



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

SAMILLE OLIVEIRA GONÇALVES

**ESTUDO DO POLIMORFISMO E MODELAGEM MOLECULAR DO
GENE TAS1R3 DE INDIVÍDUOS AUTISTAS**

Feira de Santana, BA

2021

SAMILLE OLIVEIRA GONÇALVES

**ESTUDO DO POLIMORFISMO E MODELAGEM
MOLECULAR DO GENE TAS1R3 DE INDIVÍDUOS
AUTISTAS**

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Silva Andrade

Co-orientador(a): Profa. Dr. Raquel Benévides

Feira de Santana, BA

2021

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

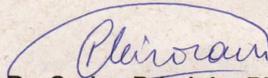
Gonçalves, Samile Oliveira
G629e Estudo do polimorfismo e modelagem molecular do gene TAS1R3 de indivíduos autistas. / Samile Oliveira Gonçalves, 2021.
77 f.; il.

Orientador: Bruno Silva Andrade
Co-orientadora: Raquel Benévides
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2021.

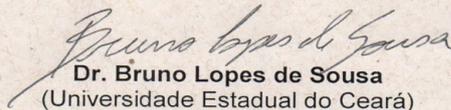
1. Polimorfismo. 2. Autismo. 3. TAS1R2. 3. TAS1R3 I. Andrade, Bruno Silva, orient. II. Benévides, Raquel, co-orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 575.113.1

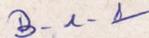
BANCA EXAMINADORA



Dr. Carlos Priminho Pirovani
(Universidade Estadual de Santa Cruz)



Dr. Bruno Lopes de Sousa
(Universidade Estadual do Ceará)



Dr. Bruno Silva Andrade
(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2019

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Esta dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer aos Professores Doutores Bruno Andrade e Raquel Benévides por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientaram neste trabalho. Muito obrigada por me terem corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

Desejo igualmente agradecer aos Professores Doutores Aristóteles Goes Neto, Eddy Oliveira e a Maiza Alves Lopes por toda ajuda laboratorial com relação aos protocolos, sempre muito solícitos e dispostos a me ajudarem no que fosse possível.

Agradeço a Ma Clarissa Cerqueira de Santana, por todo apoio e suporte quanto aos procedimentos corretos para a submissão do trabalho no Comitê de Ética, e além disso, por sempre me motivar frente as dificuldades laboratoriais. Não posso também deixar de agradecer também a Goretti por ter sido tão prestativa e solícita no laboratório.

Por último, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram - amigos do laboratório, amigos parceiros, amigos de vida.

RESUMO

O autismo é uma doença psiquiátrica rara e grave caracterizada por um desenvolvimento intelectual desequilibrado, que prejudica a capacidade de socialização, e em alguns casos a coordenação motora. Para o diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista (TEA) as principais características observadas são as comportamentais, onde é observado a interação social, comunicação (verbal e não-verbal), interesses, padrões de comportamento repetitivos e estereotipados, processamento sensorial e perceptivo. Alguns autores ainda relatam sobre a seletividade alimentar, que é muito comum em indivíduos diagnosticados com TEA, onde associam a seletividade alimentar a uma disfunção sensorial. Os genes TAS1R2 e TAS1R3 codificam receptores das proteínas G, e estão associados à detecção do sabor doce, e existem alguns estudos que sugerem que estes genes também tenham a ação de sensores de glicose nas regiões cerebrais sensíveis a nutrientes. TAS1R2 e TAS1R3 encontram-se localizados tanto na língua, atuando como receptor do sabor doce, tanto quanto em regiões do hipotálamo, onde ainda não se conhece detalhadamente a sua função. Nessa perspectiva, este trabalho verificou polimorfismos, na região codificante dos sítios ativos da proteína TAS1R3, a partir de sequências genéticas obtidas de indivíduos autistas. Para isto os métodos de extração, amplificação, sequenciamento do DNA, e modelagem molecular por homologia foram realizadas. Foram identificados 28 polimorfismos diferentes, com 4 mutações apresentando padrão de conservação entre as amostras. Para essas quatro mutações foram construídos modelos tridimensionais da proteína mutada, No docking realizado com as proteínas mutantes e a molécula de lactisole, observou-se que não houve nenhuma ligação dessa substância as proteínas mutantes, sugerindo que essas mutações provocam alguma alteração na conformação estrutura da proteína que interfira na ligação do lactisole a mesma.

Palavras-chave: TAS1R2; TAS1R3; polimorfismos; autismo.

ABSTRACT

Autism is a rare and serious psychiatric disorder characterized by imbalanced intellectual development, which impairs the ability to socialize, and in some cases motor coordination. For the diagnosis of Autism Spectrum Disorder (ASD), the main characteristics observed are behavioral, where social interaction, communication (verbal and nonverbal), interests, repetitive and stereotyped behavior patterns, sensory and perceptual processing are observed. Some authors still report on food selectivity, which is very common in individuals diagnosed with ASD, where they associate food selectivity with sensory dysfunction. The TAS1R2 and TAS1R3 genes encode G-protein receptors, and are associated with sweet taste detection, and there are some studies that suggest that these genes also have the action of glucose sensors in nutrient-sensitive brain regions. TAS1R2 and TAS1R3 are located both in the tongue, acting as receptor of sweet taste, as well as in regions of the hypothalamus, where their function is not yet known in detail. In this perspective, this work verified polymorphisms, in the coding region of the active sites of the TAS1R3 protein, from genetic sequences obtained from autistic individuals. For this, methods of extraction, amplification, DNA sequencing, and homology molecular modeling were performed. We identified 28 different polymorphisms, with 4 mutations presenting conservation pattern among the samples. In the docking performed with the mutant proteins and the lactisole molecule, it was observed that there was no binding of this substance to the mutant proteins, suggesting that such mutations cause some change in the conformation structure of the mutant protein that interferes with the binding of the lactisole to it.

Key words: TAS1R2; TAS1R3; polymorphisms; autism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do heterodímero TAS1R2-TAS1R3.....	17
Figura 2: Complexo de ligação das moléculas no receptor TAS1R2/ TAS1R3.....	18
Figura 3: Sítios de ligação do receptor TAS1R2/ TAS1R3.....	19
Figura 4: Esquema com passos para a modelagem por homologia.....	22
Figura 5: Eletroforese das extrações do DNA dos testes piloto.....	32
Figura 6: Eletroforese das extrações do DNA.....	34
Figura 7: Eletroforese da PCR das amostras dos autistas.....	35
Figura 8: Alinhamento da sequencia da amostra 5 com a proteína TAS1R3 depositada no NCBI (<i>Homo sapiens</i>).....	35
Figura 9: Alinhamento da proteína TAS1R2 com o molde 5x2n e da proteína TAS1R3 com o molde 5c5c.....	38
Figura 10: Modelo tridimensional do complexo do receptor TAS1R2/TAS1R3.....	39
Figura 11: Gráfico de Ramachandran do complexo do receptor TAS1R2/TAS1R3..	39
Figura 12: Gráfico ANOLEA para as proteínas TAS1R2 e TAS1R3.....	40
Figura 13: Gráfico QMEAN para as proteínas TAS1R2 e TAS1R3 com seus modelos..	41
.....	41
Figura 14: Modelo tridimensional do receptor TAS1R2/ TAS1R3	41
Figura 15: Docking do receptor TAS1R2/TAS1R3 controle com os ligantes e seus respectivos mapas de ligação.....	42
Figura 16: Complexo receptor da proteína controle modelada com o lactisole.....	47
Figura 17: Alinhamento do molde 5x2m com a proteína TAS1R3.....	49
Figura 18: Modelos tridimensionais das proteínas mutantes com a marcação indicada pela seta de onde se encontra o polimorfismo.....	50
Figura 19: Gráfico de Ramachandran dos modelos mutantes.....	50
Figura 20: Complexo lactisole e mutante 1 da proteína TAS1R3 em todas as posições sugeridas pelo autodock e seus respectivos mapas de ligação.....	51
Figura 21: Complexo lactisole e mutante 2 da proteína TAS1R3 em todas as posições sugeridas pelo autodock e seus respectivos mapas de ligação.....	54
Figura 22: Complexo lactisole e mutante 3 da proteína TAS1R3 em todas as posições sugeridas pelo autodock e seus respectivos mapas de ligação.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Nível do Espectro Autista	61
Gráfico 2: Relação dos indivíduos que apresentam seletividade alimentar com os tipos de alimentos e nível do espectro.....	62
Gráfico 3: Relação entre os indivíduos que apresentam seletividade alimentar aos doces com a frequência com que eles consomem esse tipo de alimento.....	62
Gráfico 4: Relação entre os indivíduos que apresentam seletividade alimentar a carboidratos com a frequência com que eles consomem esse tipo de alimento.....	63
Gráfico 5: Relação dos indivíduos que tem o comportamento alterado para agitado depois da ingestão de certos tipos de alimentos.....	63
Gráfico 6: Relação dos indivíduos que tem o comportamento alterado após a ingestão de alimentos doces com a frequência que eles ingerem esses tipos de alimentos...	64
Gráfico 7: Relação dos indivíduos que tem o comportamento alterado após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos com a frequência que eles ingerem esses tipos de alimentos.....	65
Gráfico 8: Relação entre o nível do espectro autista com a forma de seleção dos alimentos.....	66
Gráfico 9: Relação entre o nível do espectro autista com a existência ou não de dificuldades na mastigação dos alimentos.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista das sequências dos primers.....	33
Tabela 2: Polimorfismos identificados nos indivíduos autistas.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.....	15
2.2	RECEPTOR TAS1R2 E TAS1R3.....	16
2.3	NEURÔNIOS GLICO-SENSORES.....	20
2.4	MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA.....	21
3	METODOLOGIA.....	25
3.1	QUESTÕES ÉTICAS.....	25
3.2	PARTICIPANTES DA PESQUISA/ INCLUSÃO.....	26
3.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	26
3.4	APRESENTAÇÃO DO PROJETO AOS PARTICIPANTES.....	26
3.5	COLETA DO MATERIAL.....	26
3.6	EXTRAÇÃO DE DNA.....	27
3.7	PCR DAS REGIÕES CODIFICANTES DOS SÍTIOS ATIVOS DE TAS1R2 E TAS1R3 28	
3.8	SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES DE INTERESSE.....	28
3.9	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES TAS1R2 E TAS1R3 MUTANTES E MODELAGEM MOLECULAR.....	28
3.10	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA E APRESENTAÇÃO DA PESQUISA....	31
4.2	EXPERIMENTOS PILOTO.....	31
4.3	COLETA DO MATERIAL.....	33
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA.....	33
4.5	PCR DAS REGIÕES CODIFICANTES, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO 34	

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS.....	35
4.7 MODELAGEM MOLECULAR.....	37
4.8 QUESTIONÁRIOS.....	60
5 DISCUSSÃO.....	68
5.1 ANÁLISE DE DADOS FENÓTIPICA.....	68
5.2 ANÁLISE GENÓTIPICA.....	70
6 CONCLUSÃO.....	73
REFERENCIAS.....	74
APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO HÁBITOS ALIMENTARES.....	79
ANEXO A - QUESTIONÁRIO: VERSÃO BRASILEIRA DO “AUTISM BEHAVIOR CHECKLIST” (ABC) – INVENTÁRIO DE COMPORTAMENTO AUTISTA: ICA-BR..	82

1 INTRODUÇÃO

O número de indivíduos diagnosticados com o transtorno do espectro do autismo (TEA) tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, com uma estimativa atual de cerca de 100-250 casos/ 10.000 pessoas (ISAKSEN et al., 2013). O autismo é uma doença psiquiátrica rara e grave caracterizada por um desenvolvimento intelectual desequilibrado, que afeta a capacidade de socialização, e em alguns casos a coordenação motora. Em uma visão geral, constitui-se por severos problemas ao nível da comunicação e do comportamento (BITAR et al., 2018).

Muitos estudos retratam que comportamentos alimentares atípicos ocorrem com frequência em indivíduos com TEA, sendo a seletividade alimentar o problema mais frequente (MARI-BAUSET et al., 2014; CORREIA, 2015). Mari Bauset et al. (2014) relata que os fatores que influenciam a seletividade alimentar em autistas estão relacionados principalmente a textura, aparência, sabor e temperatura dos alimentos.

Muitos pesquisadores associam uma ligação entre a sensibilidade sensorial com os problemas alimentares, todavia, ainda não existe nada comprovado cientificamente (CERMAK, 2010; LANE, 2014; WILLIAMS, 2000). Além disso, Cooke (2007) retrata que alterações na percepção do sabor influenciam no processo de seleção dos alimentos, logo, variações genéticas nos receptores de sabor podem influenciar na seletividade alimentar.

Os genes TAS1R2 e TAS1R3 codificam proteínas que formam o receptor gustativo responsável pela percepção do sabor doce e pelo envio da mensagem ao cérebro. O heterodímero TAS1R2/TAS1R3 reconhecem vários tipos de açúcares incluindo aminoácidos, proteínas e açúcares artificiais (BENFORD *et al.*, 2017). Esse receptor está localizado na língua e em diferentes regiões do prosencéfalo sensíveis a nutrientes, como a periventricular, núcleos do hipotálamo, os campos CA, giro dentado do hipocampo, nos núcleos das habênulas e o córtex (REN *et al.*, 2009). Chéron *et al.* (2016) ainda corrobora que, embora, apenas o receptor TAS1R2/TAS1R3 seja específico para o reconhecimento do sabor doce, várias regiões foram relatadas como sítios de ligação de açúcares a estes receptores, inclusive abrangendo regiões da proteína TAS1R3.

Ren et al. (2009) ainda aborda que os receptores de sabor doce encontram-se

também localizados em regiões cerebrais que são sensíveis as variações da taxa de glicose, onde também estão localizados neurônios chamados de glico-sensores que são responsáveis em responder a variações dos níveis de glicose extracelular por meio de uma excitação neural (GE – glucose excited) ou por meio de uma inibição (GI – glucose inhibited), que modula a taxa de disparos dos neurônios de acordo a concentração de glicose. Um descontrole no potencial de ação que inicia uma sinapse pode resultar em uma falha nas respostas ao sistema sensorial, que consiste em uma das características de pessoas diagnosticadas com TEA.

Nessa perspectiva, tendo em vista que autistas possuem seletividade alimentar e falhas na resposta sensorial, e ainda sabendo que o gene TAS1R3 está associado ao processo de reconhecimento do sabor doce e, também às taxas de glicose em regiões cerebrais sensíveis a sua concentração, esse trabalho visa analisar polimorfismos do gene Tasr3 em uma população de autistas, a fim de verificar se existe ou não uma relação desse gene com a seletividade alimentar, e associar a seletividade alimentar ao sabor doce com os diferentes níveis de autismo. Essa pesquisa visa contribuir na identificação das bases genéticas responsáveis pela causa da doença, e assim poder colaborar com diagnósticos e uma melhoria na qualidade de vida das pessoas diagnosticadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O transtorno do espectro autista foi definido pela primeira vez por Kanner (1943) quando ele usou do termo para definir indivíduos acometidos por um distúrbio do contato afetivo, isentos de linguagem e incapazes de efetuar trocas sócio afetivas. De acordo a American Psychiatric Association (2013) TEA é uma condição de desenvolvimento neurológico caracterizado por dificuldades de socialização, comportamentos repetitivos, déficit de atenção e aprendizagem, e em casos mais avançados com comprometimento da fala e da coordenação motora. O autor ainda relata que essa condição se torna evidente nos primeiros três anos de vida do indivíduo, e que na maioria dos casos, indivíduos com TEA frequentemente co-expressam outras doenças, como a epilepsia, o que muitas vezes complica o diagnóstico e o tratamento.

A causa ou causas específicas do autismo são ainda desconhecidas, sabe-se, contudo, que tem uma base genética importante que está associada a fatores ambientais, e que resulta em uma perturbação no desenvolvimento do Sistema Nervoso, com possível envolvimento do sistema límbico, estruturas temporo-medianas e cerebelo (GADIA et al. 2006). Também Tang et al. (2014) aborda que alterações nas estruturas dos neurônios em diferentes regiões cerebrais tem sido relatadas em indivíduos com TEA, como o aumento da densidade da espinha dendrítica em neurônios piramidais corticais. Sendo assim, a regulação defeituosa da estabilidade estrutural dos neurônios pode ser um dos mecanismos subjacentes que contribuem para as alterações anatômicas do TEA.

Para o diagnóstico do TEA as principais características observadas são as comportamentais, onde é observado a interação social, comunicação (verbal e não-verbal), interesses, padrões de comportamento repetitivos e estereotipados, processamento sensorial e perceptivo, e se existe outras comorbilidades associadas (CASE-SMITH e O'BRIEN, 2010; MURRAY-SLUTSKY e PARIS, 2000). Para realização do diagnóstico existe uma gama de testes que são utilizados, como o Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM IV), Autism Behavior Checklist, Escala de Traços Autísticos (ATA) – Ballabriga e entre outros.

Correia (2015) ainda aborda que respostas sensoriais alteradas é uma característica muito comum em crianças com TEA e têm sido identificadas desde as primeiras descrições desta perturbação. Tais alterações têm um impacto significativo no desenvolvimento da criança e no envolvimento em ocupações e atividades significativas, como a alimentação. Gabriels e Hill (2007) retratam que a disfunção da modulação sensorial consiste numa resposta desregulada a um estímulo que se manifesta por um aumento ou diminuição do nível de excitabilidade neural ou mesmo por flutuações entre estes dois extremos. Assim, de acordo os autores, indivíduos com alteração na modulação sensorial têm problemas em regular e organizar o grau e a intensidade das respostas ao input dos variados sistemas sensoriais.

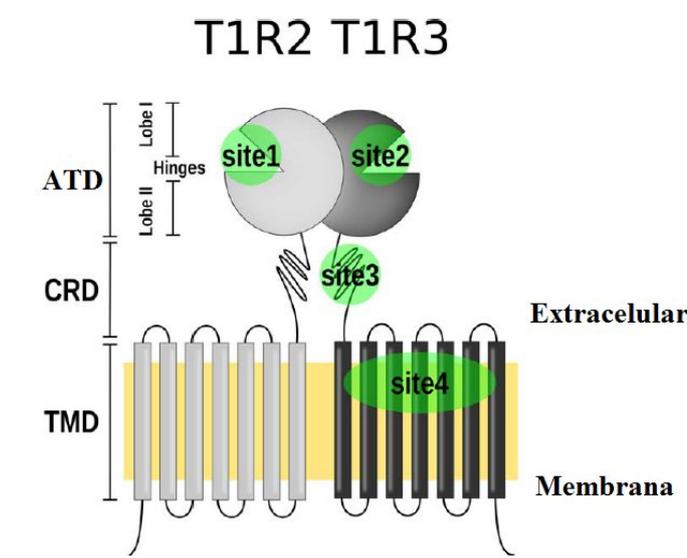
Também Correia (2015) relata que a sensibilidade oral é muito frequente em pessoas com TEA, onde o sistema sensorial pode ser hiper-responsivo ao input oral, assim como pode apresentar uma dificuldade na capacidade de modulação de uma entrada de informação sensorial variada. O autor também relata que a hiper-responsividade sensorial oral é mais comum em indivíduos com TEA do que em pessoas atípicas, essa hiper-responsividade oral é entendida como uma seletividade alimentar. As preferências alimentares são comuns em qualquer indivíduo, o problema destas preferências é quando elas podem ser causadas por uma alteração do processamento sensorial, e dificuldade na modulação da resposta sensorial é algo pertinente em indivíduos diagnosticados com TEA. Além disso, é importante salientar que os problemas comportamentais desempenham um papel importante nos hábitos alimentares de crianças com transtornos do espectro do autismo e vice-versa. Seus padrões alimentares tendem a ser regidos pela aversão / recusa alimentar ou preferências por certos tipos de comida em detrimento de outros (MARI-BAUSET et al., 2014).

2.2 RECEPTOR TAS1R2 E TAS1R3

O receptor TAS1R2/ TAS1R3 é um heterodímero constituído pelas proteínas TAS1R2 e TAS1R3 que atuam para a percepção do sabor doce (BACHMANOV & BEAUCHAMP, 2007). Os genes destas proteínas estão localizados no cromossomo 1, região p36.13 e p36.33 respectivamente, onde o TAS1R2 contém 6 exóns, e o TAS1R3 contém 5 exóns. As proteínas da família T1Rs apresentam em sua estrutura

um domínio extracelular amino-terminal (ATD), que está ligado a um domínio rico em cisteína (CRD) e a um domínio com 7 transmembranas (TMD) (CUI et al., 2006) (fig. 1). O heterodímero TAS1R2/TAS1R3 responde aos estímulos dos ligantes: açúcares (sucralose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose), aminoácidos (glicina, D-triptofano, D-fenilalanina), e a açúcares artificiais (ciclamato, sacarina, aspartame, neotame, acessulfame de potássio e ciclamato), e ao lactisole.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do heterodímero TAS1R2-TAS1R3. O domínio com 7-transmembranas (TMD), domínio extracelular amino-terminal (ATD), domínio rico em cisteína (CRD).

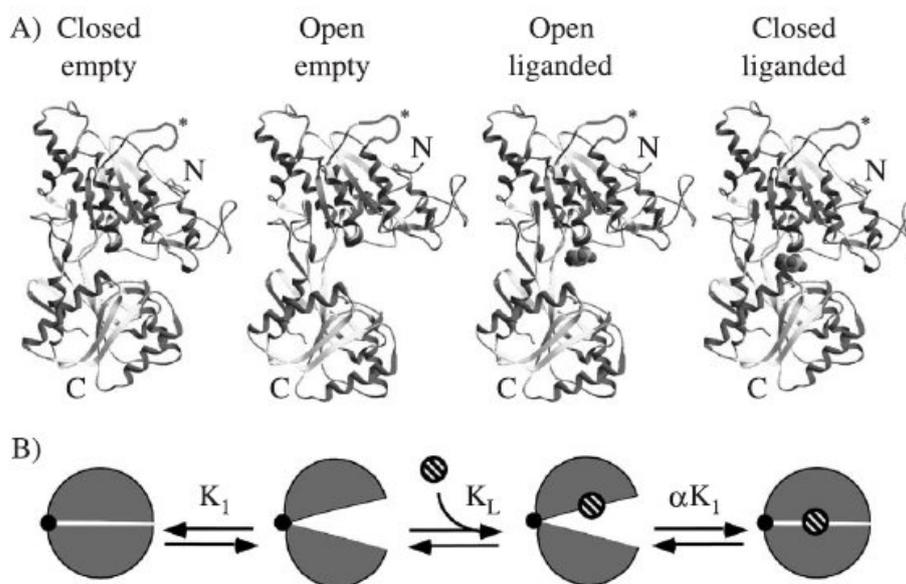


Fonte: Chéron et. Al, 2016.

Pin et al. (2003) retrata que as proteínas do receptor TAS1R2/TAS1R3 possuem estrutura muito semelhante, diferindo apenas na sequência de aminoácidos e automaticamente nas funções dos sítios de ligação. Chéron et al. (2016) descreve a região ATD, também denominada como VFD (Venus Flytrap Domain) como um heterodímero constituído por monómeros contendo aproximadamente 250 aminoácidos dobrados em dois lóbulos e conectados por três dobradiças, ou seja, cada uma das proteínas do receptor apresentam dois lóbulos na região ATD (fig. 1). De acordo Pin et al. (2013), cada lóbulo está separado por uma fenda onde a qual as substâncias a serem reconhecidas se ligam. Na ausência de ligante, as proteínas (TAS1R2 e TAS1R3) oscilam em um estado de conformação “aberto” e “fechado”, em contrapartida, na presença de ligantes encontram-se em uma conformação

denominada de “fechada”, onde na ligação do ligante no lóbulo 1 a proteína se encontra ainda em conformação aberta, estabilizando apenas quando o ligante também se liga no lóbulo 2, dentro da fenda que separa os dois lóbulos e assumindo a conformação de fechada (fig. 2).

Figura 2: Complexo de ligação das moléculas no receptor TAS1R2/ TAS1R3. Complexo de ligação das moléculas no receptor TAS1R2/ TAS1R3. A: As estruturas cristalinas revelaram uma conformação vazia fechada, uma conformação vazia aberta, uma conformação aberta com ligantes e uma conformação fechada com ligantes. O lóbulo-I está no topo, e as extremidades do terminal N e C do domínio são indicadas. B: O equilíbrio dinâmico da ligação do ligante no VFTM. De acordo com este modelo, a medida constante de dissociação, $K_d = K_L (1 + K_1) / (1 + \alpha K_1)$, depende da constante de dissociação do ligante no estado aberto (K_L), a constante de equilíbrio entre os estados aberto e fechado sem ligante (K_1) e a influência do ligante ligado em K_1 (α).



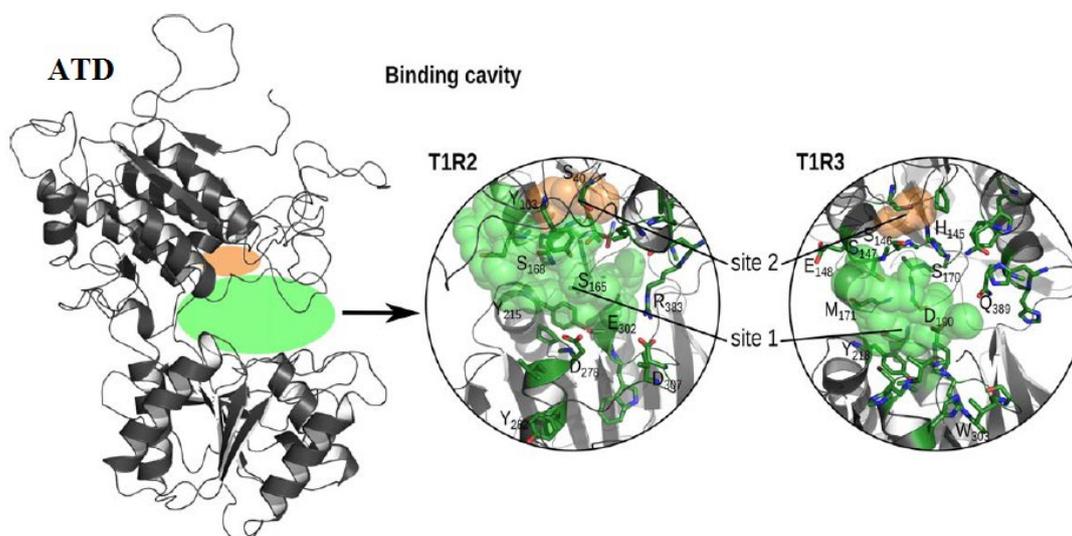
Fonte: PIN et al., (2013).

As regiões ATD das proteínas TAS1R2 e TAS1R3 apresentam sítios de ligação ortostérica (sítios 1 e 2 na fig. 1) que apresentam cerca de 4900 Å² que permite a ligação de uma variedade de ligantes (CHÉRON et al., 2016). Consistente com as propriedades dos adoçantes, ambas as cavidades TAS1R2 e TAS1R3 são hidrofílicas, com 45 e 50% de suas áreas de superfície, respectivamente, sendo acessível a moléculas polares. Chéron et. al (2016) também descreve a presença de uma cavidade secundária (sítio 2 na fig. 3) adjacente ao bolso principal.

A região CRD apresenta nove cisteínas conservadas, com a qual oito delas formam quatro domínios-intracelular de pontes dissulfeto, e a cisteína restante faz uma ligação com outro resíduo de cisteína na região ATD (CHÉRON et al., 2016).

Ainda Chéron et al. (2016) relata que essa estrutura rígida da região CRD favorece a ligação das regiões TMD e ATD durante a ativação da proteína. No entanto, o autor também relata que, os dez últimos resíduos do CRD formam uma região não estruturada, sugerindo que eles são flexíveis o suficiente para permitir uma deformação da estrutura no acoplamento VFD-TMD. A região TMD atua como um interruptor molecular, a qual a proteína G encontra-se conectada, sendo assim, a região TMD transmite esse sinal para a proteína G e esta o encaminha para o sistema nervoso central.

Figura 3: Sítios de ligação do receptor TAS1R2/ TAS1R3. Sítios de ligação do receptor TAS1R2/ TAS1R3. Na esquerda, estrutura da região ATD dos modelos das proteínas TAS1R2 e TAS1R3. Na direita, em verde o sítio ortostérico de ligação, e o bolso extensivo em laranja. Alguns dos resíduos envolvidos no sítio de ligação estão indicados por setas.



gustativa.

2.3 NEURÔNIOS GLICO-SENSORES

A glico-sensibilidade cerebral é essencial para a homeostase do corpo e para a função neuronal. Essa regulação autonômica da homeostase energética envolve um esforço coordenado entre várias regiões cerebrais interconectadas, incluindo, entre outras, o hipotálamo, a amígdala e o tronco cerebral. A necessidade de uma regulação coordenada do metabolismo e do comportamento, para garantir o fornecimento presente e futuro de concentrações adequadas de glicose ao redor dos neurônios centrais, é provavelmente o motivo pelo qual o próprio cérebro evoluiu para monitorar e responder às mudanças na glicose, em vez de depender de órgãos periféricos.

Um dos mecanismos utilizados para esse controle da homeostase são os chamados neurônios glico-sensores, que são definidos como neurônios sensitivos as concentrações de glicose intersticial, com a qual alteram a frequência do potencial de ação em resposta a mudanças nos níveis de glicose (ROUTH, 2010). Os sensores de glicose estão localizados em muitas áreas importantes do cérebro (por exemplo, hipotálamo, núcleo solitário [NTS], amígdala) que monitoram o estado energético do corpo e iniciam respostas simpato-adrenais e neuro-humorais apropriadas para manter a homeostase da glicose e energia.

Os efeitos da glicose em um neurônio hipotalâmico, por exemplo, podem ser tanto pós-sináptico (direto) ou pré-sináptico (indireto). Routh (2010) relata que existem duas categorias principais de neurônios em que a frequência do potencial de ação é diretamente (pós-sináptico) regulada pela glicose: aqueles que respondem a diminuições em glicose intersticial abaixo de 2,5 mM; e aqueles que respondem a aumentos acima de 5 mM. Ambas as categorias de neurônios sensores de glicose podem ser divididas em 2 subtipos: os neurônios excitados por glicose (GE) que aumentam a frequência do potencial de ação em resposta a aumentos de glicose intersticial de 0,1 a 2,5 mM; e os neurônios inibidos por glicose (GI) que diminuem a sua frequência de potencial de ação em resposta a aumentos na glicose intersticial de 0,1 a 2,5 mM de glicose.

Os glico-neurônios GE aumentam sua atividade elétrica à medida que os níveis

de glicose aumentam, com canais de glucoquinase e K_{ATP} atuando como efetores da sinalização induzida pela glicose na maioria dessas células. Em contrapartida, os neurônios GI também expressam a glucoquinase e são ativos na presença de baixas concentrações de glicose como resultado da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que serve como um “medidor de combustível” intracelular, e o fechamento induzido por AMPK dos canais de Cl^- (SHIMAZU e MINOKOSHI, 2017).

Ren et. al (2009) relata que a expressão neuronal dos genes gustativos (Tasr2/TAS1R3 e Tas1r1/ TAS1R3) foi detectada em diferentes regiões do prosencéfalo sensíveis a nutrientes, incluindo os núcleos paraventriculares e arqueados do hipotálamo, os campos de CA e giro dentado do hipocampo, da habênula e do córtex. A expressão também foi observada nas células epiteliais intraventriculares do plexo coroide. Além disso, estudos in vivo em camundongos demonstraram que a expressão hipotalâmica de genes relacionados ao paladar é regulada pelo estado nutricional do animal, com a privação de alimentos aumentando significativamente os níveis de expressão de Tas1r1 e TAS1R2 no hipotálamo, mas não no córtex (REN et. al, 2009). De um modo geral, Ren et. al (2009) sugerem que o receptor doce heterodimérico Ta1r2 / Ta1r3 acoplado à proteína G é um candidato a sensor de glicose cerebral ligado à membrana. Sendo assim, existe uma possibilidade que alterações nos níveis de glicose, ou até mesmo polimorfismos desses genes, podem provocar alterações nas taxas de disparos do potencial de ação dos neurônios do hipotálamo.

2.4 MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA

A Modelagem por Homologia (MH) é baseada no processo de evolução biológica, sendo que proteínas que evoluem a partir de um ancestral comum são conhecidas como homólogas. O método consiste em estudar a geometria e as propriedades das moléculas com técnicas computacionais, com o intuito de elucidar as interações intra e intermoleculares, mecanismos de reações químicas, estrutura e função de proteínas difíceis de serem purificadas em larga escala, utilizando dados experimentais (raio-X e RMN) (FIGUEIREDO et al., 2005).

A ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, onde a qual é baseada principalmente no

processo de evolução biológica, obedecendo a padrões que mostram que: (a) homologia entre sequência de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: α -hélices e folhas- β); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas (*loops*) que ligam os elementos de estrutura secundária (SANTOS-FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Andrade (2008) aborda que o processo geral de Modelagem por Homologia possui alguns passos (figura 4), como (i) localizar a estrutura 3D de uma proteína conhecida; (ii) produzir o melhor alinhamento global possível entre a sequência desconhecida (sequência-problema) e o modelo; (iii) construir um modelo do arcabouço da proteína, tendo o arcabouço da estrutura como molde; (iv) nas regiões onde há lacunas (alvo ou molde), realizar a modelagem de alças para substituir os segmentos de extensão apropriada; (v) acrescentar cadeias laterais ao arcabouço do modelo; (vi) otimizar as posições das cadeias laterais e (vii) refinar a estrutura com minimização de energia e finalmente, (viii) validar o modelo construído (GOLDSMITHFISCHMAN; HONIG, 2003; SANTOS-FILHO; ALENCASTRO, 2003; PATNY et al., 2006).

Figura 4: Esquema com passos para a modelagem por homologia.



O êxito na modelagem comparativa é diretamente proporcional ao grau de identidade entre a estrutura molde e a sequência modelo, no qual a etapa inicial do alinhamento possui grande importância e deve ser realizada com cuidado no processo. Neste método é necessário que ambas apresentem certo grau de identidade, respeitando uma escala de confiabilidade, sendo que modelos gerados com identidade superior a 50% são considerados de alta confiança, entre 30% e 50% intermediária e modelos entre 25% e 30% são considerados de baixa confiança e de difícil correção no processo de refinamento (ALMEIDA et. al., 2017).

Na construção do modelo estrutural, vários métodos podem ser empregados, todos bem conhecidos e documentados na literatura, sendo eles a restrição espacial (ROST, 1999), segmento correspondente (LEVITT, 1992), e montagem de corpos rígido (SCHOONMAN et al., 1998).

A modelagem por satisfação de restrição espacial se baseia na formação de várias delimitações na estrutura-alvo em construção, usando um alinhamento entre a proteína-alvo e proteínas-molde relacionadas como referência. A geração de estruturas por restrição espacial tem como alicerce o fato de que as distâncias entre os resíduos alinhados na proteína-alvo e proteína - molde são similares (ROST, 1999).

O método do segmento correspondente, se baseia na construção de estruturas pelo uso de conjuntos de posições atômicas da proteína-molde como guia de posição. Todos os segmentos atômicos que atuam como guias de posição podem ser obtidos pelo escaneamento de proteínas com estrutura conhecida (LEVITT, 1992). Em adição aos métodos anteriores, uma estrutura proteica pode ser gerada pela busca de restrição conformacional baseado na função de energia.

A construção do modelo pelo método de montagem de corpo rígido se baseia na dissecação da proteína-alvo em regiões conservadas e variáveis comparadas à proteína-molde. O sucesso do modelo depende diretamente da escolha da proteína-molde e do percentual de identidade do alinhamento. A montagem de corpo rígido permite um grau de flexibilidade e automação, proporcionando a construção de modelos de boa qualidade de maneira fácil e rápida (SCHOONMAN et al., 1998).

No refinamento a proteína recém-modelada é submetida a minimização de energia a fim de torna-la mais próxima da conformação nativa, onde a qual utiliza-se campo de força da mecânica molecular como Amber, GROMOS, podendo em alguns

casos utilizar outras técnicas mais aprofundadas como Monte Carlo, Dinâmica molecular e algoritmo baseado na genética (CALIXTO, 2013).

Por ultimo, a validação tem como finalidade verificar a qualidade do modelo construído, sendo necessário que o mesmo apresente bons parâmetros estereoquímicos. Para isso, o gráfico de Ramachandran é utilizado, onde a qual indica a existência de impedimentos estereoquímicos na cadeia principal dos aminoácidos. Consideramos como válido, a estrutura que apresenta poucas distorções nos contatos atômicos (LASKOWSKI et al., 1996).

3 METODOLOGIA

3.1 QUESTÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi realizada de acordo com as diretrizes e normas da Resolução 466 de 12 de Dezembro de 2012, do Ministério da Saúde, que normatiza as pesquisas realizadas com seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética. Ademais, foi entregue, explicado e assinado aos responsáveis pelos participantes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. Este termo descreve os direitos dos participantes, assim como a natureza da pesquisa e seus objetivos, esclarecendo a participação voluntária no estudo e o destino dos dados obtidos, garantindo a proteção nos aspectos de sigilo e ética. O TCLE foi destinado aos responsáveis legais dos participantes, uma vez que devido a sua condição possuem autonomia comprometida e são representados civilmente por seus responsáveis.

Cumpri também salientar, que os responsáveis legais dos indivíduos diagnosticados com TEA também foram participantes deste trabalho, pois responderam dois questionários, um de triagem comportamental e outro sobre hábitos alimentares a respeito de seu menor. Nessa perspectiva, o TCLE assinado por ele, garante segurança não somente aos participantes com TEA, mas também aos responsáveis legais participantes da pesquisa.

Além disso, também foram realizados alguns experimentos pilotos para os testes de coleta do material, extração, amplificação e purificação do DNA. Esses experimentos pilotos foram realizados com indivíduos maiores de 18 anos e não diagnosticados com TEA. O grupo piloto constituiu-se por 10 participantes voluntários, sendo estes alunos da Universidade Estadual de Feira de Santana, e as técnicas utilizadas no experimento piloto foram às mesmas a utilizadas nos experimentos com os indivíduos autistas. O experimento piloto foi realizado cerca de 30 dias antes do início da coleta do material com os voluntários com TEA. O objetivo desse experimento piloto foi de averiguar se as metodologias para a coleta, extração, amplificação e purificação do DNA eram as mais apropriadas para a pesquisa, e evitar erros nos experimentos laboratoriais que possam causar coletas demasiadas de material biológico nos participantes autistas. Para isto, os voluntários do experimento piloto também estão assegurados pela Resolução 466 de 12 de Dezembro de 2012, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 PARTICIPANTES DA PESQUISA/ INCLUSÃO

A pesquisa foi realizada com 85 indivíduos previamente diagnosticados como autistas, sendo 40 destes pacientes da Clínica Ideal, e 45 pacientes da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), ambas localizadas em Feira de Santana-BA. Os indivíduos participantes apresentam faixa etária entre 2 a 19 anos e com diferentes níveis de TEA. Foram incluídos neste trabalho todos os indivíduos diagnosticados com TEA com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado pelos pais ou por um responsável legal. A coleta foi realizada no local de atendimento usual dessas pessoas com o auxílio de pesquisadores assistentes.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas pessoas que apresentavam resfriado, febris, pessoas com prótese dentária, com alguma complicação na cavidade bucal.

3.4 APRESENTAÇÃO DO PROJETO AOS PARTICIPANTES

O projeto foi apresentado previamente aos indivíduos convidados a participar com seus respectivos responsáveis e a equipe (médicos, enfermeiros e cuidadores) que trabalham no cuidado dessas pessoas. Esse momento de introdução e apresentação do projeto a comunidade ocorreu em forma de conversa, onde os objetivos, a justificativa, o papel social e científico, e os métodos de realização desse estudo foram explanados em uma linguagem simples que permitiu a compreensão de todos. Nesta etapa, todas as dúvidas pertinentes ao trabalho foram esclarecidas. Foram aplicados também dois questionários aos responsáveis com questões relacionadas ao comportamento e hábitos alimentares do voluntário.

3.5 COLETA DO MATERIAL

O estudo contou com a participação de 85 indivíduos diagnosticados previamente como autistas, onde os quais cederam células descamadas da mucosa

bucal coletadas através de escovinha citológica estéril e transferidas para tubos com tampão específico para coleta de DNA. Os tubos foram acondicionados em ultrafreezer à -80°C.

A participação dos indivíduos nesse estudo foi condicionada a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelos seus responsáveis. O projeto foi submetido e aprovado pela Plataforma Brasil (http://portal2.saude.gov.br/sisnep/Menu_Principal.cfm). As coletas só iniciaram após a aprovação do comitê de ética.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA

As extremidades das escovinhas citológicas estéreis utilizadas para coleta dos materiais, foram transferidas para microtubos de 2mL, contendo 200µl de tampão de extração e 5µl de proteinase K (10mg/mL) e foram incubadas por 2hs a 42°C. Foi utilizado o tampão de extração TES (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%). Após a incubação, a extremidade da escovinha foi removida e 42µl de NaCl saturado (6M) adicionado, e agitado manualmente com vigor por inversão. Os microtubos foram centrifugados por 1min. a 15.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 2x o volume de etanol absoluto gelado. Os microtubos foram agitados e centrifugados por 1min. a 15.000xg. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150µl de etanol 70% gelado, invertendo o tubo várias vezes para lavagem do pellet. O material foi centrifugado por 1min. a 15.000xg, e o sobrenadante descartado em seguida. A lavagem com etanol 70% foi repetida, e após descartar o sobrenadante os tubos ficaram abertos por 30min. para a evaporação do etanol residual. A ressuspensão foi feita com 60µl de água ultrapura previamente autoclavada. A análise qualitativa e quantitativa do material extraído foi realizada por meio de eletroforese (DNA de fago-λ, digerido com Hind III) e de espectrofotometria ultravioleta nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Os géis de agarose foram preparados em TAE 1x (Tris/ ácido acético/ EDTA) com SYBR Safe (Invitrogen®) a 1:10000, em concentração de 1%. As amostras de DNA analisadas foram preparadas com o tampão de corrida azul de bromofenol. A eletroforese foi feita em TAE 1x a 80 V, 70 mA e 70 W por 45 min. A visualização dos fragmentos de DNA foi feita através de transiluminador de luz ultravioleta. Após a

corrida, os géis foram fotografados com o sistema de fotografia digital.

3.7 PCR DAS REGIÕES CODIFICANTES DOS SÍTIOS ATIVOS DE TAS1R2 E TAS1R3

Iniciadores específicos para as regiões codificantes dos sítios ativos dos genes propostos foram desenhados com a ferramenta OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>), de acordo com as sequências específicas, com o objetivo de gerar um amplicon de aproximadamente 500 pb.

As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 μ L, utilizando o kit da Master Mix e seguindo o protocolo padrão da mesma, com primers a uma concentração de 10 μ M e DNA a 70ng/ μ l. A temperatura de anelamento dos primers é 54°C, com pré-melting a 94°C por 4', desnaturação a 94°C por 1', extensão a 72°C por 1', extensão final a 72 °C por 7' e hold a 4°C por 10'. As amostras foram corridas na eletroforese por gel de agarose a 1% para verificação da amplificação, e quantificadas no nanodrop. Controles negativos, sem DNA, foram preparados em cada uma das diversas séries de amplificação para se excluir a possibilidade de contaminação dos reagentes.

3.8 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES DE INTERESSE

As amostras para serem sequenciadas foram encaminhadas a uma empresa privada para a realização do sequenciamento Sanger.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES TAS1R2 E TAS1R3 MUTANTES E MODELAGEM MOLECULAR

A tradução das sequencias foi realizada através do servidor EMBL-EBI Sequence Translator (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) em seis fases de leitura. Os alinhamentos foram feitos utilizando o T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/>) a fim detectar quais aminoácidos apareciam modificados no sítio ativo.

A modelagem das estruturas tridimensionais foi feita através da modificação dos aminoácidos mutantes, nas sequências primárias das proteínas normais. As sequências mutantes completas foram submetidas a uma busca de homólogos para construção de estruturas tridimensionais utilizando a ferramenta BLASTp. A construção das estruturas utilizou o método automático, seguido de modificações de acordo com o alinhamento prévio das sequências, através do servidor do SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org>), e da ferramenta Modeller.

Após a construção dos modelos, suas estruturas foram validadas através de ferramentas do próprio servidor de modelagem, que checaram a qualidade estereoquímica dos modelos, bem como a entropia do sistema. Em uma etapa posterior, as estruturas construídas foram alinhadas estruturalmente com os respectivos moldes dos homólogos, utilizando o programa Pymol 1.7, para verificar o desvio (RMSD) da cadeia principal e a posição dos aminoácidos do sítio ativo.

Em uma etapa seguinte, todos os modelos validados foram submetidos à cálculos de minimização de energia (10.000 ciclos, sendo 5.000 steepest descent e 5.000 gradiente conjugado) e dinâmica molecular em água por 20 nanossegundos, utilizando o pacote de programas AMBER 14.

Cálculos de acoplamento molecular com substratos descritos na literatura foram realizados tanto com as estruturas modelo quanto com as proteínas mutantes. Os substratos foram glicose, sacarose, frutose, D-triptofano e D-fenilalanina, esteviosídeo, glicirrizina, sucralose, aspartame, neotame, sacarina sódica, acessulfame, lactisole e ciclamato. Os cálculos foram feitos com o programa *Autodock 4* (MORRIS et al. 2009), seguindo as recomendações do manual, obtendo-se assim valores de energia de afinidade entre as interações dos ligantes e os respectivo alvos proteicos. Em seguida, os resultados foram interpretados a partir de análises de posicionamento dos confórmeros e de mapas de interação, utilizando os programas Pymol 1.7 (Schrödinger, 2013) e Ligand Scout 3.1 (Wolber; Langer, 2005). Nessa etapa foram estudadas as interações de cada complexo, considerando a quantidade de grupos doadores e receptores de ligação hidrogênio, aromaticidade, hidrofobicidade posicionamento dos ligantes na região exata do sítio ativo da proteína.

3.10 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados serão apresentados aos indivíduos participantes com seus respectivos responsáveis por meio de uma palestra, onde serão pontuadas as conclusões obtidas através dessa pesquisa e a importância deste estudo para a melhoria na qualidade de vida dos autistas.

4 RESULTADOS

4.1 SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA E APRESENTAÇÃO DA PESQUISA

Primeiramente, como detalhado na metodologia deste trabalho, a pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética para a aprovação do projeto dentro das diretrizes e normas da Resolução 466 de 12 de Dezembro de 2012, do Ministério da Saúde. Para isso o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), documento de comprovação de infraestrutura da Instituição (UEFS), autorização das instituições voluntárias (Clinica Ideal e APAE), documento de esclarecimento das pessoas envolvidas na pesquisa (pesquisadores assistentes, orientador e co-orientadores), documento comprovando parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), questionários para coleta de dados e o projeto detalhado tiveram que ser submetidos na Plataforma Brasil para a aprovação da pesquisa. Após a aprovação pelo Comitê de Ética é que as etapas seguintes da pesquisa foram realizadas. Assim, as Instituições que fazem parte deste trabalho como voluntárias para coleta de dados e de material biológico foram contatadas para apresentação do projeto aos responsáveis pelos indivíduos autistas e aos os profissionais das Instituições. As apresentações foram realizadas concomitantemente as coletas do material biológico e de dados. Nas apresentações explicou-se sobre os objetivos da pesquisa, a contribuição da mesma para os voluntários e para a comunidade científica, abordando também sobre os riscos, sigilo do anonimato dos participantes e comprometimento dos pesquisadores para com o projeto e o voluntariado.

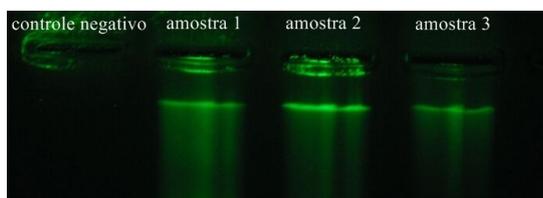
4.2 EXPERIMENTOS PILOTO

Antes de ser realizada qualquer coleta de dados ou material biológico, experimentos piloto foram realizados com o intuito de padronizar as técnicas de coleta, extração, amplificação e purificação do DNA antes que estas sejam realizadas com os indivíduos autistas. Os experimentos pilotos foram realizados com voluntários da própria Universidade estadual de Feira de Santana e também obedeceram as normas e diretrizes da Resolução 466 de 12 de Dezembro de 2012 do Ministério da Saúde.

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido foram assinados pelos voluntários dos experimentos piloto.

A primeira técnica padronizada foi a de coleta e extração do DNA, com a qual foram testados diferentes protocolos, e o protocolo que se obteve uma maior concentração de DNA e com boa qualidade foi à técnica que está descrita na metodologia deste trabalho. Foram coletadas 12 amostras de DNA, sendo assim 12 voluntários participaram do experimento piloto. Foram testados 10 protocolos diferentes de extração de DNA, com e sem o uso de kits. No protocolo padronizado obteve-se a extração de DNA com cerca de 40ng/μL, com razão de 260/280 a aproximadamente 1,8 (figura 5). Para todos os testes foram realizados controles negativos para a verificação de contaminação.

Figura 5: Eletroforese das extrações do DNA dos testes piloto.



Fonte: Elaboração própria.

Para a padronização da técnica de PCR, pares de primers (tabela 1) para a região de interesse da proteína TAS1R3 (sítio de ligação) foram desenhados utilizando a ferramenta OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para amplificação de regiões com cerca de 455bp. O DNA extraído no experimento piloto foi submetido aos experimentos piloto para a técnica de PCR. Para verificação da temperatura de anelamento dos primers, a técnica de gradiente de temperatura foi realizada. Para padronização da técnica de PCR diversas variantes foram testadas, como por exemplo: 1º concentração do DNA; 2º adição de co-fatores como MgCl₂, BSA, TBT, DMSO e betaína (adicionados um por vez); 3º Número de ciclos; 4º Extensão dos ciclos; 5º Concentração dos primers; 6º A especificidade dos kits utilizados; 7º A especificidade de diferentes termocicladores. É importante mencionar que todas essas variantes foram testadas uma por vez, para assim facilitar a padronização. Em virtude da região de interesse ser muito polimórfica, muitas

dificuldades foram encontradas para a padronização, mas por fim, as amplificações foram realizadas utilizando o kit da Master Mix e seguindo o protocolo padrão da mesma, com primers a uma concentração de 10 μ M e DNA a 70ng/ μ l. A temperatura de anelamento dos primers é 54°C, com pré-melting a 94°C por 4', desnaturação a 94°C por 1', extensão a 72°C por 1', extensão final a 72 °C por 7' e hold a 4°C por 10' (tabela 1).

Tabela 1: Lista das sequências dos primers

PRIMERS		
	Forward	Reverse
Par de primers 1	GGGCTGTTCGTTCCACCAT	GCCCAGGAAGCAGAGAAAG
Par de primers 2	CTCAGCGTCCTCCTGTTC	GAGGACCACCTGCACATT

Fonte: Elaboração própria.

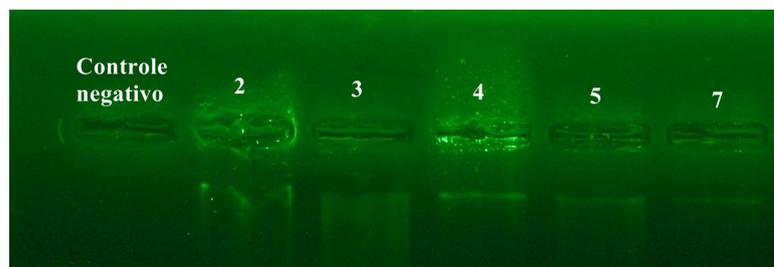
4.3 COLETA DO MATERIAL

Após a padronização das técnicas de coleta, extração e amplificação do DNA, os procedimentos foram realizados com os voluntários autistas, onde além de ter sido realizada a coleta do material biológico, os responsáveis pelos voluntários responderam dois questionários relacionados ao comportamento e hábitos alimentares do autista, tudo isso com autorização prévia e assinatura do termo de consentimento. A coleta do material foi realizada em 85 indivíduos voluntários, e o material biológico foi coletado com escovinha citológica estéril e armazenado em solução tampão de extração.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo descrito no item 3.6 acima. Obtivemos uma extração de qualidade para as 85 amostras coletadas. As concentrações do DNA das amostras variaram de 17ng/ μ L a 200ng/ μ L (figura 6). As razões de 260/280 que indicam a pureza do material estão variando de 1,3 a 1,8, o que também está relativamente dentro do padrão, uma vez que o material ainda será purificado.

Figura 6: Eletroforese das extrações do DNA.

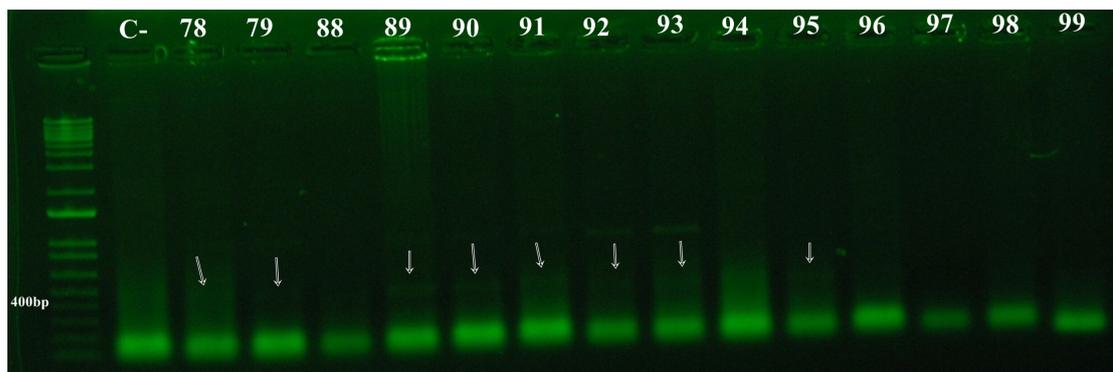


Fonte: Elaboração própria.

4.5 PCR DAS REGIÕES CODIFICANTES, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Devido a grande dificuldade de anelamento dos primers a região de interesse, por esta ser bastante polimórfica, das 85 amostras de DNA extraídas, apenas 43 foram amplificadas (figura 7). Após serem amplificadas, as amostras foram purificadas e encaminhadas para a empresa Myleus para a realização do sequenciamento Sanger. Das 43 amostras amplificadas, apenas 15 amostras obtiveram um sequenciamento de qualidade. As sequências oriundas do sequenciamento foram editadas utilizando a ferramenta Geneious, com o intuito de cortar as extremidades e regiões em que o sequenciamento obteve baixa qualidade. Após a edição das sequências, estas foram submetidas à ferramenta BLAST no NCBI para a checagem de identidade da sequência com a proteína TAS1R3 e as outras depositadas no banco. Todas as amostras apresentaram identidade de 100% com a proteína *Homo sapiens* TAS1R3 (ver link: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_689414.2?report=fasta). Além da validação das sequências através da ferramenta do BLAST, as amostras também foram alinhadas por meio do T-COFFEE com a proteína TAS1R3 *Homo sapiens* depositada no NCBI (figura 8).

Figura 7: Eletroforese da PCR das amostras dos autistas.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8: Alinhamento da sequencia da amostra 5 com a proteína TAS1R3 depositada no NCBI (*Homo sapiens*).

```

Tas1r3      GTCTCTCTGTTCCCTGGCCAGCCAGCCCTGCCGATGCCTGGCCAGCAGCCCTTGTC
Tas1r3_5    -----AGCAGCCCTTGTC

Tas1r3      CACCTCCCCTCACGGGCTGCCTGAGCACACTTCTCCTGCAGGGGCCGAGATCTTCGTG
Tas1r3_5    CACCTCCCCTCACGGGCTGCCTGAGCACACTTCTCCTGCAGGGGCCGAGATCTTCGTG

Tas1r3      GAGTCAGAAGTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGG
Tas1r3_5    GAGTCAGAAGTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGG

Tas1r3      GCCTGGCTGGTGGTGTCTGCTGGCCATGCTGGTGGAGGTCGCACTGTGCACCTGGTACCTG
Tas1r3_5    GCCTGGCTGGT-GTGTCTGCTGGCCATGCTGTGAGAGGTCGCACTGTGCACCTGGTACCTG

Tas1r3      GTGGCTTCCC GCCGGAGGTGGTGACGGACTGGCAGATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTG
Tas1r3_5    GTGGCTTCCC GCCGGAGGTGGTGACGGACTGGCAGATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTG

Tas1r3      CACTGCCGCACACGCTCCTGGGTGAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTG
Tas1r3_5    CACTGCCGCACACGCTCCTGGGTGAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTG

Tas1r3      GCCTTTCTGCTTCTCTGGGCACTTTCTGCTGGGAGCCAGCCGGGCCGCTACAACCGT
Tas1r3_5    GCCTTTCTGCTTCTCTGGGCACTTTCTGCTGGGAGCCAGCCGGGCCGCTACAACCGT

Tas1r3      GCCCGTGGCCTCACCTTTGCCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCC
Tas1r3_5    GCCCGTGGCCTCACCTTTGCCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCC

Tas1r3      CTCTGGCCAATGTGCAGTGGTCTCAGGCCCGCCGTGCAGATGGGCGCCCTCTGCTC
Tas1r3_5    CTCTGGCCAATGTGCAGG-GGTCC-----

```

Fonte: Elaboração própria.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS

Para identificação dos polimorfismos, o alinhamento das sequencias dos pacientes voluntários com a sequencia controle da proteína foi analisado através da ferramenta Bioedit que permite a identificação das bases mutadas, assim como a sua

posição. Dentre as 15 amostras de voluntários autistas sequenciadas, 5 sequencias não apresentaram mutações quando comparadas com a sequencia controle, e 10 sequencias apresentaram polimorfismos. Foram identificados 28 polimorfismos diferentes dentre as 10 sequencias obtidas. Entre esses 28 polimorfismos, a mutação na posição 2345 que se trata de uma substituição de uma timina por uma citosina se repetiu nas amostras 4 e 13. Outras mutações que também foram observadas uma conservação dentre as amostras foram na posição 2072 (substituição de uma timina por uma citosina) nas amostras 5 e 6; na posição 2292 (deleção de uma citosina) nas amostras 6 e 11; na posição 2293 (deleção de uma adenina) nas amostras 6, 11 e 23; na posição 2294 (deleção de uma citosina) nas amostras 11 e 15; nessa mesma posição (2294) na amostra 23 ocorreu uma substituição de uma citosina por uma timina; e na posição 1854 (substituição de uma citosina por uma timina) nas amostras 16 e 73 (figura 19).

Tabela 2: Polimorfismos identificados nos indivíduos autistas

AMOSTRA	MUTAÇÃO			POSIÇÃO	BN MUTADAS
	INSERÇÃO	DELEÇÃO	SUBSTITUIÇÃO		
TAS1R3_3		X		1984	T
TAS1R3_4			X	2074	G -> A
		X		2102	T
		X		2157	G
		X		2191	G
		X		2275	A
		X		2280	T
			X	2293	A -> T
			X	2328	C -> T
		X	2345	T -> C	
TAS1R3_5		X		2052	G
			X	2071	G-> T
			X	2072	T-> C
			X	2073	G-> A
		X		2360	T
TAS1R3_6			X	2072	T -> C
		X		2292	C
		X		2293	A
		X		2299	G
		X		3000	C
TAS1R3_11			X	2078	T-> A
			X	2090	C-> A
			X	2094	G-> C
			X	2095	T-> A
		X		2292	C
		X		2293	A

		X		2294	C
		X		2299	G
		X		2300	C
			X	2301	C-> T
			X	2098	C -> A
		X		2126	C
			X	2135	A -> C
			X	2197	G -> A
		X		2259	C
			X	2345	T -> A
TAS1R3_15		X		2294	C
			X	1854	C -> T
TAS1R3_16	X			1862	T
	X			2073	C
TAS1R3_23	X			2293	A
			X	2294	C -> T
TAS1R3_73			x	1854	C -> T

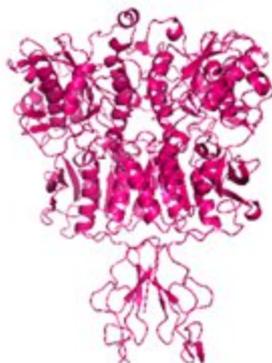
Fonte: Elaboração própria.

4.7 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular foi realizada primeiramente com o receptor TAS1R2/TAS1R3 sem mutação alguma, com o objetivo de servirem como controle durante a modelagem das proteínas mutantes (TAS1R3). Para isso, a sequência das proteínas do receptor foram submetidas à uma busca de homólogos para a construção das estruturas tridimensionais. As sequências das proteínas foram alinhadas com as sequências dos moldes para a identificação do grau de similaridade entre elas. No alinhamento da proteína TAS1R2 com o molde PDB 5X2N o score de similaridade foi de 84, considerado um score muito bom como mostra a legenda da figura 20. É importante alertar que o molde 5X2N não cobre toda a proteína TAS1R2, todavia, os sítios ativos que são do interesse desta pesquisa foram pareados no alinhamento pelas proteínas. A proteína TAS1R3 foi pareada com o molde 5C5C (Human metabotropic glutamate receptor 7), extracellular ligand binding domain, onde apresentou score de similaridade de 74, também considerado bom (figura 9). Em seguida os modelos foram construídos utilizando o servidor do SwissModel (figura 10).

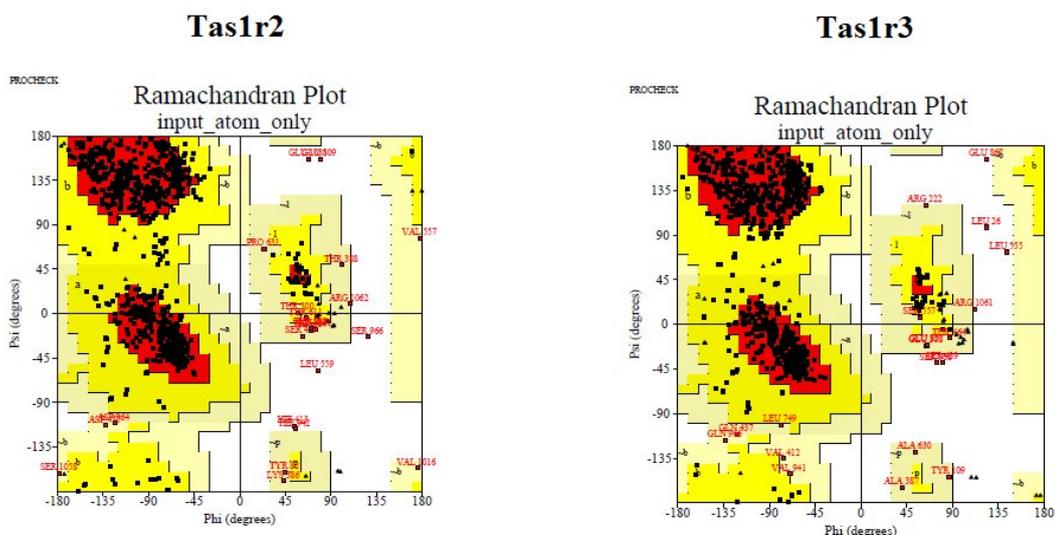
Depois de construído os modelos, estes foram minimizados energeticamente utilizando o programa Amber 14 por 5000 ciclos. As estruturas foram validadas através

Figura 10: Modelo tridimensional do complexo do receptor TAS1R2/TAS1R3. PDB: 5X2N para TAS1R2, e 5C5C para TAS1R3.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 11: Gráfico de Ramachandran do complexo do receptor TAS1R2/TAS1R3. Aminoácidos nas regiões em vermelho estão nas posições energeticamente mais favoráveis, nas regiões em amarelo nas posições adicionalmente permitidas, nas regiões em amarelo claro nas posições generosamente permitidas, e nas regiões em branco consideradas como não permitidas.

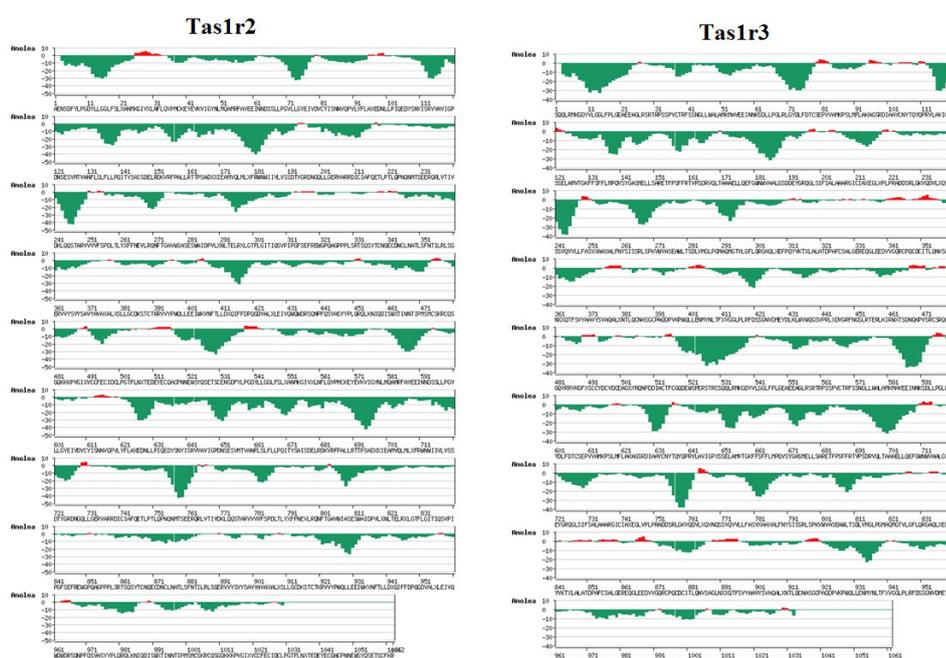


Fonte: Elaboração própria.

O ANOLEA avalia estruturas de proteínas com uma energia de interação atômica não-local, computando o ambiente dos átomos pesados por meio de cálculos de energia, sendo possível determinar zonas de alta energia na proteína, as quais estão relacionadas a erros pontuais ou regiões de interação. O gráfico do ANOLEA mostra um resumo dos resultados, onde demonstra quantos aminoácidos estão em zonas de maior energia (em número e porcentagem) e quais são eles. A figura 12 mostra os aminoácidos das proteínas TAS1R2 e TAS1R3 que estão em zonas de

maior energia, onde se observa que são poucas quando comparadas as regiões de menor energia, o que é um resultado considerado positivo, pois como mencionado acima regiões de alta energia estão relacionadas a erros pontuais ou regiões de interação.

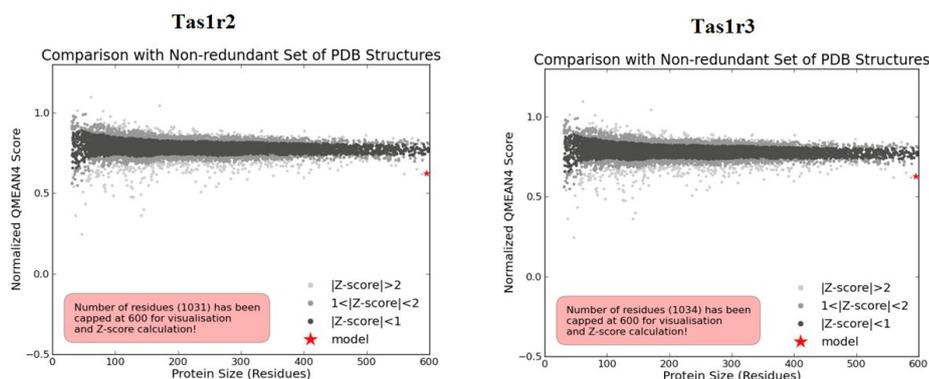
Figura 12: Gráfico ANOLEA para as proteínas TAS1R2 e TAS1R3. As regiões em vermelho são consideradas regiões de alta energia, não desejável por conta dos erros pontuais nos aminoácidos.



Fonte: Elaboração própria.

No gráfico de “Estimated absolute quality” (figura 13), os círculos coloridos em escala de cinza representam scores do QMEAN para outras estruturas de tamanho similares depositadas no PDB, com os quais o score do modelo (em vermelho) será comparado. O Z-score do QMEAN indica quantos desvios padrões o score difere dos valores esperados de estruturas experimentais. Sendo assim, quanto mais próximo da parte preta melhor (menor Z-score, ou seja, menor desvio padrão). A figura 13 demonstra o QMEAN para o receptor TAS1R2/TAS1R3 com seus respectivos moldes, onde observa-se que os modelos escolhidos encontra-se próximo dos modelos que já foram depositados no PDB.

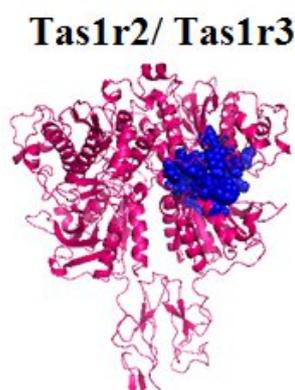
Figura 13: Gráfico QMEAN para as proteínas TAS1R2 e TAS1R3 com seus modelos. Os modelos utilizados encontram em vermelho, e os círculos em diferentes tons de cinzas são os modelos depositados no PDB.



Fonte: Elaboração própria.

A figura 14 mostra o modelo tridimensional do receptor TAS1R2/TAS1R3 com os aminoácidos encontrados na literatura (CHÉRON et al., 2016) descritos como os sítios de ligação para os ligantes desejados. Observa-se que os aminoácidos dos sítios de ligação encontram-se aglomerados em uma região da proteína, o que evidencia ainda mais a estrutura da proteína que foi descrita no referencial teórico deste trabalho.

Figura 14: Modelo tridimensional do receptor TAS1R2/ TAS1R3 com os aminoácidos dos sítios de ligação da proteína TAS1R3 marcados em azul.



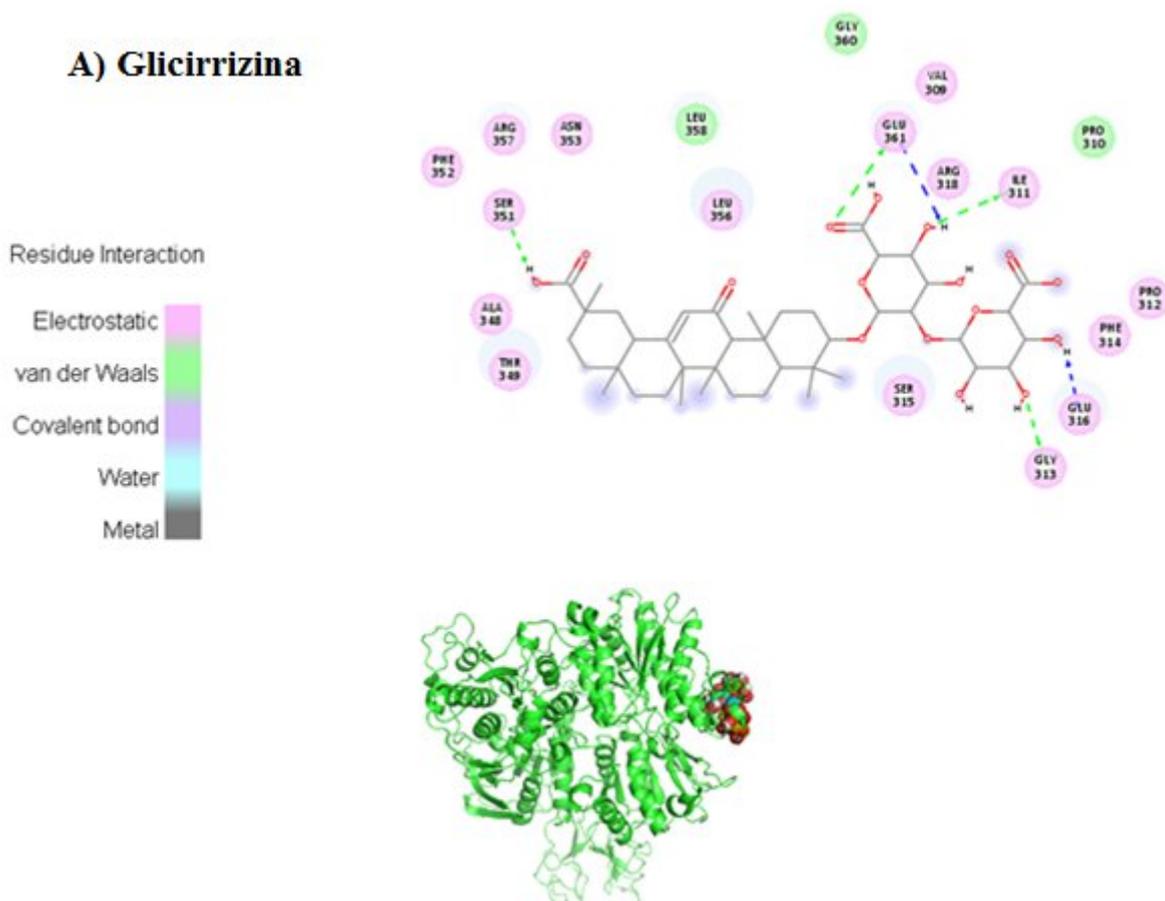
Fonte: Elaboração própria.

O modelo do receptor TAS1R2/TAS1R3 foi submetido ao docking através do programa Autodock Vina com os ligantes: glicose, sacarose, frutose, D-triptofano e D-fenilalanina, esteviosídeo, glicirrizina, sucralose, aspartame, neotame, sacarina

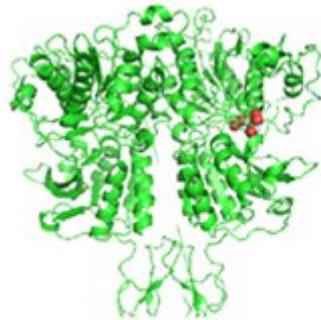
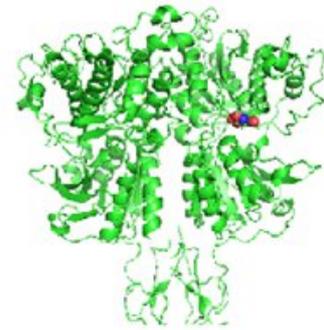
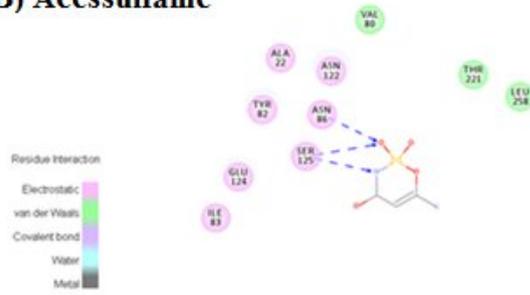
sódica, acessulfame, e ciclamato (figura 15).

Após o docking, foram construídos mapas 2D de ligação de cada uma das respectivas moléculas com a proteína TAS1R2 com o intuito de visualizar quais os aminoácidos os ligantes interagem com a proteína e quais os tipos de ligação são estabelecidas (figura 15). Observa-se que todas as moléculas apresentam no mínimo uma ligação com um aminoácido correspondente ao sítio ativo da proteína. As ligações em rosa são ligações eletrostáticas, em verde de Van der Waals, em lilás são ligações covalentes, em azul são pontes de hidrogênio e em preto são ligações metálicas (figura 15).

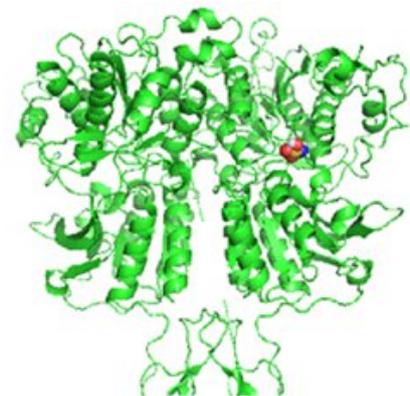
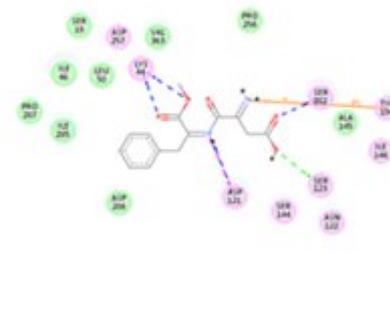
Figura 15: Docking do receptor TAS1R2/TAS1R3 controle com os ligantes e seus respectivos mapas de ligação.



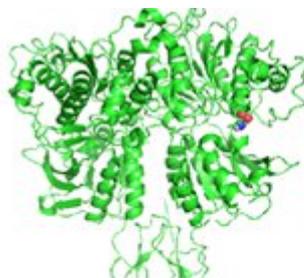
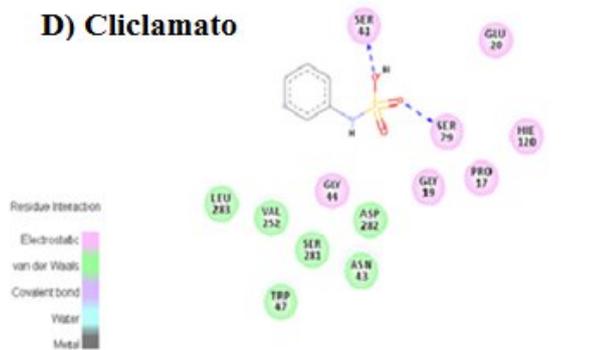
B) Acessulfame



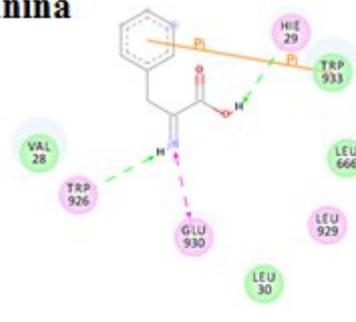
C) Aspartame



D) Clclamato



E) D- fenilalanina

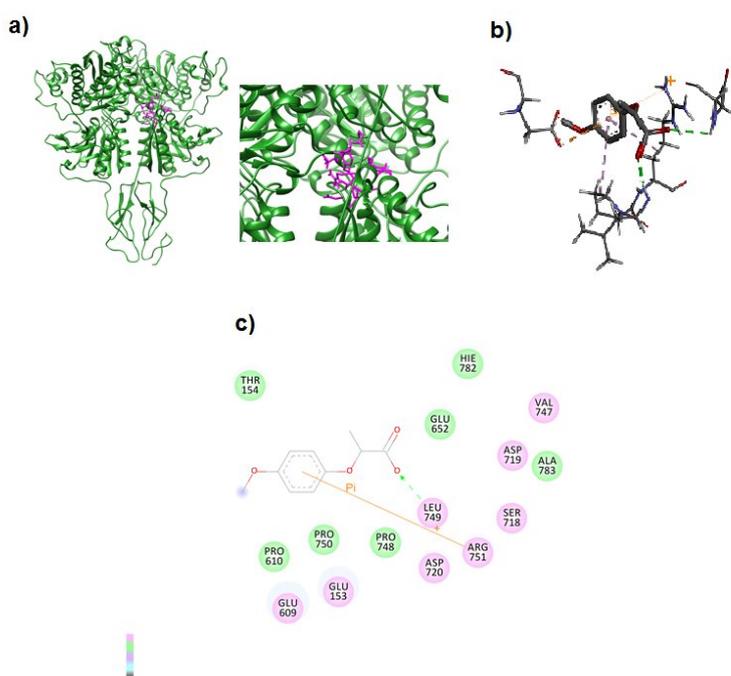


Observa-se que o ligante glicirrizina (figura 15, A) liga-se ao receptor por meios dos aminoácidos GLY 360, PRO 310 e LEU 358 estabelecendo ligações de van der Waals, e os aminoácidos VAL 309, GLU 361, ARG 318, ILE 311, PRO 312, PHE 314, GLU 316, GLY 316, SER 315, LEU 316, ASN 353, ARG 357, PHE 352, SER 351, ALA 348, THR 349 estabelecendo ligações eletrostáticas. Já o ligante acessulfame liga-se ao receptor de acordo o mapa de ligação (figura 15, B) por meio dos aminoácidos VAL 80, THR 221, LEU 258 com ligações de van der Waals, e aos aminoácidos ALA 22, ASN 122, TYR 82, ASN 86, SER 125, GLU 124, ILE 83 com ligações eletrostáticas. A molécula aspartame (figura 15, C) está associada aos aminoácidos ASP 257, LYS 44, ASP 121, SER 282, TYR 194, ILE 146, SER 123, SER 144, ASN 122 com ligações eletrostáticas, e com ligações de van der Waals com os aminoácidos PRO 256, ALA 145, VAL 363, ASP 286, ILE 285, PRO 287, ILE 46, SER 19 e LEU 50. Por outro lado, o ciclamato (figura 15, D) conecta-se ao receptor através dos aminoácidos LYS 44, ASN 122, ASP 121, SER 144, SER 282 com ligações eletrostáticas e aos aminoácidos PRO 256, ILE 285, LEU 50, VAL 363, ILE 46 com ligações de van der Waals. Nessa mesma linha, a D-fenilalanina (figura 15, E) também faz ligações eletrostáticas e de van der Waals, todavia, com os respectivos aminoácidos HIE 29, LEU 929, GLU 930, TRP 926, TRP 933, LEU 666, LEU 30, VAL 28. Continuando com a descrição dos mapas de ligação, o D – triptofano (figura 15, F) liga-se aos aminoácidos TRP 283, GLU 281, LYS 44, SER 282, ASP 286, ILE 285, SER 144, ASP 121 por ligações eletrostáticas, e a PRO 287, ILE 46, LEU 358, VAL 363, LEU 50, ARG 362, VAL 363 por ligações de van der Waals. A frutose (figura 15, G) tem em seu mapa ligações de van der Waals com os aminoácidos VAL 363, ILE285, PRO 256, e ligações eletrostáticas com os aminoácidos LYS 44, ASP 257, SER 19, SER 144, ASN 122, ASP 286, ASP 121, GLU 281, SER 282. A glicose (figura 15, H) faz ligações eletrostáticas com os aminoácidos ASP 286, SER 282, ASP 121, ASO 252, LYS 44, ASN 122, SER 144, e ligações de van der Waals com PRO 256, TRP 283, GLU 281, ILE 285, ALA 145, VAL 363, ILE 146. Neotame (figura 15, I) com os aminoácidos LEU 30, TRP 933, LEU 929, LEU 666, LEU 33, GLU 930 (ligações de van der Waals), VAL 28, ILE 27, HIE 29, PRO 686, LYS 682, ALA 687 (ligações eletrostáticas). A sacarose (figura 15, J) liga-se aos aminoácidos LEU 358, ILE 46, LEU 50, PRO 287, ALA 145, PRO 256, ILE 146 com ligações de van der Waals, e aa VAL 364, ARG 362, VAL 363, SER 144, ASP 121, GLU 281, SER 282, ASN 122, ILE 285, ASP 286, LYS 44 por ligações eletrostáticas. A figura 15, K demonstra o mapa de ligação do esteviosídeo,

com a qual se conecta aos aminoácidos PRO 310, PHE 352, GLN 438, THR 354, HIE 290, PRO 440, ARG 436 com ligações de van der Waals, e aos aminoácidos VAL 309, ILE 311, ARG 318, GLU 361, LEU 356, GLY 360, SER 359, LEU 358, ASP 435, PHE 441, ASN 439, ARG 357, GLU 319 e SER 315 por ligações eletrostáticas. A sucralose se conecta aos aminoácidos ASN 439, LEU 358, ARG 357, SER 359, PHE 441, ASP 435, GLN 442 com ligações eletrostáticas e aos aminoácidos PRO 440, GLN 438, e PHE 352 por ligações de van der Waals. É de suma relevância enfatizar que no receptor TAS1R2/TAS1R3 os ligantes mencionados acima acoplam na proteína TAS1R2 do receptor.

Além do docking com os ligantes acima, o receptor controle modelado foi submetido ao docking com a molécula de lactisole, que trata de um inibidor da ativação do receptor que funciona como um antagonista e seus sítios de acoplamento estão na proteína TAS1R3 do receptor. A figura 16 mostra o complexo receptor e lactisole e seu respectivo mapa de ligação, onde a qual o lactisole faz ligações de van der Waals e hidrostáticas com os aminoácidos do receptor: THR 154, HIE 782, VAL 747, ASP 719, ALA 783, SER 718, LEU 749, ARG 751, ASP 720, PRO 748, GLU 753, GLU 609, PRO 610, PRO 750, e THR 154.

Figura 16: A) Complexo entre a proteína controle modelada com o lactisole B) Ligações do lactisole com o receptor controle. C) Mapa de ligação.



Fonte: Elaboração própria.

Uma vez realizados a modelagem molecular da proteína controle, e após a identificação dos polimorfismos, verificou-se se havia alguma conservação das mutações entre as amostras e a partir de então construiu-se os modelos tridimensionais das mutações que foram conservadas. Como observado na tabela 2, às mutações que perpetuaram por mais de uma amostra foram: substituição de uma timina por citosina (posição 2072); deleção de uma citosina e adenina (posições 2292 e 2293), deleção de uma guanina e citosina (posições 2999 e 3000), deleção de uma citosina (posição 2294), substituição de uma citosina por timina (posição 1854). Dentre essas mutações conservadas, analisou-se também se a mutação provoca alteração na sequência de aminoácidos, e a partir de então foram selecionadas as mutações na proteína a serem modeladas. Partindo desse parâmetro de organização, as mutações nas posições 2072 (aa 691), 2292/ 2293 (aa 764 e 765) e 2294 (aa 766) foram às selecionadas para a realização da proteína modelada.

Em seguida, fizemos a averiguação se estas mutações conservadas são peculiares de indivíduos autistas ou se também estão presentes em pessoas típicas. Para isso, utilizou-se o banco de dados Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>) que atualiza constantemente os polimorfismos do gene humanos, incluindo o TAS1R3, até então identificados, além de trazer as características gerais como posição e tipo de mutação dos polimorfismos, o banco também aborda o sexo do indivíduo e se este apresenta alguma doença genética. Nessa perspectiva, fizemos a averiguação online sobre os polimorfismos conservados identificados neste trabalho. Verificamos que nenhuma das mutações nas posições 2072 (aa 691), 2292/ 2293 (aa 764 e 765) e 2294 (aa 766) foram até então catalogadas e/ou identificadas tanto em indivíduos típicos e atípicos de acordo o banco utilizado.

Nessa perspectiva, foram geradas mutações pontuais na sequência padrão utilizada anteriormente, para cada mutante identificado nos estudo de polimorfismo. Em seguida utilizamos o programa Modeller, para a construção dos modelos. Este programa, quando comparado ao Swiss Model, permite a construção do modelo com mais de um molde cristalográfico e, dessa forma, é mais confiável para a construção de modelos sem cortes na estrutura. Uma vez identificado à proteína homóloga com maior grau de identidade (PDB: 5X2M), a sequência desta foi alinhada com a sequência da proteína TAS1R3 (figura 17).

Figura 17: Alinhamento do molde 5x2m com a proteína TAS1R3.



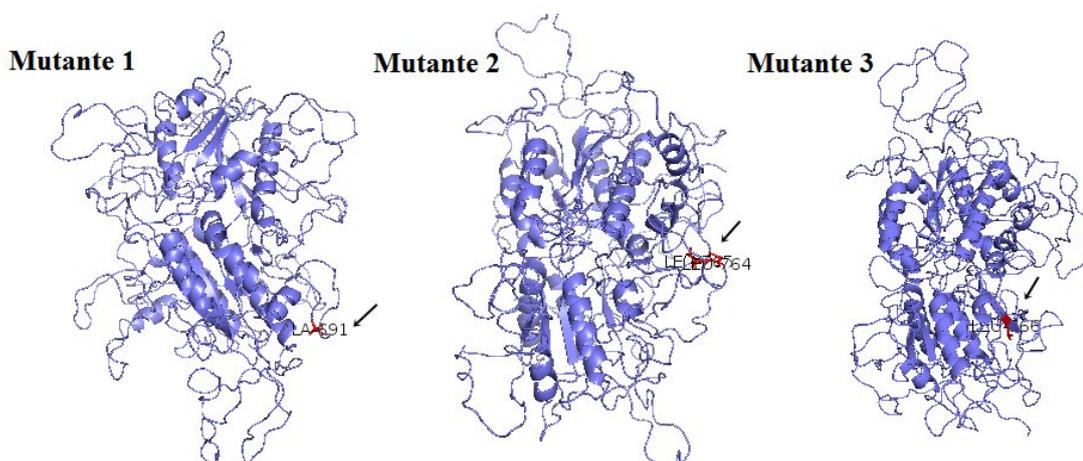
Fonte: Elaboração própria.

Foram construídos três modelos TAS1R3 mutantes: o mutante 1 (modelo com a mutação no aminoácido 691), mutante 2 (modelo com as mutações nos aminoácidos 764 e aa 765) e mutante 3 (modelo com a mutação no aminoácido 766) (figura 18).

Em seguida, os modelos foram validados utilizando como parâmetro o gráfico de Ramachandran (figura 19) que demonstra que no modelo construído com o mutante 1 (aa 691), este apresenta 76,4% dos seus resíduos em regiões favoráveis, 16,8% dos seus resíduos em regiões adicionalmente permitidas e 4,2% dos seus resíduos em regiões generosamente permitidas. O gráfico de Ramachandran para o mutante 2 (aa 764 e 765) apresenta 78,3% dos seus resíduos em regiões favoráveis, 16,0% dos seus resíduos em regiões adicionalmente permitidas e 3,7% dos seus resíduos em regiões generosamente permitidas. Em contrapartida, para o mutante 3

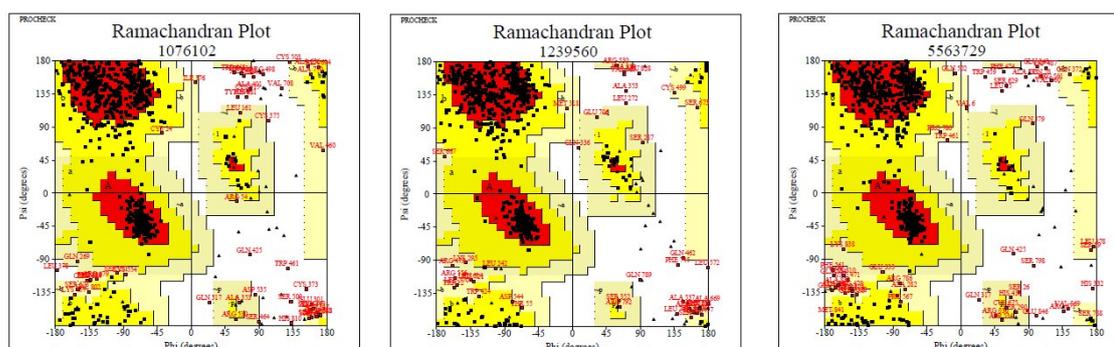
(aa 766) o gráfico de Ramachandran apresenta 78,9% dos seus resíduos em regiões favoráveis, 14,5% dos seus resíduos em regiões adicionalmente permitidas e 3,7% dos seus resíduos em regiões generosamente permitidas.

Figura 18: Modelos tridimensionais das proteínas mutantes com a marcação indicada pela seta de onde se encontra o polimorfismo.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 19: Gráfico de Ramachandran dos modelos mutantes.

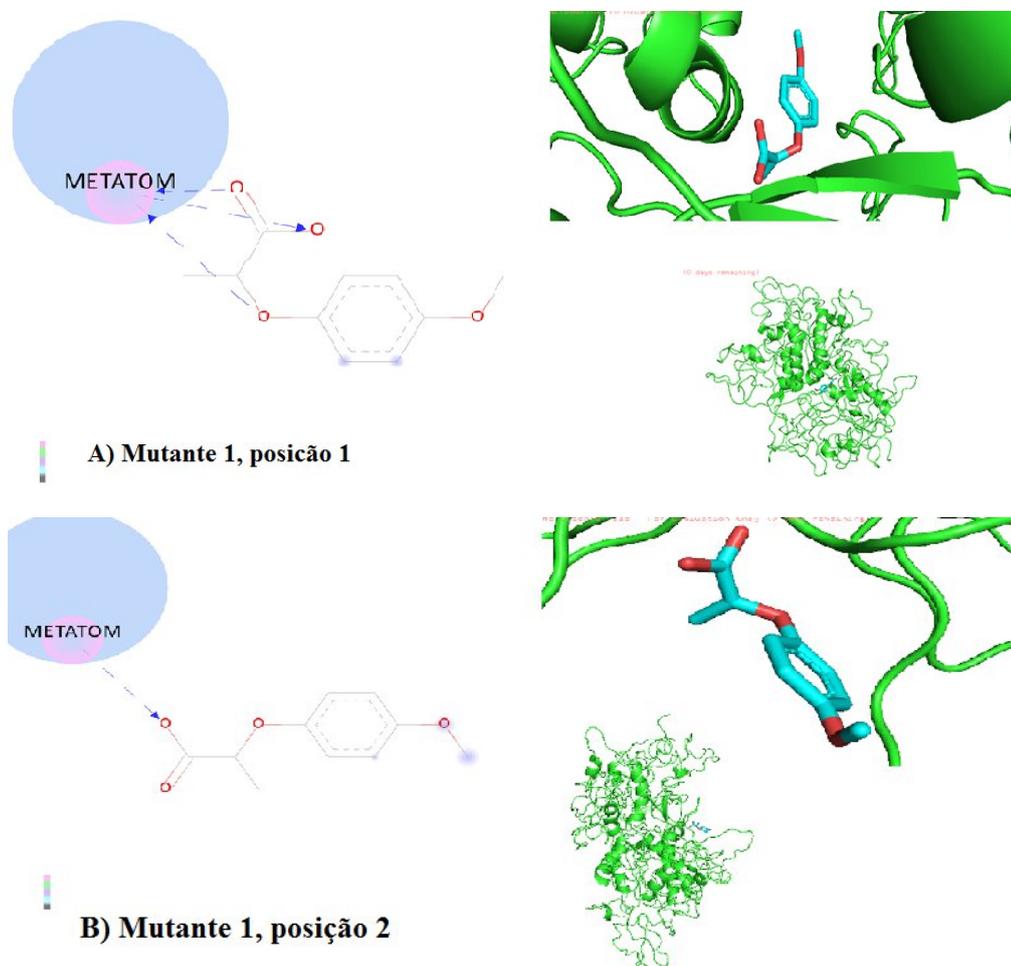


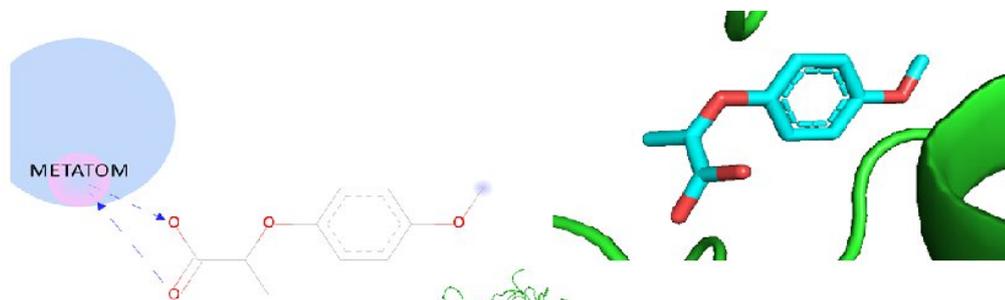
Fonte: Elaboração própria.

Levando em consideração que as mutações conservadas analisadas encontram-se na região TMD da proteína TAS1R3, e que é nessa região que encontra-se os sítios de ligação da molécula lactisole a proteína, o docking das proteínas mutantes foi realizado com o lactisole com o intuito de verificar se essas mutação causam alguma alteração no acoplamento do lactisole (figura 20, 21 e 22). A molécula de lactisole é descrita na literatura como um inibidor da proteína TAS1R3.

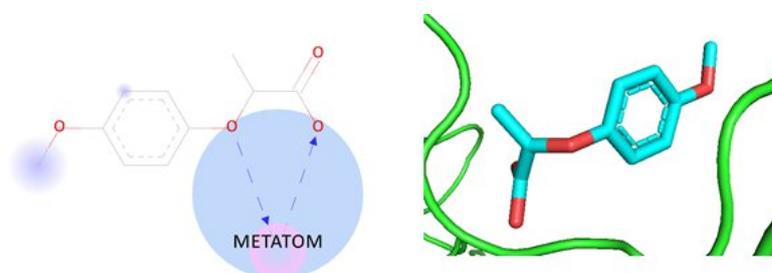
Embora a literatura mencione que os sítios de ligação do lactisole sejam nas posições 733, 778, 782, 790 e 798, e as mutações das proteínas mutantes modeladas sejam nas posições 691, 764 e 766. As figuras 20, 21 e 22 apresentam o complexo da proteína com o ligante e seus respectivos mapas de ligação para cada uma das 9 posições sugeridas para cada mutante. Analisando os mapas de ligação, verifica-se que não houve nenhuma ligação entre o ligante e aminoácidos da proteína, para todos os mutantes em todas as suas posições recomendadas pelo docking ocorreu apenas ligações de hidrogênio (figura 31, 32 e 33).

Figura 20: Complexo lactisole e mutante 1 da proteína TAS1R3 em todas as posições sugeridas pelo autodock e seus respectivos mapas de ligação.

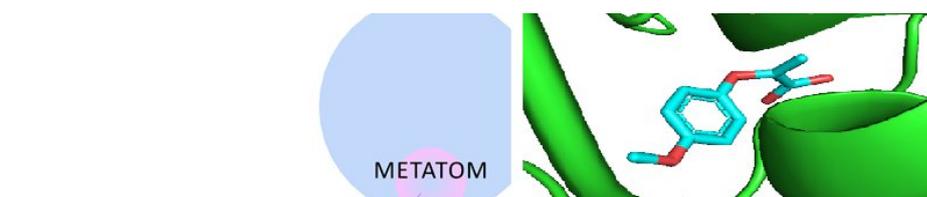




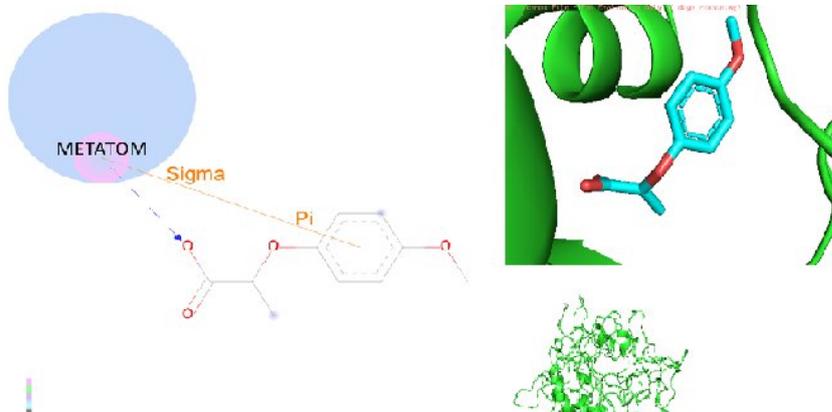
C) Mutante 1, posição 3



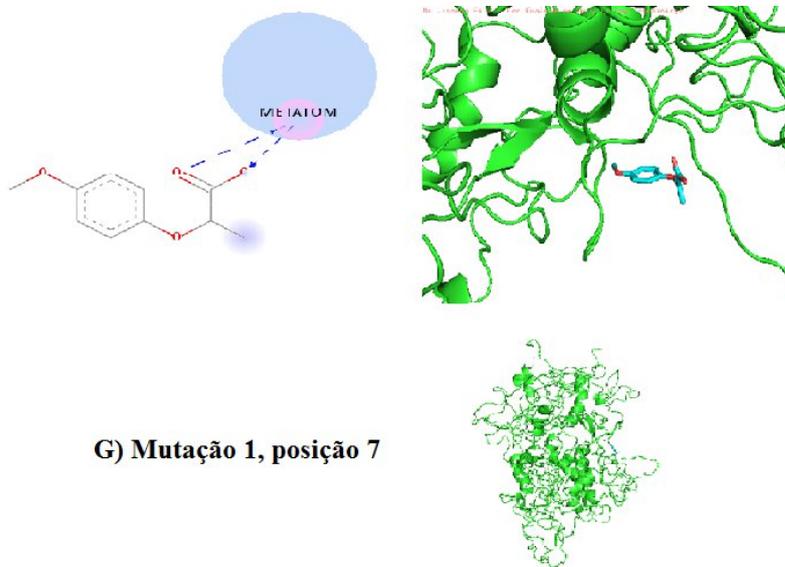
D) Mutante 1, posição 4



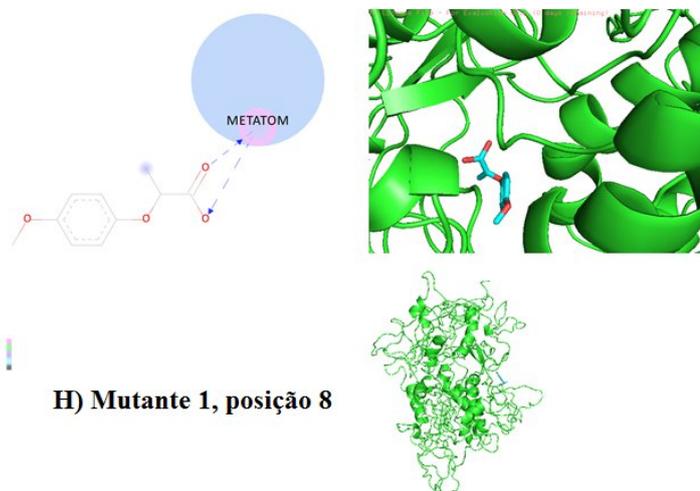
E) Mutante 1, posição 5



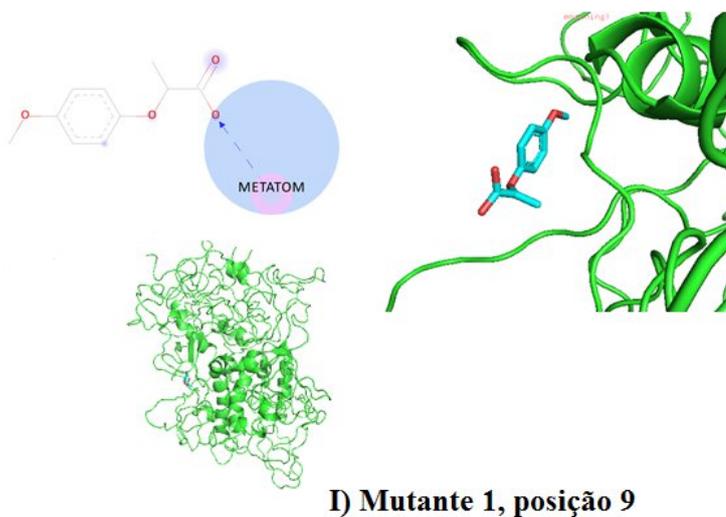
F) Mutante 1, posição 6



G) Mutação 1, posição 7

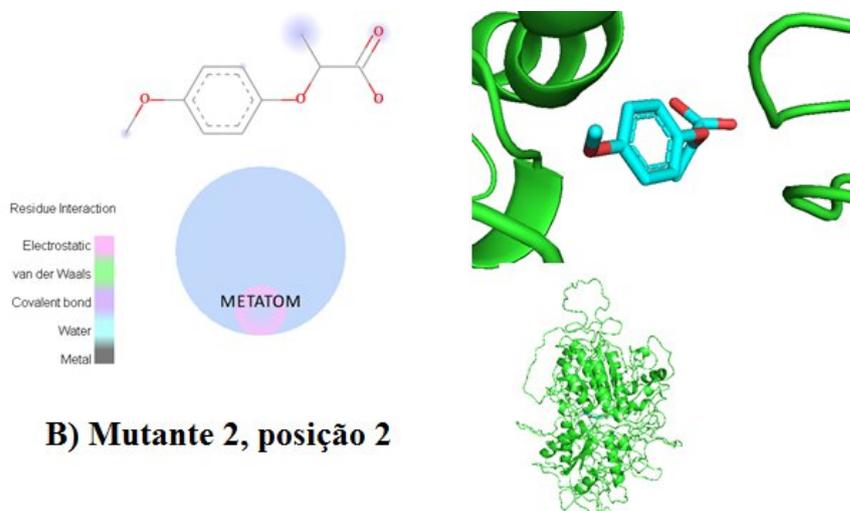
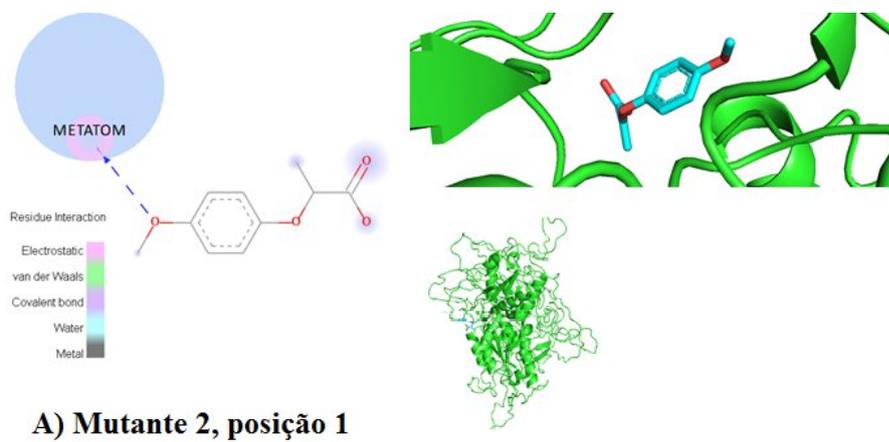


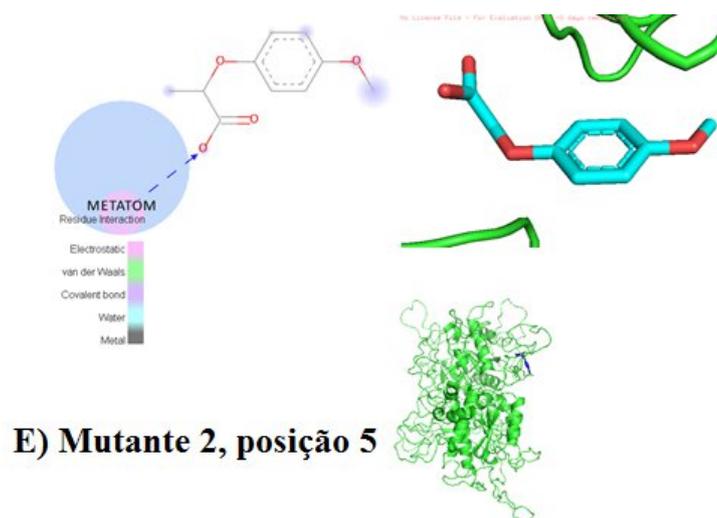
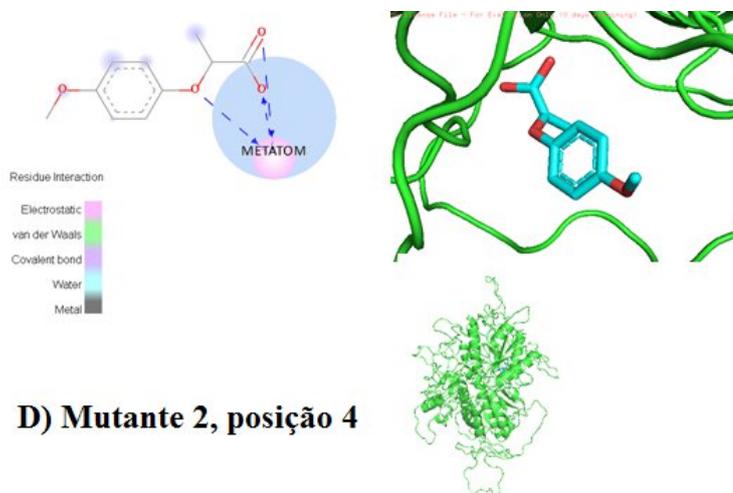
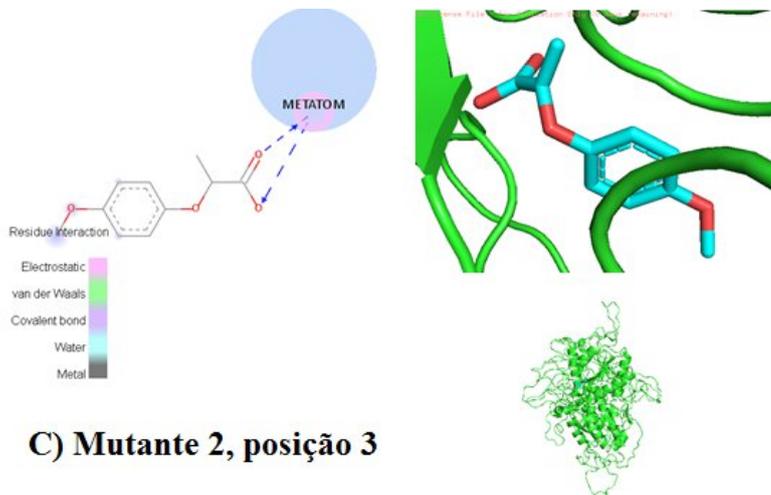
H) Mutante 1, posição 8

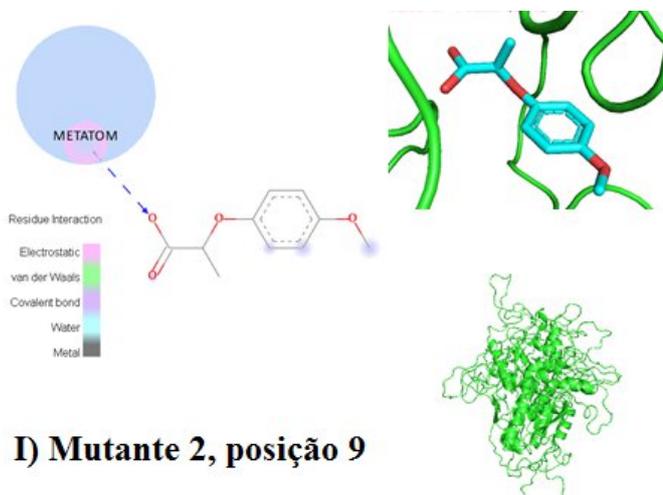


Fonte: Elaboração própria.

Figura 21: Complexo lactisole e mutante 2 da proteína TAS1R3 em todas as posições sugeridas pelo autodock e seus respectivos mapas de ligação.

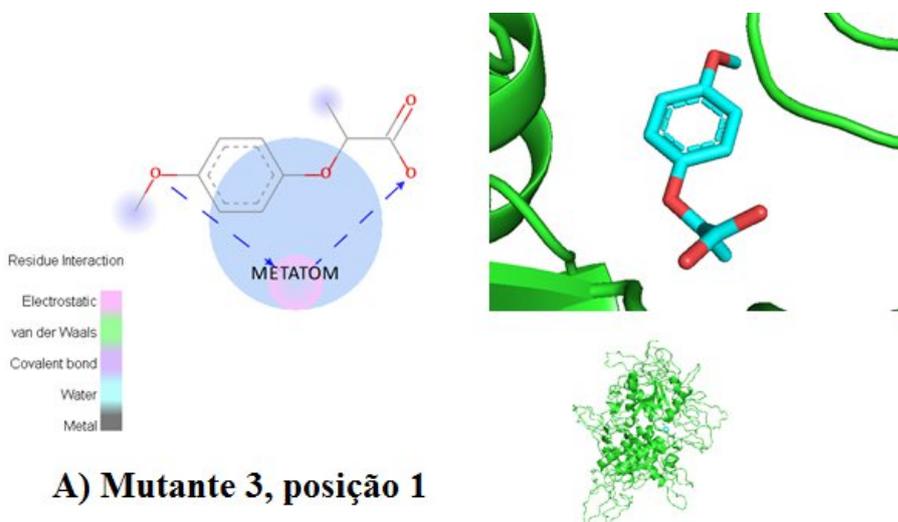


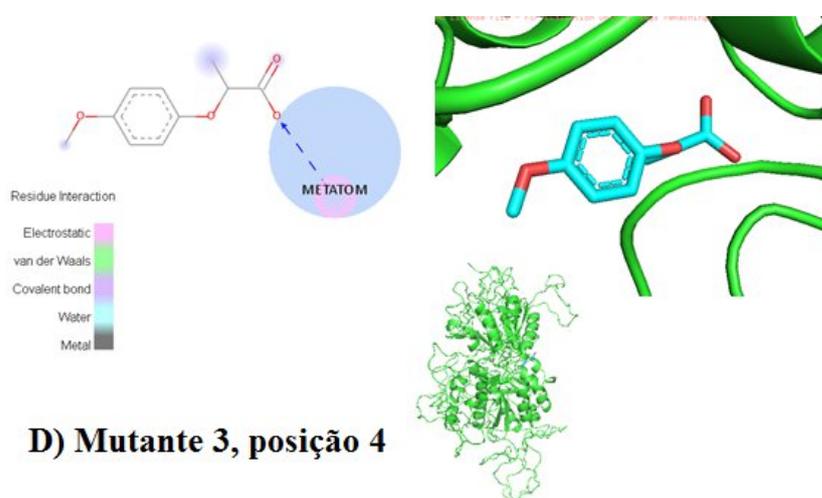
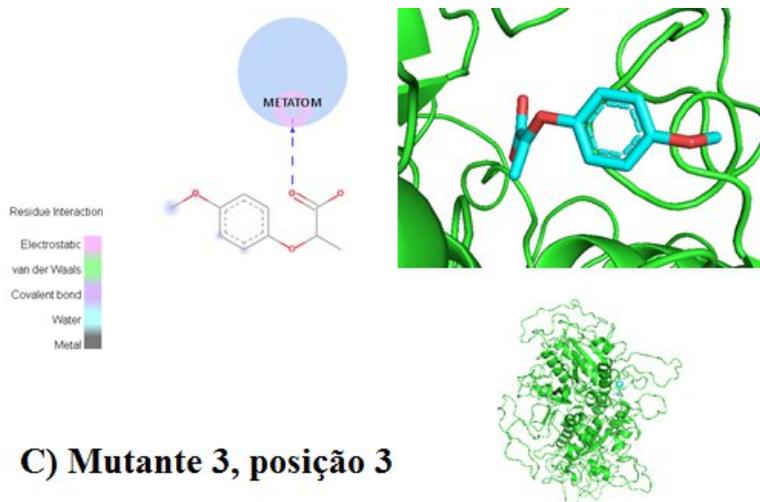
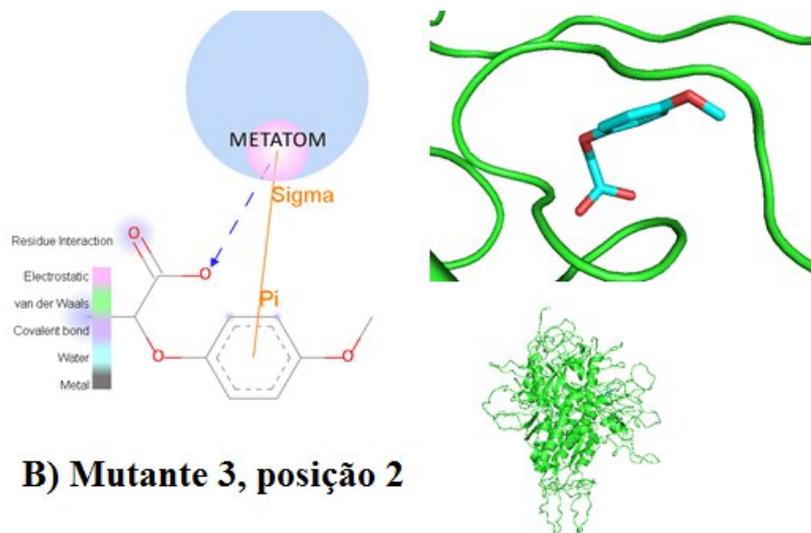


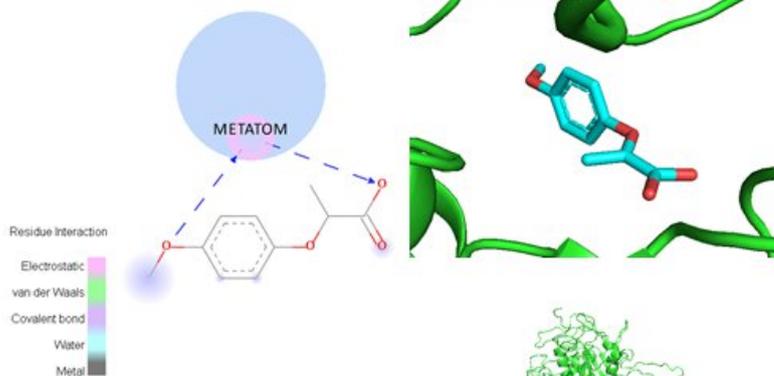


Fonte: Elaboração própria.

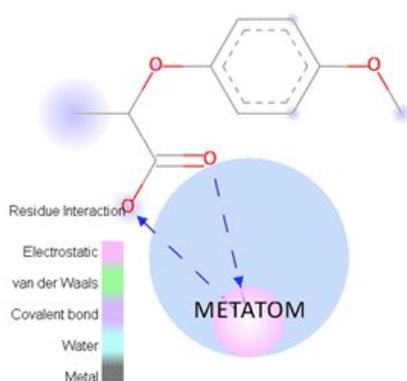
Figura 22: Complexo lactisole e mutante 3 da proteína TAS1R3 em todas as posições sugeridas pelo autodock e seus respectivos mapas de ligação.







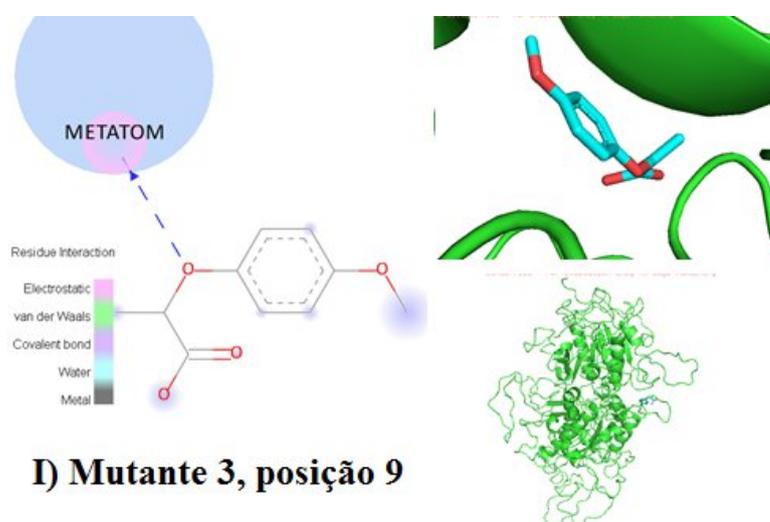
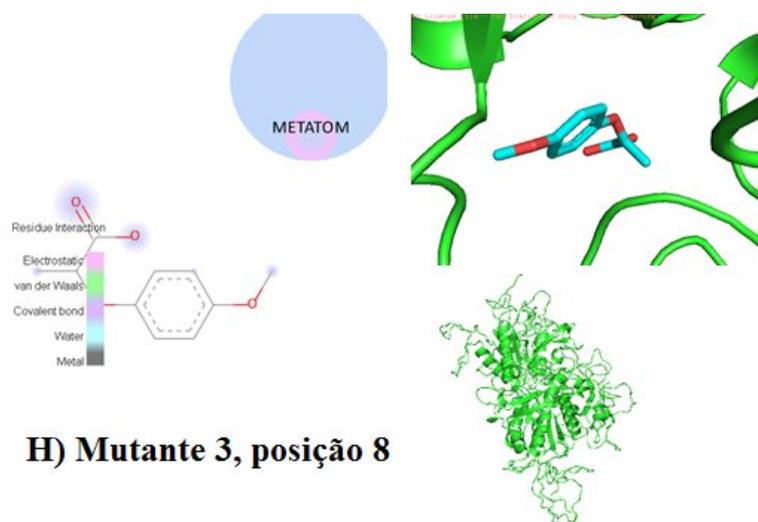
E) Mutante 3, posição 5



F) Mutante 3, posição 6



G) Mutante 3, posição 7



Fonte: Elaboração própria.

4.1 QUESTIONÁRIOS

Simultaneamente a coleta do material biológico, também foi aplicado as responsáveis pelos voluntários autistas dois questionários, sendo um destes de análise comportamental para a aferição do nível do espectro do indivíduo, e outro sobre hábitos alimentares (ver apêndice). O questionário para aferição do nível do espectro utilizado foi o “Autism Behavior Checklist” (ABC - Checklist) que trata-se de um método internacional comumente utilizado como um dos critérios de aferição do nível do espectro autista. O questionário sobre hábitos alimentares foi construído pelo autor deste trabalho com a colaboração de uma nutricionista e psicóloga.

Dentre os 85 indivíduos participantes desta pesquisa, 32 voluntários apresentam

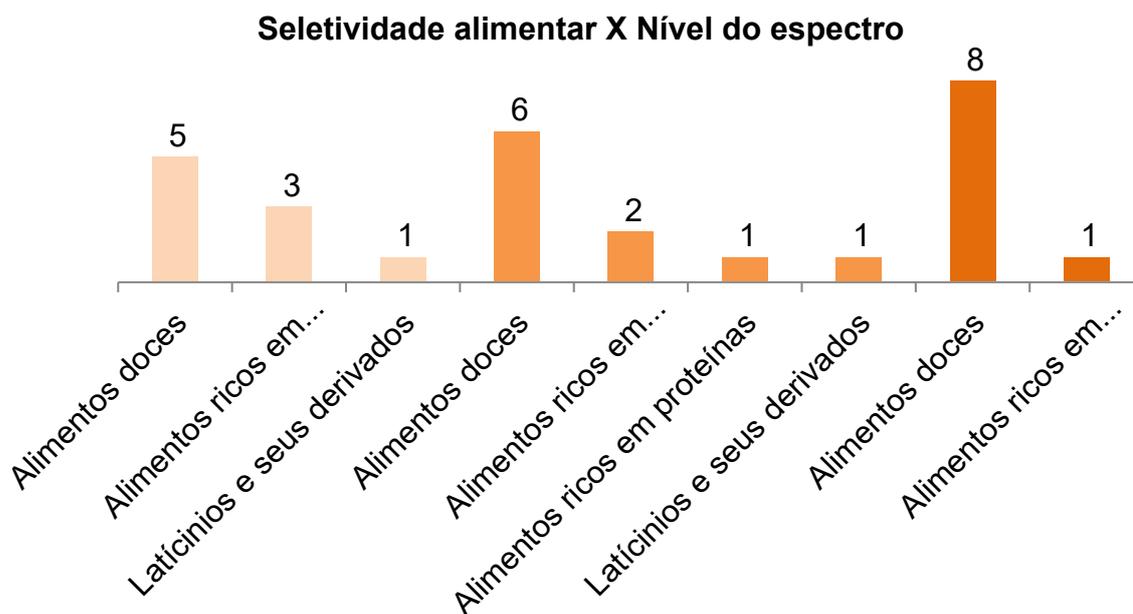
nível do espectro alto, 23 com nível moderado e 30 com nível baixo (gráfico 1). Além disso, dentro desses 85 indivíduos, 28 apresentam seletividade alimentar (gráfico 2). O gráfico 3 exibe um gráfico demonstrando os tipos de alimentos que os indivíduos com seletividade alimentar são seletivos e o nível do espectro autista. Observa-se neste gráfico que a maioria dos indivíduos que apresentam seletividade são seletivos a alimentos doces e a carboidratos. Além disso, verifica-se que dentre os indivíduos com seletividade alimentar que apresentam nível do espectro baixo, 5 voluntários em um total de 9 (55%) são seletivos a alimentos doces, já para os indivíduos seletivos que tem o espectro no nível moderado, 6 voluntários em 10 no total (60%) são seletivos a alimentos doces, todavia, quando avaliamos esse resultado para os indivíduos com o espectro no nível alto, observa-se que dentro um total de 9 indivíduos, 8 (88,89%) são seletivos a alimentos doces.

Gráfico 1: Nível do Espectro Autista



Fonte: Elaboração própria.

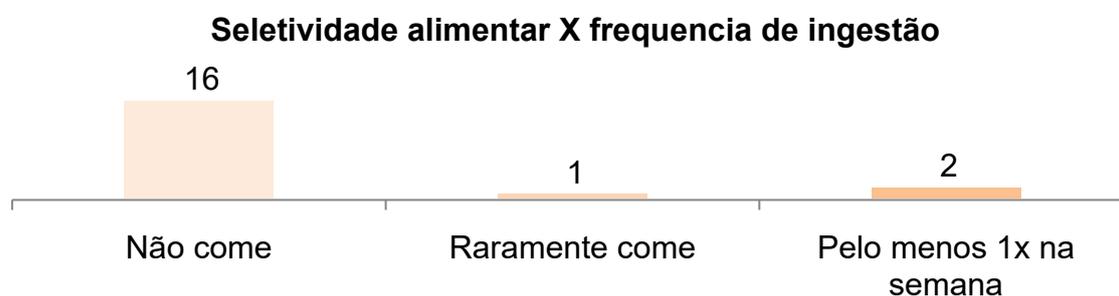
Gráfico 2: Relação dos indivíduos que apresentam seletividade alimentar com os tipos de alimentos e nível do espectro.



Fonte: Elaboração própria.

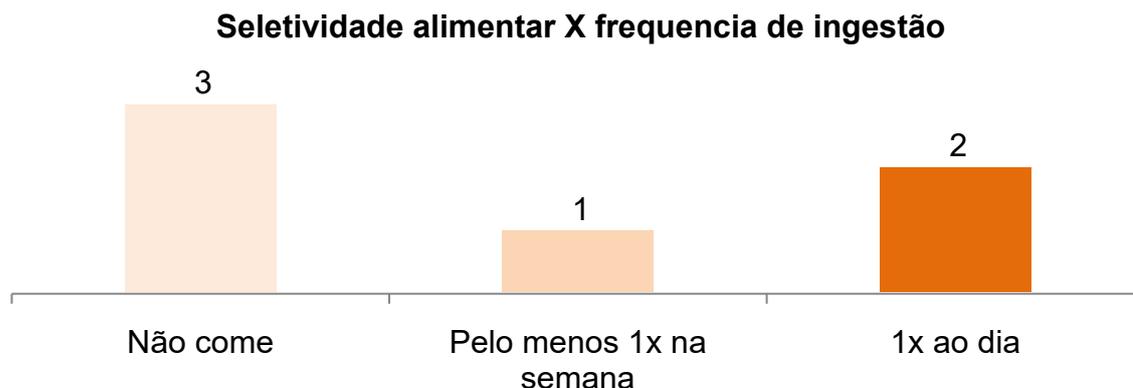
Os gráficos 3 e 4 corroboram validando os dados do gráfico 2 comparando os indivíduos que são seletivos a alimentos doces e a carboidratos e a frequência com que eles consomem esses alimentos. O gráfico 3 demonstra que dentre os 19 indivíduos seletivos a alimentos doces, 16 definitivamente não ingerem nenhum tipo de alimento doce, 1 come raramente, e 2 indivíduos comem pelo menos 1x na semana. O gráfico 4 apresenta que para 6 indivíduos com seletividade a alimentos ricos em carboidratos, 3 não comem alimentos que tenham carboidratos em grande concentração, 1 come raramente, e 2 come pelo menos 1x na semana.

Gráfico 3: Relação entre os indivíduos que apresentam seletividade alimentar aos doces com a frequência com que eles consomem esse tipo de alimento.



Fonte: Elaboração própria.

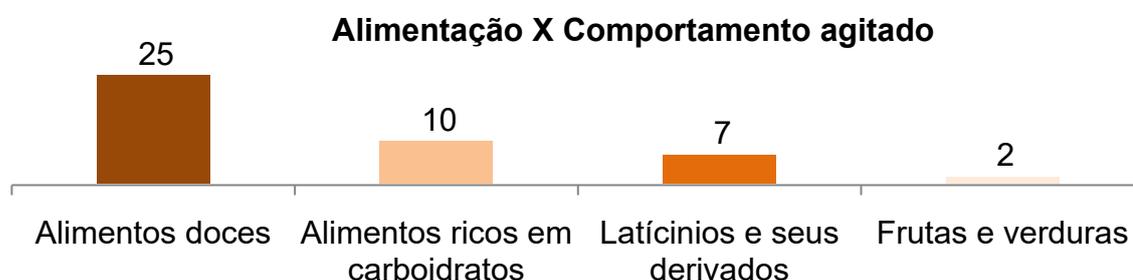
Gráfico 4: Relação entre os indivíduos que apresentam seletividade alimentar a carboidratos com a frequência com que eles consomem esse tipo de alimento.



Fonte: Elaboração própria.

O gráfico 4 demonstra que dos 85 indivíduos voluntários, 44 apresentam alteração no comportamento para agitado em virtude da alimentação, onde 25 destes exibem comportamento agitado após a ingestão de alimentos doces, 10 para alimentos ricos em carboidratos, 7 para laticínios e seus derivados e 2 para frutas e verduras. Em geral, a figura demonstra que a maioria dos voluntários que possuem alteração de comportamento em virtude da alimentação é em decorrência de alimentos doces.

Gráfico 5: Relação dos indivíduos que tem o comportamento alterado para agitado depois da ingestão de certos tipos de alimentos.

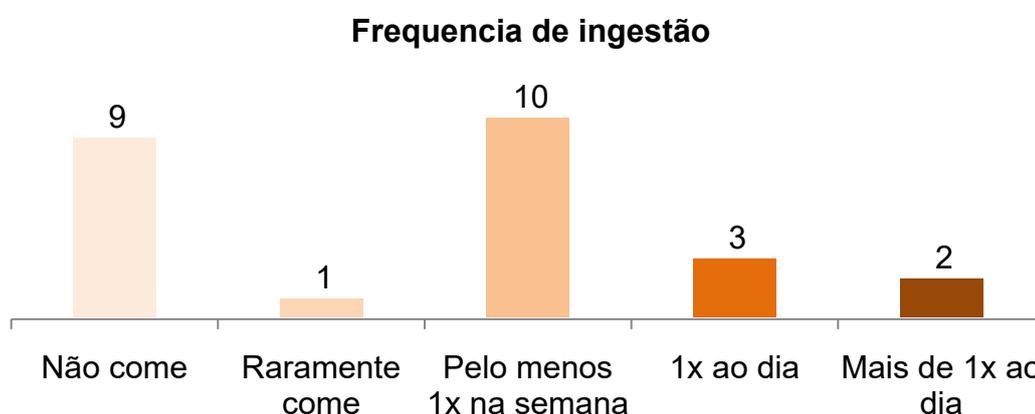


Fonte: Elaboração própria.

O gráfico 6 corrobora apresentando uma relação entre os 25 indivíduos que

possuem comportamento agitado supostamente em virtude da ingestão de alimentos doces e a frequência com que eles consomem esses tipos de alimentos. Verifica-se que dentre os 25 autistas, 9 não comem alimentos doces, 1 raramente come, 10 consomem alimentos doces pelo menos uma vez na semana, 3 comem 1x ao dia e 2 comem mais de uma vez ao dia. O gráfico 6 sugere que os participantes da pesquisa que ficam agitados após a ingestão de alimentos doces não comem com muita frequência esses tipos de alimentos. É essencial mencionar que dentro da classificação de alimentos doces fazemos referência a alimentos ricos em açúcar, como balas, doces, chicletes, sobremesas e etc.

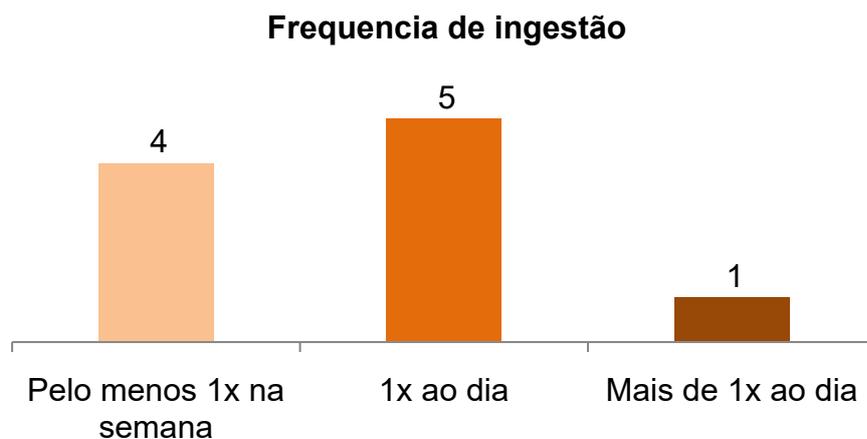
Gráfico 6: Relação dos indivíduos que tem o comportamento alterado após a ingestão de alimentos doces com a frequência que eles ingerem esses tipos de alimentos.



Fonte: Elaboração própria.

Levando em consideração que dentre uma parcela amostral de 44 indivíduos, onde 25 possuem alteração no comportamento com alimentação de doces, e 10 indivíduos com alimentação de carboidratos, o gráfico 7 apresenta a frequência com que esses 10 participantes ingerem alimentos ricos em carboidratos. Observa-se que metade dessa parcela amostral consomem carboidratos 1x ao dia.

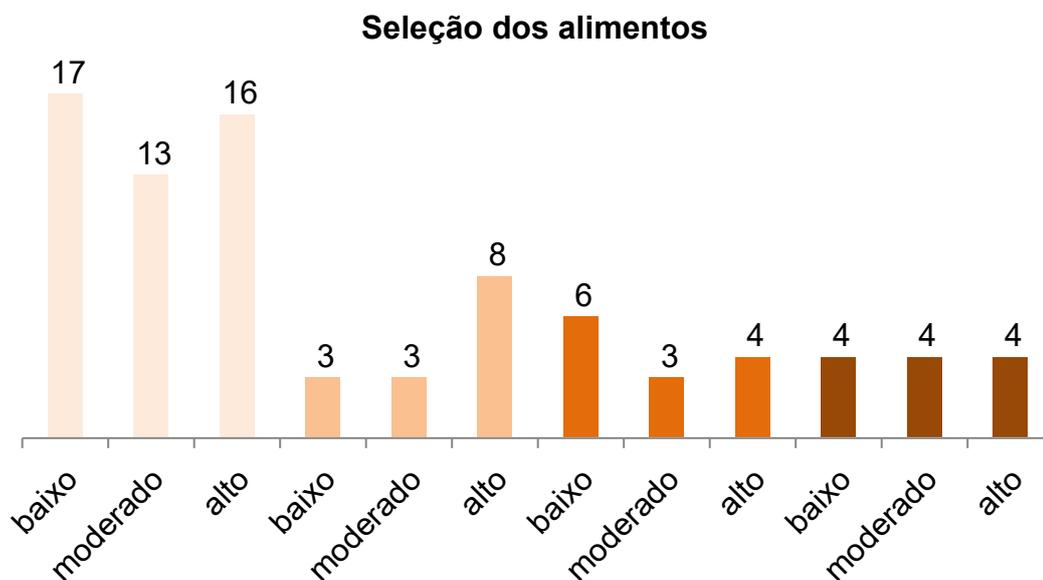
Gráfico 7: Relação dos indivíduos que tem o comportamento alterado após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos com a frequência que eles ingerem esses tipos de alimentos.



Fonte: Elaboração própria.

O gráfico 8 faz uma relação entre a existência de algum critério em especial para a seleção dos alimentos e o nível do espectro. A menção a “critério para seleção dos alimentos” nesse caso refere-se se o indivíduo apresenta algum critério diferenciado ou mais aguçado no momento em que este seleciona algo para comer. As alternativas sugeridas no questionário foram: a) não apresenta nenhum critério especial que chame a atenção; b) seleciona os alimentos pelo aspecto visual; c) seleciona os alimentos pelo toque; e d) seleciona os alimentos pelo cheiro. Os resultados apresentados no gráfico 8 demonstram que dentre 85 participantes deste trabalho, 46 não apresentam nenhum critério especial para a seleção dos alimentos, e que dentro destes 46 autistas, 17 apresentam espectro no nível baixo, 13 no nível moderado e 16 no nível alto ou seja, esses valores sugerem que não existe nenhuma relação com a forma como os autistas selecionam os alimentos com o nível do espectro.

Gráfico 8: Relação entre o nível do espectro autista com a forma de seleção dos alimentos.

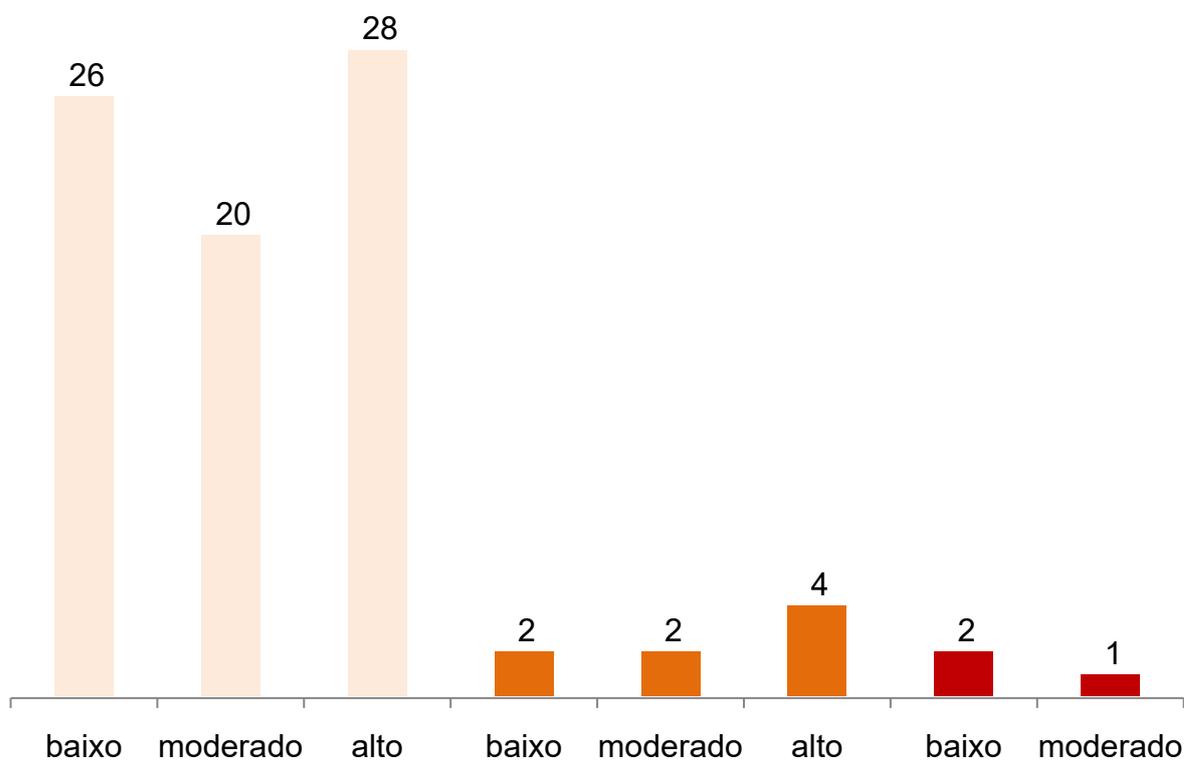


Fonte: Elaboração própria.

O gráfico 9 traz uma associação entre o nível do espectro autista dos indivíduos com a existência ou não de dificuldades na mastigação dos alimentos. Observa-se no gráfico que apenas 11 indivíduos dentre os 85 apresentam problemas na mastigação, e que não existe nenhum padrão deste relacionado ao nível do espectro.

Gráfico 9: Relação entre o nível do espectro autista com a existência ou não de dificuldades na mastigação dos alimentos.

Dificuldades na mastigação dos alimentos



Fonte: Elaboração própria.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE DADOS FENÓTIPICA

Melo (2009) retrata em seu trabalho que dependendo da gravidade, pessoas com distúrbios neuropsicológicos podem apresentar uma dificuldade na alimentação, prejudicando a saúde como qualquer pessoa normal quando não supre diariamente os nutrientes. Zuchetto; Miranda (2011) corroboram abordando que crianças autistas possuem padrão alimentar e estilo de vida diferente das crianças não autistas, comprometendo o crescimento corporal e estado nutricional desses indivíduos. Brandini et al. (2010) sugere em seu trabalho que a seletividade alimentar é mais comum em crianças com TEA do que em crianças com desenvolvimento típico, e que um repertório alimentar limitado pode estar associado a inadequações nutricionais. Os resultados dessa pesquisa demonstram que na parcela amostral trabalhada 32,9% dos indivíduos diagnosticados com autismo apresentam seletividade alimentar, todavia, não existe uma relação entre o nível do espectro do autista com a seletividade alimentar, uma vez que dentro de uma parcela de 85 indivíduos, 28 apresentam seletividade alimentar, e dentro destes 28 voluntários, 9 possuem nível do espectro alto (32,14%), o que sugere que para esta parcela amostral não há nenhuma relação da seletividade alimentar com o grau do espectro, uma vez que 67,86% dos voluntários seletivos na alimentação apresentam autismo baixo e moderado, ou seja, a prevalência do fenótipo seletivo foi semelhante nos três níveis de gravidade do espectro. Um resultado semelhante a este foi obtido por Riccio et al. (2017), todavia, em sua pesquisa Riccio estudou a seletividade alimentar de indivíduos autistas voltado para o gene TAS2R38, responsável pelo reconhecimento do sabor amargo.

Várias pesquisas abordam sobre a seletividade alimentar dos autistas, no entanto, ainda não existem pesquisas que associem a seletividade ao sabor dos alimentos, principalmente ao sabor doce (McDonald, 2014; Brandini, 2010; Suarez; Crinion, 2015). Os resultados dessa pesquisa propõem que dentre os 28 indivíduos que apresentam seletividade alimentar, 19 (67,85%) são seletivos para alimentos doces, o que sugere em uma possível alteração/mutação nos genes responsáveis pelo reconhecimento e sinalização desse sabor ao cérebro.

Algumas pesquisas relatam sobre a influência do consumo de açúcar sobre o

comportamento, tornando as pessoas mais hiperativas. Quantidades excessivas de açúcar no sangue provoca a hiperglicemia reativa que ocorre quando há um consumo elevado de açúcar simples, provocando um aumento na produção de insulina secretada pelo pâncreas. Este estímulo faz com que ocorra um aumento na produção de dopamina, que ativa o sistema nervoso, levando a um comportamento hiperativo. Além disso, a hipoglicemia exerce efeito na atividade elétrica cerebral. O córtex frontal, envolvido no controle da atenção, é fortemente ativado na presença de hipoglicemia (SILVA, 2016). Este mesmo efeito acontece com indivíduos diagnosticados com TEA, como pode ser observado no gráfico 5 que para 44 autistas que apresentam alteração do comportamento para agitado após a alimentação, 25 ficam hiperativos após a ingestão de alimentos doces. A hiperatividade para pessoas diagnosticadas com TEA pode vir acompanhada por agressividade, injúria e outros sintomas a depender do nível do espectro.

Molteni et al. (2002) aborda que gorduras saturadas e açúcar refinado podem influenciar a estrutura e a função do cérebro via regulação de neurotrofinas. Uma dieta à base de açúcar refinado e gordura saturada pode diminuir a plasticidade neuronal via regulação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é um membro da família das "neurotrofinas" dos fatores de crescimento, e foi o segundo fator neurotrófico a ser caracterizado depois do fator de crescimento nervoso (NGF). Estes fatores são encontrados no cérebro e na periferia; eles ajudam na sobrevivência neuronal e na neurogênese, além disso, agem sobre certos neurônios do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico, ajudando na manutenção dos neurônios estabelecidos e permitindo o crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses. No cérebro, o BDNF está ativo no hipocampo, córtex e tronco cerebral.

Molteni et al. (2002) relata que o BDNF está emergindo como importante participante em eventos neuronais subjacentes à aprendizagem e à memória. O autor retrata, por exemplo, que a atividade neural regula a síntese, secreção e ação do BDNF, e o BDNF induzido pela atividade pode facilitar a eficácia sináptica (POO, 2001). A expressão do BDNF é aumentada no hipocampo de animais que aprendem uma tarefa de memória espacial (KESSLAK et al., 1998; MIZUNO et al., 2000) e animais com expressão reduzida de BDNF apresentam défices na aprendizagem e memória (LINNARSSON et al., 1997). Uma dieta com concentrações excessivas de açúcar e gordura saturada diminui a expressão do BDNF no hipocampo, o que afeta

diretamente na plasticidade cerebral. Nessa perspectiva, uma redução nos alimentos processados, ricos em açúcar refinado e gordura saturada é relevante para todas as pessoas, independente de diagnóstico autista ou não, todavia, para indivíduos com TEA torna-se ainda mais crucial, uma vez que além de provocar hiperatividade pode também ser prejudicial às condições neuronais de aprendizagem desses indivíduos que já tem dificuldades. O gráfico 6 mostra a frequência com que esses indivíduos que apresentam hiperatividade ingerem alimentos doces, e observa-se que, dentro os 25 voluntários, 15 consomem esses tipos de alimentos pelo menos 1x na semana. Tendo em vista que carboidrato após ser digerido também vira açúcar, observa-se no gráfico 7, dentre os participantes que são sensíveis a carboidratos, 3 não consomem e 3 consomem pelo menos 1x na semana.

Com relação à ingestão de carboidratos, existem muitos relatos sobre a sensibilidade de alguns autistas ao consumo de alimentos ricos neles. Mundy (2011) utilizou a endoscopia com biópsia para examinar o trato digestório de 36 crianças diagnosticadas com autismo que, concomitantemente, apresentavam dor abdominal, diarreia, dor crônica, distensão abdominal, dificuldades com o sono ou irritabilidade inexplicável. Achados anormais incluíram esofagite de refluxo em 25 das crianças, gastrite crônica em 15, e duodenite crônica em 24 delas. Baixa atividade das enzimas digestivas intestinais para carboidratos foi observada em 21 crianças, enquanto 27 apresentaram aumento da secreção pancreática e da secreção biliar após a administração intravenosa do hormônio gastrointestinal secretina.

Os resultados dessa pesquisa, figura 14, sugere que não existe nenhum padrão na forma de selecionar os alimentos de pessoas com TEA com o grau do espectro, todavia, ainda pouco se sabe sobre essa relação uma vez que ainda não existem estudos que associem a seleção dos alimentos com o nível. Existem muitos trabalhos que abordam sobre como os autistas selecionam os alimentos, mas ainda não associaram com o grau do espectro autista. Além disso, na figura 15 observa-se que embora os autistas apresentem disfunção sensorial e por consequência dificuldades nas habilidades motoras, 74 dos 85 indivíduos analisados não apresentam dificuldades na mastigação dos alimentos.

5.2 ANÁLISE GENÓTIPICA

Cheron et al. (2006) retrata sobre os sítios de ligação do receptor TAS1R2/TAS1R3. Para a proteína TAS1R3 o autor aborda que entre os aminoácidos P42 e Q389 estão os sítios de ligação da região VFD da proteína; de acordo o autor, dentre os aminoácidos S620 a Y815 estão os sítios de ligação da região TMD da proteína TAS1R3, e o autor também corrobora especificando os aminoácidos supostamente responsáveis em serem os interruptores moleculares da proteína (L648, Y771, C801, S602, G603, Q654, A655, A656, E657, N759, R760, A761, R762, F809, H810, P812, R813 e Y815). Comparando os resultados de Cheron (2006) com os resultados dessa pesquisa, observa-se que todos os polimorfismos encontrados nos indivíduos autistas estão na região TMD e na região dos interruptores moleculares.

Ainda segundo Cheron (2006), a região TMD da proteína TAS1R3 possui um sítio de ligação e que o acoplamento das substâncias tanto no sítio de ligação da TAS1R3 quanto na proteína TAS1R2 promovem mudanças conformacionais nas hélices das 7 transmembranas da região TMD da proteína TAS1R3. Essas mudanças conformacionais é que são responsáveis pela ativação ou inibição do sinal as proteínas G. Além disso, o autor ainda complementa que alterações na proteína TAS1R3 podem influenciar não só a recepção do sabor doce, mas também o sabor umani, uma vez que o receptor do sabor umani é um heterodímero das proteínas Tas1r1/TAS1R3.

O sítio de ligação localizado na região TMD da proteína TAS1R3 apresenta um bolso de ligação com volume de 270Å³ que é especializado no acoplamento de substâncias menores, como o lactisole e o ciclamato, que são ligantes exclusivos da proteína TAS1R3 no receptor do sabor doce e estão estritamente associados a intensidade da emissão do sinal de reconhecimento de várias moléculas de açúcares. Schiffman et al. (2016) aborda que o lactisole atua como um inibidor, onde a qual reduz a intensidade do sabor doce de algumas substâncias, mas não todas as moléculas de açúcares. De acordo Schiffman et al. (2016) o lactisole reduz a intensidade do sabor da sucrose, frutose, glucose, estevisiideo, aspartame, acessulfame de potássio e ciclamato.

Jiang et al. (2005) retrata que os aminoácidos que estão relacionados a sensibilidade ao lactisole são Ser-640, His-641 na TM hélice 3 e Phe-778, Leu-782 na TM helix 6. Jiang et al. (2005) ainda corrobora que os sítios 733 (TM hélice 5), 790 e 798 (TM hélice 7) também afetam a sensibilidade do receptor ao lactisole.

Tendo como ponto de partida os resultados propostos por Jiang em seu trabalho, e analisando os polimorfismos encontrados nessa pesquisa, observa-se que as quatro mutações as quais foram observadas uma repetição dentre as amostras estão entre os aminoácidos 690 a 765, que conferem uma proximidade em posição bem grande com os aminoácidos propostos por Jiang et al. (2005) a serem sensíveis ao lactisole, o que propõe um indicio de investigação sobre a relação desses aminoácidos com o acoplamento ao lactisole, e por conseguinte sobre a inibição do envio do sinal de reconhecimento de algumas moléculas de açúcares.

Jiang et al. (2005) ainda aborda que as hélices que estão interligadas a ligação do lactisole são as TM 3, 5 e 6. Os dados propostos por Jiang et al. (2005) juntamente com os dados obtidos nessa pesquisa sugere a possibilidade das mutações nos aminoácidos 691, 764, 765 e 766 provocarem alguma alteração na conformação da proteína que faz com que as hélices 3, 5 e 6 se distanciem a ponto de dificultarem a ligação do lactisole na proteína. E salientando, que o lactisole é uma molécula de ligação restrita a proteína TAS1R3 no receptor do sabor doce, hipotetiza-se que alterações nesses sítios da proteína TAS1R3 podem impedir à ligação do lactisole a proteína, e por consequência inviabilizar o sistema de inibição exercido por esta molécula, o que explicaria, por exemplo, o porquê que alguns indivíduos autistas (já que estas mutações são até então peculiares a indivíduos com TEA) têm preferências ou seletividade por alimentos doces.

De acordo Jiang et al. (2005) o mecanismo de ativação e inibição do receptor heterodimérico para o sabor doce se assemelha com o da rodopsina, onde basicamente o mecanismo de ativação ocorre quando a TM hélice 6 inclina-se distanciando-se da TM helix 3; resultando no final citoplasmático da TM hélice 6 aproximando-se da extremidade citoplasmática da hélice TM 5. No caso do receptor do sabor doce, a ação inibitória do lactisole pode ser mediada pela sua ligação às hélices TM 3, 5 e 6 de hT1R3 para restringir o movimento necessário das hélices para conversão para estado ativo. Com efeito, o lactisole bloqueia o receptor no Estado Fundamental. Isso explicaria como a ligação do lactisole a o TMD de hT1R3 pode "agir à distância" para antagonizar os adoçantes.

6 CONCLUSÃO

Por meio do grupo amostral estudado neste trabalho verificou-se que o gene TAS1R3 em indivíduos autistas apresenta 28 polimorfismos diferentes, sendo algumas dessas mutações conservadas entre os indivíduos. Além disso, a seletividade alimentar pode ser considerada como um sintoma comumente encontrado entre as pessoas com TEA, onde a mesma encontra-se em maior escala para alimentos doces. Ainda, observou-se que não existe nenhuma relação entre a seletividade alimentar dos autistas com o nível do espectro, assim como também não há nenhuma relação com os problemas de mastigação.

Também analisou-se que as mutações nos sítios 691, 764, 765 e 766 na proteína TAS1R3 provoca alguma alteração conformacional da proteína que inviabiliza a molécula de lactisole de se acoplar ao receptor, sugerindo que esta seja a causa das preferências e seletividade ao alimento doce.

Por fim, conclui-se que os resultados dessa pesquisa levantam algumas hipóteses que podem justificar a base molecular da seletividade alimentar de indivíduos autistas carecendo de continuidade nas pesquisas relacionadas ao tema para fornecer um maior entendimento sobre o assunto e poder de fato, melhorar a qualidade de vida das pessoas com TEA.

REFERENCIAS

Almeida J. G., et al. – Membrane proteins structures: A review on computation modeling tools – ELSEVIER , Julho 2017

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5),ed.5. Washington, DC: American Psychiatric, 2013.

ANDRADE, Bruno Silva. Modelagem por homologia das DNA e RNA polimerases do plasmídeo mitocondrial de *moniliophthora perniciosa* e suas relações filogenéticas com outras polimerases fúngicas e virais. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. UEFS. 2008.

BACHMANOV, Alexander A.; BEAUCHAMP, Gary.K. Taste receptor genes. Annual Review of Nutrition. v. 27, p. 389–414. 2007.

BANDINI, L. ; SARAH, E; ANDERSON, S; CURTIN, C.; CERMAK, S.; EVANS, E; SCAMPINI, R; MASLIN, MELISSA, M; MUST. Food Selectivity in Children with Autism Spectrum Disorders and Typically Developing Children. The Journal of pediatrics. 157. 259-64. 10.1016/j.jpeds.2010.02.013. 2010.

BENFORD, Heather. et al. A sweet taste receptor-dependent mechanism of glucosensing in hypothalamic tanycytes. Glia. v. 65, p.773–789, 2017.

BITAR, Tania et al. Identification of metabolic pathway disturbances using multimodal metabolomics in autistic disorders in a Middle Eastern population. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.152, p. 57–65, 2018.

BRASIL (2012). Ministério da Saúde: Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 466, de 12 DE Dezembro DE 2012. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html>. Acessado em 20 de Março de 2019.

CALIXTO, M. H. P. Aspectos gerais sobre a modelagem comparativa de proteínas.

Ciência Equatorial. Volume 3 - Número 1 - 1º Semestre 2013.

CASE-SMITH, Jane; O'BRIEN, Jane C. Occupational therapy for children. Mosby Elsevier, Missouri, ed.6, 2010.

CERMAK et al., Sharon A., CURTIN, Carol, BANDINI, Linda G. Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. Journal of American Diet Association, v. 110, p. 238–246, 2010.

CHÉRON, Jean-Baptiste et al. The anatomy of mammalian sweet taste receptors. Proteins, v. 85, p. 332–341, 2017.

COOKE, Lucy J.; HAWORTH, Claire M.; WARDLE, Jane. Genetic and environmental influences on children's food neophobia. American Journal of Clinical Nutrition, v. 86, p. 428–433, 2007.

CORREIA, Cláudia Oliveira Antunes. Seletividade alimentar e sensibilidade sensorial em crianças com perturbação do espectro autista. Escola Superior de Saúde do Alcoitão. Dissertação (Mestrado em Terapia Ocupacional), 1v, 26f. Portula, Lisboa. 2015.

CUI, Meng et al. The Heterodimeric Sweet Taste Receptor has Multiple Potential Ligand Binding Sites. Current Pharmaceutical Design, v. 12, p. 4591-4600, 2006.

DA SILVA, Bianca Del Ponte. Consumo materno de cafeína durante a gestação, consumo de açúcar pela criança e Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) aos seis anos de idade. Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas. 2016.

FIGUEIREDO, José Edson Fontes et al. Estudo de modelagem por homologia para análise genômica funcional. Comunicado técnico, n. 129. 2005.

GABRIELS, Robin L. HILL, Dina E. Growing up with autism: Working with school-age children and adolescents. The Guilford Press, New York, 2007.

GADIA, Carlos. Aprendizagem e autismo: transtornos da aprendizagem: abordagem neuropsicológica e multidisciplinar. Porto Alegre: Artmed, 2006.

GOLDSMITH-FISCHMAN S.; HONIG B. Structural genomics: computational methods for structure analysis. *Protein Sci* 12: 1813-1821. 2003.

ISAKSEN, Jorn et al. Autism spectrum disorders—are they really epidemic? *European Journal of Paediatric Neurology*, v. 17, 327–333, 2013.

Jiang, Peihua & Cui, Meng & Zhao, Baohua & Liu, Zhan & Snyder, Lenore & M J Benard, Lumie & Osman, Roman & Margolskee, Robert & Max, Marianna. (2005). Lactisole Interacts with the Transmembrane Domains of Human T1R3 to Inhibit Sweet Taste. *The Journal of biological chemistry*. 280. 15238-46. 10.1074/jbc.M414287200.

KANNER, Lane. Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nervous Child*, n. 2, p. 217-250. 1943.

Kesslak, J.P., So, V., Choi, J., Cotman, C.W., Gomez-Pinilla, F., 1998. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor Messenger.

LANE, Alison E., MOLLOY, Cynthia A., BISHOP, Somer L. Classification of children with autism spectrum disorder by sensory subtype: A case for sensory-based phenotypes. *Autism Research*, v. 7, p. 322–333, 2014.

LEVITT, M. Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching. *J MOL BIOL*, V. 226, N. 2, P. 507-33, JUL., 1992.

LINNARSSON, S., BJORKLUND, A., ERNFORS, P., 1997. Learning de ζ cit in BDNF mutant mice. *Eur. J. Neurosci*. 9, 2581-2587. Ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci*. 112, 1012-1019.

MAGALHÃES, Gracinda Maria Ferreira. Mecanismos bioquímicos da percepção do doce e preferências alimentares. 2013.1v, 34f. Dissertação (Mestrado Integrado em

Medicina Dentária). Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

MARÍ-BAUSET, Salvador et al. Food Selectivity in Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review. *Journal of Child Neurology*, v. 29(11), p. 1554-1561, 2014.

MCDONALD, N.; WITHROW, A. FOOD SELECTIVITY AND WEIGHT STATUS IN CHILDREN WITH AN AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD). Degree of Doctor of Philosophy. Colorado State University. 2014.

MELLO, A. M. S. R. Autismo: Guia Prático. 4ª edição. São Paulo: AMA; Brasília: CORDE, 2009.

MELO, S.; AGNES, G. R; VITOLO, M.; M.; VANESSA, C; PAULA, A. Evaluation of the association between the TAS1R2 and TAS1R3 variants and food intake and nutritional status in children. *Genetics and molecular biology*. 2017.

Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., Nabeshima, T., 2000. Involvement of brain-derived neurotrophic factors in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci.* 20, 7116-7121.

MURRAY-SLUTSKY, Carolyn; PARIS, Betty A. Exploring the spectrum of autism and pervasive developmental disorders. Therapy Skill Builders, United States of America, 2000.

PATNY, A.; DESAI, P.; AVERY, M. A. Homology modeling of G-protein-coupled receptors and implications in drug design. *Current Medicinal Chemistry*, n. 13, p. 1667-1691, 2006.

Pia Riccio, Maria & Franco, Chiara & Negri, Rossella & Ida Ferrentino, Roberta & Maresca, Roberta & D'alterio, Elisa & Greco, Luigi & Bravaccio, Carmela. (2017). Is food refusal in autistic children related to TAS2R38 genotype?: Food refusal and autism spectrum disorders. *Autism Research*. 11. 10.1002/aur.1912.

PIN, Jean-Philippe; GALVEZ, Thierry; PRÉZEAU, Laurent. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology &*

therapeutics. 98. 325-54. 2003.

POO, M.-m. Neurotrophins as a synaptic modulator. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 24-32. 2001.

R. MOLTENI, R. J. BARNARD, Z. YING, C. K. ROBERTS; F. GO MEZ-PINILLA. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*. Vol. 112, No. 4, pp. 803-814, 2002.

REN, Xueying et al. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Frontiers in integrative Neuroscience*. v. 3. n.12. 2009.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. *PROTEINS ENG*, v. 12 n. 2, p. 85-94, Feb., 1999.

ROUTH, Vanessa H. Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. *Sensors*, v. 10, p. 9002-9025, 2010.

SANTOS-FILHO, Osvaldo Andrade; ALENCASTRO, Ricardo Bicca de. Modelagem de Proteínas por Homologia. *Química Nova*, v. 26, n. 2, p. 253 – 259, 2003.

SCHOONMAN, M. J. ET AL. Practical evaluation of comparative modelling and threading methods. *COMPUT CHEM*, V. 22, N. 5, P. 369-75, SET., 1998.

SHIMAZU, Takashi; MINOKOSHI, Yasuhiko. Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). *Journal of the Endocrine Society*, v.1, p. 449-459, 2017.

TANG, Guomei et al. Loss of mTOR - dependent macro autophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*. v. 83, p. 1131–1143, 2014.

WILLIAMS, Patricia Gail; DALRYMPLE, N., NEAL, J. Eating habits of children with autism. *Pediatric Nursing*, v. 26, p. 259–264, 2000.

ZUCHETTO, A. T., MIRANDA, T. B., Estado nutricional de crianças e adolescentes, *EFDeportes.com, Rev dig*, v. 16, n.04, p.159-170, 201

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO HÁBITOS ALIMENTARES

IDENTIFICAÇÃO _____ NÚMÉRICA _____ DO
 PARTICIPANTE: _____
 DATA DA APLICAÇÃO: ___/___/___

A criança apresenta alguns dos sintomas abaixo?

Rejeição alimentar (rejeição por alimentos)? SIM () NÃO ()

Se apresenta rejeição alimentar, quando começou?

Se apresenta rejeição alimentar, quais alimentos ele(a) rejeita?

- () Frutas doces, () verduras, () doces, () sucos doces, () refrigerantes,
- () sorvetes, () achocolatados, () sobremesas;
- () Bolos, () tortas, () pães, () massas, () pizzas, () macarrão, () arroz,
- () feijão, () panquecas, () bolachas;
- () Adoçantes () alimentos diet ou light;
- () Carnes, () peixes, () ovos, () leite, () queijo, () manteiga;
- () Nenhum dos alimentos citados acima, ele(a) apresenta seletividade para outros tipos de alimentos;

Quais são os alimentos que ele(a) mais gosta de comer?

- () Frutas doces, () verduras, () doces, () sucos doces, () refrigerantes,
- () sorvetes, () achocolatados, () sobremesas;
- () Bolos, () tortas, () pães, () massas, () pizzas, () macarrão, () arroz,
- () feijão, () panquecas, () bolachas;
- () Adoçantes () alimentos diet ou light;
- () Carnes, () peixes, () ovos, () leite, () queijo, () manteiga;
- () Alimentos azedos (frutas e sucos azedos);
- () Alimentos amargos (frutas e sucos amargos);

Existe algum alimento que altere o comportamento dele(a) (fica mais agitado ou mais apático)?

SIM (), qual alimento? _____

Mais agitado () Mais apático (sonolento, mais calmo, sem muita reação) ()

NÃO ()

Apresenta alguma estratégia para seleção dos alimentos que sempre chama a sua atenção?

Seleciona os alimentos pelo toque (formato, cor e textura);

Seleciona os alimentos pelo cheiro;

Seleciona os alimentos pelo aspecto visual;

Não apresenta nenhum critério especial que chame a atenção, seleciona os alimentos como todos, através do conjunto dos aspectos mencionados acima;

Apresenta problemas de mastigação, fechamento labial ou lateralização da língua?

SIM (), qual? _____

NÃO ()

Marque com que frequência ele(a) come os alimentos citados abaixo:

Não = ele(a) nunca come isso;

Semana = come pelo menos uma vez por semana;

Dia = come uma vez por dia,

Muitos = come mais de uma vez por dia.

	NÃO COME	PELO MENOS 1X NA SEMANA	1X AO DIA	MAIS DE 1X AO DIA
Pão				
Bolo				
Arroz				
Feijão				
Massa (panqueca, lasanha)				
Macarrão				

Torta				
Sobremesas				
Balas, chicletes				
Sorvete				
Refrigerante				
Suco				
Frutas				
Verduras				
Legumes				
Carne				
Frango				
Peixe				
Leite				
Manteiga				
Queijo				
Achocolatado				
logurte				
Ovos				

ANEXO A - QUESTIONÁRIO: Versão Brasileira do “Autism Behavior Checklist” (ABC) – Inventário de Comportamento Autista: ICA-BR

		ES	RE	CO	LG	PS
01	Gira em torno de si por longo período de tempo			4		
02	Aprende uma tarefa, mas esquece rapidamente					2
03	É raro atender estímulo não-verbal social/ambiente (expressões,gestos,situações)		4			
04	Ausência de resposta para solicitações verbais - venha cá;sente-se				1	
05	Usa brinquedos inapropriadamente			2		
06	Pobre uso da discriminação visual (fixa uma característica objeto)	2				
07	Ausência do sorriso social		2			
08	Uso inadequado de pronomes (eu por ele)				3	
09	Insiste em manter certos objetos consigo			3		
10	Parece não escutar (suspeita-se de perda de audição)	3				
11	Fala monótona e sem ritmo				4	
12	Balança-se por longos períodos de tempo			4		
13	Não estende o braço para ser pego (nem o fez quando bebê)		2			
14	Fortes reações frente a mudanças no ambiente					3
15	Ausência de atenção ao seu nome quando entre 2 outras crianças				2	
16	Corre interrompendo com giros em torno de si, balanceio de mãos			4		
17	Ausência de resposta para expressão facial/sentimento de outros		3			
18	Raramente usa "sim" ou "eu"				2	
19	Possui habilidade numa área do desenvolvimento					4
20	Ausência de respostas a solicitações verbal envolvendo o uso de referenciais de espaço				1	
21	Reação de sobressalto a som intenso (suspeita de surdez)	3				
22	Balança as mãos			4		
23	Intensos acessos de raiva e/ou frequentes "chiliques"					3
24	Evita ativamente o contato visual		4			
25	Resiste ao toque / ao ser pego / ao carinho		4			
26	Não reage a estímulos dolorosos	3				
27	Difícil e rígido no colo (ou foi quando bebê)		3			
28	Flácido quando no colo		2			
29	Apointa para indicar objeto desejado				2	
30	Anda nas pontas dos pés			2		
31	Machuca outros mordendo, batendo, etc					2
32	Repete a mesma frase muitas vezes				3	
33	Ausência de imitação de brincadeiras de outras crianças		3			
34	Ausência de reação do piscar quando luz forte incide em seus olhos	1				
35	Machuca-se mordendo, batendo a cabeça, etc			2		
36	Não espera para ser atendido (quer as coisas imediatamente)					2
37	Não aponta para mais que cinco objetos				1	
38	Dificuldade de fazer amigos		4			
39	Tapa as orelhas para vários sons	4				
40	Gira, bate objetos muitas vezes			4		
41	Dificuldade para o treino de toalete					1
42	Usa de 0 a 5 palavras/dia para indicar necessidades e o que quer				2	
43	Frequentemente muito ansioso ou medroso		3			
44	Franze, cobre ou virar os olhos quando em presença de luz natural	3				
45	Não se veste sem ajuda					1
46	Repete constantemente as mesmas palavras e/ou sons				3	
47	"Olha através" das pessoas		4			
48	Repete perguntas e frases ditas por outras pessoas				4	
49	Frequentemente inconsciente dos perigos de situações e do ambiente					2
50	Prefere manipular e ocupar-se com objetos inanimados					4
51	Toca, cheira ou lambe objetos do ambiente			3		
52	Frequentemente não reage visualmente à presença de novas pessoas	3				
53	Repete seqüências de comportamentos complicados (cobrir coisas, por ex.)			4		
54	Destrutivo com seus brinquedos e coisas da família			2		
55	O atraso no desenvolvimento identificado antes dos 30 meses					1
56	Usa mais que 15 e menos que 30 frases diárias para comunicar-se				3	
57	Olha fixamente o ambiente por longos períodos de tempo	4				

Total: _ + _ + _ + _ = _____

Comentários: _____