*, 2019; EYLES *et al.*, 2005). Além de todos os efeitos já citados anteriormente, o VDR quando ligado com o calcitriol é capaz de induzir a expressão da catelicidina (WANG, T.-T. *et al.*, 2004), um peptídeo antimicrobiano importante para a resposta imune contra patógenos.

3.3.2 Variantes do gene

O gene *VDR*, que codifica a proteína de mesmo nome, é encontrado no braço longo do cromossomo 12 humano. Ele conta com 11 éxons (MIYAMOTO *et al.*, 1997), sendo que a expressão da proteína é mais frequentemente iniciada no éxon 2.

Variantes patogênicas no gene de *VDR* são responsáveis por um tipo de raquitismo genético chamado de raquitismo hereditário resistente a 1,25-dihidroxitamina D (MACEDO *et al.*, 2008). Por tratar-se de um problema na proteína *VDR*, impedindo a transdução do sinal da vitamina D para a parte genômica, a administração de vitamina D não é capaz de reverter os sintomas em pacientes com essa doença. Variantes consideradas como não diretamente responsáveis por uma patologia determinada têm sido alvo de estudos como possíveis fatores de risco para patologias altamente multifatoriais. Dentre essas, a variante FokI tem apresentado bastante potencial, mostrando-se como uma das únicas e mais conhecidas variantes capazes de interferir na sequência proteica da proteína *VDR*.

3.3.3 Variante FokI

A variante FokI (rs2228570-C/T) do gene *VDR* é encontrada no primeiro códon ATG do éxon 2 (UITTERLINDEN *et al.*, 2004). Como a variante proteica de *VDR* mais comumente expressa é iniciada no éxon 2, essa variante ocorre no códon de iniciação da proteína. Quando uma timina (alelo f) estiver presente nessa posição, a leitura do ribossomo pode iniciar nesse códon, permitindo a expressão de uma proteína de 427 aminoácidos. Entretanto, quando está presente uma citosina (alelo F) nessa posição, o códon ATG é interrompido (passando a ser um códon ACG que não atua como códon de iniciação), o que acarreta na expressão de uma proteína menor (iniciada apenas no próximo códon ATG, a três códons de distância do original) com 424 aminoácidos (UITTERLINDEN *et al.*, 2004).

Em estudos funcionais, a proteína de menor tamanho molecular (424 aminoácidos) gerada pelo alelo F já mostrou possuir uma maior atividade transcricional em relação a proteína de tamanho maior (427 aminoácidos) gerada pelo alelo f (ARAI *et al.*, 1997), provavelmente significando que essa variante interfere no metabolismo da vitamina D.

Considerando o papel da variante FokI na proteína VDR, e conseqüentemente sua interferência no metabolismo da vitamina D, esse trabalho visa investigar um possível papel de FokI na sintomatologia do Transtorno do Espectro Autista.

4 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO IMMUNOGENETICS

Association between FokI variant in Vitamin D Receptor gene and Autism Spectrum Disorder

Guilherme Luís Tyska-Nunes ¹, Valéria de Lima Kaminski ², Marina Ziliotto ¹, Jaqueline Bohrer Schuch ³,
Tatiana Roman ⁴, José Artur Bogo Chies ¹

¹Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

³Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Dr. José Artur Bogo Chies. Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética (Prédio 43323, Laboratório 212), Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Porto Alegre - RS, Brasil, Phone: +5551 33086737. E-mail: jabchies@terra.com.br

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a disorder with genetic and environmental components, although the exact causes are yet to be defined. Vitamin D is a strong candidate in ASD heterogeneity studies since low levels of vitamin D have been described in ASD people as compared to non-ASD people. Calcitriol, the active form of vitamin D, interacts with Vitamin D Receptor (VDR) and regulates calcium and phosphate homeostasis, acting in the cell cycle regulation, and plays some immunological roles such as induction of antimicrobial peptides expression. The FokI *VDR* gene variant (rs10735810-C/T) alters both VDR structure and activity: the protein expressed by the F allele (C) has a smaller size and higher activity as compared to the protein expressed by the f allele (T). This study aims to analyze the FokI variant in ASD patients, searching for an association with ASD symptomatology. The FokI variant of the *VDR* gene was genotyped in 149 individuals diagnosed with ASD. The DNA samples were amplified by PCR, cleaved by FokI enzyme, and genotyped by electrophoresis in agarose gel 3%. The chi-squared analysis was utilized to test the association between genotypes and the symptoms. Genotypes with f allele were initially associated with presence of convulsion ($p=0.024$; $pc=0.24$), absence of panic attacks ($p=0.01$; $pc=0.1$) and absence of auto-aggressive behavior ($p=0.032$; $pc=0.32$). However, none of these associations stayed significant after the Bonferroni correction (pc), suggesting the absence of a direct correlation between this genetic variant and the development of ASD symptoms. Despite the lack of association, new studies are necessary to truly understand the genetics of this disorder.

Keywords: vitamin D, ASD, VDR, immunometabolism, FokI, rs2228570

Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) can be defined as a set of neurodevelopmental disorders generally characterized by repetitive, restrictive, and stereotypical behaviors, as well as lack of communication skills. This disorder has been linked with a strong genetic factor, evidenced by a high concordance (36-96%) in monozygotic

twins (Ronald and Hoekstra 2011), although environmental risk components, associated mostly with prenatal injuries such as hypoxia, ischemia, and contact with heavy metals or nutritional elements deficiency such as zinc and vitamin D deficiency (Modabbernia et al. 2017) and other vitamins like vitamin B12 (Altun et al. 2018), were also described. ASD also seems to have an immune component, indicated by the differential expression of immune genes (Meltzer et al. 2017) and anti-brains autoantibodies (Meltzer et al. 2017), as well as a differential presence and levels of cytokines in mothers of children with ASD during pregnancy (Goines et al. 2011; Mead and Ashwood 2015). Many other elements seem to be related to ASD development, but studies are still being doing aiming to a better comprehension of this disorder.

Vitamin D has been described as a possible risk factor to ASD development since lower vitamin D levels have been consistently found more frequently in subjects with ASD when compared to non-ASD controls (Altun et al. 2018; Wang et al. 2016; Feng et al. 2017; Guo et al. 2018). Moreover, vitamin D supplementation has been associated with an improved outcome and a significant decrease in symptoms in ASD patients (Feng et al. 2017). However, some studies reported no impact in symptomatology after vitamin D supplementation (Kerley et al. 2017), being the consequences of such procedure in ASD still controversial.

Considering vitamin D metabolism, in the cell cytoplasm, the active form of vitamin D, calcitriol (1,25(OH)₂D₃), forms a complex with the Vitamin D Receptor (VDR). Binding of the calcitriol molecule generates a conformational change in VDR which leads to heterodimerization with retinoid X receptors (RXR) proteins. This complex recognizes specific DNA sequences known as vitamin D response elements (VDRE) (Wang et al. 2005; Christakos et al. 2016), and regulates, directly or indirectly, approximately 900 genes (Schuster 2011; Jurutka et al. 2001; Bouillon et al. 2008). Calcitriol is mainly involved in the regulation of calcium and phosphate absorption but also plays important roles in parathyroid hormone (PTH) regulation, xenobiotic detoxification, and anti-inflammatory pathways (Haussler et al. 2013).

VDR is expressed in many cell types, but mostly in intestinal epithelial cells (Wang et al. 2012). Two main isoforms are translated from the *VDR* gene: the principal isoform, with 427 or 424 amino acids (aa), called VDRA, and an alternative isoform with 477 aa called VDRB1. VDRA is the most common isoform, being three times more frequent than VDRB1 in cells (Sunn et al. 2001). Also, this isoform presents a higher calcitriol-dependent transactivation index (Sunn et al. 2001). These differences between the two isoforms seem to have evolutionary importance (Zenata and Vrzal 2017; Gardiner et al. 2004), with a probable ligand and tissue-specific pathway. The transcription of *VDRA* (which will be generally referred as VDR along this manuscript) starts in exon 2. Since the FokI variant affects the structure of both isoforms, due to a missense change in VDRB1 isoform and a start codon loss/gain in VDRA isoform, this polymorphism may have an important impact on vitamin D metabolism and, consequently, in ASD development.

FokI (rs2228570-C/T) variation is situated in the second nucleotide of the first ATG codon of *VDR* gene. This single nucleotide variant (SNV) is a gain/loss-type codon variant: the maintenance of nucleotide thymine (T), characteristic of the “F” allele, allows early transcription start and generates a longer version of VDRA (a protein with 427 amino acids). However, when a cytosine (C) is present at this position, characterizing the “F” allele, the consequent loss of this early start codon only allows transcription at a second start codon, three codons apart from the first one, generating a smaller VDRA molecule (a protein variant with 424 amino acids) which exhibits more transcriptional activity than the longer VDRA form (Arai et al. 1998). Considering the VDRB1 isoform, this variant generates a missense mutation, changing a nonpolar amino acid (methionine) to a polar amino acid (threonine). However, the functional impact of FokI in VDRB1 is still unknown.

The FokI impact in VDR activity has made this variant an important target, being mostly studied focused on its potential impacts on cancer (Gnagnarella et al. 2014), although there are also some data about immune diseases like systemic lupus erythematosus (Monticcielo et al. 2012). Studies including ASD also have evaluated FokI haplotypes and manifestations of the disorder (Kaminski et al. 2021).

Taking into consideration the possible impact of vitamin D in ASD symptomatology, the influence of VDR in the vitamin D pathway and the changes in VDR provoked by FokI, this study aims to investigate FokI genotype frequencies in an ASD cohort and the potential association of this variant and the development of ASD symptoms.

Patients and Methods

Study population

The study population consists of 149 patients diagnosed with ASD according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV (DSM-IV), as previously described in Schuch et al. (2006). The clinical and demographic specifics of the patients are described in Table 1.

Table 1
Demographic and clinical characteristics of ASD samples (n=149)

Age (years) ¹		10.18 ± 5.22
Gender (male) ²		78.5% (117)
Ethnicity ²	European	75% (111)
	Afro-American	7,4% (11)
	Others ³	17,6% (26)
Symptoms ^{2, 4}	Epilepsy	12.1% (18)
	Sleep disorders	58.4% (87)
	Mood instability	45.6% (68)
	Hetero-aggressive behavior	33.6% (50)
	Self-aggressive behavior	47.7% (71)
	Repetitive Behavior	74.5% (111)
	Convulsion	27.5% (41)
	Hyperactivity	59.1% (88)
	Echolalia	66.4% (99)
	Panic	27.5% (41)
ASQ ^{1, 5}		21.86 ± 5.56
CARS ^{1, 6}		35.46 ± 5.51

¹ Mean ± SD

² % (n)

³ Amerindian and Asian ethnicities were also present in the sample.

⁴ The informed percentages and numbers refer to the total of patients presenting each symptom

⁵ Autism Screening Questionnaire

⁶ Childhood Autism Rating Scale

The samples of both biological parents of 44 patients were also utilized to perform the transmission disequilibrium test (TDT).

Genotyping of FokI (rs2228570)

All samples were genotyped by a PCR-RFLP technique. DNA samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The primers used were 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' and 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (Harris et al. 1997). The cycling conditions were set as follows: one cycle at 94°C for 5 min, 35 cycles at (94°C for 30 s, 61°C for 30 s, 72°C for 60 s), and a final cycle of extension at 72°C for 10 min. The PCR product of 265 bp was cleaved by FokI (FastDigest, Thermo Fischer) at 37°C for 15 min. The genotyping of FokI was realized in agarose gel 3% as previously described by Monticcielo et al (2012).

Statistical analysis

Chi-square 2-sided was utilized to evaluate possible associations between genotypes and symptoms. All chi-squared analyses were performed with the use of SPSS software (IBM, version 18). Bonferroni correction was applied to account for multiple tests (n = 10).

The transmission disequilibrium test (TDT) was made using a family-based approach in the FBAT (family-based association test) software.

Ethnic-based analyses were not performed due to the small number of individuals classified as Afro-descendants (37 out of 149), being the group examined as a general admixed population.

Results

Genotype frequencies of FokI were in accordance with frequencies expected for Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.576$). The presence of genotypes carrying the f allele (Ff and ff genotypes) was initially associated with the following clinical features: absence of panic ($p=0.010$, $pc=0.10$), presence of convulsion ($p=0.024$, $pc=0.24$), and absence of self-aggressive behavior ($p=0.032$, $pc=0.32$), and a trend of association with the presence of hyperactivity ($p=0.058$, $pc=0.58$) (Table 2). However, all these initial associations lost statistical significance after Bonferroni correction (pc).

Table 2
Associations between VDR FokI and ASD-related behaviors (n=149)

Symptom	Genotype	Absence, n (%)	Presence, n (%)	OR (CI 95%)	<i>p</i>	<i>pc</i>
Panic	CC (FF)	38 (35.2)	24 (58.5)			
	CT + TT (Ff + ff)	70 (64.8)	17 (41.5)	OR 0.38 (0.18-0.80)	0.010	0.10
Convulsion	CC (FF)	51 (47.2)	11 (26.8)			
	CT + TT (Ff + ff)	57 (52.8)	30 (73.2)	OR 2.44 (1.11-5.36)	0.024	0.24
Self-aggressive behavior	CC (FF)	26 (33.3)	36 (50.7)			
	CT + TT (Ff + ff)	52 (66.6)	35 (49.3)	OR 0.49 (0.25-0.94)	0.032	0.32
Hyperactivity	CC (FF)	31 (50.8)	31 (35.2)			
	CT + TT (Ff + ff)	30 (49.2)	57 (64.8)	OR 1.90 (0.98-3.70)	0.058	0.58
Echolalia	CC (FF)	26 (52.0)	36 (36.4)			
	CT + TT (Ff + ff)	24 (48.0)	63 (63.6)	OR 1.90 (0.95-3.78)	0.067	0.67
Mood instability	CC (FF)	30 (37.0)	32 (47.1)			
	CT + TT (Ff + ff)	51 (63.0)	36 (52.9)	OR 0.66 (0.34-1.28)	0.216	n.s.
Hetero-aggressive behavior	CC (FF)	44 (44.4)	18 (36.0)			
	CT + TT (Ff + ff)	55 (55.6)	32 (64.0)	OR 1.42 (0.71-2.86)	0.323	n.s.

Sleep disorders	CC (FF)	24 (38,7)	38 (43.7)			
	CT + TT (Ff + ff)	38 (61.3)	49 (56.3)	OR 0.81 (0.42-1.58)	0.544	n.s.
Repetitive Behavior	CC (FF)	14 (36.8)	48 (43.2)			
	CT + TT (Ff + ff)	24 (63.2)	63 (56.8)	OR 0.77 (0.36-1.64)	0.490	n.s.
Epilepsy	CC (FF)	54 (41.2)	8 (44.4)			
	CT + TT (Ff + ff)	77 (58.8)	10 (55.6)	OR 0.88 (0.32-2.36)	0.795	n.s.

n.s. = non significant. **bold** = significant ($p < 0.05$). p_c = p corrected with Bonferroni ($n = 10$)

The TDT analyses of VDR FokI did not detect any allele preferential transmission ($p = 0.507$) from parents to the ASD individuals, how described in Table 3.

Table 3

Analysis of FokI using the family-based association test.

Gene/Polymorphism	Allele	Informative families	Observed transmission	Expected transmission	Z	P-value
VDR FokI	F	44	51	53.5	-0.662	0.507
	f		37	34.5	0.662	

Discussion

Genetic variants of *VDR* have already been correlated with the presence of ASD, as previously reviewed by our group (Kaminski et al. 2021). FokI alone has not been correlated with a change in ASD incidence risk (being more evidenced by our non-significative results in TDT test), however, few studies evaluated its impact on ASD symptomatology. Besides, previous studies approaching other *VDR* gene polymorphisms, such as BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236) suggested different degrees of linkage disequilibrium between them and FokI (Uitterlinden et al. 2004), highlighting the need for studies encompassing this genetic variant.

Lower vitamin D levels have also been described in people with panic attacks (Liu et al. 2020), as well as lower levels of vitamin D and VDR in attention-deficit/hyperactivity disorder patients (Sahin et al. 2018) in comparison with control groups without these respective disorders. Besides, vitamin D is a known neuroregulator, including serotonin regulation (Patrick and Ames 2014), an important neurotransmitter closely related to panic disorder (Maron and Shlik 2005), as well as dopamine regulation (Pertile et al. 2018; Bivona et al. 2019), another neurotransmitter intimately connected with motor control which its dysregulation often appears associated with hyperactivity (Klein et al. 2019; Bivona et al. 2019). Vitamin D importance in brain pathways is also evidenced by the wide expression of VDR in multiple regions of both embryonic and adult brain (Eyles et al. 2004; Bivona et al. 2019). Interesting, studies in rodent models with maternal vitamin D deficiency during pregnancy showed enduring changes in brain architecture in the offspring's birth (Grecksch et al. 2009; Bivona et al. 2019). Considering these data, the FokI variant can affect the regulation of these multiple brain pathways *in vivo* due to the activity change provoked by the change in the protein structure, impacting the symptomatology manifestation.

Experiments in animal models have indicated a vitamin D impact in seizure manifestation. Calcitriol injection in the hippocampus of rats induced a decrease of seizure threshold for electric stimulation-provoked seizures (Siegel et al. 1984) even as an anticonvulsant role in seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) (Kalueff et al. 2005; De Abreu et al. 2009) - a chemical commonly used in epileptic studies. VDR also seems to

have involved in the seizure role, since mice with a *VDR* gene knockout presented more intense PTZ-induced seizures and a higher mortality rate (Kalueff et al. 2006), and the *VDR* mRNA expression was increased within the hippocampus in rats after pilocarpine-induced seizures (Janjoppi et al. 2008), another chemical known to induce seizures. Moreover, seizures are a symptom of hypocalcemia that can be caused by vitamin D deficiency (Manappallil et al. 2020). These data evidence a vitamin D pathway in both electric and chemical induction models of seizures, but since only animal models were investigated, more studies need to be done to evaluate this impact on human physiology.

Our results suggest an absence of a direct link between ASD symptoms development and the variant FokI in a southern Brazilian sample. However, these data can also be interpreted as due to a weak impact, or the existence of a redundant pathway, capable to bypass the FokI variant effect in the ASD pathophysiology. Also, the allele may be important or significant only when associated to other risk factors (e.g., hypovitaminosis D, genetic/ethnic background, other SNVs). Therefore, more studies need to be done, encompassing different human populations in different contexts, in order to allow a better comprehension of the true impact of this genetic variant in the etiology of ASD.

References

- Altun H, Kurutaş EB, Şahin N, et al (2018) The Levels of Vitamin D, Vitamin D Receptor, Homocysteine and Complex B Vitamin in Children with Autism Spectrum Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 16:383–390. <https://doi.org/10.9758/cpn.2018.16.4.383>
- Arai H, Miyamoto K-I, Taketani Y, et al (1997) A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women. *Journal of Bone and Mineral Research* 12:915–921. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.6.915>
- Bivona G, Gambino CM, Iacolino G, Ciaccio M (2019) Vitamin D and the nervous system. *Neurological Research* 41:827–835. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1622872>
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al (2008) Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocr Rev* 29:726–776. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, et al (2016) Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 96:365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Eyles DW, Smith S, Kinobe R, et al (2005) Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 29:21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.08.006>
- Feng J, Shan L, Du L, et al (2017) Clinical improvement following vitamin D3 supplementation in Autism Spectrum Disorder. *Nutritional Neuroscience* 20:284–290. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1123847>
- Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Féron F (2009) Vitamin D, a neuro-immunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* 34:S265–S277. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.023>
- Gardiner EM, Esteban LM, Fong C, et al (2004) Vitamin D receptor B1 and exon 1d: functional and evolutionary analysis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89–90:233–238. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.078>
- Gnagnarella P, Pasquali E, Serrano D, et al (2014) Vitamin D receptor polymorphism FokI and cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Carcinogenesis* 35:1913–1919. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu150>
- Grecksch G, Rùthrich H, Hòllt V, Becker A (2009) Transient prenatal vitamin D deficiency is associated with changes of synaptic plasticity in the dentate gyrus in adult rats. *Psychoneuroendocrinology* 34:S258–S264. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.07.004>
- Goines PE, Croen LA, Braunschweig D, et al (2011) Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Molecular Autism* 2:13. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-13>
- Guo M, Li L, Zhang Q, et al (2018) Vitamin and mineral status of children with autism spectrum disorder in Hainan Province of China: associations with symptoms. *Nutritional Neuroscience* 23:803–810. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1558762>
- Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, et al (1997) The Vitamin D Receptor Start Codon Polymorphism (FokI) and Bone Mineral Density in Premenopausal American Black and White Women. *Journal of Bone and Mineral Research* 12:1043–1048. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.7.1043>
- Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al (2013) Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif Tissue Int* 92:77–98. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9619-0>
- Janjoppi L, Katayama MH, Scorza FA, et al (2008) Expression of vitamin D receptor mRNA in the hippocampal formation of rats submitted to a model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine. *Brain Research Bulletin* 76:480–484. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.01.002>

- Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh J-C, et al (2001) Molecular Nature of the Vitamin D Receptor and its Role in Regulation of Gene Expression. *Rev Endocr Metab Disord* 2:203–216. <https://doi.org/10.1023/A:1010062929140>
- Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, et al (2006) Increased severity of chemically induced seizures in mice with partially deleted Vitamin D receptor gene. *Neuroscience Letters* 394:69–73. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.007>
- Kalueff AV, Minasyan A, Tuohimaa P (2005) Anticonvulsant effects of 1,25-dihydroxyvitamin D in chemically induced seizures in mice. *Brain Research Bulletin* 67:156–160. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.06.022>
- Kerley CP, Power C, Gallagher L, Coghlan D (2017) Lack of effect of vitamin D3 supplementation in autism: a 20-week, placebo-controlled RCT. *Arch Dis Child* 102:1030–1036. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2017-312783>
- Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, et al (2019) Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol* 39:31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
- Liu C, Jiang W, Deng M, et al (2020) Lower vitamin D levels in panic attacks in Shanghai: A case-control study. *Asian Journal of Psychiatry* 51:101948. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2020.101948>
- Manappallil RG, Krishnan R, Veetil PP, et al (2020) Hypocalcemic Seizure Due to Vitamin D Deficiency. *Indian J Crit Care Med* 24:882–884. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23586>
- Maron E, Shlik J (2006) Serotonin Function in Panic Disorder: Important, But Why? *Neuropsychopharmacology* 31:1–11. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300880>
- Mead J, Ashwood P (2015) Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunology Letters* 163:49–55. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.11.006>
- Meltzer A, Van de Water J (2017) The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacol* 42:284–298. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.158>
- Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A (2017) Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism* 8:13. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>
- Monticielo O, Brenol J, Chies J, et al (2012) The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 21:43–52. <https://doi.org/10.1177/0961203311421798>
- Patrick RP, Ames BN (2014) Vitamin D hormone regulates serotonin synthesis. Part 1: relevance for autism. *The FASEB Journal* 28:2398–2413. <https://doi.org/10.1096/fj.13-246546>
- Pertile RAN, Cui X, Hammond L, Eyles DW (2018) Vitamin D regulation of GDNF/Ret signaling in dopaminergic neurons. *The FASEB Journal* 32:819–828. <https://doi.org/10.1096/fj.201700713R>
- Ronald A, Hoekstra RA (2011) Autism spectrum disorders and autistic traits: A decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156:255–274. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31159>
- Sahin N, Altun H, Kurutas EB, Balkan D (2018) Vitamin D and vitamin D receptor levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 14:581–585. <https://doi.org/10.2147/NDT.S158228>
- Schuch JB, Muller D, Endres RG, et al (2014) The role of $\beta 3$ integrin gene variants in Autism Spectrum Disorders—diagnosis and symptomatology. *Gene* 553:24–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.058>
- Schuster I (2011) Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814:186–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.022>
- Siegel A, Malkowitz L, Moskovits MJ, Christakos S (1984) Administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 results in the elevation of hippocampal seizure threshold levels in rats. *Brain Research* 298:125–129. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91153-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91153-3)
- Sunn KL, Cock T-A, Crofts LA, et al (2001) Novel N-Terminal Variant of Human VDR. *Mol Endocrinol* 15:1599–1609. <https://doi.org/10.1210/mend.15.9.0693>
- Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, et al (2004) Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338:143–156. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.014>
- Wang T, Shan L, Du L, et al (2016) Serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 25:341–350. <https://doi.org/10.1007/s00787-015-0786-1>
- Wang T-T, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al (2005) Large-Scale in Silico and Microarray-Based Identification of Direct 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Target Genes. *Molecular Endocrinology* 19:2685–2695. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0106>
- Wang Y, Zhu J, DeLuca HF (2012) Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523:123–133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>

Zenata O, Vrzal R (2017) Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget* 8:35390–35402. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15697>

5 DESENVOLVIMENTO GERAL

A amostragem estudada consiste no DNA de 149 pacientes diagnosticados com TEA conforme a Quarta Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), e amostras familiares completas (contendo amostra do paciente, do pai biológico e da mãe biológica) de 44 pacientes. Os dados coletados envolvem a presença ou não de dez sintomas (Ataques de Pânico, Convulsão, Epilepsia, Comportamento Autoagressivo, Comportamento Heteroagressivo, Hiperatividade, Ecolalia, Labilidade de Humor, Distúrbios do Sono e Comportamento Repetitivo).

A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. As amostras foram amplificadas por PCR convencional. Após a confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose 2%, os amplicons foram clivados pela enzima Fast Digest FokI durante 15 min à 37°C. Os produtos de clivagem, por fim, foram corridos em gel de agarose 3% para genotipagem conforme o padrão de bandas.

Os genótipos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,576$).

Tabela 1 – Distribuição dos genótipos na população estudada (n=149)

Genótipo	Quantidade (n)	Frequência
CC	62	41,6%
CT	63	42,3%
TT	24	16,1%
TOTAL	149	100%

Fonte: Elaboração própria.

A análise de desequilíbrio de transmissão (TDT) realizada nas famílias completas (n=44) não mostrou transmissão preferencial dos alelos ($p=0,507$).

As análises de correlação entre os dez sintomas e os genótipos foram realizadas através de análises qui-quadrado com nível de significância $\alpha=0,05$. Os resultados encontrados foram corrigidos por Bonferroni (n=10) – utilizado devido à realização de múltiplos testes de hipótese.

A correlação entre os genótipos encontrados e os dez sintomas encontrados nos pacientes foi analisada por qui-quadrado. Inicialmente, genótipos com o alelo T (CT e TT) foram associados com presença de convulsões ($p=0,024$, $p_c=0,24$) e apenas

mostrou uma tendência de associação com presença de hiperatividade ($p=0.058$, $p_c=0,58$) foi observada. Estes mesmos genótipos foram também correlacionados com a ausência de ataques de pânico ($p=0,010$, $p_c=0,10$) e ausência de comportamento autoagressivo ($p=0,032$, $p_c=0,32$). Entretanto, após a correção de Bonferroni (p_c) nenhuma das associações se manteve significativa.

Tabela 2 – Análise da correlação entre genótipos e a sintomatologia (n=149)

Sintoma	Genótipo	Ausência, n (%)	Presença, n (%)	OR (CI 95%)	<i>p</i>	<i>p_c</i>
Ataques de Pânico	CC (FF)	38 (35,2)	24 (58,5)			
	CT + TT (Ff + ff)	70 (64,8)	17 (41,5)	OR 0,38 (0,18-0,80)	0,010	0,10
Convulsão	CC (FF)	51 (47,2)	11 (26,8)			
	CT + TT (Ff + ff)	57 (52,8)	30 (73,2)	OR 2,44 (1,11-5,36)	0,024	0,24
Comportamento Autoagressivo	CC (FF)	26 (33,3)	36 (50,7)			
	CT + TT (Ff + ff)	52 (66,6)	35 (49,3)	OR 0,49 (0,25-0,94)	0,032	0,32
Hiperatividade	CC (FF)	31 (50,8)	31 (35,2)			
	CT + TT (Ff + ff)	30 (49,2)	57 (64,8)	OR 1,90 (0,98-3,70)	0,058	0,58
Ecolalia	CC (FF)	26 (52,0)	36 (36,4)			
	CT + TT (Ff + ff)	24 (48,0)	63 (63,6)	OR 1,90 (0,95-3,78)	0,067	0,67
Labilidade de Humor	CC (FF)	30 (37,0)	32 (47,1)			
	CT + TT (Ff + ff)	51 (63,0)	36 (52,9)	OR 0,66 (0,34-1,28)	0,216	n.s.
Comportamento Heteroagressivo	CC (FF)	44 (44,4)	18 (36,0)			
	CT + TT (Ff + ff)	55 (55,6)	32 (64,0)	OR 1,42 (0,71-2,86)	0,323	n.s.
Distúrbios do Sono	CC (FF)	24 (38,7)	38 (43,7)			
	CT + TT (Ff + ff)	38 (61,3)	49 (56,3)	OR 0,81 (0,42-1,58)	0,544	n.s.

Comportamento Repetitivo	CC (FF)	14 (36,8)	48 (43,2)			
	CT + TT (Ff + ff)	24 (63,2)	63 (56,8)	OR 0,77 (0,36-1,64)	0,490	n.s.
Epilepsia	CC (FF)	54 (41,2)	8 (44,4)			
	CT + TT (Ff + ff)	77 (58,8)	10 (55,6)	OR 0,88 (0,32-2,36)	0,795	n.s.

n.s. = não significativo. **negrito** = significativo ($p < 0.05$). p_c = p corrigido por Bonferroni ($n = 10$)

Fonte: Elaboração própria.

A relação entre vitamina D e convulsões já tem sido estudada, mostrando um aumento do limiar convulsivo após administração de calcitriol em camundongos (SIEGEL *et al.*, 1984) e um aumento na intensidade das convulsões e da taxa de mortalidade em ratos com o gene VDR parcialmente deletado (KALUEFF *et al.*, 2006). Estes dados justificam uma possível relação entre genótipos com o alelo T e a prevalência de convulsões em indivíduos com TEA.

Níveis mais baixos de vitamina D também já foram descritos em pacientes com ataques de pânico (LIU, C. *et al.*, 2020). Entretanto, considerando que a associação inicial ocorreu entre genótipos com alelos de menor atividade (CT e TT) e um menor risco para o desenvolvimento de ataques de pânico e comportamento autoagressivo, o resultado parece ser contraintuitivo, podendo se tratar de uma associação espúria ou envolvendo uma desregulação que, através de uma série de fatores mais complexos, acaba afetando outras rotas metabólicas.

Apesar de resultados inicialmente significativos, tais dados parecem indicar uma ausência de relação entre genótipos de FokI do gene VDR e a sintomatologia do Transtorno do Espectro Autista. Entretanto, uma relação não tão forte existente pode ter sido perdida devido a correção de Bonferroni, visto que testes de correção normalmente acabam por diminuir a probabilidade de produzir resultados falsos positivos, mas aumentam a probabilidade de existência de falsos negativos.

Portanto, mais estudos precisam ser realizados para entender o real impacto de FokI *in vivo* no metabolismo da vitamina D e seu consequente potencial de afetar o TEA, avaliando polimorfismos de VDR e de outros genes do metabolismo da vitamina D e do cálcio juntamente com outros fatores (presença de deficiência de vitamina D, etnias, entre outros), juntamente com mais estudos genéticos para

entender a real complexidade da contribuição genética para o estabelecimento do TEA.

REFERÊNCIAS

- AL-AYADHI, L. Y.; MOSTAFA, G. A. Elevated serum levels of macrophage-derived chemokine and thymus and activation-regulated chemokine in autistic children. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 10, p. 72, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-72>. Acesso em: 4 set. 2020.
- ALTUN, H. *et al.* The Levels of Vitamin D, Vitamin D Receptor, Homocysteine and Complex B Vitamin in Children with Autism Spectrum Disorders. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience: The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 383–390, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.9758/cpn.2018.16.4.383>. Acesso em: 3 jun. 2020.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Fifth Edition. [S. l.]: American Psychiatric Association, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>. Acesso em: 13 mar. 2021.
- ARAI, H. *et al.* A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 915–921, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.6.915>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- BARON-COHEN, S. The extreme male brain theory of autism. **Trends in Cognitive Sciences**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 248–254, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(02\)01904-6](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(02)01904-6). Acesso em: 5 jan. 2021.
- BIVONA, G. *et al.* Vitamin D and the nervous system. **Neurological Research**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 827–835, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1622872>. Acesso em: 19 fev. 2021.
- BOUILLON, R. *et al.* Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 726–776, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>. Acesso em: 11 jul. 2020.
- CANNELL, J. J. Autism and vitamin D. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 750–759, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.08.016>. Acesso em: 7 fev. 2021.
- CDC. **Diagnostic Criteria | Autism Spectrum Disorder (ASD) | NCBDDD | CDC**. [S. l.], 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/hcp-dsm.html>. Acesso em: 3 jun. 2020.
- CHRISTAKOS, S. *et al.* Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 365–408, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>. Acesso em: 3 jun. 2020.
- CREO, A. L. *et al.* Nutritional rickets around the world: an update. **Paediatrics and International Child Health**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 84–98, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20469047.2016.1248170>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- DUSSO, A. S.; BROWN, A. J.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [s. l.], v. 289, n. 1, p. F8–F28, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00336.2004>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- EUA TEM NOVO NÚMERO DE PREVALÊNCIA DE AUTISMO: 1 PARA 54. *In*: TISMOO. 27 mar. 2020. Disponível em: <https://tismoo.us/destaques/eua-tem-novo-numero-de-prevalencia-de-autismo-1-para-54/>. Acesso em: 20 mar. 2021.
- EYLES, D. W. *et al.* Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 21–30, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.08.006>. Acesso em: 21 mar. 2021.

FENG, J. *et al.* Clinical improvement following vitamin D3 supplementation in Autism Spectrum Disorder. **Nutritional Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 284–290, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1123847>. Acesso em: 29 set. 2020.

FERREIRA, C. E. S. *et al.* Posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) sobre intervalos de referência da vitamina D [25(OH)D]. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 377–381, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170060>. Acesso em: 3 jul. 2020.

FRASER, D. R.; KODICEK, E. Unique Biosynthesis by Kidney of a Biologically Active Vitamin D Metabolite. **Nature**, [s. l.], v. 228, n. 5273, p. 764–766, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/228764a0>. Acesso em: 3 jun. 2020.

GARGUS, J.; IMTIAZ, F. Mitochondrial Energy-Deficient Endophenotype in Autism. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 4, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2008.198.207>. Acesso em: 14 out. 2020.

GARGUS, J. J. Genetic Calcium Signaling Abnormalities in the Central Nervous System: Seizures, Migraine, and Autism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1151, n. 1, p. 133–156, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03572.x>. Acesso em: 27 nov. 2020.

GOINES, P. E. *et al.* Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. **Molecular Autism**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 13, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-13>. Acesso em: 30 jan. 2021.

GREEN, R. M. *et al.* Women and Autism Spectrum Disorder: Diagnosis and Implications for Treatment of Adolescents and Adults. **Current Psychiatry Reports**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1006-3>. Acesso em: 20 nov. 2020.

HAUSSLER, M. R. *et al.* Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. **Calcified Tissue International**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 77–98, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9619-0>. Acesso em: 20 nov. 2020.

HERMAN, E. **Autism in the DSM | The Autism History Project**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://blogs.uoregon.edu/autismhistoryproject/topics/autism-in-the-dsm/>. Acesso em: 26 abr. 2020.

HEWISON, M. *et al.* Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 215, n. 1, Proceedings of the Sero Foundation for the Advancement of Medical Science Workshop on Molecular Steroidogenesis, p. 31–38, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.017>. Acesso em: 17 mar. 2021.

HOCHBERG, Z.; HOCHBERG, I. Evolutionary Perspective in Rickets and Vitamin D. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00306>. Acesso em: 28 mar. 2021.

HOLICK, M. F. *et al.* Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 107–114, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)91674-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)91674-6). Acesso em: 2 mar. 2021.

- HOLICK, Michael F. The Cutaneous Photosynthesis of Previtamin D3: A Unique Photoendocrine System. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 51–58, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12479237>. Acesso em: 2 mar. 2021.
- HOLICK, Michael F. Vitamin D Deficiency. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 357, n. 3, p. 266–281, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>. Acesso em: 17 jul. 2020.
- HULL, L. *et al.* Development and Validation of the Camouflaging Autistic Traits Questionnaire (CAT-Q). **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 819–833, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10803-018-3792-6>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- IMBRICI, P.; CAMERINO, D. C.; TRICARICO, D. Major channels involved in neuropsychiatric disorders and therapeutic perspectives. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 4, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00076>. Acesso em: 6 abr. 2021.
- JURUTKA, P. W. *et al.* Molecular Nature of the Vitamin D Receptor and its Role in Regulation of Gene Expression. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 203–216, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1010062929140>. Acesso em: 3 jun. 2020.
- KALUEFF, A. V. *et al.* Increased severity of chemically induced seizures in mice with partially deleted Vitamin D receptor gene. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 394, n. 1, p. 69–73, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.007>. Acesso em: 7 out. 2020.
- KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous child**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 217–250, 1943. Acesso em: 1 jun. 2020.
- KULIE, T. *et al.* Vitamin D: An Evidence-Based Review. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 698–706, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3122/jabfm.2009.06.090037>. Acesso em: 27 jul. 2020.
- LIPS, P.; DE JONGH, R. T. Vitamin D deficiency in immigrants. **Bone Reports**, [s. l.], v. 9, p. 37–41, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.06.001>. Acesso em: 17 jun. 2020.
- LIU, C. *et al.* Lower vitamin D levels in panic attacks in Shanghai: A case-control study. **Asian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 51, p. 101948, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2020.101948>. Acesso em: 10 abr. 2021.
- LIU, J. Vitamin D content of food and its contribution to vitamin D status: a brief overview and Australian focus. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1802–1807, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C2PP25150G>. Acesso em: 7 set. 2020.
- MACEDO, L. C. de *et al.* Mutations in the vitamin D receptor gene in four patients with hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 1244–1251, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000800007>. Acesso em: 10 abr. 2021.
- MAENNER, M. J. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. **MMWR. Surveillance Summaries**, [s. l.], v. 69, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6904a1>. Acesso em: 13 mar. 2021.
- MAZUR-KOLECKA, B. *et al.* Autoantibodies against neuronal progenitors in sera from children with autism. **Brain & Development**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 322–329, 2014.

- Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2013.04.015>. Acesso em: 18 ago. 2020.
- MEAD, J.; ASHWOOD, P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 49–55, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.11.006>. Acesso em: 8 set. 2020.
- MIYAMOTO, K. *et al.* Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1165–1179, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/mend.11.8.9951>. Acesso em: 1 jun. 2020.
- MOSTAFA, G. A.; AL-AYADHI, L. Y. The possible relationship between allergic manifestations and elevated serum levels of brain specific auto-antibodies in autistic children. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 261, n. 1, p. 77–81, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.04.003>
- ORLOV, I. *et al.* Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 291–300, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.445>. Acesso em: 17 mar. 2020.
- PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Epidemiology of vitamin D insufficiency and deficiency in a population in a sunny country: Geospatial meta-analysis in Brazil. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 13, p. 2102–2109, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1437711>. Acesso em: 13 fev. 2021.
- PETERS, B. S. E. *et al.* Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. **Annals of Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 15–21, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000199454>. Acesso em: 23 jul. 2020.
- PRIETL, B. *et al.* Vitamin D and Immune Function. **Nutrients**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 2502–2521, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu5072502>. Acesso em: 3 jun. 2020.
- RIBEIRO, S. H. B. Prevalência dos transtornos invasivos do desenvolvimento no município de Atibaia: um estudo piloto. [s. l.], 2007. Disponível em: <http://tede.mackenzie.br/jspui/handle/tede/1671>. Acesso em: 3 abr. 2021.
- RONALD, A.; HOEKSTRA, R. A. Autism spectrum disorders and autistic traits: A decade of new twin studies. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, [s. l.], v. 156, n. 3, p. 255–274, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31159>. Acesso em: 3 jun. 2020.
- SCHUSTER, I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1814, n. 1, Cytochrome P450: Structure, biodiversity and potential for application, p. 186–199, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.022>. Acesso em: 17 ago. 2020.
- SIEGEL, A. *et al.* Administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 results in the elevation of hippocampal seizure threshold levels in rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 298, n. 1, p. 125–129, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91153-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91153-3). Acesso em: 3 jun. 2020.
- SIZAR, O. *et al.* Vitamin D Deficiency. In: STATPEARLS. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. *E-book*. Acesso em: 20 dez. 2020.
- UITTERLINDEN, A. G. *et al.* Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, [s. l.], v. 338, n. 2, p. 143–156, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.014>. Acesso em: 18 nov. 2020.

VAN SCHOOR, N.; LIPS, P. Global Overview of Vitamin D Status. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, [s. l.], v. 46, n. 4, Vitamin D, p. 845–870, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.07.002>. Acesso em: 11 ago. 2020.

WANG, T. *et al.* Serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **European Child & Adolescent Psychiatry**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 341–350, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00787-015-0786-1>. Acesso em: 3 jun. 2020.

WANG, T.-T. *et al.* Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 173, n. 5, p. 2909–2912, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2909>. Acesso em: 24 ago. 2020.

WANG, T.-T. *et al.* Large-Scale in Silico and Microarray-Based Identification of Direct 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Target Genes. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 2685–2695, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2005-0106>. Acesso em: 17 dez. 2020.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 523, n. 1, p. 123–133, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>. Acesso em: 13 jun. 2020.

WERLING, D. M.; GESCHWIND, D. H. Sex differences in autism spectrum disorders. **Current opinion in neurology**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 146–153, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee548>. Acesso em: 5 ago. 2020.