

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Andressa Gonçalves Rodrigues

IMPACTO DOS POLIMORFISMOS CCR5 Δ 32 E CCR2-64I EM
CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E SEUS
GENITORES

Porto Alegre
2019

Andressa Gonçalves Rodrigues

IMPACTO DOS POLIMORFISMOS CCR5 Δ 32 E CCR2-64I EM
CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E SEUS
GENITORES

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Coorientadora: Me. Valéria de Lima Kaminski

Porto Alegre

2019

Andressa Gonçalves Rodrigues

IMPACTO DOS POLIMORFISMOS CCR5 Δ 32 E CCR2-64I EM
CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E SEUS
GENITORES

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau – UFRGS

Prof. Dr. Tiago Degani Veit – UFRGS

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Andressa Gonçalves

IMPACTO DOS POLIMORFISMOS CCR5 Δ 32 E CCR2-64I EM CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E SEUS GENITORES / Andressa Gonçalves Rodrigues. -- 2019. 70 f.

Orientador: José Artur Bogo Chies.

Coorientador: Valéria de Lima Kaminski.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação)
-- Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Instituto de Biociências, Bacharelado em
Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Genética. 2. Transtorno do Espectro Autista. I. Chies, José Artur Bogo, orient. II. Kaminski, Valéria de Lima, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer profundamente aos meus pais, Márcia Elisa Gonçalves Rodrigues e Fladimir Fialho Rodrigues, que sempre serão os meus pilares. A educação que vocês me proporcionaram, o apoio e os ensinamentos de sempre seguir os meus sonhos, de ser uma pessoa melhor a cada dia e de nunca desistir daquilo que me faz feliz, me tornaram a mulher forte e determinada que sou hoje. Eu não poderia pedir pais melhores. Gostaria de agradecer principalmente a minha mãe, que é a mulher mais forte que eu conheço e meu exemplo de vida, por todo o suporte que me deu durante a graduação, por todos os momentos bons e ruins em que ela esteve do meu lado seja pra me ouvir, me aconselhar e me dar um abraço de mãe.

Gostaria de agradecer aos meus avós Odelir Madruga Rodrigues e Diva Marlene Fialho, que também foram os meus maiores apoiadores e meu suporte durante toda a minha criação e que em muitos momentos de dificuldade, mas também durante as minhas conquistas, fizeram questão de estar ao meu lado.

Gostaria de agradecer imensamente ao meu namorado Ian Anderson Fandhrs, que durante o tempo que estamos juntos foi o meu parceiro de batalha, foi o meu porto-seguro quando eu pensei que não iria conseguir terminar meu TCC e sempre foi muito atencioso e compreensivo. Eu já disse que te amo muitas vezes, mas eu acho que você não tem ideia de como o teu apoio e companheirismo foram importantes durante a minha jornada, como as suas palavras muitas vezes me levantaram em momentos ruins. Você é um homem incrível e eu só tenho a agradecer por estar ao meu lado.

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos, principalmente os que conquistei durante a graduação, Tarso de Costa Mattos, Amanda Brandt Beschorner, Filipe Brasil Medeiros e Monique Dias Bandas, vocês foram os melhores parceiros que eu poderia ter durante essa jornada que foi a graduação, obrigada por todas as risadas, brincadeiras, saideras no Xirú e ajuda na hora dos estudos. Espero que a amizade de vocês perdure para o resto da minha vida e que a gente conquiste e celebre juntos todas as nossas realizações. E aos meus amigos do ensino médio Franciele Bremm, Pâmela Castro, Thana Aguiar, Tiago Irom, Christian Antunes e Jheine Sieben que estão comigo a uns bons anos e sempre foram amigos para todas as horas, também espero que nossa amizade perdure por mais muitos anos.

Obrigada também ao meu orientador José Artur Bogo Chies que me recebeu de braços abertos no Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética acreditando no meu potencial, o senhor é um grande exemplo pra mim como profissional e sem dúvida me ensinou grandes lições durante todo o período em que fui bolsista no laboratório. Gostaria de agradecer também ao Joel Henrique Ellwanger e à Valéria de Lima Kaminski que foram os meus maiores suportes no laboratório, me introduziram ao mundo da pesquisa e da elaboração de trabalhos científicos, sem a ajuda de vocês o meu TCC não teria saído da forma em que eu queria. E aos meus outros colegas de

laboratório, Bruna Kulmann Leal, Marina Zilliotto e Guilherme Luís Tyska-Nunes, eu os considero mais que colegas, mas também grandes amigos, obrigada por me ajudarem, por me ouvirem e por todos os outros momentos em que compartilhamos no laboratório. Com certeza eu fui privilegiada de poder trabalhar todo dia com pessoas inteligentes, alegres e de tantas formas fantásticas eu admiro imensamente todos vocês e lhes desejo somente o melhor.

Por fim, gostaria de agradecer a todas as outras pessoas que não foram mencionadas aqui, mas que com certeza são parte da minha formação de caráter e que contribuíram de diversas formas para a minha evolução. Não há dúvidas que vocês fazem parte da minha jornada e sempre serão calorosamente lembrados durante toda a minha vida.

Muito Obrigada!

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) consiste em um conjunto de transtornos do neurodesenvolvimento caracterizados por déficits sociais e na comunicação e pela presença de comportamentos estereotipados repetitivos/restritos, já manifestando-se no início da infância. Com o aumento da prevalência do TEA nas últimas décadas, diversos grupos de pesquisa dirigiram esforços no estudo dos potenciais mecanismos envolvidos na etiologia do TEA. Muitos fatores genéticos e ambientais mostraram fortes associações com o desenvolvimento do TEA. Entre estes fatores, o envolvimento da imunidade, assim como polimorfismos genéticos e alterações na expressão de genes relacionados à resposta imune, foram associados a um aumento no risco para o TEA. Neste contexto, os genes *CCR5* e *CCR2* que codificam dois receptores de quimiocinas com o mesmo nome, *CCR5* e *CCR2*, respectivamente, que pertencem a família de receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G. O polimorfismo gênico *CCR5*Δ32 gera uma proteína truncada não funcional e a variante *CCR2*-64I produz um receptor com propriedades alteradas. O objetivo deste estudo foi avaliar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos *CCR5*Δ32 e *CCR2*-64I em uma coorte do sul do Brasil de crianças diagnosticadas com TEA e seus pais biológicos, e avaliar a possível associação destes polimorfismos com sintomas frequentemente reportados em crianças com TEA. Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas para os dois polimorfismos comparando-se crianças com TEA e os grupos-controle. Da mesma forma, não foi observada diferença estatisticamente significativa nas comparações entre os grupos em relação à presença ou ausência do alelo Δ32, mesmo quando os indivíduos foram estratificados por etnia. Nas comparações entre as mães das crianças com TEA com grupos de gestantes sem intercorrências e com mulheres saudáveis também não houve diferenças. Além disso, ambos os polimorfismos não apresentaram associação com relação à sintomatologia. Também não foram observadas associações nos testes de desequilíbrio de transmissão. Na análise de sintomatologia, foi observada uma tendência de associação entre o polimorfismo *CCR2*-64I com ecolalia ($p= 0.056$), sugerindo um possível envolvimento deste receptor com o desenvolvimento de comportamentos repetitivos. Neste estudo, *CCR5*Δ32 e *CCR2*-64I não foram associados com susceptibilidade para o TEA ou como potenciais fatores modificadores da resposta imune durante a gestação destes indivíduos.

ABSTRACT

Autistic Spectrum Disorder (ASD) consists of a set of neurodevelopmental disorders characterized by social and communication deficits and the presence of repetitive/restricted stereotyped behaviors, already occurring in early childhood. The increased ASD prevalence in the last decades lead several research groups to direct efforts to study the potential mechanisms involved in the etiology of ASD. Many genetic and environmental factors were strongly associated to ASD development. Among these factors, the immune system, as well as genetic polymorphisms and alterations in gene expression related to immune responses, were already associated with an increased risk for ASD. In this context, the *CCR5* and *CCR2* genes, that respectively code for two chemokine receptors of the same name, *CCR5* and *CCR2*, and belong to the family of seven domains G protein-coupled receptors are interesting study targets. The *CCR5* Δ 32 variant leads to a truncated nonfunctional molecule and the *CCR2*-64I gene polymorphism generates a receptor with altered properties. The aim of this study was to evaluate the allelic and genotypic frequencies of *CCR5* Δ 32 and *CCR2*-64I polymorphisms in a southern Brazil cohort of children diagnosed with ASD and their biological parents, as well as to evaluate the possible association of these polymorphisms with symptoms frequently reported in children with ASD. No significant differences in genotypic and allelic frequencies were observed for any of the two polymorphisms when comparing children with ASD and the control group. Likewise, no statistical significance differences were observed in the comparisons between the groups concerning the presence or absence of the Δ 32 allele, even when the individuals were stratified by ethnicity. In the comparisons between the mothers of these individuals and a control group of pregnant women without complications and a sample of healthy women, also no differences were evidenced. Moreover, no association regarding the symptoms and the evaluated polymorphisms was observed. Again, no association was revealed in the Transmission Disequilibrium Test. In the symptomatology analysis, a tendency to association between *CCR2*-64I polymorphism and echolalia ($p= 0.056$) was observed, suggesting a possible involvement of this receptor with the development of repetitive behaviors. In this study, neither *CCR5* Δ 32 nor *CCR2*-64I were associated with susceptibility to ASD or as potentials modifying factors of the immune response during the gestation of these individuals.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA).....	9
1.2. Diagnóstico.....	10
1.3. História do Transtorno do Espectro Autista.....	11
1.4. Epidemiologia.....	12
1.5. Etiologia.....	12
1.6. Transtorno do Espectro Autista e Genética.....	13
1.7. Transtorno do Espectro Autista e Inflamação	15
1.8. Biologia das Quimiocinas.....	18
1.9. Biologia dos Receptores de Quimiocinas.....	21
1.10. O gene <i>CCR5</i> e o polimorfismo <i>CCR5Δ32</i>	22
1.11. O gene <i>CCR2</i> e o polimorfismo <i>CCR2-64I</i>	23
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
5. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno do Espectro Autista

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, Quinta Edição (DSM-V), o Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um conjunto de transtornos do neurodesenvolvimento caracterizados pela manifestação de déficits na comunicação social e comportamentos estereotipados nos indivíduos diagnosticados. O TEA normalmente é diagnosticado antes dos três anos de idade. Além disso, indivíduos afetados apresentam sintomas como padrões repetitivos/restritos de comportamento, interesse ou atividades. Em alguns casos, estes padrões estão presentes apenas no estágio inicial do desenvolvimento, podendo ser percebidos desde os 12 meses de idade se os atrasos no desenvolvimento forem graves (APA, 2013).

O TEA apresenta-se de forma heterogênea na população afetada e é um distúrbio complexo do desenvolvimento, que possui etiologia variada e diferentes graus de severidade (Gadia et al., 2004). Além disso, hipotetiza-se que o TEA seja resultante de um conjunto de anormalidades no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) e de uma organização neural precocemente alterada (revisado por O'Reilly et al., 2017; Bauman e Kemper 2005).

O TEA engloba os transtornos pervasivos do desenvolvimento antes denominados de Autismo Infantil Precoce, Autismo Infantil, Autismo de Kanner, Autismo de Alto Funcionamento, Autismo Atípico, Transtorno Global do Desenvolvimento sem Outra Especificação, Transtorno Desintegrativo da Infância e Síndrome de Asperger (DSM-V, 2013). Por ser um transtorno de espectro, existe uma ampla variabilidade no que diz respeito à presença e intensidade de sintomas, compreendendo um grupo fenotípico e geneticamente heterogêneo. Aspectos fenotípicos que indicam heterogeneidade são: idade de início, gravidade e combinação de sintomas, assim como desenvolvimento da linguagem e cognição (Cholemkey et al., 2016; Johnson e Myers, 2007).

Os principais domínios fenotípicos do TEA baseiam-se em prejuízos na comunicação e na interação social bem como na presença de padrões repetitivos de

comportamento. Porém, outros sintomas comumente reportados são incapacidades intelectuais, epilepsia, problemas no controle motor, transtorno de hiperatividade e déficit de atenção (TDAH), tiques, ansiedade, transtornos do sono e problemas gastrointestinais (LeBlanc e Fagiolini, 2011).

Com relação a sintomas diagnósticos e prevalência em diferentes amostras pode-se citar como exemplo as seguintes situações: a prevalência de atrasos na fala é de aproximadamente 87% em crianças de três anos com TEA (Fountain et al., 2012; Woynaroski et al., 2016), sintomas como tiques aparecem em 9% dos casos (Simonoff et al., 2008), 25 a 40% dos indivíduos apresentam transtornos do sono (Soke et al., 2010; Sivertsen et al., 2012), sintomas gastrointestinais aparecem em 47% dos casos (Chaidez et al., 2014), constipação e dificuldades de evacuação em 12% (Gorrindo et al., 2012) e epilepsia aparece em 6 a 8% dos casos de crianças com TEA (Thomas et al., 2012).

1.2. Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico do TEA baseia-se somente no diagnóstico clínico, principalmente devido à falta de achados genéticos e moleculares que expliquem por si só a manifestação da condição. Além disso, os critérios de diagnóstico para o TEA sofreram mudanças ao longo dos anos em decorrência da maior compreensão desta desordem, do acesso a novos dados epidemiológicos e principalmente em razão de uma maior conscientização dos pais e cuidadores sobre os primeiros sinais da doença. Atualmente, com o avanço das ferramentas de triagem, os profissionais da área da saúde possuem cada vez mais domínio para reconhecer os sintomas do transtorno (APA, 2013; Gadia et al., 2004; Johnson e Myers, 2007; Lord et al., 2018).

Nota-se que, de acordo com dados publicados pela Rede de Monitoramento de Deficiências Mentais e Autismo (ADDM, sigla em inglês), a prevalência desta desordem vem aumentando ao longo dos anos, o que leva a especulações sobre uma possível “epidemia do autismo”. Conforme os últimos dados coletados pela ADDM em 2014, a prevalência desta desordem nos Estados Unidos foi estimada em 16,8 casos a cada 1.000 habitantes, o que difere muito dos primeiros dados publicados por esta rede em 2000, que estimavam uma prevalência de 6,7 casos a cada 1.000 habitantes.

Sugere-se que tal aumento esteja relacionado a um número maior de pessoas diagnosticadas devido ao maior conhecimento dos indícios dessa desordem, além das recentes mudanças nas características diagnósticas que, conforme mencionadas, incluem atualmente outros transtornos invasivos do desenvolvimento a partir do DSM-IV, como a Síndrome de Asperger dentro da categoria do TEA.

Atualmente a ferramenta mais utilizada como referência dos critérios de diagnóstico do TEA é o DSM-V, publicado em 2013. Porém, outras ferramentas disponíveis são a Ferramenta de Triagem para Autismo em Crianças de Colo e Crianças Pequenas (STAT, sigla em inglês), a Entrevista para Diagnóstico de Autismo-Revisada (ADI-R, sigla em inglês) e o Cronograma de Observação para Diagnóstico de Autismo (ADOS, sigla em inglês), todas baseadas na observação de uma criança com suspeita de TEA por um profissional treinado, como psicólogos e psiquiatras.

1.3. História do Transtorno do Espectro Autista

O termo autismo foi usado pela primeira vez em 1911 pelo psiquiatra suíço Paul Eugen Bleuler para caracterizar a perda de contato com a realidade, e que acarretava uma grande dificuldade de comunicação (apud Gadia et al., 2004). Posteriormente, esse termo foi novamente utilizado pelo psiquiatra Leo Kanner, em 1943, que descreveu a condição em um grupo de 11 crianças que compartilhavam um comportamento alterado em comum: extremo desinteresse e total indiferença em relação a outras pessoas (Johnson e Myers, 2007; Gadia et al., 2004). Pouco tempo depois, em 1944, Hans Asperger, um pediatra austríaco, que não estava ciente do trabalho de Kanner, descreveu sintomas similares em seus pacientes, porém com a exceção de que as habilidades cognitivas e verbais eram maiores (Asperger, 1944 apud Johnson e Myers, 2007; Gadia et al., 2004).

O Autismo apareceu pela primeira vez como uma classificação isolada, sob o termo “autismo infantil” (*infantile autism*, em inglês) e com critérios de diagnóstico únicos no DSM-III, em 1980. A versão revisada desta edição passou a incluir o PDD-NOS (*Pervasive Developmental Disorder - Not Otherwise Specified*) como uma subdivisão do Transtorno Autista, ampliando os critérios diagnósticos, e incluindo casos menos severos. Após anos de análises, visando diminuir a abrangência desta classificação, o DSM-IV foi publicado passando a incluir a Síndrome de Asperger no

TEA. Na quinta edição do DSM o diagnóstico do TEA passou a ser considerado um Transtorno de Espectro com dois domínios: comunicação social e comportamentos restritos, repetitivos ou incomuns (Johnson e Myers, 2007).

1.4. Epidemiologia

Os estudos epidemiológicos em relação ao TEA iniciaram-se em 1960; a partir dessa década, mais dados tornaram-se disponíveis o que permitiu detectar um aumento na incidência do transtorno. Uma revisão sistemática conduzida em 2012 estimou a prevalência do TEA na população mundial em aproximadamente uma a cada 160 crianças (Elsabbagh et al., 2012). Fatores que podem ter contribuído para o aumento na prevalência de autismo incluem a melhor identificação de transtornos genéticos relacionados com o TEA. Por outro lado, independentemente de fatores como o tipo de estudo, o ano em que foi conduzido, ou a taxa reportada de prevalência, a prevalência de TEA tende a ser maior em meninos do que em meninas, com taxas variando de 2:1 até 6,5:1 (Johnson e Myers, 2007).

No Brasil, um estudo publicado em 2011 estimou que a prevalência do Transtorno Global do Desenvolvimento é de um caso a cada 367 habitantes (Paula et al., 2011). Em 18 de julho de 2019, foi sancionada a Lei 13.861/19, que determina que o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) deve inserir, no Censo 2020, dados sobre autismo. Com isso, será possível obter uma proporção mais realística da incidência do TEA em nosso país.

1.5. Etiologia

O TEA é uma desordem do neurodesenvolvimento com etiologia ainda desconhecida, mas que sofre uma grande influência de fatores genéticos e ambientais. Esta desordem possui uma elevada heterogeneidade fenotípica e complexibilidade genética, o que é evidenciado por estudos conduzidos em famílias de crianças com TEA que avaliaram os riscos de recorrência e que estimam uma recorrência em torno de 5% a 8% quando há um irmão mais velho com TEA, sendo o risco maior em famílias com mais de duas crianças diagnosticadas com TEA (Szatmari et al., 1998). Além disso, estudos mostraram uma taxa de concordância de 92% em gêmeos monozigóticos, enquanto que em gêmeos dizigóticos a taxa de concordância não passou dos 10% (Bailey et al., 1995), mostrando uma forte herdabilidade no risco para o TEA.

O TEA também está associado com outras doenças do neurodesenvolvimento, distúrbios neurológicos e desordens genéticas. De acordo com o DSM-V, cerca de 70% das pessoas diagnosticadas com TEA podem ter um transtorno mental comórbido e cerca de 40% podem ter dois ou mais transtornos mentais comórbidos. Além disso, foram sugeridos diversos fatores de risco capazes de influenciar o desenvolvimento do TEA. Diversos estudos citam idades materna e paterna avançadas como possíveis fatores de risco ao TEA na progênie (Guinchat et al., 2012; Idring et al., 2014; Sandin et al., 2012; Sandin et al., 2016).

Embora a contribuição genética seja importante para a suscetibilidade ao TEA, observa-se que para a maioria dos casos o desfecho do TEA é o resultado da interação dos genes com fatores ambientais (Herbert, 2010; Deth et al., 2008). Fármacos como ácido valpróico, talidomida e antidepressivos (em especial os inibidores de recaptação de serotonina), durante o primeiro trimestre de gestação, podem atuar como teratógenos, podendo estes estressores afetar o desenvolvimento do SNC e de outros órgãos e sistemas, assim como processos fisiológicos em andamento (Johnson e Myers, 2007; Herbert, 2010; Croen et al., 2011; Christensen et al., 2013). Além disso, foi reportado um risco aumentado para TEA em mulheres grávidas residentes próximas de áreas agrícolas onde ocorria a aplicação de pesticidas (Omoy et al., 2015). Outras condições clínicas maternas como obesidade, diabetes, ocorrência de infecções virais/bacterianas e deficiência de ácido fólico também foram listadas como fatores de risco para o TEA (Grabrucker, 2013; Lyall et al., 2013; Omoy et al., 2015).

1.6. Transtorno do Espectro Autista e Genética

Diversas evidências relacionam fatores genéticos com a etiologia e manifestações fenotípicas clínicas do TEA (Wang e Zhong, 2012; Devlin e Scherer, 2012). A observação de altas taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos e da presença de aproximadamente 2 a 3% de crianças com TEA no mesmo grupo familiar (Bailey et al, 1995) sugerem um alto envolvimento genético na etiologia do TEA. Uma meta-análise conduzida por Tick e colaboradores (2016) estimou a herdabilidade do TEA entre 74 e 93%.

Entre 10 e 15% dos indivíduos diagnosticados com TEA tem uma doença referente a uma condição mendeliana ou síndrome genética. As condições genéticas

mais comumente associadas com o TEA são: a síndrome do X-frágil que aparece de 1-2% dos casos de TEA, esclerose tuberosa em 0,5% dos casos, e neurofibromatose em menos de 1% dos casos (Devlin e Scherer, 2012). Além disso, de acordo com o DSM-V, outras síndromes neurogenéticas que podem desempenhar papel causativo ou estarem associadas ao TEA são: a Fenilcetonúria, a Síndrome Alcólica-Fetal, a Síndrome de Angelman, a Síndrome de Down e a Síndrome de Rett. Entretanto, nenhum desses transtornos é considerado causativo para o TEA, pois eles englobam indivíduos com e sem a presença de características autistas (Masi et al., 2017).

Um estudo identificou 103 genes e 44 loci genômicos implicados em incapacidades intelectuais em indivíduos com TEA (Betancur, 2011). Os genes mais comumente associados com a patogênese do TEA são os genes que codificam o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA) beta 3 (*GABRB3*), o receptor de oxitocina (*OXTR*), a relina (*RELN*), o transportador de serotonina (*SLC6A4*), o receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA; *GRIN2B*), o receptor de arginina-vasopressina (*AVPR1A*), o homeobox gravado (*EN2*), a integrina beta 3 (*ITGB3*), o proto-oncogene *MET* e a proteína associada a contactina (*CNTCAP2*) (Yoo, 2015; Sutcliffe et al., 2005; Ma et al., 2010; Kim et al., 2006; Rudie et al., 2012; Penagarikano e Geschwind, 2013; Yang et al., 2010; Yamasue, 2015; Persico e Napolioni, 2013; Wang et al., 2008; Lee et al., 2015; Yoo et al., 2012; Skaar et al., 2005).

Cerca de 5% dos indivíduos com TEA possuem algum rearranjo cromossômico, sendo a duplicação do cromossomo 15q11–q13 a anormalidade citogenética mais encontrada nesses indivíduos, estando geralmente no alelo materno, na região Prader-Willi/Síndrome de Angelman (Buiting et al., 1995). Além disso, diversas CNVs (*Copy Number Variations*), embora ocorrendo em pequenas proporções, também são reportadas com frequência no TEA (Lord et al., 2018; Ivanov et al., 2015). CNVs são sub-regiões cromossômicas duplicadas ou deletadas, podendo ser herdadas ou ocorrer *de novo*. Diversos estudos reportaram uma proporção de três a cinco vezes maior de CNVs em famílias com crianças com TEA em comparação a controles (Sebat et al., 2007; Marshall et al., 2008; Pinto et al., 2010; Sanders et al., 2011; Levy et al., 2011). É importante salientar que indivíduos com TEA que apresentam duas ou mais CNVs *de novo* possuem sintomas mais severos (Marshall et al., 2008; Pinto et al., 2010). Ainda, foi observado que genes afetados por CNVs raras são a principal causa de anormalidades na formação de sinapses e sua manutenção, também afetando outras vias

como proliferação e motilidade celular, sinalização GTPase/Ras e neurogênese (Pinto et al., 2010; Ben-David et al., 2012). Neste contexto, dois estudos independentes de associação em genomas completos (GWAS) identificaram dois loci (5p14.1 e 5p15.2) associados com TEA (Wang et al., 2009; Weiss et al., 2009); enquanto outros autores argumentam que estas variantes possuem um impacto modesto no risco para o TEA (Devlin et al., 2011). Em conjunto, estes dados levaram à aceitação atual da hipótese de que o TEA seja resultante de interações entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Ivanov et al., 2015).

1.7. Transtorno do Espectro Autista e Inflamação

Durante um processo inflamatório comum, a ativação de células do sistema imune ocorre através do reconhecimento de padrões moleculares de patógenos e de padrões moleculares de estresse ou dano tecidual por receptores específicos do sistema imune, que desencadeiam cascatas intracelulares, levando à produção de mediadores inflamatórios, normalmente representados pelas citocinas (Savitz e Harrison, 2018). Citocinas são moléculas sinalizadoras que auxiliam na comunicação entre células do sistema imune inato e adaptativo, sendo os controladores primários da inflamação (Masi et al., 2017). As mudanças fisiológicas que ocorrem durante o processo inflamatório são transformadas em sinais e transportadas até o SNC de modo a “informar” este sistema sobre o status imune do organismo. Esse processo ocorre, através da entrada, no SNC, de citocinas ou de células imunes, como monócitos e linfócitos T, através da barreira hematoencefálica. De modo recíproco, o encéfalo também pode modular o status imune, estimulando ou inibindo o processo inflamatório através da liberação de hormônios ou pelas vias simpáticas (Savitz e Harrison, 2018).

Além de seu papel fisiológico no processo inflamatório, as citocinas são importantes componentes imunes que possuem uma profunda implicação no desenvolvimento neuronal, atuando em processos como migração, diferenciação e formação sináptica. Assim, um balanço corrompido de citocinas pode impactar no neurodesenvolvimento e crescimento inicial cerebral, culminando em um comportamento alterado (Onore et al., 2012).

A inflamação mostra-se cada vez mais implicada na patogênese de transtornos psiquiátricos (Fond, 2014; Bauer e Teixeira, 2019). Embora não seja reconhecida como

uma doença autoimune, o TEA compartilha diversas características com essa classe de doenças, como a predisposição genética a anormalidades imunes e a influência de fatores ambientais. Além disso, a ativação imune materna, histórico familiar de doenças autoimunes e alterações na expressão de genes relacionados ao sistema imune são fatores de risco para o TEA (Edminston et al, 2017). Especificamente, genes como os do complexo MHC-II, *C4B* e *MIF* foram associados como genes candidatos de risco para TEA (Lee et al., 2006; Torres et al., 2002; Odell et al., 2005; Grigorenko et al., 2008).

Uma varredura conduzida por Croen et al. (2015) mostrou que, além de sintomas psiquiátricos, indivíduos adultos com TEA também apresentavam maiores frequências de problemas imunológicos (doenças autoimunes e alergias), transtornos gastrointestinais e do sono, além de maior incidência de convulsões, obesidade, dislipidemia, hipertensão e diabetes. A partir dessas evidências, acredita-se que o sistema imunológico desempenhe um papel chave na patogênese do TEA. Em estudos realizados por diversos grupos de pesquisa, foi observada a presença marcante de citocinas pró-inflamatórias como $\text{INF-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ em células mononucleadas periféricas e em culturas de células sanguíneas de indivíduos com TEA, citocinas estas que podem estar associadas com respostas imunes disfuncionais, culminando em problemas no desenvolvimento do SNC (Jyonouchi et al., 2001; Croonenberghs et al., 2002; Molloy et al., 2006)

Não obstante, dano celular pode ser induzido pela ligação de proteínas do sistema complemento a anticorpos, levando em consideração que o sistema complemento participa da poda sináptica (uma regulação fina do sistema nervoso que exclui sistemas redundantes), opsonizando sinapses e tornando-as alvo para remoção fagocítica pela micróglia (Onore et al., 2012; Gasque et al., 2012). Neste contexto, um nível aumentado de proteínas complemento já foi reportado no soro de crianças com TEA (Corbett et al., 2007).

Análises de transcriptoma conduzidas por Gupta et al. (2014) e por Voineagu et al. (2011) identificaram vias celulares de remodelamento genético, de desenvolvimento e sinalização neural, assim como conexões entre genes relacionados à resposta imune e ativação de micróglia de classe 2, coativadas em encéfalos de pacientes com TEA, ainda que as implicações dessas redes gênicas não tenham sido completamente elucidadas. O

SNC possui um grupo de células imunes próprias denominadas de micróglia. A micróglia consiste em células imunes que se originam no saco vitelínico durante a vida uterina (Ginhoux e Prinz, 2015).

A micróglia participa do processo de poda sináptica a fim de aumentar a eficiência das transmissões neuronais, que ocorre no início da vida (Paolicelli et al, 2011). A ativação da micróglia ocorre em resposta a diversas mudanças homeostáticas associadas a risco (dano celular, infecção por microrganismos, inflamação, etc.), mas também pode ser ativada pela exposição repetida ao estresse ambiental, que está relacionado à liberação de ATP em resposta a sinalização neuronal do glutamato. A micróglia também é sensível a sinais sistêmicos de perigo, incluindo inflamação periférica (Weber et al., 2017; Rivest, 2009).

Além de seu papel imunológico, a micróglia também exerce um papel importante em doenças neuropsiquiátricas. Estas células possuem um mecanismo eficiente e complexo de produção de citocinas e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em resposta a sinais imunes, como dano tecidual e infecções encefálicas. A via de ativação da micróglia pode ser diferenciada em dois tipos: o M1 (fenótipo clássico) e o M2 (fenótipo alternativo). No fenótipo clássico, a micróglia normalmente adquire um perfil pró-inflamatório produzindo citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Réus et al, 2015).

A ativação imune materna (MIA - *Maternal Immune Activation*) pode estar associada com o aumento no risco de desenvolver TEA (Meltzer and Van de Water et al., 2017). Além disso, histórico familiar de doenças autoimunes também é considerado um fator de risco para TEA. Neste contexto também poderia ocorrer a transferência para o feto de anticorpos maternos que podem impactar o desenvolvimento neuronal (Lyll et al., 2017). A possível associação entre ativação imune materna durante os primeiros meses de gestação e risco para o TEA é um tema emergente na literatura científica, existindo evidências da presença de anticorpos anti-encéfalo fetal em mães de crianças com TEA (Braunschweig et al., 2012). Indivíduos que portam esses anticorpos reativos a proteínas cerebrais possuem sérios prejuízos cognitivos, sendo também esses anticorpos associados a um papel patológico durante o neurodesenvolvimento fetal (Lee et al., 2009).

Em conformidade com estes achados, estudos do repertório de anticorpos de indivíduos com TEA realizados por Croonenberghs et al. (2002) e por Enstorm et al. (2009) mostram um aumento nos níveis de isotipos de anticorpos no plasma destes pacientes e maiores níveis de imunoglobulina (Ig) G4 neutralizante quando comparados com crianças que apresentavam um desenvolvimento típico. Porém, ainda não está claro o papel desempenhado por esses autoanticorpos em crianças com TEA (Onore et al., 2012)

Estudos realizados *post-mortem* com encéfalos de indivíduos com autismo identificaram a presença de neuroinflamação, caracterizada pela ativação da micróglia e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-1b, IL-6, IL-12p40, TNF-a e CCL-2) (Vargas et al., 2005; Morgan et al., 2010; Li et al., 2009). Corroborando esses achados, análises proteômicas demonstraram uma produção alterada de componentes imunológicos como citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento no plasma e soro sanguíneos de crianças com TEA, sendo essas alterações associadas com prejuízos comportamentais na comunicação e na interação social (Ashwood et al., 2011a; Ashwood et al., 2011b; Kajizuka et al., 2010).

1.8. Biologia das Quimiocinas

A função pela qual as quimiocinas são mais conhecidas é a da regulação da migração de leucócitos em processos como inflamação, doenças autoimunes, doenças infecciosas, angiogênese e câncer (Van der Meer et al., 2000; Rossi e Zlotnik, 2000; Zlotnik et al, 2006). Elas são proteínas ligantes que possuem baixo peso molecular e são compostas por pequenas sequências de aminoácidos (Charo et al., 2006; Zlotnik et al., 2006; DeVries et al., 2006). Já foram identificados 46 tipos de quimiocinas e 18 receptores sinalizadores. As quimiocinas exercem sua função através de sua ligação com receptores que apresentam sete domínios transmembrana e que ativam a sinalização através de proteínas G heterotriméricas (Bajetto et al., 2002; Campbell et al., 1996).

Além disso, estas moléculas podem gerar um gradiente estável por serem capazes de estabelecer interações com proteínas sulfatadas e proteoglicanas na superfície de células endoteliais (Bajetto et al., 2001; Locati e Murphy, 1999). As quimiocinas podem ser facilmente identificadas em virtude da sua conformação

estrutural que possui uma série de cisteínas (comumente quatro) em posições conservadas que estão ligadas por pontes dissulfeto (Baggiolini et al., 1997).

O estudo das quimiocinas inicia em 1977 com a descoberta do fator plaquetário 4 (PF4), que também é conhecido como CXCL4, que foi purificado ainda que sua exata função fosse desconhecida. Uma década depois, se deu o que foi conhecido como o “big bang” da pesquisa sobre quimiocinas, com a descoberta da quimiocina CXCL8 (IL-8) que foi vista como um fator quimiotático derivado de monócitos neutrófilo-específico (Locati e Murphy, 1999).

O nome “quimiocina” foi atribuído a essa classe de moléculas em 1992 durante o Terceiro Simpósio Internacional de Citocinas Quimioatraentes, com o intuito de classificar toda a superfamília dessas moléculas e de distingui-las de outras moléculas quimioatraentes leucocitárias (Bajetto et al, 2001). No ano de 1996, o interesse no estudo das quimiocinas tomou um novo rumo com a descoberta de que quimiocinas que interagem especificamente com os receptores CXCR4 e CCR5 poderiam reprimir a replicação do vírus HIV através do bloqueio da entrada do vírus nas células em decorrência da competição pela ligação nestes receptores (Miller, 2008; Locati e Murphy, 1999).

Essas moléculas são liberadas em locais de infecção, inflamação e dano, atraindo leucócitos que carregam receptores de quimiocinas. Quimiocinas são constitutivamente expressas em órgãos linfóides, regulando também o *homing* (mobilização de células do sistema imune para o local onde foram originadas) e maturação leucócitos (DeVries et al., 2006). Em condições homeostáticas, quimiocinas são produzidas por células presentes nos linfonodos, no timo e na medula óssea, sugerindo um papel regulatório destas moléculas na produção e distribuição de leucócitos (Locati e Murphy, 1999). Quimiocinas e seus receptores podem ser expressos constitutivamente ou de modo induzido por virtualmente todas as células do corpo (Lira e Furtado, 2012), com expressão e mecanismo de ação variando de acordo com o tipo celular e de modo a conferir especificidade no tráfico de leucócitos ou de preencher outras funções sinalizadoras (Locati e Murphy, 1999).

Uma importante característica das quimiocinas é o mecanismo de redundância, podendo diferentes quimiocinas ligarem-se ao mesmo receptor, embora algumas

exceções existam onde pares únicos de ligantes-receptores realizam determinada função biológica (Bajetto et al, 2002). Além disso, na ausência de um receptor ou quimiocina específico, as vias alternativas de interação receptor-quimiocina podem não ser altamente eficientes frente a estímulos específicos, como infecções virais (Ellwanger et al, 2019). Existem quatro subfamílias de quimiocinas que são classificadas de acordo com o arranjo das cisteínas na estrutura da proteína: CXC (alfa), CC (beta), C (gama) e CX3C (delta) (Rossi e Zlotnik, 2000).

Quimiocinas membros da família CXC podem ser subclassificadas entre aquelas que possuem um motivo tripeptídico conservado formado pelos aminoácidos ácido glutâmico-leucina-arginina (ELR) na porção terminal da proteína e aquelas que não o possuem. Quimiocinas da família ELR atraem principalmente neutrófilos, atuando não só na quimiotaxia das células, mas também na angiogênese, enquanto que as quimiocinas dessa família que não possuem o fator ELR atraem principalmente linfócitos e monócitos, sendo pouco quimioatrentes de neutrófilos (Bajetto et al, 2002). Já as quimiocinas membros da família CC atraem principalmente monócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos. Além disso, ambas as famílias englobam quimiocinas que atuam na migração de linfócitos T (Locati e Murphy, 1999)

Já foi demonstrado que no SNC as quimiocinas e seus receptores participam de processos como a vigilância imunológica, neuro/gliogênese e modulação da transmissão sináptica (Williams et al., 2014). Foi reportada também a expressão e produção destas moléculas em virtualmente todas as células do SNC, como astrócitos, micróglia, oligodendrócitos, neurônios e células endoteliais (Bajetto et al., 2002). Além do seu papel em condições homeostáticas, a expressão de diversas quimiocinas e de seus respectivos receptores já foi extensamente discutida e revisada por diversos autores em diferentes contextos (Hesselgesser e Horuk, 1999; Bajetto et al, 2001; Bajetto et al, 2002; Callawaere et al, 2007; Reaux-Le Goazigo et al, 2013; Stuart e Baune, 2014; Williams et al., 2014), ressaltando o amplo envolvimento destas moléculas em processos relacionados a doenças do SNC, como no enfraquecimento da barreira hematoencefálica, em doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, em acidentes vasculares cerebrais, em casos de demência induzida pelo HIV, bem como sua importância em doenças psiquiátricas, como transtorno bipolar, depressão, esquizofrenia e em déficit cognitivo leve.

1.9. Biologia dos Receptores de Quimiocinas

Receptores de quimiocinas são proteínas com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G. A nomenclatura destes receptores é baseada na classe de quimiocinas as quais eles se ligam: CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 e CXCR5 se ligam as quimiocinas da classe CXC, já a classe dos receptores CCR1 ao CCR9 liga-se às quimiocinas da família CC, o receptor XCR1 liga-se à linfotactina e o receptor CX3CR1 liga-se a quimiocina CX3C, também chamada de fractalcina (Rossi e Zlotnik, 2000).

Em humanos, os genes que codificam receptores de quimiocinas encontram-se majoritariamente agrupados no cromossomo 3 (*CCR1-9*; *CCRL1*; *CCRL2*; *CXCR6*; *CX3CR1*), sendo outros genes de receptores encontrados no cromossomo 2 (*CXCR1*; *CXCR2* e *CXCR4*), no cromossomo 17 (*CCR7* e *CCR10*), no cromossomo 6 (*CCR6*), cromossomo 11 (*CXCR5*), e no cromossomo X (*CXCR3*) (DeVries et al., 2006). As famílias de receptores possuem similaridades em suas sequências de aminoácidos. A família de receptores CXC possui uma identidade de 36-77%, enquanto que a família de receptores CC possui uma identidade de 46-89% (Baggiolini et al, 1997).

A estrutura dos receptores de quimiocinas normalmente consiste em três diferentes domínios, um domínio N-terminal flexível, um longo *loop*, que leva a três folhas β pregueadas e uma α -hélice que recobre as folhas (Baggiolini e Loetscher 2000; Callawaere et al., 2007). Todos os receptores de quimiocinas têm duas cisteínas conservadas, uma no domínio NH₂-terminal e outra no terceiro *loop* extracelular, que formam uma ponte dissulfeto vista como essencial para firmar a conformação de ligante-receptor (Baggiolini et al, 1997).

Apesar das similaridades estruturais e um aparente mecanismo de redundância, os receptores de quimiocinas diferem muito no que se diz respeito à capacidade de ativar vias sinalizadoras (Bajetto et al., 2002). A via mais comumente ativada é a da migração celular mediada pela via da fosfolipase C, que leva à geração de inositol-1,4,5,-trifosfato e uma transiente elevação na concentração de Ca⁺ citosólica. Além disso, também é possível que a ativação da via da fosfolipase gerada pelas quimiocinas

leve à formação de diacilglicerol, que gerará a subsequente ativação da proteína quinase C (Bajetto et al., 2002).

1.10. O gene *CCR5* e o polimorfismo *CCR5Δ32*

O receptor de quimiocinas *CCR5* faz parte da superfamília dos receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs) (Alkhatib, 2009). Esse receptor é expresso principalmente em linfócitos T efetores e de memória, monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas, onde regula, nestas células, sua ativação e quimiotaxia (Oppermann, 2004).

O *CCR5* possui sete domínios transmembrana, com 3 *loops* extracelulares e 4 intracelulares (Oppermann, 2004). Quando um dos ligantes do *CCR5* interage com este receptor, ele é capaz de transmitir sinais para a célula via ativação da proteína G e também através de outras moléculas de sinalização. Após a interação com seus ligantes, este receptor é internalizado, o que impede uma nova ligação com outras moléculas. Porém, através de um mecanismo celular de reciclagem, esse receptor é capaz de retornar à superfície celular (Lederman et al., 2006).

As quimiocinas que possuem maior especificidade com o *CCR5* são a proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1 α), a MIP-1 β e o *regulado sob ativação normalmente expresso e secretado por linfócitos T* (RANTES). Esses três ligantes também são chamados de CCL3, CCL4 e CCL5, respectivamente (Lederman et al., 2006; Alkhatib, 2009).

O *CCR5* é amplamente conhecido devido a sua atuação como co-receptor no processo de entrada do HIV nos linfócitos T CD4⁺ (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996). A ocorrência natural de indivíduos que são homozigotos para uma deleção de 32 pares de bases no gene *CCR5*, que culmina na inibição da expressão do *CCR5* na superfície da célula, despertou interesse de diversos grupos de pesquisa, devido ao seu papel como variante genética de resistência à infecção pelo HIV-1 (Samson et al., 1996; Sorce et al., 2011). Embora indivíduos heterozigotos sejam infectados pelo vírus, nesses indivíduos a progressão da infecção é mais demorada e a carga viral é menor (Liu et al., 1996). Através do descobrimento do importante envolvimento deste receptor com o HIV, medicamentos como o maraviroc, um antagonista do *CCR5*, foram desenvolvidos a fim

de conter a progressão da doença e suas complicações (Dragic et al., 1996; Dean et al., 1996; Ioannidis et al., 2001; Levine et al., 2009; Llibre et al., 2015).

Diversos estudos já reportaram o papel do CCR5 no tráfico de linfócitos T para locais de infecção/lesão no encéfalo em diversos contextos (revisado por Sorce et al., 2011). Embora o SNC seja um ambiente imunologicamente privilegiado, foi observada a expressão de diversos receptores de quimiocinas em muitas regiões do encéfalo (Bajetto et al., 2001). Dentro da família dos CCR, a expressão dos receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR9/10 e CCR11 é detectada no encéfalo sob condições inflamatórias (Bajetto et al., 2001). Assim, o CCR5 pode exercer importantes funções em situações de inflamação no SNC, como regulação da produção de citocinas inflamatórias em células da micróglia (Gamo et al., 2008), recrutamento de monócitos e macrófagos, bem como de células NK e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para o SNC sob condições inflamatórias (Glass et al., 2005; Khan et al., 2006; Zang et al., 2000). Entretanto, evidências indicam que a ativação do CCR5 no encéfalo está mais relacionada com a regulação de atividades fisiológicas do que com o sistema de defesa propriamente dito, desempenhando um papel durante o desenvolvimento encefálico e em processos de transmissão sináptica (Sorce et al., 2011).

1.11. O gene *CCR2* e o polimorfismo *CCR2V64I*

O CCR2 é um GPCR envolvido na migração de monócitos (Chu et al., 2014). Essa proteína possui sete domínios transmembrana ligados por *loops* intra e extracelulares. A extremidade N-terminal possui especificidade com os ligantes e a extremidade intracelular C-terminal está envolvida na sinalização intracelular. O *CCR2* é um gene altamente conservado entre os mais diversos grupos de vertebrados (Yamasakiet al., 2012).

O CCR2 possui duas isoformas, o CCR2A (composto de 360 aminoácidos) e o CCR2B (composto de 374 aminoácidos), que diferem somente nas suas caudas carboxi-terminais cujas diferenças são originadas através de *splicing* alternativo. A sequência de aminoácidos presente na cauda carboxi-terminal da isoforma CCR2B é o que garante o seu transporte bem-sucedido para a superfície da célula, tornando o CCR2B a forma dominante nestes sítios, representando 90% da expressão do CCR2 (Van Coillie et al.,

1999; Navratilova, 2006). O CCR2A e o CCR2B são capazes de induzir diferentes vias de sinalização celular e desencadear diversas ações (Bose et al., 2013).

Algumas das quimiocinas que conseguem ativar este receptor são: CCL2 (ou MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-3) e CCL16 (HCC-4, presente só em humanos) (Boring et al., 1997), sendo CCL2 e CCL7 as principais quimiocinas agonistas da migração de monócitos dependente do CCR2 (Tsou et al., 2007). É importante ressaltar que a mobilização de monócitos regulada pelo CCR2 é essencial para uma resposta imune inata bem-sucedida (Chu et al., 2014).

Conforme mencionado anteriormente, o CCR2 é mais amplamente expresso em monócitos, onde foi originalmente descrito (Fantuzzi et al., 1999). Esse receptor é associado com a ativação de respostas do tipo Th1, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Geissman et al., 2003). Em acordo, pode-se encontrar o mRNA do CCR2 em linfócitos T, células *Natural Killer* e células dendríticas, além de já ter sido observada sua expressão em monócitos e basófilos em condições de inflamação (Yamasaki et al., 2012). Além disso, já foi reportada a expressão desse receptor em células não-hematopoiéticas, principalmente em neurônios, células endoteliais, astrócitos e células da micróglia, sendo esta detectada por imuno-histoquímica com uma maior concentração no hipocampo (Van Der Meer et al., 2000).

A expressão seletiva do CCR2 em certas estruturas encefálicas sugere que este receptor possa estar envolvido na comunicação neuronal e na transmissão dopaminérgica, colinérgica e em doenças relacionadas a estes processos (Conductier et al., 2010). Astrócitos e oligodendrócitos são capazes de produzir quimiocinas como CCL2 e RANTES (Johnstone et al., 1999), embora os astrócitos sejam as maiores fontes de CCL2 no SNC (Ransohoff et al., 1993). Em doenças desmielinizantes, o papel do CCR2 parece ser de recrutamento de monócitos para os locais de lesão. Quando há uma falta de infiltração de monócitos para os locais de lesão ocorre um aumento na população de outras células mielóides inflamatórias, levando à formação de um ambiente alterado, influenciando a progressão e severidade das respectivas doenças (Yamasaki et al., 2012). Em modelos animais da doença de Alzheimer, a expressão de *Ccr2* está correlacionada com o acúmulo de depósitos β -amilóides ($A\beta$), o que sugere que a remoção destes depósitos nos estágios iniciais da doença é importante para o controle de sua progressão (El Khoury et al., 2007).

Além de seu papel na mobilização de monócitos, o conhecimento de outras funções fisiológicas do CCR2 é limitado. Um estudo sugeriu que o CCR2 contribui para o estabelecimento e manutenção dos estágios iniciais da gestação, influenciando o crescimento e a proliferação de células decíduais (Meng et al., 2013). Em paralelo, acredita-se que o CCR2 possua uma função de manutenção dos níveis de citocinas através de um mecanismo de retroalimentação por células imunes migratórias diante de altas concentrações de quimiocinas, em especial a CCL2 (Chu et al., 2014; Tylaska et al., 2002; Mahad et al., 2006).

De um modo intrigante, o mecanismo de ação dos monócitos durante infecções ou outras condições inflamatórias desenrola-se de maneira controversa, pois promove a ativação das defesas imunes do organismo e de reparo tecidual. Por outro lado, causa mais dano tecidual, devido à produção de moléculas inflamatórias (Nahrendorf et al., 2007; Chu et al., 2014).

No gene *CCR2*, um dos polimorfismos mais estudados é a variante gênica CCR2-64I, a qual consiste na substituição do nucleotídeo Guanina pelo nucleotídeo Adenina na posição 190 (Smith et al., 1997). Esse polimorfismo causa uma mudança no códon 64 que culmina na troca de uma valina para uma isoleucina no primeiro domínio transmembrana do CCR2. Além disso, um estudo conduzido por Nakayama et al. (2004) observou que a ocorrência deste polimorfismo na isoforma CCR2A causava um aumento na sua estabilidade, fazendo com que esta isoforma passasse a ser mais expressa na superfície da célula e também aumentava a capacidade quimiotática das células expressando esta variante.

2. JUSTIFICATIVA

O sistema imune desempenha uma função importante durante o desenvolvimento do encéfalo. Além disso, alterações imunológicas estão associadas com manifestações clínicas presentes no TEA. Neste contexto, considerando que a expressão de CCR5 e CCR2 é detectada no encéfalo sob condições inflamatórias e que estes receptores regulam a migração de linfócitos e monócitos para o encéfalo nessas condições considera-se que eles podem influenciar a patogênese do TEA. Considerando, também, o fato de que células do SNC como neurônios, astrócitos e células da micróglia produzem as quimiocinas ligantes destes receptores durante contextos inflamatórios, essas evidências sugerem um papel importante do sistema imunológico na patogênese do TEA.

Desta maneira, o estudo de variantes de genes do sistema imune em indivíduos acometidos por este transtorno e seus parentais, pode revelar potenciais influências destes em relação ao desenvolvimento e às diferentes manifestações clínicas do TEA. Neste contexto, os polimorfismos CCR5 Δ 32 (rs333) e CCR2-64I (rs1799864), que geram receptores de quimiocinas não funcionais ou com propriedades alteradas, são importantes alvos para o estudo dos fatores genéticos que podem estar envolvidos no desenvolvimento do TEA.

3. OBJETIVOS

3.1.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência dos polimorfismos CCR5 Δ 32 (rs333) e CCR2V64I (rs1799864) no desenvolvimento do TEA em uma amostra de crianças com este transtorno e seus genitores, provenientes de uma população do sul do Brasil.

3.1.2. Objetivos Específicos

- 1) Genotipar os polimorfismos CCR5 Δ 32 (rs333) e CCR2-64I (rs1799864) em amostras de material genético de crianças com TEA e seus respectivos pais biológicos, a fim de descrever suas frequências alélicas e genotípicas.
- 2) Investigar a influência destas variantes gênicas na susceptibilidade ao desenvolvimento do TEA.
- 3) Avaliar a potencial associação destes polimorfismos com sintomas comumente presentes no TEA.
- 4) Avaliar a possível presença de desequilíbrio de transmissão destes alelos dos pais para as crianças com TEA.

4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

O trabalho apresentado a seguir está no formato de *Original Research Paper* a ser submetido para a revista *Brain, Behavior & Immunity* [ISSN: 0889-1591]

Effect of the genetic variants CCR5 Δ 32 and CCR2-64I on Autism Spectrum Disorder

Andressa Gonçalves Rodrigues^a, Valéria de Lima Kaminski^a, Joel Henrique Ellwanger^a, Jaqueline Bohrer Schuch^{b,d}, Rudimar dos Santos Riesgo^c, Tatiana Roman^b, José Artur Bogo Chies^a

- a. Laboratory of Immunobiology and Immunogenetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
- b. Laboratory of Psychiatric Genetics, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
- c. Child Neurology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
- d. Laboratory of Immunosenescence, Graduate Program in Biomedical Gerontology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

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

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a set of complex neurodevelopmental disorders characterized by social/communication deficits and the presence of repetitive/restrictive stereotypical behaviors that appear in early stages of development. Several genetic and environmental factors have been associated with the development of ASD. Among them, the involvement of the immune system, as well as both genetic polymorphisms and alterations in the expression of immune-related genes have been associated with increased risk for ASD. *CCR5* and *CCR2* genes code two seven-transmembrane G-coupled chemokine receptors respectively named CCR5 and CCR2. Considering the impact of immune unbalances in ASD, the aim of this study was to evaluate the allelic and genotypic frequencies of two gene polymorphisms that affect these receptors, CCR5 Δ 32 (rs333) and CCR2-64I (rs1799864), in a southern Brazilian cohort composed by 476 individuals (185 children with ASD, 167 mothers of children with ASD and 126 fathers of children with ASD). We also tested for association of these polymorphisms with clinical symptoms often reported in children with ASD. No significant differences regarding allelic and genotypic frequencies between children with ASD and controls were found. Also, no significant association was found regarding the mothers of ASD children and woman without gestational complications. It was observed a tendency to association between the CCR2-64I polymorphism with echolalia ($p=0.059$), suggesting a possible involvement of this receptor with the development of repetitive behaviors. In this study, CCR5 Δ 32 and CCR2-64I were not associated with susceptibility to ASD.

Key Words: Autism Spectrum Disorder, immunogenetics, polymorphisms, CCR5 Δ 32, CCR2-64I, immune system.

1) Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder that is raising awareness in many pediatricians and specialized professionals due to its increasing prevalence in the latest years (Baio et al., 2018). Since the first description of Autism by the Austrian psychiatrist and physician Leo Kanner, in 1943, the comprehension of this disorder has become greater, although the core features described by Kanner, such as social communication deficits and repetitive and unusual sensory–motor behaviors remained the same (Lord et al., 2018).

The CDC's Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network (ADDM, 2014) estimates that 1 in each 59 children are diagnosed with ASD. This disorder is also characterized by gender differences, with boys being more affected than girls. Approximately 1 in each 42 boys and 1 in each 189 girls are diagnosed with ASD according to ADDM Network reports. In Brazil, the estimate prevalence of Pervasive Developmental Disorder (PDD) is 27.2/10.000 (Paula et al., 2011)

Several reports denoted an important genetic component in the etiology of ASD. Studies with twins demonstrated concordance rates of 82–92% in monozygotic twins compared with 1–10% in dizygotic twins (Bailey et al, 1995; Folstein et al, 1977). Besides, studies with siblings reported rates of 7-20% in families where there is an older sibling diagnosed with ASD (Ozonoff et al., 2011; Sandin et al., 2014). However, Genome Wide Association Studies (GWAS) have identified just a few copy-number variation and single nucleotide polymorphisms associated with susceptibility to ASD and they appear to contribute only slightly to the phenotypic outcomes of ASD (Devlin et al., 2011).

Several research groups have also gathered evidences regarding the influence of the immune system on ASD development. As results, associations with immune-related genes (Warren et al., 1991; Warren et al., 1996; Torres et al., 2006; Mostafa and Shehab, 2010; Torres et al., 2012), family history of autoimmune diseases (Jung et al., 2011; Comi et al., 1999; Atladottir et al., 2009; Wu et al., 2015), maternal inflammation and infection during pregnancy (Atladottir et al., 2010; Estes and McAllister, 2016), and

altered immune responses reported in children diagnosed with ASD (Edminston et al., 2017) were already described.

Chemokines are proteins with low molecular weight that act as mediators of the innate immunity through the mobilization of leukocytes to sites of inflammation (Schluger and Rom, 1997). Chemokines as well as their respective receptors exert an important role in brain development and physiology, regulating neuronal cell migration, proliferation, and differentiation (Biber et al, 2008).

CCR5 is a seven-transmembrane domain G protein-coupled receptor expressed mainly in effector and memory T cells, monocytes, macrophages and immature dendritic cells, regulating cell adhesion and chemotaxis (Oppermann, 2004). The genetic variant CCR5 Δ 32 (rs333) is characterized by a 32 base-pair (bp) deletion in the coding region of the *CCR5* gene, resulting in a truncated protein, which is not expressed on the cell surface of homozygous individuals. Reduced CCR5 expression is observed in heterozygous individuals (Alkhatib, 2009; Samson et al., 1996). Among Caucasian populations from north Europe, the Δ 32 allele frequency varies around ~10% (Galvani and Novembre, 2005). In Brazil, the estimated frequency of the allele is ~4% (Silva-Carvalho et al., 2016). In the state of Rio Grande do Sul, the CCR5 Δ 32 allele frequency is ~6% (Ellwanger et al., 2018; Vargas et al., 2006).

CCR2 is a chemokine receptor that also belongs to the family of seven-transmembrane domain G protein-coupled receptors. CCR2 is mainly expressed in monocytes, macrophages, T lymphocytes, dendritic cells, B cells and basophils (Yamasaki et al, 2012). This receptor is present in two isoforms, named A and B. Both isoforms represent alternatively spliced variants of the same receptor gene that differ only in their carboxyl tails (Charo et al., 1994; Wong et al., 1997). A single nucleotide polymorphism (SNP) in the *CCR2* gene causes a conservative change of a valine to an isoleucine at codon 64 (CCR2-64I; rs1799864) in the first transmembrane domain of the receptor (Smith et al., 1997). The allelic frequency of this genetic variant in Caucasians, Afro-Americans, Asians and Hispanics is approximately 10%, 15%, 25% and 17%, respectively (Martinson et al, 2000). In Brazil and in the state of Rio Grande do Sul the CCR2-64I allele frequencies in the general population is 11-14% (Vargas et al., 2005; Zambra et al., 2013)

Given the immune alterations observed in ASD, in the present study, we hypothesized that the genetic variants CCR5 Δ 32 and CCR2-64I could play a role in the

susceptibility to ASD or be preferentially transmitted from their biological parents, addressing a southern Brazilian population sample. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible association of these gene polymorphisms with both susceptibility to ASD and the severity of different clinical manifestations in a sample of children from south Brazil.

2) **Methods**

2.1) **Samples**

For this study, blood samples of 476 individuals (185 children with ASD, 167 mothers of children with ASD and 126 fathers of children with ASD) were collected at the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil), at the Psychology Department of the *Universidade Federal Rio Grande do Sul* (UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) and other medical and educational institutions of the state of Rio Grande do Sul. This sample was previously collected/reported by Schuch et al. (2014).

All probands in this sample were diagnosed with idiopathic ASD according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV (DSM-IV) criteria (American Psychiatric Association, 1994). The probands were submitted to an evaluation by neuropsychiatrists at the Neuropsychiatric Outpatient Unit from HCPA, where the diagnosis was attributed. For all probands, data on the presence or absence of clinical symptoms commonly observed in ASD patients such as repetitive behaviors, echolalia, seizures, epilepsy, mood instability, auto- and hetero-aggression, hyperactivity, panic, and sleep disorders were collected. These data were obtained during the regular appointments inquiring the parents and/or caregivers whether the patient exhibited each type of symptom (Schuch et al, 2014). Details about the exclusion criteria, tools for diagnostic and other clinical and socio-demographic information are specified in the studies of Longo et al. (2009) and Schuch et al. (2014).

This study was approved by the Ethics Committee of HCPA (protocol numbers 05-451, 06-237, and 06632012.4.0000.5334) and was performed in accordance with the ethical standards established in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. Informed consent was obtained from all individual participants and legal representatives included in the study.

As controls, we established four groups, named control groups A, B, C, and D. Control group A consists of 274 blood donor samples, representing the distribution of CCR5 Δ 32 in the general population. Control group B is composed by 213 healthy pregnant women with uncomplicated pregnancies that were chosen to test the hypothesis of an inflammatory context during the gestational period of the mothers of ASD children. For both control groups, the CCR5 Δ 32 genetic variant was genotyped in previous studies performed by our research group (Ellwanger et al., 2018; Kaminski et al., 2019). For the CCR2-64I polymorphism, control groups C and D were assessed for comparisons with the allelic and genotypic frequencies in the ASD group. Control group C is composed of 270 healthy subjects representing the general population: this group is composed by 151 healthy women and 119 healthy men genotyped for this genetic variant in previous studies of our research group (Zambra et al., 2013; Giongo, 2012). In addition, control group D is composed by 151 healthy women without familiar history of cancer from the study of Giongo (2012). Control D group was used to compare the allelic and genotypic frequencies of CCR2-64I with the allelic and genotypic frequencies of mothers of children with ASD.

2.2) Genotyping

DNA extraction from peripheral blood was performed by salting out as described in Lahiri and Nurnberger (1991). CCR2-64I genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay, following the protocol described by Zambra et al. (2013). The 128bp fragment PCR product was verified in a 2% agarose gel. Then, the PCR products were digested with 4U of the BseJI (BsaBI isoschizomer) restriction enzyme for 16h at 60°C, producing 110bp and 18bp fragments (CCR2-64I allele) or a single undigested 128bp fragment (Val allele), which were visualized under UV irradiation in a 3% agarose gel with ethidium bromide.

CCR5 Δ 32 genotyping was performed by conventional PCR and the amplicons were visualized on 3% agarose gel with ethidium bromide, as described in Chies and Hutz (2003). Amplification of the CCR5-wt allele generates a 137bp fragment length although a 105bp band corresponds to the CCR5 Δ 32 allele.

2.3) Statistical analysis

Chi-square analysis was used to assess the deviation from Hardy–Weinberg equilibrium and for test for associations between different symptoms reported for the children with ASD (specified at the Sample section) and the CCR5 Δ 32 and CCR2-64I polymorphism, performed with SPSS version 18 software. Considering the allelic frequencies for both SNPs, a dominant model was used for these last analyses, where heterozygotes were combined with the less frequent homozygotes. Transmission disequilibrium test (TDT) was performed to evaluate the association hypothesis through the family-based approach using FBAT (*family-based association test*) software.

For susceptibility analyzes, allelic and genotypic frequencies were compared between the groups using chi-square test with Yates's correction or exact Fisher's test. Odds ratio and Wald 95% confidence interval were also considered. *P*-values <0.05 were set as statistically significant. These analyses were performed with WINPEPI (version 11.65) software (Abramson, 2011).

3) Results

3.1. Demographic data of children with ASD and their mothers

The characteristics of TEA children and their respective mothers are shown in Table 1, Table 2 shows the genotypic and allelic data regarding CCR5 Δ 32 and CCR2V64I polymorphisms of both groups. The ASD subjects were predominantly Caucasoids and our sample comprises mostly boys (69.5%) with a mean age of 9.7 \pm 5.1 years. The mean age of mothers of the probands, when they gave birth, was 28.87 \pm 6.4. In addition, data regarding pregnancy complications reported in the mothers of ASD children of our study are shown in Table 3.

3.3. Allelic and genotypic frequencies of the studied population and controls

All SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium for both polymorphisms ($p > 0.05$). For the CCR5 Δ 32 polymorphism, 185 children with ASD and 167 of their respective mothers were genotyped. For the ASD group, 85.9% were wild-type homozygous, 14.1% were heterozygous. In this sample, no homozygotes for Δ 32 allele were found. Considering the mothers of these children, 85.6% were wild-type homozygous, 13.8% heterozygous, and 0.6% were Δ 32 homozygous (Table 2).

For the CCR2-64I polymorphism, 180 children with ASD and 166 of their respective mothers were genotyped. 79.5% of children with ASD were homozygous for the Val allele, while 18.3% were heterozygous, and 2.2% were homozygous for the 64I

allele. For the mothers, 77.1% were Val homozygous, 21.7% were heterozygous, and 1.2% were 64I homozygous (Table 2).

Demographic, allelic, and genotypic data about the four control groups (A, B, C and D) are presented in Table 4. The allelic frequencies of CCR5 Δ 32 among the healthy population group and the healthy pregnant women were 6.6% and 4.5%, respectively. The allelic frequencies of CCR2-64I were 13.8% and 13.6% in healthy population and healthy women groups, respectively. The genotypic frequencies distribution were in agreement with the Hardy–Weinberg equilibrium in all control groups ($p>0.05$).

3.5. CCR5 Δ 32 and CCR2-64I influence on ASD susceptibility

No statistically significant differences were observed when the allelic and genotypic frequencies of the CCR5 Δ 32 polymorphism were compared with the control groups ($p>0.05$), considering children with ASD and their mothers (Table 5). Considering that the frequency of homozygotes for CCR5 Δ 32 is very low and that this variant is more frequent in Caucasoid individuals, we also compared the groups considering the presence of the Δ 32 allele and stratifying individuals by ethnicity. The frequency differences in such analyzes were also not statistically significant ($p>0.05$) (Table 6).

Table 7 shows the results of the comparisons between the children with ASD and their mothers groups *versus* controls regarding CCR2-64I. No statistically significant differences ($p>0.05$) were observed in the comparisons between the studied population groups and the respective controls.

3.6. Association with clinical symptoms

The test for association between the polymorphisms CCR5 Δ 32 and CCR2-64I and the ten common symptoms of ASD showed a tendency to association only for the CCR2-64I polymorphism and Echolalia ($p=0.059$) (Table 8). No significant association ($p>0.05$) of the CCR5 Δ 32 allele and the clinical behaviors evaluated was observed (Table 9).

3.7. FBAT analyses

The family-based analyses indicated absence of a preferential transmission of the polymorphisms to children with ASD (data not shown).

4) Discussion

ASD is a highly heterogeneous neurodevelopmental disorder with diverse genetic and environmental factors impacting its etiology (Chaste and Leboyer, 2012). In this study, we investigated the influence of two polymorphisms in immune-related genes, namely CCR5 Δ 32 and CCR2-64I, on ASD development and symptoms.

Inflammation during critical periods of the embryonic development is suggested as a risk factor for ASD (Onore et al, 2012). CCR5-mediated inflammation could therefore have some influence on these aspects of development. However, no significant association was found regarding CCR5 Δ 32 polymorphism in the comparison between the mothers of children with ASD and women that had uncomplicated pregnancies. A previous study of our group (Kaminski et al., 2019) found a protective effect of the CCR5 Δ 32 allele on the development of preeclampsia, a *de novo* pregnancy-related hypertensive condition with a strong inflammatory background. Taking this data into account, further studies with a larger sample size and including subgroups of mothers classified according to the occurrence of inflammatory-related conditions during pregnancy could be interesting in order to assess the potential influence of inflammation (and CCR5) in ASD development.

In addition, considering some pathophysiology similarities of ASD with other mood disorders, some studies have reported the importance of chemokine receptor gene polymorphisms on the susceptibility to specific outcomes. For bipolar disorder (BD), Tokac et al (2016) found an association between CCR5 Δ 32 genotype frequencies and an increased risk for disease. On the other hand, in agreement with our results, Korshid et al. (2012) found no association of the CCR5 Δ 32 and CCR2-64I variants with susceptibility to Alzheimer's disorder (AD) in an Iranian population. In agreement, no association of these two polymorphisms was evidenced by Huerta et al (2004) with the susceptibility to AD and Parkinson's disease (PD). However, Galimberti et al. (2004) suggested a protective effect of the CCR2-64I homozygous genotype in patients with AD.

In the present study, no association of CCR5 Δ 32 and CCR2-64I in the susceptibility for ASD was evidenced. On the other hand, a previous study has assessed the expression of several chemokine receptors in children diagnosed with ASD from Saudi Arabia, reporting a high expression of CCR5 in these children as well as an increased expression of CCR5 in splenic CD8⁺ T cells when compared with age-and

sex-matched controls (Ahmad et al, 2018a). Similar data came also from an animal model of ASD (Ahmad et al, 2018b). Moreover, in the same animal model of autism (BTBR T+ Itpr3tf/J), Ahmad et al. (2019) found that the administration of a CCR5 antagonist (D-Ala-peptide T-amide-DAPTA) attenuated the aberrant behaviors found in these mice. Finally, the CCR5 antagonist decreased the levels of pro-inflammatory cytokines and increased the levels of IL-10. Considering these findings, it is possible that the ethnic diversity of our sample could have interfered in the observation of a potential protective influence of CCR5 Δ 32 polymorphism on the impaired behaviors found in children with ASD.

Despite poorly explored in the context of ASD, the influence of CCR2-mediated signaling has been associated with several neuroinflammatory diseases, such as multiple sclerosis, stroke, and Alzheimer's disease (reviewed by Yamasaki, 2012). Besides, CCR2 expression was reported at different embryonic stages in relation to the cytoarchitectural organization of the CNS, which suggests a role of this chemokine receptor during brain development (Rezaie et al, 2002). In this study, we observed a tendency for association between CCR2-64I and echolalia ($p=0.056$). Echolalia is the repetition or echoing of words and sounds and can be found in other disorders such as aphasia and schizophrenia, but it is more likely to be associated with ASD (Gernsbacher et al, 2016). In this sense, it would be interesting to verify if, in other conditions comprising echolalia, this association occurs.

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated the possible influence of the CCR5 Δ 32 and CCR2-64I in children with ASD in Brazil. Also, this is the first study that assessed the potential associations of the allelic distribution of these polymorphisms with the most common clinical manifestations found in children with ASD.

5) Conclusions

Although our investigation did not provide evidences of the CCR5 and CCR2 influence in the pathophysiology of ASD, further analyzes of the chemokine receptors must be conducted to uncover the molecular mechanisms involved in the development of ASD. Moreover, the detection of a possible CCR264I involvement with repetitive behaviors needs deeper investigations. Studies approaching chemokine and chemokine receptor expression during critical periods of embryonic development and during the

post-natal periods might help to determine the role of these molecules in ASD pathophysiology.

Acknowledgements

AGR receives a scholarship from *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS, Brazil). VLK receives a doctoral scholarship from CAPES (Brazil). JHE receives a postdoctoral fellowship from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazil). JABC receives a research fellowship from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazil).

References

- Abramson JH. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov.* 2011;8(1):1. Published 2011 Feb 2. doi:10.1186/1742-5573-8-1
- Ahmad SF., Ansari MA., Nadeem A, Bakheet SA., Alotaibi MR., Alasmari AF., Alshammari MA., Al-Mazroua HA., Attia SM. (2019). DAPTA, a C-C chemokine receptor 5 (CCR5) antagonist attenuates immune aberrations by downregulating Th9/Th17 immune responses in BTBR T+ Itpr3tf/J mice. *European Journal of Pharmacology*; Volume 846, Pages 100-108, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.016>.
- Ahmad S.F., Ansari M.A., Nadeem A., Bakheet S.A., AL-Ayadhi L.Y., Attia S.M. (2018). Upregulation of peripheral CXC and CC chemokine receptor expression on CD4+ T cells is associated with immune dysregulation in children with autism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Volume 81, Pages 211-220, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.10.001>.
- Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, Bakheet SA, Almutairi MM, Attia SM. Adenosine A2A receptor signaling affects IL-21/IL-22 cytokines and GATA3/T-bet transcription factor expression in CD4+ T cells from a BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism. *J Neuroimmunol.* 2017 Oct 15;311:59-67. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.08.002. Epub 2017 Aug 9.

- Alkhatib, Ghalib. The biology of CCR5 and CXCR4. *Current Opinion InHiv And Aids*, [s.l.], v. 4, n. 2, p.96-103, mar. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/coh.0b013e328324bbec>.
- APA (1994) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV®*. American Psychiatric Pub
- Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I.N., Van de Water J (2011). Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroimmunology*; Volume 232, Issues 1–2, Pages 196-199, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.025>.
- Atladóttir HO, Pedersen MG, Thorsen P, Mortensen PB, Deleuran B, Eaton WW, Parner ET. Association of family history of autoimmune diseases and autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2009 Aug;124(2):687-94. doi: 10.1542/peds.2008-2445. Epub 2009 Jul 5.
- Atladóttir HO, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2010 Dec;40(12):1423-30. doi: 10.1007/s10803-010-1006-y.
- Bailey, A & Couteur, A & Gottesman, I & Bolton, P & Simonoff, E & Yuzda, E & Rutter ML. (1995). Autism as a Strongly Genetic Disorder: Evidence from a British Twin Study. *Psychological medicine*. 25. 63-77. 10.1017/S0033291700028099.
- Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Robinson Rosenberg C, White T, Durkin MS, Imm P, Nikolaou L, Yeargin-Allsopp M, Lee LC, Harrington R, Lopez M, Fitzgerald RT, Hewitt A, Pettygrove S, Constantino JN, Vehorn A, Shenouda J, Hall-Lande J, Van Naarden Braun K, Dowling NF. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*. 2018 Apr 27;67(6):1-23. doi: 10.15585/mmwr.ss6706a1. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018

May 18;67(19):564. Erratum in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018 Nov 16;67(45):1280. Corrected and republished in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018 Nov 16;67(45):1279. PMID: 29701730; PMCID: PMC5919599.

Biber K, Vinet J, Boddeke HW. Neuron-microglia signaling: chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol.* 2008 Jul 31;198(1-2):69-74. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.012. Epub 2008 Jun 5.

Centre for Disease Control and Prevention (2014). Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network. Available on: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/addm.html>

Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 29;91(7):2752-6.

Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin Neurosci.* 2012 Sep;14(3):281-92. PMID: 23226953; PMCID: PMC3513682.

Chies, J.A.B.; Hutz, M. H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J MedBiol Res, Ribeirão Preto,* v. 36, n. 1, p. 71-75, jan.2003.<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2003000100010>.

Comi AM, Zimmerman AW, Frye VH, Law PA, Peeden JN. Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. *J Child Neurol.* 1999 Jun;14(6):388-94.

Devlin B, Melhem N, Roeder K. Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings. *Brain Res.* 2011 Mar 22;1380:78-84. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.026.

Edmiston E, Ashwood P, Van de Water J. Autoimmunity, Autoantibodies, and Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry.* 2017 Mar 1;81(5):383-390. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.08.031. Epub 2016 Sep 1.

- Ellwanger JH, Leal BK, Valverde-Villegas JM, Simon D, Marangon CG, Mattevi V, Lazzaretti RK, Sprinz E, Kuhmmer R, Chies JAB. CCR5 Δ 32 in HCV infection, HCV/HIV co-infection, and HCV-related diseases. *Infect Genet Evol.* 2018 Apr;59:163-166. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.002. Epub 2018 Feb 3
- Ellwanger JH, Leal BK, Valverde-Villegas JM, et al. CCR5 Δ 32 in HCV infection, HCV/HIV co-infection, and HCV-related diseases. *Infect Genet Evol.* 2018;59:163–166. doi:10.1016/j.meegid.2018.02.002
- Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science.* 2016 Aug 19;353(6301):772-7. doi: 10.1126/science.aag3194.
- Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry.* 1977 Sep;18(4):297-321.
- Galimberti, Daniela & Fenoglio, Chiara & Lovati, Carlo & Gatti, Alberto & Guidi, Ilaria & Venturelli, Eliana & Cutter, Gary & Mariani, Claudio & Forloni, Gianluigi & Pettenati, Carla & Baron, Pierluigi & Conti, Giancarlo & Bresolin, Nereo & Scarpini, Elio. (2004). CCR2-64I polymorphism and CCR5 Δ 32 deletion in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences.* 225. 79-83. 10.1016/j.jns.2004.07.005.
- Galvani AP, Novembre J. The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation. *Microbes Infect.* 2005 Feb;7(2):302-9. Epub 2005 Jan 8.
- Gernsbacher MA, Morson EM, Grace EJ. Language and Speech in Autism. *Annual review of linguistics.* 2016; 2:413-425. doi:10.1146/annurev-linguist-030514-124824
- Han YMY, Cheung WKY, Wong CK, Sze SL, Cheng TWS, Yeung MK and Chan AS (2017) Distinct Cytokine and Chemokine Profiles in Autism Spectrum Disorders. *Front. Immunol.* 8:11. doi: 10.3389/fimmu.2017.00011
- Huerta, Cecilia & Mata, Ignacio & Coto, Eliecer & Ribacoba, René & Martínez, Carmen & Blázquez, Marta & Guisasola, Luis & Salvador, Carlos & Hernández-Lahoz, Carlos & Peña, Joaquín. (2004). Chemokines (RANTES and MCP-1)

and chemokine-receptors (CCR2 and CCR5) gene polymorphisms in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 370. 151-4. 10.1016/j.neulet.2004.08.016.

Johnson C. P., Myers S. M., Council on Children With Disabilities. Identification and Evaluation of Children With Autism Spectrum Disorders. doi:10.1542/peds.2007-2361

Jung, J., Kohane, I. & Wall, D. Identification of autoimmune gene signatures in autism. *Transl Psychiatry* 1, e63 (2011) doi:10.1038/tp.2011.62

Kaminski VL, Ellwanger JH, Sandrim V, Pontillo A, Chies JAB. Influence of NKG2C gene deletion and CCR5 Δ 32 in Pre-eclampsia-Approaching the effect of innate immune gene variants in pregnancy. *Int J Immunogenet*. 2019 Apr;46(2):82-87. doi: 10.1111/iji.12416. Epub 2019 Feb 20.

Khorshid KH., Manoochehri, M., Nasehi, L., Ohadi, M., Rahgozar, M., Kamali, K. Ccr2-64i and Ccr5 Δ 32 Polymorphisms in Patients with Late-Onset Alzheimer's disease; A Study from Iran (Ccr2-64i And Ccr5 Δ 32 Polymorphisms in Alzheimer's disease). *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2012; 15(4): 937-944. doi: 10.22038/ijbms.2012.4882

Lahiri, D & Nurnberger, J. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*. 19. 5444. 10.1093/nar/19.19.5444.

Longo D, Schüler-Faccini L, Brandalize AP, dos Santos Riesgo R, Bau CH. Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain Res*. 2009 Apr24;1267:9-17. doi: 10.1016/j.brainres.2009.02.072. Epub 2009 Mar 10.

Lord C., Elsabbagh M., Baird G., Veenstra-Vanderweele J. Autismspectrumdisorder. *Lancet* 2018; 392: 508–20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)

Martinson JJ, Hong L, Karanicolas R, Moore JP, Kostrikis LG. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS*. 2000 Mar 31;14(5):483-9.

- Mostafa GA, Shehab AA. The link of C4B null allele to autism and to a family history of autoimmunity in Egyptian autistic children. *J Neuroimmunol*. 2010 Jun;223(1-2):115-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.025. Epub 2010 May 10.
- Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun*. 2012;26(3):383–392. doi:10.1016/j.bbi.2011.08.007
- Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular Signalling* Volume 16, Issue 11, November 2004; 1201-1210. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.04.007>
- Ozonoff, Sally & Young, Gregory & Carter, Alice & Messinger, Daniel & Yirmiya, Nurit & Zwaigenbaum, Lonnie & Bryson, Susan & Carver, Leslie & Constantino, John & Dobkins, Karen & Hutman, Ted & Iverson, Jana & Landa, Rebecca & Rogers, Sally & Sigman, Marian & Stone, Wendy. (2011). Recurrence Risk for Autism Spectrum Disorders: A Baby Siblings Research Consortium Study. *Pediatrics*. 128. e488-95. 10.1542/peds.2010-2825.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyltermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.
- Schluger NW, Rom WN. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol*. 1997 Aug;9(4):504-8.
- Schuch JB, Muller D, Endres RG3, Bosa CA, Longo D, Schuler-Faccini L, Ranzan J, Becker MM, dos Santos Riesgo R, Roman T. The role of $\beta 3$ integrin gene variants in Autism Spectrum Disorders--diagnosis and symptomatology. *Gene*. 2014 Dec 10;553(1):24-30. doi: 10.1016/j.gene.2014.09.058. Epub 2014 Sep 30.
- Silva-Carvalho WH, de Moura RR, Coelho AV, Crovella S, Guimarães RL. Frequency of the CCR5-delta32 allele in Brazilian populations: A systematic literature

review and meta-analysis. *Infect Genet Evol.* 2016 Sep;43:101-7. doi: 10.1016/j.meegid.2016.05.024. Epub 2016 May 18.

Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science.* 1997 Aug 15;277(5328):959-65.

Tokac, Damla & Tüzün, Erdem & Güleç, Hüseyin & Yılmaz, Vuslat & Bireller, Elif & Cakmakoglu, Bedia & Kucukali, Cem. (2016). Chemokine and Chemokine Receptor Polymorphisms in Bipolar Disorder. *Psychiatry Investigation.* 13. 541. 10.4306/pi.2016.13.5.541.

Torres AR, Sweeten TL, Cutler A, Bedke BJ, Fillmore M, Stubbs EG, Odell D. The association and linkage of the HLA-A2 class I allele with autism. *Hum Immunol.* 2006; 67:346–351. [PubMed: 16720216]

Torres AR, Westover JB, Rosenspire AJ. HLA Immune Function Genes in Autism. *Autism Res Treat.* 2012;2012:959073. doi: 10.1155/2012/959073. Epub 2012 Feb 15.

Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JA. Braz Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *J Med Biol Res.* 2006 Mar;39(3):321-5

Vargas AE, da Silva MA, Silla L, Chies JA. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens.* 2005 Dec;66(6):683-90.

Warren RP, Singh VK, Cole P, Odell JD, Pingree CB, Warren WL, White E. Increased frequency of the null allele at the complement C4b locus in autism. *Clin Exp Immunol.* 1991 Mar;83(3):438-40.

- Warren RP, Singh VK, Averett RE, Odell JD, Maciulis A, Burger RA, Daniels WW, Warren WL. Immunogenetic studies in autism and related disorders. *Mol Chem Neuropathol*. 1996 May-Aug;28(1-3):77-81.
- Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem*. 1997 Jan 10;272(2):1038-45.
- Wu S, Ding Y, Wu F, Li R, Xie G, Hou J, Mao P. Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Aug;55:322-32. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.004. Epub 2015 May 15.
- Yamasaki R, Liu L, Lin J, Ransohoff RM. Role of CCR2 in immunobiology and neurobiology. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 3 (2012) 16–29. <https://doi.org/10.1111/j.1759-1961.2011.00024.x>
- Zambra FM, Biolchi V, Brum IS, Chies JA. CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum Immunol*. 2013 Aug;74(8):1003-8. doi: 10.1016/j.humimm.2013.04.031. Epub 2013 Apr 28.

Table 1. Demographic data of the study participants

Characteristic	ASD diagnosed children (<i>n</i> =209)	Mothers of ASD diagnosed children (<i>n</i> =181)
Age, mean \pm S.D. ¹	9.7 \pm 5.1	28.87 \pm 6.4
Sex		
Female, <i>n</i> (%)	36 (19.6)	181/181 (100)
Male, <i>n</i> (%)	148 (80.4)	0/181 (0)
Ethnicity		
Caucasoid, <i>n</i> (%)	129/166 (77.7)	NA
Afro-American, <i>n</i> (%)	9/166 (5.4)	NA
Others, <i>n</i> (%)	28/166 (16.8)	
ASD diagnosis		
Autistic disorder, <i>n</i> (%)	80/174 (43.5)	
Asperger disorder, <i>n</i> (%)	14/174 (7.6)	
PDD-NOS, <i>n</i> (%)	57/174 (31.0)	
Symptoms		
Hetero-aggression	67/182 (36.4)	
Auto-aggression	83/182 (45.1)	
Panic	54/182 (29.3)	
Echolalia	114/182 (62.0)	
Epilepsy	23/182 (12.5)	
Seizures	45/182 (24.5)	
Mood instability	90/182 (48.9)	
Repetitive behaviors	136/182 (73.9)	
Sleep disorders	104/182 (56.5)	
Hyperactivity	110/182 (59.8)	

n, sample size; ¹missing data were not considered; NA, not available/applicable.

Table 2. Genotypic and allelic data of the study participants.

Polymorphisms	Autistic children (<i>n</i> =185)	Mothers of autistic children (<i>n</i> =167)
CCR5Δ32 (rs333)		
wt/wt, <i>n</i> (%)	159/185 (85.9)	143/167 (85.6)
wt/Δ32, <i>n</i> (%)	26/185 (14.1)	23/167 (13.8)
Δ32/Δ32, <i>n</i> (%)	0/185 (0)	1/167 (0.6)
wt allele, <i>n</i> (%)	344/370 (93.0)	309/334 (92.5)
Δ32 allele, <i>n</i> (%)	26/370 (7.0)	25/334 (7.5)
Δ32 allele carrier, <i>n</i> (%)	26/185 (14.1)	24/167 (14.4)
Δ32 allele non-carrier, <i>n</i> (%)	159/185 (85.9)	143/167 (85.6)
CCR2-64I (rs1799864)		
Val/Val, <i>n</i> (%)	143/180 (79.5)	128/166 (77.1)
64I/Val, <i>n</i> (%)	33/180 (18.3)	36/166 (21.7)
64I/64I, <i>n</i> (%)	4/180 (2.2)	2/166 (1.2)
Val allele, <i>n</i> (%)	319/360 (88.6)	292/332 (87.9)

64I allele, <i>n</i> (%)	41/360 (11.4)	40/332 (12.1)
--------------------------	---------------	---------------

Table 3. Pregnancy complications reported in the mothers of ASD children.

Characteristic	<i>n</i>/total (%)
Pregnancy complication	64/175 (38.0)
Fever	21/175 (11.4)
Bleeding	33/175 (17.9)
Gestational Diabetes	9/175 (4.9)
Infections*	3/175 (1.6)
STIs	6/175 (3.3)
Hypertension	24/175 (13.0)
Cramps	25/175 (13.6)
Antidepressant consumption	4/178 (2.2)
Anticonvulsant consumption	1/178 (0.5)
Acid retinoic consumption	2/178 (1.1)
Premature birth	
Less than 37 weeks	32/177 (17.4)
Between 37-41 weeks	139/177 (75.5)
More than 41 weeks	6 /177 (3.3)
Labor	
Normal spontaneous birth	66/182 (35.6)
Normal induced birth	18/182 (9.8)
Normal induced + forceps birth	8/182 (4.3)
Normal induced + forceps + anesthesia birth	4/182 (2.2)
Schedule Caesarean section	39/182 (21.2)
Urgent Caesarean section	44/182 (23.9)
Others	21.4/174 (11.4)

*Measles, rubella, mumps, toxoplasmosis, etc...

Table 4. Demographic, genotypic and allelic data of controls

Characteristic	Controls A: healthy population, for CCR5Δ32 analyses of autistic children (<i>n</i> =274) ¹	Controls B: healthy pregnant women, for CCR5Δ32 analysis of mothers of autistic children (<i>n</i> =213) ³	Controls C: healthy population, for CCR2-64I analyses of autistic children (<i>n</i> =270) ⁵	Controls D: healthy women, for CCR2-64I analyses of mothers of autistic children (<i>n</i> =151) ⁷
Age	44.4 ± 8.3 ²	25 (21-30) ⁴	54.8 ⁶	52.44 ± 6.14
Sex				
Female, <i>n</i> (%)	86/274 (31.4)	213/213 (100)	151/270 (55.9)	151/151 (100)
Male, <i>n</i> (%)	188/274 (68.6)	NA	119/270 (44.1)	NA
Ethnicgroup				
Caucasoid, <i>n</i> (%)	223/274 (81.4)	33/212 (15.6%)	NA	NA
Non-caucasoid, <i>n</i> (%)	51/274 (18.6)	179/212 (84.4%)	NA	NA
CCR5Δ32 (rs333)				
wt/wt, <i>n</i> (%)	240/274 (87.6)	194/213 (91.1)	NA	NA
wt/Δ32, <i>n</i> (%)	32/274 (11.7)	19/213 (8.9)	NA	NA
Δ32/Δ32, <i>n</i> (%)	2/274 (0.7)	0/213 (0)	NA	NA
wtallele, <i>n</i> (%)	512/548 (93.4)	407/426 (95.5)	NA	NA
Δ32 allele, <i>n</i> (%)	36/548 (6.6)	19/426 (4.5)	NA	NA
Δ32 allele carrier, <i>n</i> (%)	34/274 (12.4)	19/213 (8.9)	NA	NA
Δ32 allele non-carrier, <i>n</i> (%)	240/274 (87.6)	194/213 (91.1)	NA	NA
CCR2-64I (rs1799864)				
Val/Val, <i>n</i> (%)	NA	NA	199/269 (74.0)	111/151 (73.6)
64I/Val, <i>n</i> (%)	NA	NA	66/269 (24.5)	39/151 (25.8)
64I/64I, <i>n</i> (%)	NA	NA	4/269 (1.5)	1/151 (0.6)
Val allele, <i>n</i> (%)	NA	NA	464/538 (86.2)	261/302 (86.4)
64I allele, <i>n</i> (%)	NA	NA	74/538 (13.8)	41/302 (13.6)

n, sample size; ¹Data from Ellwanger et al. (2018); ²mean ± S.D.; ³Data from Kaminski et al. (2019); ⁴median (interquartile); ⁵Data from Zambra et al. (2013) and Giongo (2012); ⁶mean; ⁷Data from Giongo (2012); NA, not available/applicable.

Table 5. Comparisons of genotypic and allelic frequencies regarding CCR5Δ32 (rs333)

Comparison	<i>p</i> -value ¹
Autistic children <i>versus</i> Controls A (allelic frequencies)	0.891
Autistic children <i>versus</i> Controls A (genotypic frequencies)	0.688
Mothers of autistic children <i>versus</i> Controls B (allelic frequencies)	0.106
Mothers of autistic children <i>versus</i> Controls B (genotypic frequencies)	0.117

¹Chi-square test with Yates' correction or Fisher's exact test.

Table 6. Comparisons between groups considering the presence of the Δ32 allele (rs333)¹

Comparison	O.R.	C.I. 95%	<i>p</i> -value ²
Autistic children <i>versus</i> Controls A (caucasoids + non-caucasoids)	1.15	0.67-2.00	0.710
Autistic children <i>versus</i> Controls A (caucasoids only)	0.95	0.52-1.76	1.000
Autistic children <i>versus</i> Controls A (non-caucasoids only)	3.77	0.62-39.67	0.141
Mothers of autistic children <i>versus</i> Controls B	1.71	0.90-3.25	0.133

O.R., odds ratio. C.I., confidence interval. ¹Analysis considering the number of carriers and non-carriers of the Δ32 allele in each group (data detailed in Tables 1 and 2). ²Chi-square test with Yates' correction or Fisher's exact test.

Table 7. Comparisons of genotypic and allelic frequencies regarding CCR2-64I (rs1799864)

Comparison	<i>p</i> -value ¹
Autistic children <i>versus</i> Controls C (allelic frequencies)	0.348
Autistic children <i>versus</i> Controls C (genotypic frequencies)	0.244
Mothers of autistic children <i>versus</i> Controls D (allelic frequencies)	0.648
Mothers of autistic children <i>versus</i> Controls D (genotypic frequencies)	0.619

¹Chi-square test with Yates' correction or Fisher's exact test.

Table 8. Logistic regression analyses regarding the influence of the 64I allele (rs1799864) on ASD-related behaviors

	Genotype	Presence <i>n</i>	Absence <i>n</i>	Odds Ratio (CI 95%)	<i>P</i> value
Seizures	Val	32	110	0.627-3.129	0.400
	64I carriers	11	27		
Epilepsy	Val	19	123	0.155-1.984	0.577
	64I carriers	3	35		
Hyperactivity	Val	87	55	0.639-2.937	0.456
	64I carriers	26	12		
Hetero-aggression	Val	49	93	0.743-3.179	0.260
	64I carriers	17	21		
Auto-aggression	Val	62	80	0.699-2.939	0.362
	64I carriers	20	18		
Panic	Val	41	101	0.763-3.384	0.238
	64I carriers	15	23		
Echolalia	Val	83	59	1.010-5.195	0.059
	64I carriers	29	9		
Mood Instability	Val	67	75	0.747-3.173	0.276
	64I carriers	22	16		
Repetitive Behaviors	Val	109	33	0.475-2.715	1.000
	64I carriers	30	8		
Sleep disorders	Val	79	63	0.589-2.537	0.713
	64I carriers	23	15		

Table 9. Logistic regression analyses regarding the influence of the $\Delta 32$ allele (rs333) on ASD-related behaviors

	Genotype	Presence <i>n</i> (%)	Absence <i>n</i> (%)	Odds Ratio (CI 95%)	<i>P</i> value
Seizures	Wt	38	113	0.230-1.819	0.479
	$\Delta 32$ carriers	5	23		
Epilepsy	Wt	20	131	0.111-2.288	0.535
	$\Delta 32$ carriers	2	26		
Hyperactivity	Wt	92	59	0.378-1.935	0.834
	$\Delta 32$ carriers	12	16		
Hetero-aggression	Wt	56	95	0.340-1.897	0.674
	$\Delta 32$ carriers	19	9		
Auto-aggression	Wt	67	84	0.644-3.249	0.413
	$\Delta 32$ carriers	15	13		
Panic	Wt	43	108	0.596-3.265	0.500
	$\Delta 32$ carriers	10	18		
Echolalia	Wt	96	55	0.387-2.026	0.832
	$\Delta 32$ carriers	17	11		
Mood Instability	Wt	78	73	0.266-1.379	0.304
	$\Delta 32$ carriers	11	17		
Repetitive Behaviors	Wt	88	63	0.275-1.589	0.351
	$\Delta 32$ carriers	17	11		
Sleep disorders	Wt	88	63	0.367-1.857	0.681
	$\Delta 32$ carriers	15	13		

Referências

ALKHATIB G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Current Opinion In Hiv And Aids*, [s.l.], v. 4, n. 2, p.96-103, mar. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/coh.0b013e328324bbec>.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. (2013). DSM-V. *American Journal of Psychiatry*.

ASHWOOD P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*. 2011a; 25:40–45. [PubMed: 20705131]

ASHWOOD P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol*. 2011b; 232:196–199. [PubMed: 21095018]

BAGGIOLINI M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:675-705.

BAGGIOLINI M and Loetscher, P. (2000). Chemokines in inflammation and immunity. *Immunologytoday*. 21. 418-20. 10.1016/S0167-5699(00)01672-8.

BAILEY A, Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter ML. (1995). Autism as a Strongly Genetic Disorder: Evidence from a British Twin Study. *Psychological medicine*. 25. 63-77. 10.1017/S0033291700028099.

BAJETTO A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G. Chemokines and Their Receptors in the Central Nervous System. *Frontiers in Neuroendocrinology* 22, 147–184 (2001); doi:10.1006/frne.2001.0214

BAJETTO A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G. (2002). Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *Journal of neurochemistry*. 82. 1311-29. 10.1046/j.1471-4159.2002.01091.x.

BAUER ME, Teixeira AL. Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Feb;1437(1):57-67. doi: 10.1111/nyas.13712. Epub 2018 May 11.

BAUMAN ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 2005;23: 183–87.

BAZAN JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385: 640–644.

BEN-DAVID E, Shifman S. Networks of neuronal genes affected by common and rare variants in autism spectrum disorders. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002556.

BETANCUR C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.* 2011 Mar 22;1380:42-77. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.078.

BORING L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15;100(10):2552-61.

BRAUNSCHWEIG, D., Duncanson, P., Boyce, R. et al. *J Autism Dev Disord* (2012) 42: 1435. <https://doi.org/10.1007/s10803-011-1378-7>

BUITING, K., Saitoh, S., Gross, S. et al. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader–Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 9, 395–400 (1995) doi:10.1038/ng0495-395

CALLEWAERE C, Banisadr G, Rostène W, Melik PS. (2007). Chemokines and chemokine receptors in the brain: Implication in neuroendocrine regulation. *Journal of molecular endocrinology.* 38. 355-63. 10.1677/JME-06-0035.

CAMPBELL J, Qin S, Bacon K, Mackay C, Butcher E. (1996). Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *The Journal of cell biology.* 134. 255-66.

CENTRE FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2014). Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/addm.html>> Acesso em: 15 out. 2019.

CHAIDEZ V, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *J Autism Dev Disord* 2014; 44: 1117–27.

CHARO IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):610-21.

CHIES, J.A.B.; Hutz, M. H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v. 36, n. 1, p. 71-75, jan.2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2003000100010>.

CHOE H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1135-48.

CHOLEMKERY H., Medda J., Lempp T., Freitag C. M. Classifying Autism Spectrum Disorders by ADI-R: Subtypes or Severity Gradient? *J Autism Dev Disord* (2016) 46:2327–2339 DOI 10.1007/s10803-016-2760-2

CHRISTENSEN J, Grønberg TK, Sørensen MJ, et al. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 2013; 309: 1696–703.

CHU HX, Arumugam TV, Gelderblom M, Magnus T, Drummond GR, Sobey CG. Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2014) 34, 1425–1429; doi:10.1038/jcbfm.2014.120;

CONDUCTIER G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovère C. (2010). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *Journal of neuroimmunology*. 224. 10.1016/j.jneuroim.2010.05.010.

CORBETT BA, Kantor AB, Schulman H, Walker WL, Lit L, Ashwood P, Rocke DM, Sharp FR. A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins. *Mol Psychiatry*. 2007; 12:292–306. [PubMed: 17189958]

CROEN LA, Grether JK, Yoshida CK, Odouli R, Hendrick V. Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Nov;68(11):1104-12. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.73.

CROEN, L. A., Zerbo, O., Qian, Y., Massolo, M. L., Rich, S., Sidney, S., & Kripke, C. (2015). The health status of adults on the autism spectrum. *Autism*, 19(7), 814–823. <https://doi.org/10.1177/1362361315577517>

CROONENBERGHS J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M. Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology* 2002a;45:1–6. [PubMed: 11803234]

DEAN M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia growth and development study, multicenter AIDS cohort study, multicenter hemophilia cohort study, San Francisco City cohort, ALIVE study. *Science*. 1996;273:1856–62.

DENG H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):661-6.

DETH R, Muratore C, Benzecry J, Power-Charnitsky VA, Waly M. (2008). How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. *Neurotoxicology*. 29. 190-201. 10.1016/j.neuro.2007.09.010.

DEVLIN B, Melhem N, Roeder K. Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings. *Brain Res*. 2011 Mar 22;1380:78-84. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.026.

DEVLIN, Bernie & Scherer, Stephen. (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current opinion in genetics & development*. 22. 229-37. 10.1016/j.gde.2012.03.002.

DEVRIES M, Kelvin A, Xu L, Ran L, Robinson J, Kelvin D. (2006). Defining the Origins and Evolution of the Chemokine/Chemokine Receptor System. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 176. 401-15. 10.4049/jimmunol.176.1.401.

DORANZ BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1149-58.

DRAGIC T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):667-73.

EDMISTON E, Ashwood P, Van de Water J. Autoimmunity, Autoantibodies, and Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*. 2017 Mar 1;81(5):383-390. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.08.031.

EL KHOURY J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C et al. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 2007; 13: 432–438.

ELLWANGER JH, Leal BK, Valverde-Villegas JM, Simon D, Marangon CG, Mattevi V, Lazzaretti RK, Sprinz E, Kuhmmer R, Chies JAB. CCR5 Δ 32 in HCV infection, HCV/HIV co-infection, and HCV-related diseases. *Infect Genet Evol*. 2018 Apr;59:163-166. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.002. Epub 2018 Feb 3

ELLWANGER JH, Leal BK, Valverde-Villegas JM, et al. CCR5 Δ 32 in HCV infection, HCV/HIV co-infection, and HCV-related diseases. *Infect Genet Evol*. 2018;59:163–166. doi:10.1016/j.meegid.2018.02.002

ELLWANGER JH, Kaminski VL, Chies JA. What we say and what we mean when we say redundancy and robustness of the chemokine system - how CCR5 challenges these concepts. *Immunol Cell Biol*. 2019 Oct 15. doi: 10.1111/imcb.12291.

ELSABBAGH, M; Divan, G; Koh, Y.J. & Kim, Y; Kauchali, S; Marcin, C; Montiel-nava, C; Patel, V; Paula, C; Wang, C; Yasamy, M.T.; Fombonne, E. (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research*. 10.1002/aur.239.

ENSTROM A, Krakowiak P, Onore C, Pessah IN, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Van de Water JA, Ashwood P. Increased IgG4 levels in children with autism disorder. *Brain Behav Immun*. 2009 Mar;23(3):389-95. doi: 10.1016/j.bbi.2008.12.005.

FANTUZZI L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S. Loss of CCR2 Expression and Functional Response to Monocyte Chemotactic Protein (MCP-1) During the Differentiation of Human Monocytes: Role of Secreted MCP-1 in the Regulation of the Chemotactic Response. *Blood*, Vol 94, No 3 (August 1), 1999: pp 875-883

FOND G. Inflammation in psychiatric disorders. *European Psychiatry*, Volume 29, Issue 8, Supplement, 2014, Pages 551-552, <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2014.09.347>.

FOLSTEIN S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry*. 1977 Sep;18(4):297-321.

FOUNTAIN C, Winter AS, Bearman PS. Six developmental trajectories characterize children with autism. *Pediatrics* 2012; 129: e1112–20.

GADIA, C. A., Tuchmann R., Rotta N. T. Autismo e Doenças Pervasivas do Desenvolvimento. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80(2 Supl):S83-S94.

GAMO, K., Kiryu-Seo, S., Konishi, H., Aoki, S., Matsushima, K., Wada, K., Kiyama, H., 2008. G-protein-coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity. *J. Neurosci*. 28, 11980–11988.

GASQUE P, Neal JW, Singhrao SK, McGreal EP, Dean YD, Van BJ, Morgan BP. Roles of the complement system in human neurodegenerative disorders: pro-inflammatory and tissue remodeling activities. *Mol Neurobiol*. 2002; 25:1–17. [PubMed: 11890454]

GEISSMANN F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19: 71–82.

GERNSBACHER MA, Morson EM, Grace EJ. Language and Speech in Autism. *Annual review of linguistics*. 2016; 2:413-425. doi:10.1146/annurev-linguist-030514-124824

GINHOUX F, Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jul 1;7(8):a020537. doi: 10.1101/cshperspect.a020537.

GLASS, W.G., Lim, J.K., Cholera, R., Pletnev, A.G., Gao, J.L., Murphy, P.M., 2005. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J. Exp. Med*. 202, 1087–1098.

GORRINDO P, Williams KC, Lee EB, Walker LS, McGrew SG, Levitt P. Gastrointestinal dysfunction in autism: parental report, clinical evaluation, and associated factors. *Autism Res* 2012; 5: 101–08.

GRABRUCKER AM. Environmental Factors in Autism. *Front Psychiatry*. 2013; 3: 118.doi: 10.3389/fpsy.2012.00118

GRIGORENKO EL, Han SS, Yrigollen CM, Leng L, Mizue Y, Anderson GM, Mulder EJ, de Bildt A, Minderaa RB, Volkmar FR, Chang JT, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor and autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2008; 122:e438–445. [PubMed: 18676531]

GUINCHAT V, Thorsen P, Laurent C, Cans C, Bodeau N, Cohen D. Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta ObstetGynecolScand* 2012; 91:287–300. DOI: 10.1111/j.1600-0412.2011.01325.x

GUPTA S, Ellis SE, Ashar FN, Moes A, Bader JS, et al. 2014. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat Commun*. 2014 Dec 10;5:5748. doi: 10.1038/ncomms6748.

HERBERT M. R. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol*. 2010 Apr;23(2):103-10. doi: 10.1097/WCO.0b013e328336a01f

HESSELGESSER, J and Horuk, R. (1999). Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *Journal of neurovirology*. 5. 13-26. 10.3109/13550289909029741.

IDRING S, Magnusson C, Lundberg M, Ek M, Rai D, Svensson AC, Dalman C, Karlsson H, Lee BK. Parental age and the risk of autism spectrum disorders: findings from a Swedish population-based cohort. *Int J Epidemiol*. 2014 Feb;43(1):107-15. doi: 10.1093/ije/dyt262.

IOANNIDIS JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Buchbinder SP, Coutinho RA, Eugen-Olsen J, Gallart T, Katzenstein TL, et al. Effects of CCR5- Δ 32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med*. 2001; 135:782-9

IVANOV H. Y., Stoyanova V. K., Popov N. T., Vachev T. I. Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *Folia Medica* 2015; 57(1): 19-28. doi: 10.1515/folmed-2015-0015

JOHNSON C. P., Myers S. M., Council on Children with Disabilities. Identification and Evaluation of Children with Autism Spectrum Disorders. doi:10.1542/peds.2007-2361

JOHNSTONE M, Gearing AJ, Miller KM. A central role for astrocytes in the inflammatory response to β -amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol*. 1999 Jan 1;93(1-2):182-93.

JYONOUCHI H, Sun S, Itokazu N. Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. *Neuropsychobiology* 2002;46:76-84. [PubMed: 12378124]

KAJIZUKA M, Miyachi T, Matsuzaki H, Iwata K, Shinmura C, Suzuki K, Suda S, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Takei N, Mori N. Serum levels of platelet-derived growth factor BB homodimers are increased in male children with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34:154-158. [PubMed: 19879307]

KAMINSKI VL, Ellwanger JH, Sandrim V, Pontillo A, Chies JAB. Influence of NKG2C gene deletion and CCR5 Δ 32 in Pre-eclampsia-Approaching the effect of innate

immune gene variants in pregnancy. *Int J Immunogenet.* 2019 Apr;46(2):82-87. doi: 10.1111/iji.12416. Epub 2019 Feb 20.

KHAN, I.A., Thomas, S.Y., Moretto, M.M., Lee, F.S., Islam, S.A., Combe, C., Schwartzman, J.D., Luster, A.D., 2006. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoSPathog.* 2, e49.

KIM SA, Kim JH, Park M, Cho IH, Yoo HJ. Association of GABRB3 polymorphisms with autism spectrum disorders in Korean trios. (2006) *Neuropsychobiology* 54:160-165.

LEBLANC JJ, Fagiolini M. 2011. Autism: a “critical period” disorder? *Neural Plast.* 2011:921680

LEDERMAN MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D. Biology of CCR5 and Its Role in HIV Infection and Treatment. *JAMA.* 2006;296(7):815–826. doi:10.1001/jama.296.7.815

LEE LC, Zachary AA, Leffell MS, Newschaffer CJ, Matteson KJ, Tyler JD, Zimmerman AW. HLADR4 in families with autism. *Pediatr Neurol.* 2006; 35:303–307. [PubMed: 17074598]

LEE JY, Huerta PT, Zhang J, Kowal C, Bertini E, Volpe BT, Diamond B. Neurotoxic autoantibodies mediate congenital cortical impairment of offspring in maternal lupus. *Nat Med.* 2009; 15:91–96. [PubMed: 19079257]

LEE EJ, Choi SY, Kim E (2015) NMDA receptor dysfunction in autism spectrum disorders. *Curr Opin Pharmacol* 20:8-13.

LEVINE AJ, Singer EJ, Shapshak P. The role of host genetics in the susceptibility for HIV-associated neurocognitive disorders. *AIDS Behav.* 2009;13:118–32.

LEVY D, Ronemus M, Yamrom B, Lee YH, Leotta A, Kendall J, Marks S, Lakshmi B, Pai D, Ye K, Buja A, Krieger A, Yoon S, Troge J, Rodgers L, Iossifov I, Wigler M. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron.* 2011 Jun 9;70(5):886-97. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.015.

LI X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, Ji L, Brown T, Malik M. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol.* 2009; 207:111–116. [PubMed: 19157572]

LIRA S.A. and Furtado G.C. The biology of chemokines and their receptors. *Immunol Res.* 2012 Dec; 54(0): 111–120. doi: 10.1007/s12026-012-8313-7

LIU R., Paxton W.A., Choe S., Ceradini D., Martin S.R., Horuk R., MacDonald M.E., Stuhlmann H., Koup R.A., Landau N.R., 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86, 367–377.

LIU C, Cui G, Zhu M, Kang X, Guo H. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(12):8342-8355. www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP0002967

LLIBRE JM, Rivero A, Rojas JF, Garcia Del Toro M, Herrero C, Arroyo D, Pineda JA, Pasquau J, Masia M, Crespo M, et al. Safety, efficacy and indications of prescription of maraviroc in clinical practice: factors associated with clinical outcomes. *Antivir Res.* 2015;120:79–84.

LOCATI M, Murphy PM. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med.* 1999;50:425-40.

LONGO D, Schüler-Faccini L, Brandalize AP, dos Santos Riesgo R, Bau CH. Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain Res.* 2009 Apr 24; 1267:9-17. doi: 10.1016/j.brainres.2009.02.072. Epub 2009 Mar 10.

LORD C., Elsabbagh M., Baird G., Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet* 2018; 392: 508–20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)

LYALL K, Munger KL, O'Reilly EJ, Santangelo SL, Ascherio A. Maternal dietary fat intake in association with autism spectrum disorders. *Am J Epidemiol.* 2013 Jul 15; 178(2):209-20. doi: 10.1093/aje/kws433.

LYALL K, Schmidt RJ, Hertz-Picciotto I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *Int J Epidemiol.* 2014 Apr;43(2):443-64. doi: 10.1093/ije/dyt282.

LYALL K, Croen L., Daniels J., Fallin M. D., Ladd-Acosta C, Lee B. K., Park BY., Snyder N. W., Schendel D., Volk H., Windham G. C., Newschaffer C. The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu. Rev. Public Health* 2017. 38:81–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044318>

MA DQ, Rabionet R, Konidari I, Jaworski J, Cukier HN, Wright HH, Abramson RK, Gilbert JR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, Martin ER. Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism. (2010) *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:477-483.

MAHAD D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisakk P, Tucky B et al. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 2006; 129: 212–223.

MARSHALL CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2008 Feb;82(2):477-88. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.009.

MASI A., Glozier N., Dale R., Guastella A. J. The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism. *Spectrum Disorder. Neurosci. Bull.* April, 2017a, 33(2):194–204. DOI 10.1007/s12264-017-0103-8

MASI, A & De Mayo, M & Glozier, N & Guastella, A. (2017b). An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. *Neuroscience Bulletin.* 33. 10.1007/s12264-017-0100-y.

MENG YH, Li H, Chen X, Liu LB, Shao J, Chang KK et al. RANKL promotes the growth of decidual stromal cells in an autocrine manner via CCL2/CCR2 interaction in human early pregnancy. *Placenta* 2013; 34: 663–671.

MILLER RJ, Rostene W, Apartis E, Banisadr G, Biber K, Milligan ED, White FA, Zhang J. Chemokine action in the nervous system. *J Neurosci*. 2008 Nov 12;28(46):11792-5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3588-08.2008.

MOLLOY CA, Morrow AL, Meinzen-Derr J, Schleifer K, Dienger K, Manning-Courtney P, Altaye M, Wills-Karp M. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol* 2006;172:198–205. [PubMed: 16360218]

MORGAN JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, Courchesne E, Everall IP. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral pré-frontal cortex in autism. *Biol Psychiatry*. 2010; 68:368–376. [PubMed: 20674603]

NAHRENDORF M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204: 3037–3047.

NAKAYAMA, E & Tanaka, Y & Nagai, Y & Iwamoto, A & Shioda, T. (2004). A CCR2-V641 polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS (London, England)*. 18. 729-38. 10.1097/00002030-200403260-00003.

NAVRATILOVA Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006 Nov;150(2):191-204.

ODELL D, Maciulis A, Cutler A, Warren L, McMahon WM, Coon H, Stubbs G, Henley K, Torres A. Confirmation of the association of the C4B null allele in autism. *Hum Immunol*. 2005; 66:140–145. [PubMed: 15694999]

ONORE C., Careaga M., Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun*. 2012 March; 26(3): 383–392. doi:10.1016/j.bbi.2011.08.007.

OPPERMANN M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular Signalling* Volume 16, Issue 11, November 2004; 1201-1210. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.04.007>

- O'REILLY C, Lewis JD, Elsabbagh M. Is functional brain connectivity atypical in autism? A systematic review of EEG and MEG studies. *PLoS One* 2017; 12: e0175870.
- OZONOFF S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, Bryson S, Carver LJ, Constantino JN, Dobkins K, Hutman T, Iverson JM, Landa R, Rogers SJ, Sigman M, Stone WL. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*. 2011 Sep;128(3):e488-95. doi: 10.1542/peds.2010-2825. Epub 2011 Aug 15.
- PAOLICELLI RC., Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Davide R, Gross CT. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 09 Sep 2011: Vol. 333, Issue 6048, pp. 1456-1458 DOI: 10.1126/science.1202529
- PAULA C., Ribeiro S., Fombonne E, Mercadante M. (2011). Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. *Journal of autism and developmental disorders*. 41. 1738-42. 10.1007/s10803-011-1200-6.
- PENAGARIKANO O, Geschwind D (2013) CNTNAP2 and autism spectrum disorders. In: *The autisms* (Powel CM, ed), pp 274-285. Oxford University Press: New York, NY.
- PERSICO AM, Napolioni V (2013) Autism genetics. *Behav Brain Res* 251:95-112.
- PINTO D, Pagnamenta AT, Klei L, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010;466:368-372.
- RANSOHOFF RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, Shick HE, Major JA, Estes ML, Thomas DM, Tuohy VK. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J*. 1993 Apr 1;7(6):592-600.
- RÉAUX-LE GOAZIGO A, Van Steenwinckel J, Rostène W, Mélik Parsadaniantz S. Current status of chemokines in the adult CNS. *Prog Neurobiol*. 2013 May;104:67-92. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.02.001. Epub 2013 Feb 27.
- RÉUS GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology

of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2015 Aug 6;300:141-54. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.018

RIVEST S (2009): Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9:429–439.

ROSSI D, Zlotnik A. (2000). The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annual review of immunology*. 18. 217-42. 10.1146/annurev.immunol.18.1.217.

RUDIE JD, Hernandez LM, Brown JA, Beck-Pancer D, Colich NL, Gorrindo P, Thompson PM, Geschwind DH, Bookheimer SY, Levitt P, Dapretto M (2012) Autism associated promoter variant in MET impacts functional and structural brain networks. *Neuron* 75:904-915.

SAMSON M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.

SANDERS SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta AR, Thomson SA, Mason CE, Bilguvar K, Celestino-Soper PB, Choi M, Crawford EL, Davis L, Wright NR, Dhodapkar RM, DiCola M, DiLullo NM, Fernandez TV, Fielding-Singh V, Fishman DO, Frahm S, Garagaloyan R, Goh GS, Kammela S, Klei L, Lowe JK, Lund SC, McGrew AD, Meyer KA, Moffat WJ, Murdoch JD, O'Roak BJ, Ober GT, Pottenger RS, Raubeson MJ, Song Y, Wang Q, Yaspan BL, Yu TW, Yurkiewicz IR, Beaudet AL, Cantor RM, Curland M, Grice DE, Günel M, Lifton RP, Mane SM, Martin DM, Shaw CA, Sheldon M, Tischfield JA, Walsh CA, Morrow EM, Ledbetter DH, Fombonne E, Lord C, Martin CL, Brooks AI, Sutcliffe JS, Cook EH Jr, Geschwind D, Roeder K, Devlin B, State MW. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):863-85. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.002.

SANDIN S, Hultman CM, Kolevzon A, Gross R, MacCabe JH, Reichenberg A. Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and

meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012 May;51(5):477-486.e1. doi: 10.1016/j.jaac.2012.02.018.

SANDIN, S., Schendel, D., Magnusson, P. et al. Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Mol Psychiatry* 21, 693–700 (2016) doi:10.1038/mp.2015.70

SAVITZ J., Harrison N. A. Interoception and Inflammation in Psychiatric Disorders. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*; Volume 3, Issue 6, June 2018, Pages 514-524 <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2017.12.011>

SCHUCH JB, Muller D, Endres RG3, Bosa CA, Longo D, Schuler-Faccini L, Ranzan J, Becker MM, dos Santos Riesgo R, Roman T. The role of $\beta 3$ integrin gene variants in Autism Spectrum Disorders--diagnosis and symptomatology. *Gene*. 2014 Dec 10;553(1):24-30. doi: 10.1016/j.gene.2014.09.058. Epub 2014 Sep 30.

SEBAT J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007 Apr 20;316(5823):445-9.

SIMONOFF E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2008;47: 921–29.

SIVERTSEN B, Posserud M-B, Gillberg C, Lundervold AJ, Hysing M. Sleep problems in children with autism spectrum problems: a longitudinal population-based study. *Autism* 2012; 16: 139–50.

SKAAR DA, Shao Y, Haines JL, Stenger JE, Jaworski J, Martin ER, DeLong GR, Moore JH, McCauley JL, Sutcliffe JS, Ashley-Koch AE, Cuccaro ML, Folstein SE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA (2005) Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Mol Psychiatry* 10:563-571.

SMITH MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K,

Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science*. 1997 Aug 15;277(5328):959-65.

SOKE GN, Maenner MJ, Christensen D, Kurzius-Spencer M, Schieve LA. Prevalence of co-occurring medical and behavioral conditions/symptoms among 4- and 8-year-old children with autism spectrum disorder in selected areas of the United States in 2010. *J Autism Dev Disord* 2018. DOI:10.1007/s10803-018-3521-1.

SORCE S, Myburgh R, Krause K. The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 93 (2011) 297–311

STUART M.J. and Baune B. (2014). Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: A systematic review of biomarker studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 42. 10.1016/j.neubiorev.2014.02.001.

SUTCLIFFE JS, Delahanty RJ, Prasad HC, McCauley JL, Han Q, Jiang L, Li C, Folstein SE, Blakely RD. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. (2005) *Am J Hum Genet* 77:265-279.

SZATMARI, P., Jones, M.B., Zwaigenbaum, L. et al. *J Autism Dev Disord* (1998) 28: 351. <https://doi.org/10.1023/A:1026096203946>

THOMAS S, Hovinga ME, Rai D, Lee BK. Brief report: prevalence of co-occurring epilepsy and autism spectrum disorder: the U.S. National Survey of Children's Health 2011–2012. *J Autism Dev Disord* 2017; 47: 224–29.

TICK B, Bolton P, Happé F, Rutter M, Rijdsdijk F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry* 2016; 57: 585–95.

TORRES AR, Sweeten TL, Cutler A, Bedke BJ, Fillmore M, Stubbs EG, Odell D. The association and linkage of the HLA-A2 class I allele with autism. *Hum Immunol*. 2006; 67:346–351. [PubMed: 16720216]

TSOU CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites *J. Clin. Invest.* 117:902–909 (2007). doi:10.1172/JCI29919.

TYLASKA LA, Boring L, Weng W, Aiello R, Charo IF, Rollins BJ et al. Ccr2 regulates the level of MCP-1/CCL2 in vitro and at inflammatory sites and controls T cell activation in response to alloantigen. *Cytokine* 2002; 18: 184–190.

VAN COILLIE E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999 Mar;10(1):61-86.

VAN DER MEER P, Ulrich AM, González-Scarano F, Lavi E. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol.* 2000 Dec;69(3):192-201.

VARGAS DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 2005; 57:67–81. [PubMed:15546155]

VOINEAGU I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, et al. 2011. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature.* 2011 May 25;474(7351):380-4. doi: 10.1038/nature10110.

WANG L, Jia M, Yue W, Tang F, Qu M, Ruan Y, Lu T, Zhang H, Yan H, Liu J, Guo Y, Zhang J, Yang X, Zhang D (2008) Association of the ENGRAILED 2 (EN2) gene with autism in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:434-438.

WANG K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM, Kim CE, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere CM, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Herman EI, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney JA, Brune CW, Cantor RM, Bernier R, Gilbert JR, Cuccaro ML, McMahon WM, Miller J, State MW, Wassink TH, Coon H, Levy SE, Schultz RT, Nurnberger JI, Haines JL, Sutcliffe JS, Cook EH, Minshew NJ, Buxbaum JD, Dawson G, Grant SF, Geschwind DH, Pericak-Vance MA, Schellenberg

GD, Hakonarson H. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*. 2009 May 28;459(7246):528-33. doi: 10.1038/nature07999.

WANG Y and Zhong N. Clinical and Genetic Heterogeneity of Autism. 2012 DOI: 10.5772/48700

WEBER MD, Godbout JP, Sheridan JF (2017): Repeated social defeat, neuroinflammation, and behavior: Monocytes carry the signal. *Neuropsychopharmacology* 42:46–61.

WEISS LA, Arking DE; Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly MJ, Chakravarti A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):802-8. doi: 10.1038/nature08490.

WILLIAMS JL, Holman DW, Klein RS. Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci*. 2014 May 28;8:154. doi: 10.3389/fncel.2014.00154. eCollection 2014.

WOYNAROSKI T, Yoder P, Watson LR. Atypical cross-modal profiles and longitudinal associations between vocabulary scores in initially minimally verbal children with ASD. *Autism Res* 2016; 9: 301–10.

YAMASAKI R, Liu L, Lin J, Ransohoff RM. Role of CCR2 in immunobiology and neurobiology. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 3 (2012) 16–29. <https://doi.org/10.1111/j.1759-1961.2011.00024.x>

YAMASUE H (2015) Promising evidence and remaining issues regarding the clinical application of oxytocin in autism spectrum disorders. *Psychiatry Clin Neurosci**

YANG SY, Cho SC, Yoo HJ, Cho IH, Park M, Yoe J, Kim SA (2010) Family-based association study of microsatellites in the 5' flanking region of AVPR1A with autism spectrum disorder in the Korean population. *Psychiatry Res* 178:199-201.

YOO HJ, Cho IH, Park M, Yang SY, Kim SA (2012) Family based association of GRIN2A and GRIN2B with Korean autism spectrum disorders. *Neurosci Lett* 512:89-93.

YOO H. Genetics of Autism Spectrum Disorder: Current Status and Possible Clinical Applications. *Exp Neurol.* 2015 Dec;24(4):257-272. <http://dx.doi.org/10.5607/en.2015.24.4.257>

ZANG, Y.C., Samanta, A.K., Halder, J.B., Hong, J., Tejada-Simon, M.V., Rivera, V.M., Zhang, J.Z., 2000. Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Overexpression of chemokine receptor CCR5. *Brain* 123 (Pt 9), 1874–1882.

ZAMBRA FM, Biolchi V, Brum IS, Chies JA. CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum Immunol.* 2013 Aug;74(8):1003-8. doi: 10.1016/j.humimm.2013.04.031. Epub 2013 Apr 28.

ZLOTNIK A., Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7, 243 (2006) doi:10.1186/gb-2006-7-12-243