

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**INFLUÊNCIA DE FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS NOS TRANSTORNOS  
DO ESPECTRO AUTISTA**

**Dânae Longo**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciências

**Orientadora:** Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup> Lavínia Schüler-Faccini

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Rudimar dos Santos Riesgo

Porto Alegre, Maio de 2009.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o apoio financeiro do CNPq (taxa de bancada da profa. Lavínia Schüller-Faccini, processo nº 501070/2004-4), FIPE-HCPA (processo nº 05-451) e Instituto Milênio, processo nº 420019/05-7.

## AGRADECIMENTOS

☺ Agradeço inicialmente a todas as diretoras, coordenadoras e professoras das APAEs, escolas e instituições parceiras desse estudo: Escola Recanto da Alegria e Escola Lucena Borges (Porto Alegre), Escola Charão (Gravataí), APAE Santa Rosa, Escola Especial Helen Keller (Três de Maio), AMA Rio Grande, e as APAEs das cidades de Boa Vista Buricá, Camaquã, Campo Novo, Canguçu, Esteio, Giruá, Guaíba, Horizontina, Panambi, Parobé, Pelotas, Portão, Santa Rosa, Santo Augusto, São José do Norte, São Lourenço do Sul, São Sebastião do Caí, Tapes, Tenente Portela. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

☺ As minhas colegas Pollyanna e Ana Paula pela parceria e companheirismo, principalmente durante as perigosas “expedições” pelo interior do Rio Grande do Sul. A Leila por ter me acolhido no Rio de Janeiro e ter me apresentado o forró da Lapa. A querida e talentosa Bibi por ter tornado minha vida mais fácil nesses últimos dois anos. Ao Elmo, Ellen e Lúcia Andréia por tornarem a vida de todo mundo mais fácil na pós-graduação.

☺ Ao professor Rudimar dos Santos Riesgo pela orientação fundamental no diagnóstico e avaliação dos pacientes. Aos professores Renato Flores, Maria Teresa Sanseverino, Ida Vanessa Schwartz, Carolina Fischinger e Têmis Félix pelos conselhos, parcerias e suporte clínico adicional.

☺ Ao professor Claiton Henrique Dotto Baú pelo exemplo de profissionalismo, competência e rigor científico na preparação dos artigos.

☺ A minha família, pelo apoio afetivo, emocional, gastronômico, habitacional, logístico e financeiro ao longo desses 11 anos em Porto Alegre. Espero poder devolver ao mundo através de bons atos todas as orações a mim destinadas.

☺ E, por fim, a professora Lavínia, agradeço pela coragem de embarcar em uma área de estudo tão diferente e, o pior, ter acreditado que daria certo! Nas horas mais difíceis eu tive força para continuar porque sabia que tu estarias ao meu lado. Muito mais que orientadora, em muitos momentos, tu foste a minha segunda mãe em Porto Alegre. Não tenho palavras para agradecer por isso.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	4
LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	
1. Introdução .....	15
1.1 Transtorno autista e transtornos do espectro autista – definição e heterogeneidade fenotípica .....	15
1.2 Critérios diagnósticos .....	16
1.3 Prevalência na população .....	17
1.4 Etiologia .....	18
1.5 TEA Secundário x Idiopático .....	18
1.5.1 TEA Secundário .....	19
1.5.2 Síndrome de Rett e TEA .....	20
1.5.3 TEA Idiopático .....	23
1.6 Fatores genéticos de risco associados aos TEA idiopáticos .....	23
1.7 Sistema serotoninérgico e TEA idiopáticos .....	24
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	
2. Objetivos .....	29
2.1 Justificativa .....	29
2.2 Objetivo Geral .....	29
2.3 Objetivos Específicos .....	29
CAPÍTULO III – ARTIGO 1	
Clinical profile and environmental risk factors associated to autism spectrum disorders in a Brazilian sample .....	33

## CAPÍTULO IV – ARTIGO 2

Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders .....	55
--	----

## CAPÍTULO V – ARTIGO 3

Interaction between 5-HTTLPR and prenatal smoking exposure: the effect on aggression in autism spectrum disorders .....	67
---	----

## CAPÍTULO VI – ARTIGO 4

Análise do gene <i>MECP2</i> em uma amostra de meninas com diagnóstico de transtornos do espectro autista .....	83
---	----

## CAPÍTULO VII - DISCUSSÃO

7. Discussão .....	99
7.1 Variabilidade clínica dos TEA .....	99
7.2 Síndrome de Rett e TEA .....	100
7.3 Estudos de fatores genéticos de risco associados a TEA idiopáticos .....	101
7.4 Estudos de fatores ambientais de risco associados a TEA idiopáticos .....	103

## CAPÍTULO VIII – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

8. Conclusões e Perspectivas .....	107
8.1 Conclusões .....	107
8.2 Perspectivas .....	108

## CAPÍTULO IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas .....	111
-------------------------------------	-----

## CAPÍTULO X – ANEXOS

10.1 ANEXO I - Critérios diagnósticos para os transtornos do espectro autista .....	129
10.2 ANEXO II - Aprovação ética e termo de consentimento livre e esclarecido ....	133
10.3 ANEXO III – Protocolo de pesquisa .....	139

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A = adenina
- array CGH = *array comparative genome hybridization* (hibridização genômica comparativa)
- ARX = *aristaless related homeobox*
- ASD = *autism spectrum disorders*
- C = citosina
- CARS = *Childhood Autism Rating Scale*
- cDNA = ácido desoxirribonucléico complementar
- CI = *confidence interval*
- DNA = ácido desoxirribonucléico
- DP = desvio padrão
- DSM-III = Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, terceira edição
- DSM-IV = Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, quarta edição
- DSM-IV-TR = Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, quarta edição, texto revisado
- EEG = eletroencefalografia
- FBAT = *family-based association test* (teste de associação baseado em famílias)
- FMR1 = *fragile X mental retardation 1*
- G = guanina
- HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- IC = intervalo de confiança
- in/del = inserção/deleção
- L = alelo longo do polimorfismo 5-HTTLPR
- La = alelo longo com a variante 'A' do SNP rs25531
- Lg = alelo longo com a variante 'G' do SNP rs25531
- MBD = *methyl-CpG-binding domain* (domínio de ligação a metil-CpG)
- MECP2 = *methyl-CpG-binding protein 2*
- MIM = *mendelian inheritance in men*
- mRNA = ácido ribonucléico mensageiro
- n = número amostral
- ND = informação não disponível
- OR = *odds ratio* (razão de chances)
- PCR = *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PDD = *pervasive development disorder*

PDD-NOS = *pervasive development disorder-not otherwise specified*

PTEN = *phosphatase and tensin homolog*

QI = quociente de inteligência

S = alelo curto do polimorfismo 5-HTTLPR

SLC6A4 = *solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin) member 4* (gene do transportador de serotonina)

SNP = *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo simples)

SR = síndrome de Rett

SSRIs = *selective serotonin reuptake inhibitors* (inibidores de recaptação de serotonina)

T = timina

TEA = transtornos do espectro autista

TDT = *transmission disequilibrium test* (teste de desequilíbrio de transmissão)

TGD = transtorno global de desenvolvimento

TGD-NE = transtorno global do desenvolvimento não especificado

TRD = *transcriptional repressor domain* (domínio de repressão de transcrição)

5-HT = 5-hidroxitriptamina ou serotonina

5-HTT = transportador de serotonina

5-HTTLPR = *5-hydroxytryptamine transporter linked polymorphic region* (região polimórfica ligada ao gene transportador de serotonina)

## RESUMO

**Introdução:** Os transtornos do espectro autista (TEA) são condições que atingem o desenvolvimento cerebral prejudicando o estabelecimento da interação social recíproca e da comunicação verbal e não verbal e são acompanhados por comportamentos repetitivos e padrões anormais de interesses e atividades. Os TEA incluem três condições: transtorno autista, transtorno de Asperger e transtorno global do desenvolvimento não especificado. A ampla heterogeneidade clínica apresentada pelos indivíduos afetados prejudica as pesquisas que visam a identificar as origens etiológicas dos TEA. Cerca de 10% dos casos de TEA são secundários a condições genéticas e neurológicas conhecidas. Dentre essas condições, a investigação de mutações no gene *MECP2*, associado à síndrome de Rett, é de especial interesse devido à sobreposição fenotípica com TEA. A grande maioria dos pacientes com TEA, no entanto, é classificada como TEA idiopático, uma condição multifatorial influenciada de forma complexa por diversos fatores genéticos e ambientais de risco. O polimorfismo de inserção/deleção localizado na região promotora do gene transportador de serotonina (5-HTTLPR) é um dos fatores mais investigados em estudos de associação com TEA. Esses estudos, no entanto, não avaliaram a estrutura funcional trialélica do polimorfismo 5-HTTLPR recentemente descrita. Além disso, poucos estudos investigaram a influência desse polimorfismo, bem como de fatores ambientais de risco, na variabilidade fenotípica de pacientes com TEA.

**Objetivo:** Investigar a influência de fatores genéticos e ambientais de risco na manifestação clínica de pacientes com diagnóstico de TEA.

**Métodos:** Inicialmente, 184 pacientes foram avaliados clinicamente, dos quais 168 foram confirmados com diagnóstico de TEA idiopático. A associação entre o polimorfismo 5-HTTLPR e TEA foi testada através de estudo caso-controle com 151 pacientes e 179 crianças controle, bem como através de teste de associação baseado em famílias (FBAT) em uma amostra de 105 trios (pacientes juntamente com seus pais biológicos). Além disso, foi testada a influência da interação entre 5-HTTLPR e exposição pré-natal a fumo na manifestação de agressividade em pacientes com TEA. Por fim, foram investigadas mutações no gene *MECP2* em 38 meninas com diagnóstico de TEA idiopático.

**Resultados:** Não houve associação entre 5-HTTLPR e TEA em ambos os estudos caso-controle e FBAT, mas o genótipo LaLa foi associado com instabilidade de humor nos pacientes ( $P=0,006$ ). Além disso, pacientes com o genótipo LaLa concomitantemente expostos a fumo pré-natal apresentaram maior risco de desenvolver agressão ( $P=0,02$ ) e auto-



agressão ( $P=0,02$ ). A exposição pré-natal a drogas potencialmente neuroteratogênicas foi associada com epilepsia ( $P<0,001$ ). Por fim, duas pacientes com diagnóstico de TEA idiopático apresentaram mutações patogênicas em *MECP2*: p.R255X e dois eventos inserção/deleção ainda não descritos no éxon 4.

**Conclusões:** Todos os estudos sobre a etiologia dos TEA idiopáticos deveriam iniciar com uma avaliação clínica adequada. Essa abordagem é fundamental tanto para a identificação de TEA secundários quanto para distinguir fenótipos clínicos mais informativos para estudos de associação. Levando em consideração as características fenotípicas das duas pacientes portadoras de mutações patogênicas em *MECP2*, bem como em resultados de estudos prévios, sugerimos que o sequenciamento desse gene seja cogitado nas meninas com TEA que apresentem atraso no desenvolvimento social e comunicativo. O polimorfismo 5-HTTLPR não parece influenciar o risco para TEA em si, mas parece contribuir para a variabilidade fenotípica dos pacientes. Da mesma forma, a exposição pré-natal a substâncias potencialmente neuroteratogênicas também pode influenciar o quadro clínico de pacientes com TEA.

## ABSTRACT

**Introduction:** Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders of brain function which impair reciprocal social interactions, verbal and nonverbal communications and are accompanied by restricted educational activities, abnormal interests, and stereotypic behaviors. ASD include three conditions: autistic disorder, Asperger disorder and pervasive development disorder-not otherwise specified. The broad clinical heterogeneity of affected individuals impairs research on identification of ASD etiological origins. About 10% of ASD are secondary to known genetic or neurological conditions. Among these conditions the investigation of mutations in *MECP2*, the gene associated with Rett syndrome, is of great interest due to phenotypic overlapping with ASD. The remaining majority of cases is classified as idiopathic ASD, a multifactorial condition influenced by complex sets of genetic and environmental factors. Among genetic risk factors, the polymorphic region on promoter of serotonin transporter gene (5-HTTLPR) is one of the most investigated in association studies with ASD. The previous studies, however, have not evaluated 5-HTTLPR functional triallelic structure recently described. Moreover, few studies have assessed 5-HTTLPR and environmental risk factors influence on phenotypic variability of ASD patients.

**Objective:** Investigate the influence of genetic and environmental risk factors in clinical presentation of patients with ASD.

**Methods:** Initially, 184 were clinically evaluated and 168 were confirmed with diagnosis of idiopathic ASD. The association between the 5-HTTLPR polymorphism and ASD was tested by case-control study with 151 patients and 179 control children, as well as by family-based association test (FBAT) in a sample of 105 trios (patients and their parents). Moreover, it was tested the influence of interaction between 5-HTTLPR prenatal smoking exposure on aggressive behavior in patients with ASD. Finally, mutations in *MECP2* gene were investigated in 38 girls with diagnosis of idiopathic ASD.

**Results:** There was no evidence of association between the 5-HTTLPR with ASD in both case-control and FBAT tests, but the LaLa 5-HTTLPR genotype was associated with mood instability in patients ( $P=0.006$ ). Additionally, patients with the LaLa genotype concurrently exposed to prenatal smoking had an increased risk of presenting aggression ( $P=0.02$ ) and self-injury ( $P=0.02$ ). The pre-natal exposure to potential neuroteratogenic drugs was associated with epilepsy in ASD patients ( $P<0.001$ ). Finally, two girls with diagnostic of idiopathic ASD were detected with pathogenic mutations in *MECP2*: p.R255X and two no described insertion/deletion events inside forth exon.

**Conclusions:** The studies addressing etiology of idiopathic ASD should begin with appropriate clinical evaluation. This is an essential approach for identification of secondary ASD cases as well for discriminate more informative clinical phenotypes for association studies. Considering the phenotypic characteristics of the two patients carried pathogenic mutations in the *MECP2* gene, along with results of previous papers, we suggest that the sequencing of the gene should be considered for girls with ASD who present delayed development of social and communicational skills. The 5-HTTLPR polymorphism seems not influence risk for ASD per se, but contributes to phenotypic variation in patients. In the same way, prenatal exposure to potential neuroteratogenic substances may also influence clinical presentation of ASD patients.



## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO**



## **1. Introdução**

### **1.1 Transtorno autista e transtornos do espectro autista – definição e heterogeneidade fenotípica**

O termo ‘autismo’ foi primeiramente usado por Bleuler em 1911 para designar crianças que, aparentemente, haviam perdido o contato com a realidade resultando em grande dificuldade ou incapacidade de comunicação (Ajuriahuerra, 1977). Mais tarde, Kanner (1943) usou o mesmo termo para descrever 11 crianças que compartilhavam o mesmo comportamento peculiar: inabilidade para interação social, problemas no uso da linguagem (ex. ecolalia, inversão pronominal, entonação de voz anormal), desenvolvimento cognitivo desigual, comportamentos repetitivos, resposta sensorial atípica e extrema atração por objetos inanimados. Ele nomeou essa condição de “autismo infantil” e a definiu como uma síndrome caracterizada pela inabilidade inata em estabelecer contato afetivo com outras pessoas.

Um ano depois de publicado o trabalho de Kanner, Asperger (1944) descreveu quatro crianças que apresentavam a mesma dificuldade em estabelecer contato social e os mesmos padrões de interesses restritos, mas que exibiam habilidades linguísticas sofisticadas.

Apesar de que diversos estudos clínicos tenham se seguido após as descrições iniciais de Kanner e Asperger, o autismo foi considerado como sinônimo de esquizofrenia infantil até a publicação da terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-III) da Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association, 1980), onde foi classificado como um tipo de transtorno global de desenvolvimento (TGD). Os critérios diagnósticos adotados no DSM-III refletem a descrição inicial de Kanner, expandida por Rutter (1978). No DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) revisões nos critérios diagnósticos levaram a substituição do termo “autismo infantil” por “transtorno autista”. Além disso, também foram revisadas as categorias dentro dos TGD, dentre elas, a condição descrita por Asperger, denominada como transtorno de Asperger, o transtorno global do desenvolvimento não especificado (TGD-NE), transtorno de Rett e transtorno desintegrativo da infância.

Os níveis de gravidade dos indivíduos caracterizados como autistas variam de crianças não-verbais com retardo mental grave (Gillberg e Coleman, 2000) até estudantes de QI acima da média, a despeito de linguagem e uso de habilidades sociais inadequados (Baron-Cohen e cols., 2001). Apesar de 80% das crianças autistas apresentarem retardo mental, as habilidades Savant – desempenho extraordinário, a despeito de baixo QI, em certos domínios

cognitivos como cálculo, música, artes e memória – são 200 vezes mais comuns em autistas do que em outras formas de retardo mental (Treffert e Wallace, 2002). Essa grande heterogeneidade fenotípica, ou seja, a grande variação observada nos padrões comportamentais e nos níveis de habilidade social e comunicativa dos pacientes, levou ao uso cada vez mais frequente do termo transtornos do espectro autista (TEA) (Filipek e cols., 1999b). Esse termo, apesar de originalmente empregado como sinônimo de TGD, na literatura atual está sendo mais frequentemente utilizado para designar três condições de forma conjunta: transtorno autista, transtorno de Asperger e TGD-NE (Johnson e cols., 2007; Volkmar e cols., 2009) (Quadro 1).

Quadro 1 – Categorias diagnósticas dos TGD segundo a classificação do DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000).

Transtornos Globais do Desenvolvimento (TGD)	Características
Transtorno autista *	Autismo clássico (características descritas no texto).
Transtorno de Rett	Condição genética (mutações em <i>MECP2</i> ), afeta meninas predominantemente e atinge o desenvolvimento cerebral pós-natal.
Transtorno desintegrativo da infância	Regressão cognitiva, comportamental e na linguagem entre 2 e 10 anos, precedida de desenvolvimento completamente normal.
Transtorno de Asperger *	Indivíduos com algumas características autistas que desenvolvem a linguagem na idade esperada, sem retardo mental.
Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação *	Indivíduos com algumas características autistas que não pertencem as categorias anteriores.

\* Também denominadas conjuntamente como transtornos do espectro autista (TEA).

## 1.2 Critérios diagnósticos

Apesar da evidência da contribuição de fatores genéticos e da grande quantidade de estudos que buscam determinar a identidade desses genes, como mostrado a seguir, a etiologia dos TEA ainda continua sob debate. Na ausência de um marcador biológico definido, o diagnóstico do transtorno autista e a sua diferenciação dos demais TEA é ainda, de certa forma, uma decisão clínica arbitrária (Gadia e cols., 2004). Os critérios mais usados atualmente são descritos no DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000) (Anexo 1). De modo geral, os pacientes diagnosticados com transtorno autista devem apresentar



prejuízos em três domínios comportamentais principais, sendo o início dos sintomas anterior aos 3 anos de idade: interação social, linguagem e comunicação, repertório de interesses e atividades. Pacientes com transtorno de Asperger apresentam prejuízos sociais e interesses restritos, mas as habilidades de linguagem apresentam-se preservadas ou até acima da média para a idade. Por fim, crianças com prejuízos em uma ou mais áreas do desenvolvimento, mas não em número ou intensidade suficientes para serem incluídas no transtorno autista ou de Asperger, recebem o diagnóstico de transtorno global do desenvolvimento não especificado (TGD-NE).

O diagnóstico diferencial do transtorno autista e demais TEA é ainda mais complicado pela co-ocorrência de um ou mais transtornos psiquiátricos e neurológicos em 72% dos pacientes, incluindo transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, transtorno de tiques, dispraxia, dislexia, transtorno obsessivo-compulsivo, fobias, ansiedade, transtornos de humor, transtornos do sono e transtornos alimentares (Leyfer e cols., 2006). Além disso, os pacientes com TEA geralmente exibem ampla variação de co-morbidades nos domínios de desenvolvimento cognitivo, adaptativo, afetivo e comportamental, incluindo retardo mental, deficiências em funções executivas, limitações em habilidades adaptativas, problemas de aprendizado, auto e hetero-agressão e labilidade de humor (revisado em Bregman, 2005).

### **1.3 Prevalência na população**

Dependendo do critério de inclusão e da população em estudo, a prevalência do transtorno autista varia de 31 a 60 por 10 mil (Williams e cols., 2006), aparecendo em terceiro lugar entre os transtornos de desenvolvimento, depois das malformações congênitas e a síndrome de Down. A taxa aumenta para 3 a 121 ocorrências em cada 10 mil sujeitos em estudos que consideram os critérios para TEA (Williams e cols., 2006). Estimativas mais conservadoras apontam para uma prevalência de dois a três casos de TEA em 1000 indivíduos (Fombonne, 2003a; Williams e cols., 2006). O Transtorno autista é mais comum em meninos do que em meninas, com razão sexual em torno de 3:1 e 4:1 (Gillberg, 1993; Fombonne, 1998).

O departamento norte-americano de Serviços de Desenvolvimento relatou um aumento de 556% na prevalência do transtorno autista entre 1991 e 1997 (Stokstad, 2001). A explicação mais provável para o crescente aumento no número de diagnósticos de TEA nos últimos anos seria o aumento do conhecimento dos profissionais acerca da amplitude de manifestações clínicas desses transtornos, que incluiria uma melhor detecção de casos sem

retardo mental, ou seja, maior atenção para casos de transtorno de Asperger e autismo de alto funcionamento (isto é, transtorno autista com habilidades cognitivas preservadas) (Klin, 2006). No Brasil, na ausência de dados oficiais, a Associação Brasileira de Autismo calcula que existam cerca de 600 mil pessoas com a doença (Bosa e Callias, 2000).

#### **1.4 Etiologia**

Desde a primeira descrição do autismo por Kanner (1943), alguns dos seus aspectos característicos começaram a ser notados na personalidade de alguns dos pais de crianças autistas. Essas observações, inicialmente, foram interpretadas como se o autismo fosse causado por pais emocionalmente frios, não responsivos aos seus filhos (hipótese da “mãe geladeira”). A partir dos anos 60, diversos estudos científicos associando o autismo com retardo mental, síndromes genéticas, epilepsia e outras condições neurológicas, começaram a elucidar as bases orgânicas do autismo e seus transtornos correlacionados (Klin, 2006). Esses estudos contribuíram significativamente para o esclarecimento dos aspectos biológicos envolvidos nos TEA, mas ao mesmo tempo, revelaram que se trata de condições complexas, com etiologias múltiplas e níveis variáveis de gravidade (Rutter e cols., 1994; Keller e Persico, 2003).

#### **1.5 TEA Secundário x Idiopático**

Há muito tempo é reconhecido que as pesquisas envolvendo os TEA são prejudicadas pela extensa variabilidade clínica dos pacientes (Links e cols., 1980). A idéia de que essa ampla heterogeneidade clínica reflete, na verdade, uma conjunção de etiologias distintas ganhou força na última década devido a grande dificuldade em se identificar genes de efeito maior relacionados aos TEA (revisado por Yang e Gill, 2007).

Na tentativa de lidar com a complexidade etiológica dos TEA durante a prática clínica, o primeiro passo é a distinção entre os subtipos idiopático e secundário (Rutter, 2005). Aproximadamente 10% dos casos de TEA são secundários, ou seja, podem ser atribuídos a alguma anomalia cromossômica, transtorno genético ou condição neurológica grave (Fombonne, 2003). Os casos de TEA idiopáticos, correspondendo aos 90% restantes, apresentam etiologia multifatorial, ou seja, teoricamente são influenciados por uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais de risco.

### 1.5.1 TEA Secundário

Dezenas de condições genéticas já foram relatadas em pacientes com TEA (Tabela 1), mas a maioria delas em uma frequência muito baixa, ou então apenas em relatos de caso (Cohen e cols., 2005, Schaefer e Mendelsohn, 2008).

Tabela 1 – Síndromes e condições genéticas mais frequentemente associadas com TEA (adaptado de Cohen e cols., 2005).

Condição	Taxa estimada (%) em TEA	Taxa estimada (%) de TEA na condição
Síndrome do X Frágil	2,4 – 5	10 – 20
Síndrome de Down	2,5	<5 – 10
Esclerose tuberosa	1 – 4	40 – 70
mutações em <i>MECP2</i>	3 – 5	80 – 100
Síndrome de Angelman/Prader-Willi	1	80 – 100
Mucopolissacaridose tipo III	1 (?)	80 – 100
Deficiência adenilsuccinato liase	<1	80 – 100
Síndrome Smith-Magenis	<<1	80 – 100
Síndrome Smith-Lemli-Opitz	(?)	50
Síndrome de Cohen	(?)	(?)
Fenilcetonúria	(?)	(?)
Alterações citogenéticas em geral	3 – 5	(?)
duplicação 15q11-13	(?)	80 – 100 (?)
deleção 22q13	(?)	10 (?)
outras: deleções em 7q, 2q37, 16p, 17p, 17q, 18q, Xp e aneuploidias sexuais	(?)	(?)

Para auxiliar o diagnóstico de casos de TEA secundários, alguns autores sugerem protocolos para avaliação clínica (Filipek e cols., 2000; Cohen e cols., 2005; Herman e cols., 2007, Schaefer e cols., 2008; Lintas e Persico, 2009) iniciando por uma ampla avaliação física e dismorfológica, seguida de exames laboratoriais e de neuroimagem e, por fim, avaliação genética mais específica. Os protocolos mais recentes incluem testagem para síndrome do X frágil (MIM 300624), causada por mutação no gene *FMRI*, como rotina para todos os pacientes. Além de ser a condição genética mais frequentemente associada a pacientes com TEA (Tabela 1), em alguns estudos clínicos foi observado que certos pacientes com mutação em *FMRI* não apresentavam o quadro clínico característico da síndrome do X

frágil, mas apenas diagnóstico de TEA (Estécio e cols., 2002; Schaefer e Lutz, 2006; Marco e Skuse, 2006). Da mesma forma, alguns autores recomendam a avaliação de mutações no gene *MECP2* para todas as meninas com diagnóstico de TEA (Schaefer e cols., 2008), ou pelo menos nas pacientes com associação de retardo no desenvolvimento neuropsicomotor (Abdul-Rahman e Hudgins, 2006). Apesar de mutações nesse gene estarem tradicionalmente associadas à síndrome de Rett (MIM 312750), na literatura há um crescente número de relatos encontrando mutações patogênicas em *MECP2* em pacientes com quadro clínico atípico (Herman e cols., 2007; Zappella e cols., 2003), ou mesmo pacientes com diagnóstico de TEA, sem manifestações clínicas de síndrome de Rett (Lam e cols., 2000; Carney e cols., 2003; Schaefer e Lutz, 2006).

### **1.5.2 Síndrome de Rett e TEA**

A síndrome de Rett (SR), descrita primeiramente por Andreas Rett (1966), foi reconhecida internacionalmente em 1983 com o trabalho de Hagberg e colaboradores. Dados de prevalência não são muito precisos, variando de 0.25 a 1 caso em 10.000 indivíduos, sendo muito mais comum em meninas (Hagberg e cols., 1985). Os critérios diagnósticos, segundo o DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000) incluem regressão da fala, perda do uso funcional das mãos e microcefalia progressiva após um período de desenvolvimento normal da criança (Anexo 1).

A evolução do quadro clínico, conforme descrita por Hagberg e Witt-Engerström (1986), inicia com desenvolvimento normal nos primeiros 6 a 18 meses de vida, seguida por um período de estagnação do desenvolvimento acompanhada por desaceleração do crescimento do perímetro cefálico e tendência ao isolamento social. Entre o primeiro e o terceiro ano de vida é observada uma clara regressão na linguagem, contato social e habilidades motoras, principalmente o uso das mãos: as pacientes substituem sua função praxica por movimentos repetitivos e estereotipados característicos. Pode ocorrer perda da fala adquirida, comportamento autista, epilepsia e irregularidades respiratórias (apnéia e hiperventilação). Entre os dois e dez anos de idade, pode-se desenvolver ataxia e apraxia, espasticidade, escoliose e bruxismo. Depois dos 10 anos ocorre uma lenta deterioração somática e neurológica adicional. Prejuízos motores mais graves podem levar à necessidade de cadeira de rodas. A condição geralmente estabiliza no final da adolescência ou início da vida adulta. O fenótipo resultante, no entanto, é bastante amplo, variando de pacientes com severa deterioração neurológica até casos com manutenção da fala e habilidades cognitivas

(Figura 1). As pacientes geralmente atingem a idade adulta, porém há uma chance mais elevada de morte súbita comparada a controles pareados por idade (Sekul e cols., 1994).

Mutações no gene *MECP2*, localizado no cromossomo Xq28, são encontradas em aproximadamente 80% dos casos de SR (Amir e cols., 1999). O gene tem 4 éxons e expressa uma proteína nuclear de 486 aminoácidos codificada pelos éxons 2, 3 e 4 (Figura 2) (D’Esposito e cols., 1996; Sirianni e cols., 1998). A proteína MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein*) possui quatro domínios funcionais responsáveis pela ligação a DNA metilado e repressão da transcrição de outros genes. A hipótese inicial era de que se tratasse de um repressor geral de transcrição, uma vez que MeCP2 é expressa em muitos tecidos (D’Esposito e cols., 1996; Nan e cols., 1997). Dados mais recentes, por outro lado, indicam que, pelo menos no sistema nervoso central, a proteína estaria envolvida na regulação da transcrição de sistemas gênicos mais específicos, importantes para sinaptogênese e maturação neuronal (Matijevic e cols., 2009). Alguns genes especificamente silenciados por MeCP2 já foram identificados, porém a relação funcional desses genes com a patogenia da SR ainda não foi muito bem esclarecida (Matijevic e cols., 2009).

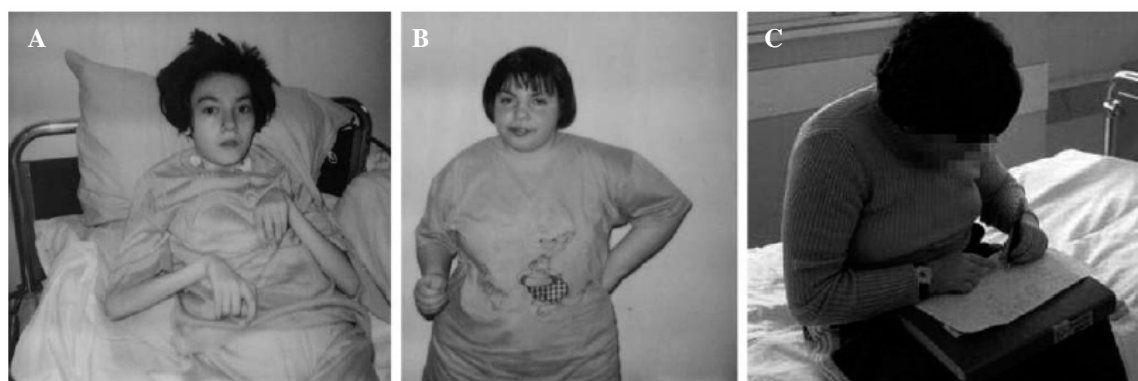


Figura 1 – Pacientes com três fenótipos associados com mutações em *MECP2*. A) Paciente de 12 anos com SR clássica, apresentando quadriparesia espástica; B) Paciente de 21 anos, irmã da paciente A, com fala preservada; C) Paciente de 13 anos com fala preservada e de “alto funcionamento” escrevendo as letras de seu nome (modificado de Renieri e cols., 2003).

Existe uma grande variedade de mutações patogênicas já descritas no gene *MECP2*, dispersas ao longo de todo o gene (<http://MECP2.chw.edu.au/>) (Figura 2). Quase todas ocorrem *de novo* nos gametas parentais, principalmente no gameta paterno (Trappe e cols., 2001). Existem relatos de exceções onde a mutação é transmitida pela mãe normal ou

levemente afetada, mas que apresenta simultaneamente mosaicismos gonadais ou inativação do X favorável ao silenciamento do *MECP2* mutante (Zoghbi e cols., 1990).

Diversos estudos já buscaram estabelecer correlações entre os tipos de mutações patogênicas de *MECP2* e características clínicas dos pacientes. Os resultados, entretanto, são conflitantes, incluindo relatos de fenótipos distintos associados à mesma mutação (Ham e cols., 2005; Matijevic e cols., 2009). Além disso, conforme exposto na seção anterior, há um número crescente de relatos de mutações patogênicas em *MECP2* encontradas em pacientes com quadro atípico ou com diagnóstico de TEA. Young e cols. (2008) concluem que muitos casos inicialmente diagnosticados como autismo ou TEA são identificados mais tarde como sendo na verdade síndrome de Rett devido a sobreposição fenotípica entre essas condições: ambas envolvem prejuízos no desenvolvimento social e na linguagem, acompanhados de maneirismos repetitivos e estereotipados.

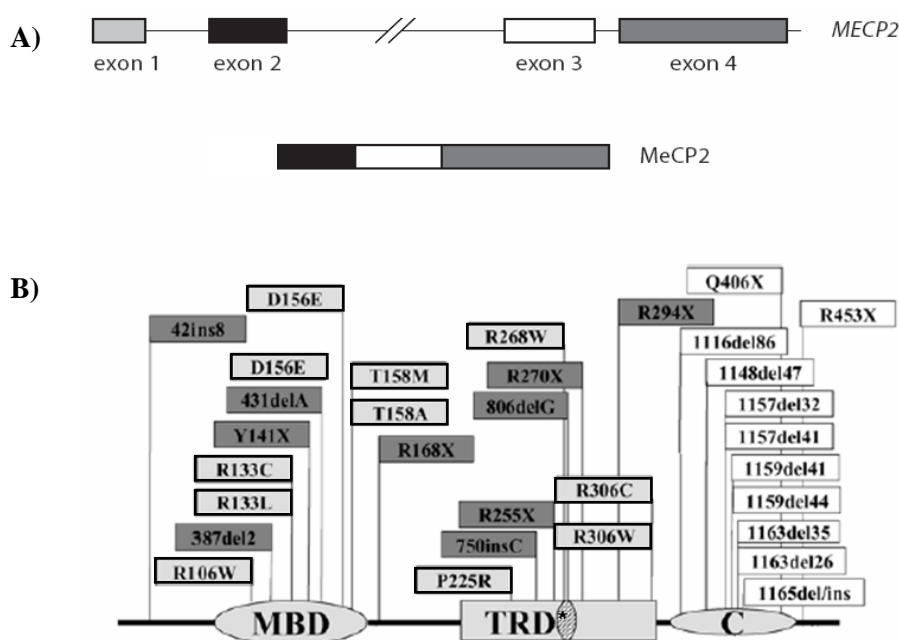


Figura 2 – A) Estrutura esquemática do gene *MECP2* e da proteína MeCP2, codificada pelos éxons 2, 3 e 4; B) Representação esquemática dos domínios funcionais da proteína MeCP2 e localização das mutações patogênicas mais frequentes: caixas brancas e cinza-escuro indicam mutações que criam códon de parada prematuro; caixas delimitadas indicam mutações de troca de aminoácidos. Asterisco marca o sinal de localização nuclear. MBD, domínio de ligação a metil-CpG; TRD, domínio de repressão de transcrição; C, domínio C-terminal (modificado de Renieri e cols., 2003).

### 1.5.3 TEA Idiopático

A importância da contribuição de fatores genéticos de risco para a etiologia dos TEA idiopáticos é evidenciada tanto em estudos epidemiológicos quanto em estudos de gêmeos. O risco de recorrência de autismo idiopático é de 10 a 20 vezes mais alto em famílias com uma criança autista do que na população em geral (Fisher e cols., 1998; Shao e cols., 2002). A taxa de concordância para diagnóstico de transtorno autista em gêmeos monozigóticos é de no mínimo 60%, se forem usados os critérios estritos para transtorno autista (VanderWeele e Cook, 2003), 71% para TEA e 92% para um espectro mais amplo de problemas de linguagem ou interação social (Folstein e Piven, 1991). Entre os transtornos de etiologia multifatorial, os TEA estão entre as condições que apresentam maior herdabilidade, 90% ou maior, estimada por estudo de gêmeos (Folstein e Rosen-Sheidley, 2001).

Apesar das inúmeras evidências para a importância da contribuição de fatores genéticos para a etiologia dos TEA, hoje se sabe que essa influência é complexa (Rutter, 2000). A ampla heterogeneidade clínica dos TEA provavelmente reflete a complexidade de sua natureza multifatorial, incluindo a contribuição de múltiplos *loci*, heterogeneidade genética, epistasia e interações gene-ambiente (Persico e Bourgeron, 2006).

Há controvérsias também sobre o papel dos efeitos ambientais na etiologia dos TEA (Cook, 2001). A idade avançada dos pais e ocorrências obstétricas como parto prematuro, baixo peso ao nascimento e hipóxia perinatal foram relacionadas como fatores de risco para TEA (Kolevzon e cols., 2007). Embora a mídia já tenha chamado atenção para a vacina de sarampo-caxumba-rubéola e, mais recentemente, intoxicação por mercúrio, como possíveis fatores relacionados ao aumento da incidência de TEA nos últimos anos, essas hipóteses ainda não foram confirmadas por estudos epidemiológicos (Madsen e cols., 2002; Taylor e cols., 2002).

### 1.6 Fatores genéticos de risco associados aos TEA idiopáticos

Desde 1998, 14 estudos de ligação, 5 estudos de expressão gênica diferencial (revisado em Yang e Gill, 2007) e dois estudos de associação genômica (Lauritsen e cols., 2006; Weiss e cols., 2008) identificaram mais de 90 *loci* possivelmente relacionados aos TEA (Figura 3). Resultados convergentes sugerem algumas regiões cromossômicas mais promissoras, que provavelmente contêm genes de risco para TEA: 7q21.2–q36.2, 16p12.1–p13.3, 6q14.3–q23.2, 2q24.1–q33.1, 17q11.1–q21.2, 1q21–q44 e 3q21.3–q29. As evidências

de ligação com o cromossomo X permanecem inconsistentes, com apenas dois estudos sugerindo ligação (Auranen e cols., 2002; Shao e cols., 2002) a despeito do desvio significativo da razão sexual.

Esses achados corroboram a hipótese inicial (Risch e cols., 1999) de que os TEA idiopáticos, apesar dos altos valores de herdabilidade, se constituem como neuropatologias muito heterogêneas, com a contribuição de múltiplos fatores genéticos de risco, o que dificulta a busca por genes associados.

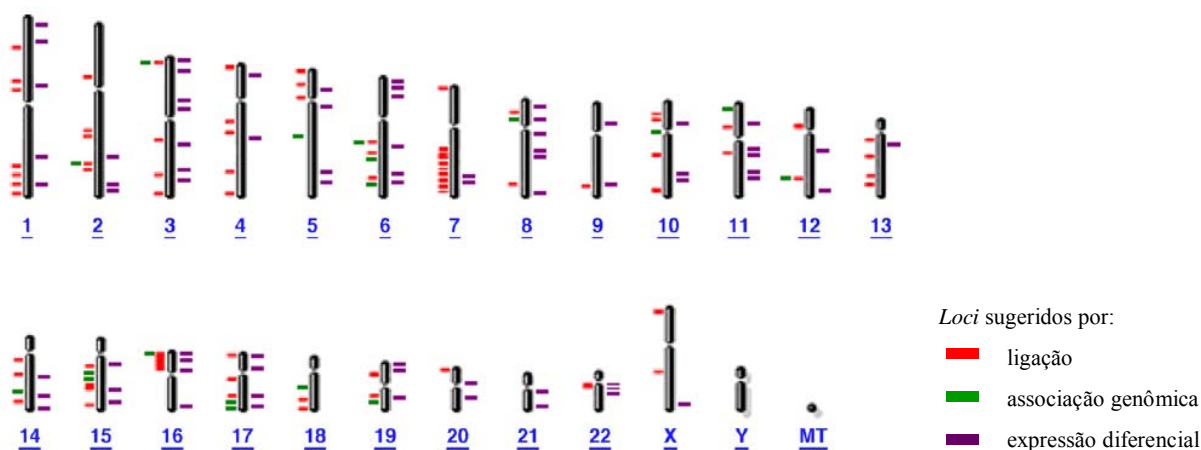


Figura 3 – Diagrama representativo do genoma humano mostrando a localização aproximada dos mais de 90 *loci* associados aos TEA identificados em estudos de ligação, associação genômica e expressão gênica diferencial (adaptado de Yang e Gill, 2007).

### 1.7 Sistema serotoninérgico e TEA idiopáticos

O sistema neurotransmissor serotoninérgico representa um candidato promissor na patologia dos TEA. Em estudos neuroquímicos, o elevado nível de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) em amostras de sangue e urina é o achado mais consistente em pacientes autistas (Shain e Freedman, 1961; Cook e cols., 1993; Mulder e cols., 2004). Estudos de neuroimagem sugerem anormalidade nas taxas de síntese de serotonina no cérebro de indivíduos autistas (Chugani e cols., 1999; Muller e cols., 1998). Além disso, o período de síntese elevada de serotonina que acontece no cérebro de crianças normais acima de cinco anos (capacidade de síntese 200% maior do que adultos) não parece acontecer em crianças autistas (Chugani e cols. 1997; Muller e cols., 1998).



Devido ao efeito positivo de antidepressivos que atuam nesse sistema em pacientes com TEA (Hollander e cols., 2003) o gene do transportador de serotonina (*5-HTT* ou *SLC6A4*) e os vários receptores de serotonina foram focalizados como genes candidatos para investigação (Lamb e cols., 2000). O gene *5-HTT* está localizado no cromossomo 17q11.1-q12, uma região que mostrou forte ligação ao transtorno autista em diversos estudos (Cook e cols., 1997; IMGSAC, 2001; Kim e cols., 2002; Yonan e cols., 2003, McCauley e cols., 2004a). Mais de 20 polimorfismos nesse gene foram identificados, mas um deles é de particular interesse em neuropsiquiatria dado seu efeito aparente na expressão e função do transportador da serotonina (Lesch e cols., 1996, Greenberg e cols., 1999; MacKenzie e Quinn, 1999; Nobile e cols., 1999; Anderson e cols., 2002; Sakai e cols., 2002). Trata-se de um polimorfismo de inserção/deleção localizado na região promotora do gene *5-HTT* (*5-HTTLPR*, *serotonin transporter gene-linked polymorphic region*). Inicialmente, foram descritos dois alelos funcionais, um longo (L) e um curto (S), sendo o alelo S caracterizado pela deleção de um trecho de 44 pares de base e associado a um menor nível de atividade transcricional (Heils e cols., 1996). Recentemente, um polimorfismo de base única A>G (rs25531), detectado dentro do *5-HTTLPR* (Nakamura e cols., 2000) também mostrou-se funcional, modificando o nível de transcrição do gene *5-HTT* (Hu e cols., 2006). Como a variante ‘G’ quase sempre ocorre dentro da região compreendida pelo alelo L, o polimorfismo *5-HTTLPR* é atualmente considerado funcionalmente trialélico (Hu e cols., 2006), composto pelos alelos S (curto), La (longo com a variante ‘A’) e Lg (longo com a variante ‘G’) (Figura 4).

Os resultados dos estudos de associação entre o polimorfismo *5-HTTLPR* e TEA são controversos. Dependendo da população e do tipo de delineamento, alguns estudos mostraram associação com o alelo L (Klauck e cols., 1997; Tordjman e cols., 2001; Yirmiya e cols., 2001; Cho e cols., 2007; Devlin e cols., 2005), outros com o S (Cook e cols., 1997; Kim e cols., 2002; Conroy e cols., 2004; McCauley e cols., 2004a) e outros ainda não encontram associação (Maestrini e cols., 1999, Persico e cols., 2000; Betancur e cols., 2002; Coutinho e cols., 2004; Koishi e cols., 2006; Guhathakurta e cols., 2006; Ramoz e cols., 2006; Mulder e cols., 2005; Wu e cols., 2005; Zhong e cols., 1999).

Apesar do *5-HTTLPR* ser um polimorfismo amplamente investigado em TEA não há estudos publicados para população brasileira. Da mesma forma, os estudos anteriores não avaliaram a estrutura trialélica do polimorfismo *5-HTTLPR*. O alelo La está associado à produção de altos níveis de mRNA, enquanto o alelo Lg é funcionalmente equivalente ao S (Figura 4). Estudos que, pela falta de avaliação da estrutura trialélica, incluírem muitos

indivíduos com alelos Lg no grupo de genótipos SL ou LL podem ofuscar o real efeito funcional do 5-HTTLPR e comprometer seus resultados (Hu e cols., 2006). Além disso, os estudos anteriores não testaram a possível interação entre 5-HTTLPR e fatores ambientais potencialmente envolvidos na etiologia dos TEA e sua influência na manifestação de características clínicas específicas em pacientes com TEA.

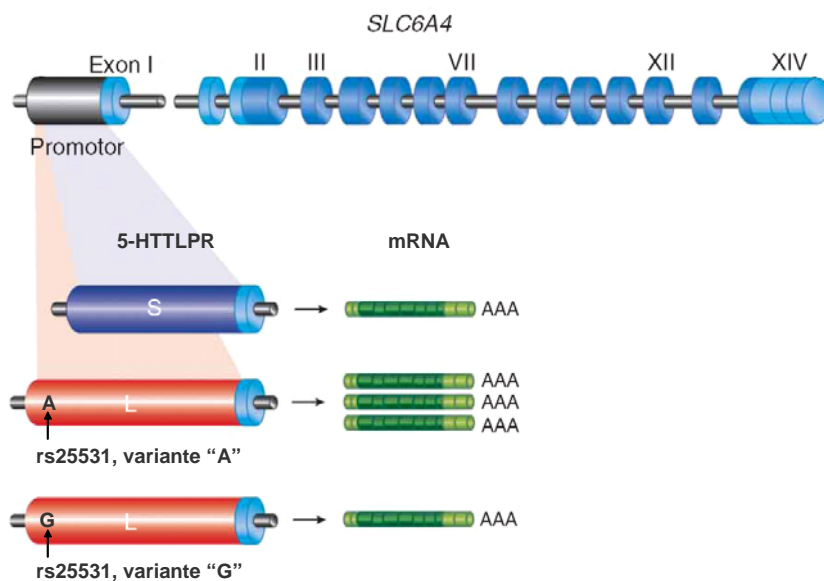


Figura 4 – Variação alélica da região promotora do gene do transportador de serotonina (*SLC6A4*) e seu efeito funcional na produção de mRNA. Os alelos longo (L) e curto (S) se diferenciam pela presença/ausência de uma região de 44pb. O alelo L também se diferencia pela presença de um polimorfismo de base única A>G (rs25531). O alelo La (L com variante “A”) está associado à maior produção de mRNA do gene *SLC6A4* do que os alelos S e Lg (L com variante “G”) (adaptado de Canli e Lesch, 2007).

## **CAPÍTULO II – OBJETIVOS**



## **2. Objetivos**

### **2.1 Justificativa**

Apesar das múltiplas evidências acerca da influência de fatores genéticos, a etiologia dos TEA idiopáticos ainda continua em debate. Apesar do 5-HTTLPR ser um polimorfismo amplamente investigado em TEA não há estudos publicados para população brasileira. Além disso, os estudos anteriores não avaliaram a estrutura trialélica do polimorfismo. Por fim, existem poucos estudos avaliando a influência de fatores genéticos e ambientais de risco na manifestação de características clínicas em pacientes com TEA.

### **2.2 Objetivo Geral**

Investigar a influência de fatores genéticos e ambientais de risco na manifestação clínica de pacientes com diagnóstico de transtornos do espectro autista.

### **2.3 Objetivos Específicos**

- Descrever características clínicas e comportamentais, bem como as comorbidades médicas, de uma amostra de pacientes diagnosticados com TEA idiopáticos;
- Investigar a influência de fatores ambientais de risco na ocorrência de comorbidades médicas e demais características clínicas e comportamentais desses pacientes;
- Caracterizar frequências gênicas e genótípicas da forma bialélica e trialélica do polimorfismo 5-HTTLPR uma amostra de crianças com TEA idiopáticos;
- Estudar uma possível associação entre o 5-HTTLPR e TEA idiopáticos através da análise de desequilíbrio de transmissão e caso-controle;
- Testar a interação entre 5-HTTLPR e fatores ambientais de risco na manifestação de características clínicas em pacientes com TEA idiopáticos;
- Seqüenciar o gene *MECP2* nos indivíduos do sexo feminino em busca de mutações e relacioná-las com o quadro clínico e comportamental;



## **CAPÍTULO III – ARTIGO 1**

### **Clinical profile and environmental risk factors associated to autism spectrum disorders in a Brazilian sample**

Manuscrito em preparação





**Clinical profile and environmental risk factors associated to autism spectrum disorders  
in a Brazilian sample**

Authors: Dânae Longo <sup>1</sup>, Claiton Henrique Dotto Bau <sup>1,2</sup>, Bibiane Armiliato de Godoy <sup>1</sup>,  
Rudimar dos Santos Riesgo <sup>3</sup>, Lavínia Schuler-Faccini <sup>1,2</sup>

1 Post-graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

2 Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

3 Department of Pediatrics, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

number of text pages: 22

number of tables: 6

Corresponding author:

Dr. Lavínia Schuler-Faccini

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS,

Caixa Postal: 15053, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Email: [lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

URL adress: <http://www.ppgbm.com.br/>

Telephone: 55 51 3308-9826

Fax: 55 51 2101-8010

## **Abstract**

Autism spectrum disorders (ASD), which includes autism, Asperger disorder and pervasive developmental disorder-not otherwise specified, are complex neuropsychiatric disorders characterized by broad clinical heterogeneity that reflects multiple etiological origins. Many authors have been suggesting studying subgroups of ASD patients with tightly-defined phenotypes to help identification of genetic and environmental risk factors. The objective of this study was to examine the concurrent clinical characteristics and environmental pre/perinatal risk factors exposure in a Brazilian group of patients with ASD in order to improve further etiological studies with this sample. It seems there are no strikingly differences in clinical presentation or rates of exposure to environmental risk factors in our sample of 168 idiopathic ASD patients, as compared with previous studies. However, the higher mean age at the moment of ASD diagnosis and exclusion of 16 patients from an initial referred set of 184 due to failure on correct diagnosis point toward a necessity for improvement of ASD evaluation procedures in Brazilian health system. The adoption of appropriate clinical assessment, besides providing more homogeneous groups for biologic research, can render a better understanding of ASD pathogenesis as well as to improve patient management and family counseling.

**Keywords:** autism spectrum disorders, Asperger disorder, clinical assessment, environmental risk factors, genetic disorders, epilepsy.

## **Introduction**

Autism spectrum disorders (ASD), which includes autism, Asperger disorder and pervasive developmental disorder-not otherwise specified (PDD-NOS), are complex neuropsychiatric disorders characterized by social impairment, communication problems and unusual behaviors, such as stereotyped movements and mannerisms, with onset before 30 months of age (Rutter, 1978; American Psychiatric Association, 2000). The prevalence rate of ASD vary from 3 to 121 in 10,000 subjects, with more conservative estimatives ranging from 2 to 3 cases in 1,000 (Williams et al., 2006).

The broad clinical heterogeneity presented by ASD patients has long been addressed (Wing and Gould, 1979; Johnson et al., 2007). The first level of such complexity is etiological subdivision concerning concurrent genetic and neurological disorders. About 10% of ASD may be associated with a neurological condition or a known syndrome (Chakrabarti and Fombonne, 2005) including cerebral palsy, fragile X syndrome, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, Rett syndrome and others (Fombonne, 2003). In these cases, ASD conditions have been considered as a secondary manifestation of a major disorder. In the remainder “essential” or “idiopathic” group it is not possible to identify genetic or severe neurological conditions (Miles et al., 2005). However, even among idiopathic ASD patients the clinical variation remains notable, with children having distinct symptoms for diagnostic, very low to above average IQs, and outcomes ranging from well functioning scholar and social life to requiring lifelong care (Klin, 2006).

Evidence is compelling that this wide clinical variation observed in idiopathic ASD may be influenced by a variety of genetic and environmental risk factors (Arndt et al., 2005; Freitag, 2007; Geschwind and Levitt, 2007). The etiology of the disorder is thought to be largely genetically determined (Gillberg and Wing, 1999) although early environmental insults affecting brain development may also be associated with autism (London and Etzel, 2000). It has been hypothesized that pregnancy, delivery, or neonatal complications may increase the risk of autism or may interact with a genetic disposition to increase the risk (Bolton et al., 1997). However, despite many suggestive evidence (Kolevzon e cols., 2007), there has been no consistent pattern of specific prenatal and perinatal risk factors associated with autism (Hertz-Picciotto, 2006).

In ASD etiological studies, many authors have been suggesting studying subgroups of patients with tightly-defined phenotypes to help identification of genetic and environmental risk factors (Volkmar et al., 2009). The rationale under this strategy is that

more homogeneous groups should be influenced by a more homogeneous genetic and/or environmental background. In genetic studies, some authors have been achieving more consistent results after stratifying the sample in subsets of patients based in clinical and behavioral characteristics (Freitag, 2007). This subdivision, however, seems to be limited by evaluation procedures. The usual standard instruments are based in relatively particular behavioral criteria, once they are used to ASD diagnosis. Other medical co-occurrences not exclusive for ASD patients, but important for clinical management, like epilepsy, sleep disorders or aggressive behavior, in general are not accounted. Analysis of such clinical information, unfortunately not assessed in most ASD etiological studies, provides more homogeneous groups for biologic research and, consequently, can render a better understanding of ASD pathogenesis as well as to facilitate patient management (Ming et al., 2008).

The objective of this study was to examine the concurrent clinical characteristics and environmental pre/perinatal risk factors exposure in a Brazilian group of patients with autism spectrum disorders. We propose that this careful clinical assessment will help to substantially improve further studies addressing the role of genetic and environmental risk factors in ASD etiology.

## **Experimental Procedures**

### **Subjects**

Patients were recruited at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and other medical and educational institutions of Rio Grande do Sul State. In order to select only idiopathic cases, exclusion criteria were: age lower than three years; diagnosis of neurofibromatosis, tuberous sclerosis, fragile X syndrome, Rett syndrome, chromosomal abnormalities or other known genetic condition; and cerebral palsy or other encephalopathy possibly associated with ASD (Miles et al., 2005). The study was approved by the Ethics Committee of the HCPA, and all participants or legal representatives signed an informed consent form.

An initial set of 184 patients with previous idiopathic ASD diagnosis were referred for clinical reevaluation performed by experienced professionals from PROTID (Programa para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento), a multidisciplinary program directed to research and treatment of Pervasive Developmental Disorders. Patients were evaluated using DSM-IV-TR criteria (American Psychiatric Association, 2000), and the

Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Schöpler et al., 1986) in its Brazilian version (Pereira et al., 2008). Five patients did not meet diagnostic criteria for ASD diagnostic and were excluded (Table 1). The remaining 179 patients were assessed through an evaluation protocol. Information was recovered by interview with parents, direct clinical examination and review of medical records. Cytogenetic studies were available for 40% of children, and all patients were screened for *FMRI* (fragile X mental retardation 1) gene expansions by a polymerase chain reaction (PCR) protocol (O'Connell et al., 2002). Since the *FMRI* screening result was inconclusive in 23 female patients, they were submitted to a careful evaluation and were maintained in the study due to absence of clinical signals of fragile X syndrome. After clinical and genetic reevaluation, 11 patients were excluded due to diagnosis of cytogenetic abnormalities, fragile X syndrome, FG syndrome, cerebral palsy or inborn error of metabolism not specified (Table 1). A total of 168 idiopathic ASD patients were further characterized. Nine children (5.4%) were adopted. Sixty four patients (38.0%) presented autistic disorder, 88 (53.0%) had PDD-NOS, and 15 (9.0%) had Asperger disorder. Patients were predominantly European derived (93.5%). The mean age of patients was 10.5 ( $\pm$  5.2) years and male-female ratio was 3.4:1. Demographic information is summarized in Table 2.

### **Clinical and behavioral outcomes**

The patients' assessment included demographic data, onset of ASD symptoms, age at first diagnosis, diseases in first degree relatives, neurological and genetic complementary exams, as well as child behavioral and clinical symptoms. The presence of specific symptoms was confirmed by clinical examination performed by neurologists, under supervision of one of us (RSR). Clinical outcomes included concurrent disruptive behaviors and clinical disorders frequently observed in ASD individuals (Ming et al., 2008) leading to disturbs in family and educational activities, and to the necessity of pharmacological treatment. The clinical outcomes evaluated included: (a) epilepsy, defined as at least two unprovoked seizures; (b) mood instability, defined as excessive, unpredictable and disabling fluctuation in daily mood; (c) stereotyped movements defined as repetitive and purposeless movements; (d) aggression, including unprovoked and recurrent aggressive behavior such as kicking, biting, pinching, hitting, or head-banging toward others; (e) self-injury, defined as unexplained and recurrent self-inflicted aggressive behavior; (f) sleep disorders, including any of the following disorders: sleep psychomotor agitation, night terror, chronic daily night awakening for an estimated duration of 10 or more minutes, sleep maintenance disorder (total nightly sleep time of less than 6 hours) and (g) psychomotor agitation, defined as excessive

motor activity disconnected from the situation. To be considered affected by a clinical outcome cited above, except for epilepsy, the patient should exhibit it daily, with behavior persisting for an estimate of 6 months or more.

### **Environmental pre/perinatal risk factors evaluation**

The maternal obstetric history was recovered by interview with parents and review of medical records. Perinatal and neonatal events that have been associated with ASD in epidemiological studies were considered as environmental risk factors for fetal development (Kolevzon et al., 2007; Wallace et al., 2008). They were: (a) advanced maternal and paternal ages; (b) maternal history of medical conditions during pregnancy, including hypothyroidism, mood disorders and thrombosis; (c) history of previous abortion; (d) history of prenatal occurrences, including bleeding, gestational diabetes, congenital infections, hypertension or pre-eclampsia; (e) use of substances during pregnancy, including alcohol, smoking, and drugs with potential teratogenic effect; (f) pregnancy length; (g) weight at birth; (h) APGAR score; (i) perinatal obstetric occurrences including fetal distress, hypoxia, hypoglycemia, neonatal sepsis; (j) neonatal occurrences, like infections, cardiac arrest, surgery.

### **Statistical analysis**

The SPSS software (SPSS 13.0 for Windows) was used to create the database, as well as for statistical procedures. Clinical and behavior outcomes were compared between patient's diagnostic classes. The remaining variables of obstetric occurrences and family history of diseases were not statistically tested once it were just described in terms of frequency. Categorical variables were compared with the chi-square ( $\chi^2$ ) test or Fisher's exact test. The continuous variables were analyzed by ANOVA or Kruskal-Wallis test (H), when appropriated. P values presented are uncorrected for multiple comparisons in this exploratory set of analyses, and alfa was set as 0.05.

## **Results and discussion**

### **Parental ages and obstetric occurrences**

The mean maternal and paternal ages at time of child's birth were 29.5 ( $\pm$  6.9) and 33.4 ( $\pm$  8.3) years, respectively. Advanced maternal and paternal ages have been pointed as risk factors for autism, but age risk varies across studies. Lauritsen et al. (2005) and Reichenberg et al. (2006) have found paternal age risk above 35 years and 40 years, while

Hultman et al. (2002) and Larsson et al. (2005) reported maternal age risks above 35 and 30 years, respectively. We have observed 25% and 40.5% of fathers above 40 and 35 years, while 19% and 51.2% of mothers were above 35 and 30 years (Table 3). These percents were slightly higher than previous reported rates in epidemiological studies: 12.7% of ASD fathers above 40 years (Reichenberg et al., 2006), 32.1% of fathers above 35 years (Lauritsen et al., 2004), 18% of mothers above 35 years (Hultman et al., 2002) and 41.8% of mothers above 30 years (Larson et al., 2005).

Among perinatal and prenatal adverse occurrences that have been pointed as risk factors for autism development, the low birth weight, maternal smoking during pregnancy, low APGAR 5' score, fetal distress and hypoxia are the most reported in literature (Kolevzon et al., 2007). We have found 12.8% children with birth weight under 2500g and 3% above 4500g (Table 3), similar to rates of 12.03% and 2.3%, found by Larson (2004). Our rate of 6.7% of births with APGAR 5' scores under than 7 and 17.2% of smoker mothers (Table 3) were higher than rates of 2.6% and 11.3% reported by Larson (2004). The rates of fetal distress and hypoxia 22.2% (Table 5), on the other hand, were lower than 26.2% reported by Glasson (2004).

### **Familiar history of diseases**

A full disease history could not be recovered from all analyzed families. Data presented in Table 4 were related to available data for each condition and it refers to rates of the disorder in any first degree relative. There was no ASD diagnostic for accessed parents. The prevalence of ASD among siblings was 3.3% and it is in accordance to other family studies that have reported a rate ranging from 2 to 6% (reviewed in Bailey et al., 1998). Alcohol abuse and drug addiction were present in 9.7% of first degree relatives, similar to rates of 9.1 and 5.2%, respectively, found by Mazefsky et al. (2008). About ~5% of parents or siblings of ASD patients were hospitalized due to some psychiatric condition, mainly mood disorders. The family history rates for presence of mental retardation, congenital malformation and epilepsy were 5.1, 3.2 and 4.5% respectively. In order to compare these rates with general population prevalence rates, the number of positive reports in each condition were divided by total number of accessed relatives (siblings + parents = 502). The general prevalence of epilepsy among ASD first degree relatives was 1.4% (7/502), slightly above the rate of 0.92% (9.2/1,000 people, 95% CI 8.4-10.0) of lifetime epilepsy previously described for Brazilian population (Li et al., 2007). Prevalence of mental retardation and congenital malformation were, respectively, 1.6% (8/502) and 0.99% (5/502). Both rates were under

previous described rates of 2.3% and 1.7%, respectively (Almeida Filho, 1982; Costa et al., 2006).

### **Clinical and behavior outcomes**

In this group of patients the mean age when parents noticed first signal of ASD symptoms was 17.6 months (Table 5). This age is in accordance with previous reports, ranging from 12 to 24 as mean age for onset of ASD symptoms (Klin, 2006; Mandell, 2008). The first signs reported more frequently by parents were abnormal socioemotional responsiveness associated with speech delay or lost of previous acquired phrasal words. These first symptoms appear to be a very frequent complains among parents of ASD children (Brune et al., 2006; Klin, 2006).

The mean age of first specific diagnostic for ASD was ~57 months (Table 5), which is above of mean diagnostic age in countries like USA and Sweden ranging from 48 to 55 months (Hultman et al., 2002; Kleinman et al., 2008; Mandell, 2008).

Epilepsy was present in ~23% of patients (Table 5), according with previous reports varying from 17.4% to 38% (Danielsson et al., 2005; Amiet et al., 2008) and similar with 25.4% found by McDermott et al. (2005). The rate of patients with EEG abnormalities, however, was 41.4% (Table 6). Chez et al. (2006) shows 60.7% idiopathic ASD subjects had abnormal EEG epileptiform activity regardless seizures history. We believe our rate of EEG abnormalities was lower due to lack of EEG evaluation in 56 patients (33.5% of total sample) without seizures history. There were no significant differences in gender ratios of epilepsy (data not shown). Despite some works suggesting increased risk of epilepsy in females as opposed to males in ASD patients (reviewed in Spence and Schneider, 2009), our results agree with Hara (2007) study of idiopathic autism, which reported no significant differences in epilepsy gender ratios.

Although sleep disorders and stereotyped movements prevalence can show high variation according to sample selection, the frequency of these outcomes in our patients (57.1% and 73.9%, respectively, Table 5) were similar to previous reports (Brune et al., 2006; Richler et al., 2007; Mandell, 2008; Ming et al., 2008). Aggression and self-injury were present in 38.3% and 46.7% of our patients which is not much different of that reported by Mandell (2008): 49.6% of aggression and 41.2% of self-injury. Nevertheless, other studies use to assemble aggression toward others and self-injury in a single aggression variable. In our patients, 62.3% show some kind of aggressive behavior (aggression and/or self-injury, data



not shown). This rate was larger than 32% found by Ming et al. (2008) but lower than 70.6% reported by Brune et al. (2006).

There is a broad range of sleep problems rates related in children with autism, varying from 44 to 83% (review in Richdale, 1999). The rate of 57.1% of patients with sleep disorders is slightly above the rates of 53% and 54% found by Krakowiak et al. (2008) and Mandell (2008) in ASD patients.

Considering diagnostic classes (Table 5), we have found that patients with Asperger disorder were diagnosed later (74.6 months) than autistic disorder or PDD-NOS (53.44 and 55.9 months, respectively) ( $P = 0.038$ ). The age of onset of ASD symptoms, however, didn't vary between different diagnostic class ( $P=0.176$ ). These results are in accordance to previous studies (Chakrabarti and Fombonne, 2005). Despite the similar age of onset of symptoms, individuals with Asperger disorder show less epilepsy, mood instability, stereotyped movements and sleep disorders than other ASD (Table 5). Due to this mild clinical presentation those patients are not generally referred to neurological follow-up and only are recognized as ASD when attending school due to socialization problems.

## **Final considerations**

ASDs are complex neurodevelopmental conditions associated with broad range of clinical and behavioral manifestations (Wing and Gould, 1979; Johnson et al., 2007). It is likely that much of this phenotypic heterogeneity is due to underlying etiological differences, leading to concerns that autism research is hampered by a lack of diagnostic uniformity (Links et al., 1980). For this reason, any study pursuing ASD etiology should start with a detailed clinical characterization.

Besides the research purposes, appropriate clinical evaluation can help with patients management. One example is assessment epileptiform activity in ASD patients. Despite been advised for ASD routine assessment (Schaefer and Lutz, 2006), 1/3 of our sample didn't perform an EEG evaluation. Recently, there have been reports of high rates of EEG epileptiform activity, from 60.7% to 73%, in idiopathic ASD individuals without a history of seizures or epilepsy (Chez et al., 2006; Kim et al., 2006). This observation reinforces etiological link between ASD and epilepsy as long suggested (Tuchman et al., 2009), and raises interesting hypothesis concerning pharmacological management of ASD patients. The concept of "treating the EEG" regardless seizure history is based on the hypothesis that discharges may have some causal relationship to the behavioral, language, or

cognitive disturbance. Multiple case studies have demonstrated specific improvements in ASD symptoms after therapy to suppress discharges with anti-epileptic drugs (Nass and Petruca, 1990; Plioplys, 1994; Hollander et al., 2001). The therapeutic response, however, varies across patients. At present, there are no controlled data investigating the efficacy of treating epileptiform EEG discharges in ASD, and the practice of medication use remains controversial.

It seems there are no strikingly differences in clinical presentation or rates of exposure to environmental risk factors in our sample of idiopathic ASD patients, as compared with previous studies. The mean age at first ASD diagnosis in our patients, however, were above the reports of European and North-American studies. Additionally, in an initial sample of 184 patients initially referred with diagnostic of idiopathic ASD, 5 were excluded due to wrong diagnosis. Moreover, 11 were excluded as well due to co-occurrence of genetic or neurological condition. These observations point toward a necessity for improvement of ASD evaluation procedures in Brazilian health system.

Many authors have suggested protocols for diagnosis and additional clinical evaluation of ASD patients (Herman et al., 2007; Johnson et al., 2007; Schaefer and Mendelsohn, 2008). According to recent guidelines, evaluation of the child with autism should include a detailed history, comprehensive developmental, psychological, and communication assessments, and measurement of adaptive skills to the demands of everyday life. Medical examination should rule out hearing impairment and other sensory deficits, gross and fine motor abnormalities, neurocutaneous disorders (tuberous sclerosis, neurofibromatosis, etc), and neurological conditions (cerebral palsy, etc). According to these suggested guidelines, genetic screening should rule out fragile X syndrome, cytogenetic abnormalities and, when appropriated, mutations in *MECP2* gene. These guidelines should help to better establish the underlying etiology for children suspected of ASD diagnosis. According stated in Battaglia and Carey (2006), the appropriate clinical assessment may help in predicting the prognosis and recurrence risk; organizing appropriate laboratory testing; initiating adequate treatment, when feasible; and, in many instances, may be crucial for the therapeutic alliance and provides significant and long-lasting emotional relief for the parents.

**Acknowledgments:** We are indebted to APAEs (Associação de pais e amigos dos excepcionais) and special education institutes of Rio Grande do Sul State which allow us contact with patients families. This project was funded by FIPE-HCPA, CNPq, CAPES, FAPERGS-DECIT-/PPSUS and CNPq-Instituto do Milênio.

Table 1 – Final diagnostic after reevaluation of initial set of 184 patients referred with ASD diagnostic.

Sex	Idiopathic	Excluded						Total
		no ASD <sup>a</sup>	Cyt. alt <sup>b</sup>	Frag. X <sup>c</sup>	FG <sup>d</sup>	CP <sup>e</sup>	Metab. dis. <sup>f</sup>	
M	130	3	-	3	1	2	-	139
F	38	2	1	-	1	-	3	45
Total	168	5	1	3	2	2	3	184

a – ASD diagnostic not confirmed after clinical reevaluation; b – cytogenetic alteration (47,XX + 21, 16q(dup)); c – fragile X syndrome; d – FG syndrome; e – cerebral palsy; f – patients in investigation due to suspicion of inborn errors of metabolism;

Table 2 – Demographic information of 168 patients with idiopathic ASD.

Characteristic	n° (%) or mean ( $\pm$ SD) (n = 168)
Sex	
Male	130 (77.4)
Ethnicity	
European derived	158 (93.5)
African derived	11 (6.5)
Ages (years)	10.5 (5.2)
Diagnostic class of autism spectrum disorder	
Autism	64 (38.0)
PDD-NOS <sup>a</sup>	88 (53.0)
Asperger disorder	15 (9.0)

a - pervasive developmental disorder-not otherwise specified

Table 3 – Parental ages and obstetric occurrences of 168 patients with idiopathic ASD.

Characteristics (n° of valid data)	n° (%)
Parental ages (n = 168)	
Fathers above 35 years	68 (40.5)
Fathers above 40 years	42 (25.0)
Mothers above 30 years	86 (51.2)
Mothers above 35 years	32 (19.0)
Maternal disease during pregnancy (n = 152)	14 (9.2)
Abortion history (n = 411 pregnancies)	
Spontaneous	52 (12.6)
Induced	18 (4.3)
Prenatal occurrences (n = 158)	
Bleeding/threatened abortion.	21 (13.3)
Gestational diabetes	7 (4.4)
Congenital infections	6 (3.8)
Hypertension or pre-eclampsia	21 (13.3)
Substances use	
Alcohol (n = 160)	42 (26.3)
Smoking (n = 163)	28 (17.2)
Drugs (n = 159)	
Abortive drugs	5 (3.1)
Anticonvulsivant and psychiatric drugs	5 (3.1)
Other	3 (1.9)
Pregnancy length (n = 160)	
Less than 37 weeks	28 (17.5)
37 to 41 weeks	127 (79.4)
More than 41 weeks	5 (3.1)
Weight at birth (n=165)	
≤ 2,500 g	21 (12.8)
2,501 – 4,500 g	139 (84.2)
> 4,500 g	5 (3.0)
Apgar 5' score (n = 104)	
1-7	7 (6.7)
8-10	97 (93.3)
Perinatal obstetric occurrences (n = 140)	
fetal distress, hypoxia	31 (22.2)
neonatal sepsis	3 (2.1)
hypoglycemia	3 (2.1)
Other	13 (9.3)
Neonatal occurrences (n = 148)	46 (31.1)

Table 4 - Family history rates for presence of disorders in any first degree relative.

Family history in any first degree relative (n° of valid data)	n (%)
ASD (n = 152)	5 (3.3)
Mental retardation (n = 156)	8 (5.1)
Congenital malformation (n = 155)	5 (3.2)
Epilepsy (n = 156)	7 (4.5)
Alcoholism (n = 155)	15 (9.7)
Drug addiction (n = 155)	15 (9.7)
Psychiatric disorder (n = 155)	8 (5.2)

Table 5 – Clinical and behavior outcomes of 168 patients with idiopathic ASD, according to diagnostic classes.

Characteristics	n° (%) or mean ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>			
	Autistic disorder	Asperger disorder	PDD-NOS <sup>b</sup>	Total sample
Ages (months)				
Onset ASD symptoms	16.1 (11.1)	22.7 (18.6)	17.3 (13.5)	17.6 (13.6)
First ASD diagnostic	53.4 (30.3)	<b>74.6<sup>c</sup></b> (30.8)	55.9 (28.0)	57.4 (29.6)
Specific concurrent symptoms				
epilepsy	13 (21.7)	<b>0 (0)<sup>d</sup></b>	24 (28.6)	37 (23.4)
mood instability	26 (44.1)	<b>2 (14.3)<sup>e</sup></b>	43 (51.8)	71 (45.5)
stereotyped movements	52 (86.7)	<b>6 (42.9)<sup>f</sup></b>	58 (69.9)	116 (73.9)
sleep disorders	38 (64.4)	<b>3 (21.4)<sup>g</sup></b>	48 (57.8)	89 (57.1)
aggression	23 (38.3)	3 (21.4)	33 (39.8)	59 (37.6)
self-injury	29 (48.3)	3 (21.4)	42 (50.6)	74 (47.1)
psychomotor agitation	33 (55.0)	10 (71.4)	45 (54.2)	88 (56.1)

a – percentage and means referred to valid data; b - pervasive developmental disorder-not otherwise specified; c - Kruskal-Wallis test,  $H_{df=2} = 6.55$ ,  $P = 0.038$ ; d – Fisher’s exact test 6.095,  $P = 0.043$ ; e –  $\chi^2_{df=2} = 6.88$ ,  $P = 0.032$ ; f -  $\chi^2_{df=2} = 8.57$ ,  $P = 0.014$ ; g -  $\chi^2_{df=2} = 12.75$ ,  $P = 0.002$ ;

Table 6 – Neurological and genetic complementary evaluation of 168 ASD patients.

Exams	Results - n° (%)			Total of evaluated patients
	normal	abnormal	inconclusive	
Fragile X syndrome	132 (85.2)	-	23 (14.9) <sup>a</sup>	155
karyotype	67 (100)	-	-	67
Inborn errors of metabolism	26 (100)	-	-	26
electroencephalography	65 (58.6)	46 (41.4)	-	111
computed tomography	89 (82.4)	19 (17.6)	-	108
magnetic resonance	46 (83.6)	9 (16.4)	-	55

a – These 23 female patients with inconclusive *FMRI* screening results were maintained in the study due to absence of clinical signals of fragile X syndrome.



## References

- Almeida Filho, N. Prevalence of mental disorders in childhood in an urban region of Salvador – Bahia. *J. Bras. Psiquiatr* 1982 31(4):225-36, 1982.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition, text revision. American Psychiatric Association, 2000, Washington D.C.
- Amiet C, Gourfinkel-An I, Bouzamondo A, Tordjman S, Baulac M, Lechat P, Mottron L, Cohen D. Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 2008 64(7):577-82.
- Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2005 23(2-3):189-99.
- Bailey A, Palferman S, Heavey L, Le Couteur A. Autism: the phenotype in relatives. *J Autism Dev Disord*. 1998 28(5):369-92.
- Battaglia A, Carey JC. Etiologic yield of autistic spectrum disorders: a prospective study. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006 142: 3–7.
- Brune CW, Kim SJ, Salt J, Leventhal BL, Lord C, Cook EH Jr. 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. *Am J Psychiatry* 2006 163: 2148-2156.
- Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry*. 2005 162(6):1133-1141.
- Chez MG, Chang M, Krasne V, Coughlan C, Kominsky M, Schwartz A. Frequency of epileptiform EEG abnormalities in a sequential screening of autistic patients with no known clinical epilepsy from 1996 to 2005. *Epilepsy Behav*. 2006 8(1):267-271.
- Costa CM, da Gama SG, Leal Mdo C. Congenital malformations in Rio de Janeiro, Brazil: prevalence and associated factors. *Cad Saude Publica*. 2006 22(11): 2423-2431.
- Danielsson S, Gillberg IC, Billstedt E, Gillberg C, Olsson I. Epilepsy in young adults with autism: a prospective population-based follow-up study of 120 individuals diagnosed in childhood. *Epilepsia*. 2005 46(6):918-923.
- Freitag CM. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry*. 2007 12(1):2-22.
- Fombonne E. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord*. 2003 33(4):365-382.
- Geschwind DH, Levitt P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol*. 2007 17(1):103-111.

- Glasson EJ, Bower C, Petterson B, de Klerk N, Chaney G, Hallmayer JF. Perinatal factors and the development of autism: a population study. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 61(6): 618-627.
- Goussé V, Plumet MH, Chabane N, Mouren-Siméoni MC, Ferradian N, Leboyer M. Fringe phenotypes in autism: a review of clinical, biochemical and cognitive studies. *Eur Psychiatry*. 2002 17(3):120-128.
- Hara H. Autism and epilepsy: a retrospective follow-up study. *Brain Dev*. 2007 29(8):486-490.
- Herman GE, Henninger N, Ratliff-Schaub K, Pastore M, Fitzgerald S, McBride KL. Genetic testing in autism: how much is enough? *Genet Med*. 2007 9(5): 268-274.
- Hollander E, Dolgoff-Kaspar R, Cartwright C, Rawitt R, Novotny S. An open trial of divalproex sodium in autism spectrum disorders. *J Clin Psychiatry*. 2001 62:530-534
- Hultman CM, Sparén P, Cnattingius S. Perinatal risk factors for infantile autism. *Epidemiology*. 2002 13(4):417-423.
- Johnson CP, Myers SM, American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2007 120(5):1183-1215.
- Kim HL, Donnelly JH, Tournay AE, Book TM, Filipek P. Absence of seizures despite high prevalence of epileptiform EEG abnormalities in children with autism monitored in a tertiary care center. *Epilepsia*. 2006 47(2):394-398.
- Kleinman JM, Ventola PE, Pandey J, Verbalis AD, Barton M, Hodgson S, Green J, Dumont-Mathieu T, Robins DL, Fein D. Diagnostic stability in very young children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2008 38(4):606-615.
- Klin A. Autism and Asperger syndrome: an overview. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006 28 Suppl 1:S3-11.
- Krakowiak P, Goodlin-Jones B, Hertz-Picciotto I, Croen LA, Hansen RL. Sleep problems in children with autism spectrum disorders, developmental delays, and typical development: a population-based study. *J Sleep Res*. 2008 17(2):197-206.
- Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, Schendel D, Thorsen P, Mortensen PB. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *Am J Epidemiol*. 2005 161(10):916-925.
- Lauritsen MB, Pedersen CB, Mortensen PB. The incidence and prevalence of pervasive developmental disorders: a Danish population-based study. *Psychol Med*. 2004 34(7):1339-1346.

- Li LM, Fernandes PT, Noronha AL, Marques LH, Borges MA, Cendes F, Guerreiro CA, Zanetta DM, de Boer HM, Espíndola J, Miranda CT, Prilipko L, Sander JW. Demonstration Project on Epilepsy in Brazil: situation assessment. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007 65 Suppl 1:5-13.
- Links PS, Stockwell M, Abichandani F, Simeon J. Minor physical anomalies in childhood autism. Part I. Their relationship to pre- and perinatal complications. *J Autism Dev Disord.* 1980 10: 273–285.
- Mandell DS. Psychiatric hospitalization among children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 2008 Jul;38(6):1059-1065.
- Mazefsky CA, Williams DL, Minshew NJ. Variability in adaptive behavior in autism: evidence for the importance of family history. *J Abnorm Child Psychol.* 2008 36(4):591-599.
- McDermott S, Moran R, Platt T, Wood H, Isaac T, Dasari S. Prevalence of epilepsy in adults with mental retardation and related disabilities in primary care. *Am J Ment Retard.* 2005 110(1):48-56.
- Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A.* 2005 135(2):171-180.
- Ming X, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B, Wagner GC. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J Child Neurol.* 2008 23(1):6-13.
- Nass R, Petrucha D. Acquired aphasia with convulsive disorder: a pervasive developmental disorder variant. *J Child Neurol.* 1990 5:327-328
- O’Connell CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA, Richie KL. Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet.* 2002 61: 13-20.
- Pereira AM, Vagner MB, Riesgo RS. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2008 84: 487-494.
- Plioplys AV. Autism: electroencephalogram abnormalities and clinical improvement with valproic acid. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1994 148:220-222
- Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, Rabinowitz J, Shulman C, Malaspina D, Lubin G, Knobler HY, Davidson M, Susser E. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2006 63(9):1026-1032.
- Richdale AL. Sleep problems in autism: prevalence, cause, and intervention. *Dev Med Child Neurol.* 1999 41(1):60-66.

- Richler J, Bishop SL, Kleinke JR, Lord C. Restricted and repetitive behaviors in young children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 2007 37 (1):73-85.
- Rutter M. Diagnosis and definitions of childhood autism. *J Autism Dev Disord.* 1978 8(2): 139-161.
- Schaefer GB, Lutz RE. Diagnostic yield in the clinical genetic evaluation of autism spectrum disorders. *Genet Med.* 2006 8(9):549-556.
- Schaefer GB, Mendelsohn NJ, Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders. *Genet Med.* 2008 10(4): 301-305.
- Schöpler E, Reiehler RJ, Roehen Renner BR. *The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism.* Irvington Publishers Inc, 1986, New York.
- Spence SJ, Schneider MT. The Role of Epilepsy and Epileptiform EEGs in Autism Spectrum Disorders. *Pediatr Res.* 2009 65(6):599-606.
- Tuchman R, Moshé SL, Rapin I. Convulsing toward the pathophysiology of autism. *Brain Dev.* 2009 31(2):95-103.
- Volkmar FR, State M, Klin A. Autism and autism spectrum disorders: diagnostic issues for the coming decade. *J Child Psychol Psychiatry.* 2009 50(1-2):108-115.
- Wing L, Gould J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: Epidemiology and classification. *J Autism Dev Disord.* 1979 9(1): 11-29.

## **CAPÍTULO IV – ARTIGO 2**

**Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors  
in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders**

Brain Research 1267 (2009) 9-17



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)


---



---

**BRAIN  
RESEARCH**


---



---

## Research Report

# Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders

Dânae Longo<sup>a</sup>, Lavínia Schüler-Faccini<sup>a,b</sup>, Ana Paula Carneiro Brandalize<sup>a</sup>,  
Rudimar dos Santos Riesgo<sup>c</sup>, Claiton Henrique Dotto Bau<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup>Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup>Department of Pediatrics, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 28 February 2009

Available online 10 March 2009

## Keywords:

5-HTTLPR

Serotonin transporter

Autism spectrum disorder

Environmental risk factor

Genetics

## ABSTRACT

The 5-HTTLPR polymorphism of serotonin transporter gene is widely investigated in association studies in autism spectrum disorders (ASD). The results of such studies, however, remain controversial possibly due to the great genetic heterogeneity related to ASD and the lack of evaluation of the triallelic functional structure of 5-HTTLPR. This study tested for association between the 5-HTTLPR and ASD in a Brazilian sample by case–control and family-based association test (FBAT) methods, considering the biallelic and triallelic structures of this polymorphism. In addition, we performed an exploratory analysis of associations between specific clinical outcomes of ASD patients and 5-HTTLPR as well as several prenatal environmental factors. Genotyping was achieved in 151 ASD patients, 179 unrelated controls and 105 complete trios. There was no evidence of association between the 5-HTTLPR with ASD in both case–control and FBAT tests, but the LaLa 5-HTTLPR genotype was associated with mood instability in patients ( $P=0.006$ ). The prenatal exposure to potential neuroteratogenic drugs was associated with epilepsy ( $P<0.001$ ). Our findings suggest that the 5-HTTLPR is not associated with ASD in the Brazilian population, even considering the triallelic structure. Additionally, this study suggested a role of the 5-HTTLPR and environmental factors in the clinical expression of ASD.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal: 15053, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 3308 7311.

E-mail address: [claiton.bau@ufrgs.br](mailto:claiton.bau@ufrgs.br) (C.H.D. Bau).

URL: <http://www.ppgbm.com.br/> (C.H.D. Bau).

Abbreviations: 5-HTTLPR, 5-hydroxytryptamine transporter linked polymorphic region; ASD, autism spectrum disorders; FBAT, family-based association test; PDD-NOS, pervasive development disorder-not otherwise specified; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; SLC6A4, solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4; 5-HTT, serotonin transporter; SNP, single nucleotide polymorphism; TDT, transmission disequilibrium test; SSRIs, selective serotonin reuptake inhibitors

## 1. Introduction

Autistic disorder, Asperger disorder and pervasive development disorder-not otherwise specified (PDD-NOS), collectively designated as autism spectrum disorders (ASD), are complex neurodevelopmental conditions characterized by impairments in social interaction and communication, and restricted and stereotyped patterns of interests and behaviors (American Psychiatric Association, 2000). The prevalence of narrowly defined autism is ~1/1,000 (Chakrabarti and Fombonne, 2001), and inclusion of broad spectrum autism increases this rate to ~1/300–1/500 (Fombonne, 2003; Yeargin-Allsopp et al., 2003). Males are affected more often, with a male:female ratio of 4:1. The sibling-recurrence risk of narrowly defined autism is ~6%–8% (Jones and Szatmari, 1988; Ritvo et al., 1989). Family and twin studies provided heritability estimates as high as 90% (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001; Lamb et al., 2000), pointing to an important role of genetic factors in the etiology of ASD.

Schain and Freedman (1961) reported elevated levels of platelet serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in ~20%–25% of autistic individuals. Since then, other studies have reinforced the potential role of serotonin in ASD etiology. Serotonin acts as a morphogenetic agent and differentiation factor in the developing brain (Whitaker-Azmitia, 2001). The manipulation of 5-HT levels in developing brains in animal models induces neuroanatomic changes, with behavioral manifestations similar to autism (reviewed in Whitaker-Azmitia, 2005). There are also evidences of defects in 5-HT peripheral metabolism in autistic patients (Croonenberghs et al., 2005). Finally, a rich 5-HT innervation is found in limbic areas, which are critical for emotional, social and affiliative behavior (Bachevalier, 1994), as well as in areas controlling sensory gating, behavioral inhibition, aggression, sleep and mood (Lucki, 1998), often observed to be affected in individuals with autism.

Among the candidate genetic factors for association studies in ASD, the serotonin transporter gene (SLC6A4)

(Lesch et al., 1993) is one of the most promising. The neuronal serotonin transporter (5-HTT) is the target of reuptake inhibitors used to improve part of the symptoms cited above (Cook et al., 1992; Fatemi et al., 1998; Gordon et al., 1993; Hollander et al., 2000; McDougle et al., 1996; Namerow et al., 2003). The SLC6A4 gene bears a 44 base pair insertion/deletion polymorphism in the promoter region (5-HTT gene-linked polymorphic region, 5-HTTLPR, Heils et al., 1996). This polymorphism was initially considered functionally biallelic, with a short (S) and a long (L) frequent alleles (Lesch et al., 1996). However, an A→G single-nucleotide polymorphism (SNP, rs25531) was detected within 5-HTTLPR (Nakamura et al., 2000) and shown to be functional, modifying the SLC6A4 transcriptional level (Hu et al., 2006). Since a G variation almost always occurs in the context of the long allele, 5-HTTLPR is currently considered triallelic with S (short), La (long with SNP “A”) and Lg (long with SNP “G”) alleles (Hu et al., 2006).

Three meta-analyses of association studies of the biallelic 5-HTTLPR and ASD have been published to date. Guhathakurta et al. (2006), in a group of 12 family-based studies, observed preferential transmission of the S allele to affected offspring. On the other hand, Betancur et al. (2002) and Huang and Santangelo (2008) found no association of either the short or long alleles with autistic disorder.

Among the possible explanations for these controversial results is the fact that the real functional status of the 5-HTTLPR polymorphism derives from the triallelic structure, which was not assessed in previous studies. Considering that Lg drives expression nearly equivalently to S, studies that include many Lg alleles within the SL and LL genotypes may underestimate the real effect of 5-HTTLPR.

Another point to consider is the great genetic heterogeneity related to ASD (Risch et al., 1999; Szatmari, 1999), which adds complexity to the identification of susceptibility genes (Ioannidis, 2006). The most recent genetic studies tend to evaluate subsets of patients who share certain clinical characteristics (McCauley et al., 2004; Nurmi et al., 2003; Shao et al., 2002; Sutcliffe et al., 2005). No studies to date, however, have

**Table 1 – Genotype and allele frequencies of triallelic and biallelic structures of 5-HTTLPR in a Brazilian sample.**

Triallelic 5-HTTLPR			Biallelic 5-HTTLPR		
Genotypes <sup>a</sup>	Patients N (%)	Controls N (%)	Genotypes <sup>b</sup>	Patients N (%)	Controls N (%)
SS	33 (21.8)	40 (22.3)	SS	33 (21.8)	40 (22.3)
SLa	59 (39.1)	76 (42.5)	SL	68 (45.1)	83 (46.5)
SLg	9 (6.0)	7 (4.0)			
LaLa	36 (23.8)	45 (25.1)	LL	50 (33.1)	56 (31.2)
LaLg	14 (9.3)	11 (6.1)			
Total	151 (100)	179 (100)	Total	151 (100)	179 (100)
Allelic frequency <sup>c</sup>			Allelic frequency <sup>d</sup>		
S	0.44	0.45	S	0.44	0.45
La	0.48	0.5	L	0.56	0.55
Lg	0.08	0.05			

<sup>a</sup>  $\chi^2=2.061$ ;  $df=4$ ;  $P=0.725$ .

<sup>b</sup>  $\chi^2=0.126$ ;  $df=2$ ;  $P=0.939$ .

<sup>c</sup>  $\chi^2=1.884$ ;  $df=2$ ;  $P=0.390$ .

<sup>d</sup>  $\chi^2=0.089$ ;  $df=1$ ;  $P=0.765$ .



analyzed the triallelic 5-HTTLPR data among clinical subsets of autistic patients.

Finally, besides genetic factors, epidemiological studies have also considered a role for environmental factors in ASD etiology. Harmful factors to fetal growth, such as smoking during pregnancy, intrapartum hypoxia, hypoglycemia after delivery, obstetric conditions like hypertension and preeclampsia, or history of maternal medical disorders, are particularly considered (Kolevzon et al., 2007; Wallace et al., 2008). Although many genetic and environmental risk factors associated with ASD are already identified, no study to date has investigated the role of such factors on clinical subsets of ASD individuals.

The objective of this study was to investigate the role of the 5-HTTLPR polymorphism (biallelic and triallelic presentations) in ASD etiology. In addition, we investigated a possible association between specific clinical outcomes of ASD patients and 5-HTTLPR as well as several prenatal environmental factors. None of these genetic or environmental factors have been previously studied in Brazilian patients with ASD.

## 2. Results

DNA samples were available for 151 patients with ASD, 105 complete trios (mother, father and ASD patient) and 179 control individuals. The allelic and genotypic frequencies of the 5-HTTLPR polymorphism are listed in Table 1 for biallelic (S and L alleles) and triallelic forms (S, La and Lg alleles). The genotypic frequencies in patient and control samples were distributed according to the Hardy–Weinberg equilibrium. In the case–control study, the frequencies of the biallelic and triallelic 5-HTTLPR genotypes and alleles did not differ among patients and controls (Table 1). The allelic frequencies in our control sample (0.45 for the S allele) were very similar to other control samples from the same population (Grevet et al., 2007; Segal et al., 2006). A very rare ultra-long allele was found in our sample (in only one patient). This finding has already been reported in other studies (Cho et al., 2007; Guhathakurta et al., 2006; Narita et al., 2003). However, following the strategy of Cho et al. (2007) and for the convenience of further analyses, it was included in the group of long allele variants.

Results of the transmission disequilibrium test (TDT) in the 105 complete trios are shown in Table 2. No preferential transmission of any 5-HTTLPR allele, in the biallelic or triallelic forms, was observed.

The results of association analyses between risk factors and clinical and behavior outcomes are shown in Table 3. There were no significant ASQ score differences in any risk factor tested. Considering the occurrence of specific symptoms, the use of potential neuroteratogenic substances (including misoprostol, psychiatric drugs and anticoagulants) was associated with epilepsy in ASD patients ( $P < 0.001$ ). Overall, 5-HTTLPR genotypes were not associated with the clinical and behavioral outcomes in this study. The only exception was an association between the triallelic genotypes (LaLa vs. other genotypes) and mood instability ( $P = 0.006$ ;  $OR = 2.9$ ; 95% CI: 1.3–6.4). Results for some comparisons were not maintained after correction for multiple comparisons, but might deserve attention considering their biological plausibility. Maternal chronic disease in pregnancy (including mood disorders, thrombosis and hypothyroidism) presented a trend towards association with epilepsy in ASD patients ( $P = 0.02$ ). Likewise, smoking during pregnancy was slightly related to stereotyped movements ( $P = 0.046$ ).

## 3. Discussion

The present study presents for the first time suggestive evidence that the 5-HTTLPR polymorphism (LaLa genotype) is associated with mood instability in patients with ASD. Another new and interesting finding was the association between the use of potential neuroteratogenic substances and the occurrence of epilepsy in these patients.

Despite substantial evidence for the role of variations in the serotonergic system on ASD, results of association studies of the 5-HTTLPR polymorphism have been controversial. Our results, as many others (Coutinho et al., 2004; Guhathakurta et al., 2006; Kim et al., 2002; Koishi et al., 2006; Maestrini et al., 1999; Mulder et al., 2005; Persico et al., 2000; Ramoz et al., 2006; Zhong et al., 1999), show lack of association between 5-HTTLPR and ASD. However, there are also positive findings, and the overall set of investigations has already been subject to three meta-analyses, two of them suggesting lack of association (Betancur et al., 2002; Huang and Santangelo, 2008) and one suggesting association of 5-HTTLPR with autism (Guhathakurta et al., 2006). The lack of evaluation of the triallelic structure of the 5-HTTLPR polymorphism could be a possible explanation for these controversial results, since all the association studies of ASD and this polymorphic region have considered just two alleles, S and L. As the present work

**Table 2 – Association analysis of 5-HTTLPR and ASD by family-based association test (FBAT).**

Marker	Allele	Frequency	Family	Z	P
Biallelic 5-HTTLPR	S	0.440	73	–0.632	0.527089
Biallelic 5-HTTLPR	L	0.560	73	0.632	0.527089
Triallelic 5-HTTLPR	S	0.440	73	–0.318	0.750485
Triallelic 5-HTTLPR	La	0.500	70	0.218	0.827259
Triallelic 5-HTTLPR	Lg	0.060	24	0.200	0.841481

Family: number of informative families for that allele; Z: statistic value, indicate if transmission of a specific allele deviate from expected under the null hypothesis of no linkage and no association.

**Table 3 – Clinical outcomes, ASQ score and frequency of genetic and environmental pre/postnatal risk factors in subjects with ASD.**

Risk factors	Clinical and behavioral outcomes														
	Epilepsy		Mood instability		Stereotyped movements		Aggression		Self-injury		Sleep disorders		Psychom. agitation		ASQ (mean + SD)
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Sex</b>															
M (n=131)	22	16.9 <sup>a</sup>	58	45.0 <sup>a</sup>	94	72.3 <sup>a</sup>	49	37.7 <sup>a</sup>	53	40.8 <sup>a</sup>	72	55.8 <sup>a</sup>	69	53.1 <sup>a</sup>	22.04 (5.45)
F (n=38)	11	29.7 <sup>a</sup>	19	51.4 <sup>a</sup>	27	73.0 <sup>a</sup>	16	43.2 <sup>a</sup>	16	42.1 <sup>a</sup>	22	59.5 <sup>a</sup>	23	62.2 <sup>a</sup>	21.34 (5.76)
<b>Maternal chronic disease</b>															
Yes (n=13)	6	46.2 <sup>b</sup>	7	53.8	9	69.2	8	61.5	7	53.8	10	76.9	8	61.5	24.14 (5.02)
No (n=139)	26	18.7	63	45.3	99	71.2	52	37.4	57	41.0	82	59.0	78	56.1	21.93 (5.42)
<b>Maternal teratogen exposure</b>															
Yes (n=12)	8	66.7 <sup>c</sup>	5	41.7	9	75.0	7	58.3	5	41.7	9	75.0	7	58.3	21.09 (6.82)
No (n=144)	23	16.0	67	46.9 <sup>a</sup>	104	72.2	53	36.8	60	41.6	83	58.0 <sup>a</sup>	78	54.2	22.16 (5.31)
<b>Maternal smoking</b>															
Yes (n=26)	8	30.8	13	50.0	23	88.5 <sup>d</sup>	12	46.2	14	53.8	13	50.0	13	50.0	22.39 (4.41)
No (n=134)	24	17.9	60	45.1 <sup>a</sup>	93	69.4	50	37.3	53	39.5	77	57.9 <sup>a</sup>	75	56.0	21.95 (5.60)
<b>Maternal alcohol use</b>															
Yes (n=40)	12	30.0	16	40.0	29	72.5	13	32.5	17	42.5	20	50.0	23	57.5	21.61 (4.79)
No (n=117)	20	17.1	57	49.1 <sup>a</sup>	85	72.6	48	41.0	49	41.9	70	60.3 <sup>a</sup>	63	53.8	22.27 (5.63)
<b>Obstetric occurrences</b>															
Yes (n=50)	13	26.0	24	48.0	39	78.0	22	44.0	26	52.0	29	58.0	28	56.0	23.16 (5.03)
No (n=87)	15	17.2	39	44.8	59	67.8	29	33.3	33	37.9	50	57.5	54	62.1	21.78 (5.24)
<b>5-HTT genotypes<sup>f</sup></b>															
Low (n=42)	8	19.0	15	35.7	29	69.0	16	38.1	15	35.7	25	59.5	22	52.4	21.05 (6.59)
Medium (n=72)	16	22.2	28	38.9	55	76.4	23	31.9	34	47.2	41	56.9	37	51.4	22.00 (5.51)
High (n=36)	7	19.4	23	63.9 <sup>e</sup>	26	72.2	17	47.2	12	33.3	18	50.0	22	61.1	22.32 (5.26)

<sup>a</sup> Percentage referring to the available data for each variable (these cells have some missing information).

<sup>b</sup> P=0.02.

<sup>c</sup> P<0.001.

<sup>d</sup> P=0.046.

<sup>e</sup> P=0.006 (low+medium×high).

<sup>f</sup> Genotypes are classified based on the assumed gene expression (Hu et al., 2006): low = SS, SLg; medium = SLa, LaLg; high = LaLa.

is the first association study between 5-HTTLPR and ASD which take into account the triallelic polymorphism, other investigations are necessary to confirm or refute our findings.

Similar to our results, other studies could not find an association of 5-HTTLPR with ASD, but with clinical subsets of ASD patients. Coutinho et al. (2004), for instance, did not find an association of 5-HTTLPR with autism, but with hyperserotonemia in their patients. Likewise, Tordjman et al. (2001) observed that the 5-HTT promoter alleles do not influence the severity of autistic impairment, but modify some behavior domains, particularly social and communication skills. This observation is consistent with our findings, where 5-HTTLPR did not influence ASD itself but was associated with excessive and disabling variations in mood. The L allele and, particularly, the LaLa genotype, were associated with higher 5-HTT expression (Hu et al., 2006), which could lead to increased serotonin reuptake in neurons and depletion of the 5-HT in the synaptic cleft (Cook and Leventhal, 1996; Klauck et al., 1997). Several investigations of 5-HTTLPR in disorders such as Alzheimer, schizophrenia, fragile X syndrome, ADHD and autism found associations between the L allele or LL genotype and phenotypic subgroups defined by behaviors influenced by serotonergic activity, such as aggression, psychomotor agitation, stereotypy, irritability and emotional instability (Brune et al., 2006; Han et al., 2004; Hessel et al., 2008; Retz et al., 2002; Sukonick et al., 2001; Sweet et al., 2001).

There is evidence that environmental risk factors play a role in the clinical heterogeneity of ASD. We observed a higher frequency of epilepsy in individuals whose mothers were treated with potential neuroteratogens during pregnancy (misoprostol, warfarin, psychiatric drugs). This is an interesting result, considering the potential disruptive effect of these medications on the developing brain. Neurological sequelae secondary to intrauterine warfarin and misoprostol exposure may be due to a direct teratogenic effect or from secondary causes such as fetal vascular disruption damage (Raghav and Reutens, 2007; Vargas et al., 2000), while psychiatric drugs theoretically can interfere with the action of neuromorphogens, like serotonin itself. The use of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) during pregnancy, for example, has been shown to be associated with an increased risk of seizure development in infants (De las Cuevas and Sanz, 2006; Wen et al., 2006). Therefore, we can infer the existence of a neurological liability in ASD brain, in which epilepsy could be triggered by fetal exposure to adverse factors during pregnancy. Maternal chronic diseases could also represent a potential risk factor for epilepsy, but possibly with a smaller effect than neuroteratogenic drugs.

Although non-significant, we observed a trend toward association of smoking during pregnancy with a higher frequency of repetitive movements. Since carbon monoxide from tobacco smoke has the property of inhibiting the release of oxygen into fetal tissues (Benowitz et al., 1990; Luck et al., 1985), our finding might reflect an indirect effect of fetal hypoxia on stereotypy. This hypothesis is consistent with the Laviola et al. (2004) study on the exposure to chronic hypoxia during pregnancy in an animal model. The authors reported in the offspring increased stereotypy, decreased social contact and maladaptation to novel situations, all of them part of the ASD diagnostic criteria (American Psychiatric Association,

2000). Since epidemiological studies have indicated daily smoking and fetal hypoxia as risk factors for autism (review in Kolevzon et al., 2007), it is reasonable to expect that smoking could be a risk factor for some behavior domains in ASD as well.

Any investigation on genetic and environmental factors in a group of complex disorders such as ASD has several limitations. First of all, a larger sample size would bring significant improvement to this study which is relatively underpowered for small effect sizes, with odds-ratios lower than 2. However, the fact that the sample size is too small to draw definite conclusions is balanced by the novel description on genetic (especially the triallelic approach) and environmental risk factors in a different country. We did not use some instruments frequently applied to ASD in other countries, such as the ADI-R (Lord et al., 1994) and ADOS (Lord et al., 1989). Unfortunately, these instruments have not been validated in Portuguese up to now. Our group is involved in the validation process of ADI-R, and we hope that the availability of this method will stimulate new studies of ASD in Brazil. The simultaneous application of neuroimaging techniques could certainly help to identify potential pathways for analyzing the relationships between risk factors and clinical outcomes. Unfortunately, these techniques are still very expensive for application in a reasonable number of patients. Population stratification could be a limitation in the case-control branch of the present study. However, this analysis provided similar results to the present FBAT analysis, which is not vulnerable to this confounding factor.

In conclusion, the 5-HTTLPR polymorphism does not seem to be a risk factor for ASD per se, but may influence the phenotypic expression in ASD patients. Additionally, we observed a group of environmental factors modifying the behavioral phenotype in ASD. To confirm and further clarify these findings, future ASD studies with larger sample sizes should focus not only in the core disorder, but also in the possible role of genetic and environmental agents on the heterogeneity of ASD.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Subjects

Patients and their biological parents were recruited at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) or other medical and educational institutions of the State of Rio Grande do Sul, following clinical and diagnostic evaluation by experienced professionals from PROTID (Programa para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento), a multidisciplinary program directed to research and treatment of Pervasive Developmental Disorders. Patients were diagnosed using DSM-IV-TR criteria (American Psychiatric Association, 2000), and/or the Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Schopler et al., 1986) in its Brazilian version (Pereira et al., 2008). The selected patients fulfilled diagnostic criteria for autistic disorder, Asperger disorder or PDD-NOS. Exclusion criteria were age lower than three years and diagnoses of neurofibromatosis, tuberous sclerosis, fragile X syndrome, Rett syndrome, chromosomal abnormalities or other genetic condition, cerebral palsy or other encephalopathy possibly associated with ASD, fetal

rubella, toxoplasmosis and other prenatal infections associated with neurological damage. The aim of these criteria was to obtain a sample of idiopathic cases of ASD.

All patients were screened for FMR1 (fragile X mental retardation 1) gene expansions by a polymerase chain reaction (PCR) protocol (O'Connell et al., 2002). Since the screening result was inconclusive in 23 female patients, they were submitted to a careful evaluation to confirm absence of clinical signals of fragile X syndrome. In total, 3 male patients were excluded due to fragile X syndrome. Cytogenetic studies were available for 40% of children. For individuals with no cytogenetic assessment, we performed a very careful clinical evaluation and excluded from the study all children with dysmorphic features. There is evidence that it is unlikely that the non-dysmorphic patients have cytogenetic alterations (Miles et al., 2005).

Each patient was assessed through an evaluation questionnaire administered by trained interviewers. The questionnaires were administered in a clinic setting. Information was collected from mothers, fathers or both parents. The questionnaire included questions on demographic data, familiar history of diseases, mother's prior obstetric history with respect to child, perinatal and neonatal periods, as well as child behavior characteristics. A total of 169 idiopathic ASD patients were clinically evaluated, 131 males (77.5%) and 38 females, with a mean age of 10.5 years ( $\pm 5.2$  years). Sixty-five patients (38.4%) had autistic disorder, 89 (52.7%) had PDD-NOS, and 15 (8.9%) had Asperger disorder. The mean age of onset of symptoms was 17.5 months ( $\pm 13.6$  months) and the average ASQ score was 21.88 ( $\pm 5.5$ ).

Control subjects consisted of 179 unrelated children, 102 males (57%) and 77 females, recruited at an outpatient clinic for orofacial clefts (115 non-syndromic individuals, with isolated cleft lip and/or palate) or during routine exams at HCPA (64 individuals). We compared the allele and genotype frequencies of the 5-HTTLPR in both groups and verified that there are no significant differences. For these reasons, all individuals were included together in the control group. These children have undergone a clinical examination in order to exclude genetic and/or developmental disorders, but no specific assessment for ASD diagnosis was done. The control sample was thus designed to be non-screened for ASD, representative of the gene frequencies in Porto Alegre. The expected frequency of ASD in this group is the same as in the general population. Cases and controls were predominantly European derived (92% and 93%, respectively). Considering this frequency similarity, the fact that there were no genotype differences in relation to ethnicity in cases or controls, and that these frequencies were similar to other samples studied in Porto Alegre (Grevet et al., 2007; Marques et al., 2006; Segal et al., 2006) we disregarded ethnicity as a possible confounder and included the entire sample in the analyses.

The study was approved by the Ethics Committee of HCPA, and all participants or legal representatives signed an informed consent form.

#### 4.2. Clinical and behavioral outcomes

The score obtained in the Brazilian version of Autism Screening Questionnaire (ASQ) (Berument et al., 1999) was

used as a severity measure of autistic behavioral symptoms. The presence of specific symptoms was assessed by clinical examination performed by neurologists, under de supervision of RSR. Clinical outcomes included concurrent clinical disorders that are frequently observed in ASD individuals (Ming et al., 2008), which disrupt family and educational activities and usually require pharmacological treatment. The clinical outcomes evaluated included: (a) epilepsy, defined as at least two unprovoked seizures; (b) mood instability, defined as excessive and disabling variations in mood; (c) stereotyped movements defined as repetitive and purposeless movements; (d) aggression, including unprovoked and recurrent aggressive behavior such as kicking, biting, pinching, hitting, or head-banging toward others; (e) self-injury, defined as unexplained and recurrent aggressive behavior toward self; (f) sleep disorders, including any of the following disorders: sleep psychomotor agitation, night terror, chronic daily night awakening for an estimated duration of 10 or more minutes, sleep maintenance disorder (total nightly sleep time of less than 6 h) and (g) psychomotor agitation, defined as excessive motor activity disconnected from the situation. To be considered affected by a clinical outcome cited above, except for epilepsy, the patient should exhibit it daily, with behavior persisting for an estimated period of 6 months or more.

#### 4.3. Environmental pre/perinatal risk factors evaluation

The maternal medical history during pregnancy was recovered by interview with parents and review of medical records. Pre and postnatal events that have been associated with ASD in epidemiological studies were considered as environmental risk factors for fetal development (Kolevzon et al., 2007; Wallace et al., 2008). They were: (a) maternal history of medical conditions during pregnancy, including hypothyroidism, mood disorders and thrombosis; (b) maternal smoking; (c) alcohol use; (d) maternal exposure to neuroteratogenic drugs including misoprostol, psychiatric drugs including SSRIs e anticoagulant drugs, like warfarin; (e) obstetric occurrences including fetal distress, hypoxia, hypoglycemia, cardiorespiratory arrest, and neonatal sepsis.

#### 4.4. Genotyping

Blood samples from patients, their parents, and control individuals were used for DNA extraction by salting out (Lahiri and Numberger, 1991). The polymorphic region 5-HTTLPR was amplified using the primers and PCR protocol described in Kaiser et al. (2001) but with  $MgCl_2$  concentration adjusted according to Yonan et al. (2006) in order to improve genotyping accuracy. PCR products were analyzed on 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide, resulting in a 484-bp PCR product for the S allele, a 528-bp PCR product for the L allele and 613-bp for a very rare ultra-long allele. PCR products were submitted to enzymatic cleavage for discrimination of La and Lg alleles, according to Stein et al. (2006). In this protocol, the A→G substitution inside the L allele (i.e., La→Lg) creates an additional MspI site besides two other constant MspI sites. After restriction digestion, the digest mixture was size-fractionated on 2.5% agarose gel stained

with ethidium bromide. Band sizes were: 165, 174, 62, and 128 bp for the Lg allele; 339, 62, and 128 bp for the La allele; and 295, 62, and 128 bp for the S allele.

#### 4.5. Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by direct counting. The genotype and allele frequencies among ASD patients and controls, as well as other categorical variables, were compared with the chi-square test. The only continuous variable (ASQ scores) was analyzed by ANOVA.

The transmission disequilibrium test (TDT) (Spielman and Ewens, 1996) was performed using the FBAT program, version 2.0.2C (Laird et al., 2000) under additive genetic model. The test determined how often a specific allele was transmitted by normal parents to ASD patients. Positive Z statistic of single locus FBAT indicated that a specific locus was more frequently transmitted to patients with ASD in informative families than expected under the null hypothesis of no linkage and no association.

The Bonferroni procedure, used for correction for multiple comparisons, considered a conceptual analysis of the literature as well as the pattern of correlations between the variables included in the study, since independence between variables is an assumption for such corrections. The two “predictor” risk factors were the gene and a group of moderately correlated environmental risk factors. The variance in the “outcome” variables could be ascribed to three main factors: (a) a group of variables including the general ASQ measure, mood instability, sleep disturbances, self-injury, aggression and psychomotor agitation; (b) epilepsy; and (c) stereotyped movements. Therefore, the number of independent comparisons to correct for was 6 and the P value set at 0.008.

#### Acknowledgments

We are indebted to Sandra Leistner Segal for helping at genotyping standards; to Marcos T. Mercadante for the cession of ASQ Brazilian Version; to Julia Genro for assistance in statistical analysis and to Bibiane Armiliato de Godoy for kind help with laboratory procedures. This project was funded by FIFE-HCPA, CNPq, CAPES, FAPERGS-DECIT-/PPSUS and CNPq-Institutos do Milênio.

#### REFERENCES

- American Psychiatric Association, 2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, text revision. American Psychiatric Association, Washington D.C.
- Bachevalier, J., 1994. Medial temporal lobe structures and autism. A review of clinical and experimental findings. *Neuropsychologia* 32, 627–648.
- Benowitz, N.L., Porchet, H., Jacob, P., 1990. Pharmacokinetics, metabolism and pharmacodynamics of nicotine. In *Nicotine Psychopharmacology*, ed. Oxford Press, New York, pp. 112–157.
- Berument, S.K., Rutter, M., Lord, C., Pickles, A., Bailey, A., 1999. Autism screening questionnaire: diagnostic validity. *Br. J. Psychiatry* 175, 444–451.
- Betancur, C., Corbex, M., Spieleswoy, C., Philippe, A., Laplanche, J.L., Launay, J.M., Gillberg, C., Mouren-Simeoni, M.C., Hamon, M., Giros, B., Nosten-Bertrand, M., Leboyer, M., 2002. Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. *Mol. Psychiatry* 7, 67–71.
- Brune, C.W., Kim, S.J., Salt, J., Leventhal, B.L., Lord, C., Cook Jr., E.H., 2006. 5-HTTLPR genotype-specific phenotype in children and adolescents with autism. *Am. J. Psychiatry* 163, 2148–2156.
- Chakrabarti, S., Fombonne, E., 2001. Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA* 285, 3093–3099.
- Cho, I.H., Yoo, H.J., Park, M., Lee, Y.S., Kim, S.A., 2007. Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT2A receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios. *Brain Res.* 1139, 34–41.
- Cook, E.H., Leventhal, B., 1996. The serotonin system in autism. *Curr. Opin. Pediatr.* 8, 348–354.
- Cook, E.H., Rowlett, R., Jaselskis, C., Leventhal, B.L., 1992. Fluoxetine treatment of children and adults with autistic disorder and mental retardation. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* 31, 739–745.
- Coutinho, A.M., Oliveira, G., Morgadinho, T., Fesel, C., Macedo, T.R., Bento, C., Marques, C., Ataíde, A., Miguel, T., Borges, L., Vicente, A.M., 2004. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. *Mol. Psychiatry* 9, 264–271.
- Croonenberghs, J., Verkerk, R., Scharpe, S., Deboutte, D., Maes, M., 2005. Serotonergic disturbances in autistic disorder: L-5-hydroxytryptophan administration to autistic youngsters increases the blood concentrations of serotonin in patients but not in controls. *Life Sci.* 76, 2171–2183.
- De las Cuevas, C., Sanz, E.J., 2006. Safety of selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy. *Curr. Drug. Saf.* 1, 17–24.
- Fatemi, S.H., Realmuto, G.M., Khan, L., Thuras, P., 1998. Fluoxetine in treatment of adolescent patients with autism: a longitudinal open trial. *J. Autism Dev. Disord.* 28, 303–307.
- Folstein, S.E., Rosen-Sheidley, B., 2001. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat. Rev. Genet.* 2, 943–955.
- Fombonne, E., 2003. The prevalence of autism. *JAMA* 289, 87–89.
- Gordon, C.T., State, R.C., Nelson, J.E., Hamburger, S.D., Rapoport, J.L., 1993. A double-blind comparison of clomipramine, desipramine, and placebo in the treatment of autistic disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 50, 441–447.
- Grevet, E.H., Marques, F.Z.C., Salgado, C.A.I., Fischer, A.G., Kalil, K.L., Victor, M.M., Garcia, C.R., Sousa, N.O., Belmonte-de-Abreu, P., Bau, C.H.D., 2007. Serotonin transporter gene polymorphism and the phenotypic heterogeneity of adult ADHD. *J. Neural Transm.* 114, 1631–1636.
- Guhathakurta, S., Ghosh, S., Sinha, S., Chatterjee, A., Ahmed, S., Chowdhury, S.R., Gangopadhyay, P.K., Ghosh, S., Singh, M., Usha, R., 2006. Serotonin transporter promoter variants: analysis in Indian autistic and control population. *Brain Res.* 1092, 28–35.
- Han, D.H., Park, D.B., Na, C., Kee, B.S., Lee, Y.S., 2004. Association of aggressive behavior in Korean male schizophrenic patients with polymorphisms in the serotonin transporter promoter and catecholamine-O-methyltransferase genes. *Psychiatry Res.* 129, 29–37.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stober, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K.P., 1996. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J. Neurochem.* 66, 2621–2624.
- Hessl, D., Tassone, F., Cordeiro, L., Koldewyn, K., McCormick, C., Green, C., Wegelin, J., Yuhas, J., Hagerman, R.J., 2008. Brief report: aggression and stereotypic behavior in males with fragile X syndrome — moderating secondary genes in a “single gene” disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 38, 184–189.
- Hollander, E., Kaplan, A., Cartwright, C., Reichman, D., 2000. Venlafaxine in children, adolescents, and young adults with

- autism spectrum disorders: an open retrospective clinical report. *J. Child Neurol.* 15, 132–135.
- Hu, X., Lipsky, R.H., Zhu, G., Akhtar, L.A., Taubman, J., Greenberg, B.D., Xu, K., Arnold, P.D., Richter, M.A., Kennedy, J.L., Murphy, D.L., Goldman, D., 2006. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 815–826.
- Huang, C.H., Santangelo, S.L., 2008. Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. Part B* 147B, 903–913.
- Ioannidis, J.P., 2006. Common genetic variants for breast cancer: 32 largely refuted candidates and larger prospects. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1350–1353.
- Jones, M.B., Szatmari, P., 1988. Stoppage rules and genetic studies of autism. *J. Autism Dev. Disord.* 18, 31–40.
- Kaiser, R., Tremblay, P.B., Schmider, J., Henneken, M., Dettling, M., Müller-Oerlinghausen, B., Uebelhack, R., Roots, I., Brockmöller, J., 2001. Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparanoid and residual subtypes of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 6, 179–185.
- Kim, S.J., Cox, N., Courchesne, R., Lord, C., Corsello, C., Akshoomoff, N., Guter, S., Leventhal, B.L., Courchesne, E., Cook, E.H., 2002. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Mol. Psychiatry* 7, 278–288.
- Klauck, S.M., Poustka, F., Benner, A., Lesch, K., Poustka, A., 1997. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum. Mol. Genet.* 6, 2233–2238.
- Koishi, S., Yamamoto, K., Matsumoto, H., Koishi, S., Enseki, Y., Oya, A., Asakura, A., Aoki, Y., Atsumi, M., Iga, T., Inomata, J., Inoko, H., Sasaki, T., Nanba, E., Kato, N., Ishii, T., Yamazaki, K., 2006. Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev.* 2, 257–260.
- Kolevzon, A., Gross, R., Reichenberg, A., 2007. Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161, 326–333.
- Lahiri, D.K., Nurnberger Jr., J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444.
- Lamb, J.A., Moore, J., Bailey, A., Monaco, A.P., 2000. Autism: recent molecular genetics advances. *Hum. Mol. Genet.* 9, 861–868.
- Laird, N., Horvath, S., Xu, X., 2000. Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet. Epidemiol.* 19 (Suppl. 1), S36–S42.
- Laviola, G., Adriani, W., Rea, M., Aloe, L., Alleva, E., 2004. Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology* 175, 196–205.
- Lesch, K.P., Wolozin, B.L., Murphy, D.L., Riederer, P., 1993. Primary structure of the human platelet serotonin (5-HT) uptake site: identity with the brain 5-HT transporter. *J. Neurochem.* 60, 2319–2322.
- Lesch, K.P., Bebgel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L., 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274, 1527–1531.
- Lord, C., Rutter, M., Le Couteur, A., 1994. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 24, 659–685.
- Lord, C., Rutter, M., Goode, S., Heemsbergen, J., Jordan, H., Mawhood, L., Schopler, E., 1989. Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J. Autism Dev. Disord.* 19, 185–212.
- Luck, W., Nau, H., Hansen, R., Stelding, R., 1985. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. *Dev. Pharmacol. Ther.* 8, 384–395.
- Lucki, I., 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry* 44, 151–162.
- Marques, F.Z., Hutz, M.H., Bau, C.H., 2006. Influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcohol-dependent individuals. *Psychiatr. Genet.* 16, 125–131.
- Maestrini, E., Lai, C., Marlow, A., Matthews, N., Wallace, S., Bailey, A., Cook, E.H., Weeks, D.E., Monaco, A.P., 1999. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. Serotonin transporter (5-HTT) and d-aminobutyric acid receptor subunit b3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. *Am. J. Med. Genet., Part B Neuropsychiatr. Genet.* 88, 492–496.
- McCauley, J.L., Olson, L.M., Dowd, M., Amin, T., Steele, A., Blakely, R.D., Folstein, S.E., Haines, J.L., Sutcliffe, J.S., 2004. Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. *Am. J. Med. Genet., Part B Neuropsychiatr. Genet.* 127, 104–112.
- McDougle, C.J., Naylor, S.T., Cohen, D.J., Volkmar, F.R., Heninger, G.R., Price, L.H., 1996. A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 53, 1001–1008.
- Ming, X., Brimacombe, M., Chaaban, J., Zimmerman-Bier, B., Wagner, G.C., 2008. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J. Child Neurol.* 23, 6–13.
- Mulder, E.J., Anderson, G.M., Kema, I.P., Brugman, A.M., Ketelaars, C.E., de Bildt, A., van Lang, N.D., den Boer, J.A., Minderaa, R.B., 2005. Serotonin transporter intron 2 polymorphism associated with rigid-compulsive behaviors in Dutch individuals with pervasive developmental disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 133, 93–96.
- Nakamura, M., Ueno, S., Sano, A., Tanabe, H., 2000. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol. Psychiatry* 5, 32–38.
- Narita, M., Nishigami, N., Narita, N., Yamaguti, K., Okado, N., Watanabe, Y., Kuratsune, H., 2003. Association between serotonin transporter gene polymorphism and chronic fatigue syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 264–266.
- Namerow, L.B., Thomas, P., Bostic, J.Q., Prince, J., Monuteaux, M.C., 2003. Use of citalopram in pervasive developmental disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 24, 104–108.
- Nurmi, E.L., Dowd, M., Tadevosyan-Leyfer, O., Haines, J.L., Folstein, S.E., Sutcliffe, J.S., 2003. Exploratory subsetting of autism families based on savant skills improves evidence of genetic linkage to 15q11–q13. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* 42, 856–863.
- O’Connell, C.D., Atha, D.H., Jakupciak, J.P., Amos, J.A., Richie, K.L., 2002. Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin. Genet.* 61, 13–20.
- Pereira, A.M., Vagner, M.B., Riesgo, R.S., 2008. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J. Pediatr. (Rio J)* 84, 487–494.
- Persico, A.M., Militerni, R., Bravaccio, C., Schneider, C., Melmed, R., Conciatori, M., Damiani, V., Baldi, A., Keller, F., 2000. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. *Am. J. Med. Genet.* 96, 123–127.
- Raghav, S., Reutens, D., 2007. Neurological sequelae of intrauterine warfarin exposure. *J. Clin. Neurosci.* 14, 10–99.
- Ramoz, N., Reichert, J.G., Corwin, T.E., Smith, C.J., Silverman, J.M., Hollander, E., Buxbaum, J.D., 2006. Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. *Biol. Psychiatry* 60, 186–191.
- Retz, W., Thome, J., Blocher, D., Baader, M., Rosler, M., 2002. Association of attention deficit hyperactivity disorder-related psychopathology and personality traits with the serotonin

- transporter promoter region polymorphism. *Neurosci. Lett.* 319, 133–136.
- Risch, N., Spiker, D., Lotspeich, L., Nouri, N., Hinds, D., Hallmayer, J., Kalaydjieva, L., McCague, P., Dimiceli, S., Pitts, T., Nguyen, L., Yang, J., Harper, C., Thorpe, D., Vermeer, S., Young, H., Hebert, J., Lin, A., Ferguson, J., Chiotti, C., Wiese-Slater, S., Rogers, T., Salmon, B., Nicholas, P., Petersen, P.B., Pingree, C., McMahon, W., Wong, D.L., Cavalli-Sforza, L.L., Kraemer, H.C., Myers, R.M., 1999. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 493–507.
- Ritvo, E.R., Freeman, B.J., Pingree, C., Mason-Brothers, A., Jorde, L., Jenson, W.R., McMahon, W.M., Petersen, P.B., Mo, A., Ritvo, A., 1989. The UCLA–University of Utah epidemiologic survey of autism: prevalence. *Am. J. Psychiatry* 146, 194–199.
- Shao, Y., Raiford, K.L., Wolpert, C.M., Cope, H.A., Ravan, S.A., Ashley-Koch, A.A., Abramson, R.K., Wright, H.H., DeLong, R.G., Gilbert, J.R., Cuccaro, M.L., Pericak-Vance, M.A., 2002. Phenotypic homogeneity provides increased support for linkage on chromosome 2 in autistic disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1058–1061.
- Schain, R.J., Freedman, D.X., 1961. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J. Pediatr.* 58, 315–320.
- Schopler, E., Reiehler, R.J., Rothen Renner, B.R., 1986. *The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism*. Irvington Publishers Inc, New York.
- Segal, J., Pujol, C., Birck, A., Gus Manfro, G., Leistner-Segal, S., 2006. Association between suicide attempts in south Brazilian depressed patients with the serotonin transporter polymorphism. *Psychiatry Res.* 143, 289–291.
- Spielman, R.S., Ewens, W.J., 1996. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 983–989.
- Stein, M.B., Seedat, S., Gelernter, J., 2006. Serotonin transporter gene promoter polymorphism predicts SSRI response in generalized social anxiety disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 187, 68–72.
- Sukonick, D.L., Pollock, B.G., Sweet, R.A., Mulsant, B.H., Rosen, J., Klunk, W.E., Kastango, K.B., DeKosky, S.T., Ferrell, R.E., 2001. The 5-HTTPR<sup>S</sup>/<sup>L</sup> polymorphism and aggressive behavior in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 58, 1425–1428.
- Sutcliffe, J.S., Delahanty, R.J., Prasa, H.C., McCauley, J.L., Han, Q., Jiang, L., Li, C., Folstein, S.E., Blakely, R.D., 2005. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 265–279.
- Sweet, R.A., Pollock, B.G., Sukonick, D.L., Mulsant, B.H., Rosen, J., Klunk, W.E., Kastango, K.B., Dekosky, S.T., Ferrell, R.E., 2001. The 5-HTTPR polymorphism confers liability to a combined phenotype of psychotic and aggressive behavior in Alzheimer disease. *Int. Psychogeriatr.* 13, 401–409.
- Szatmari, P., 1999. Heterogeneity and the genetics of autistic disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 24, 159–165.
- Tordjman, S., Gutknecht, L., Carlier, M., Spitz, E., Antoine, C., Slama, F., Carsalade, V., Cohen, D.J., Ferrari, P., Roubertoux, P.L., Aderson, G.M., 2001. Role of the serotonin transporter in the behavioral expression of autism. *Mol. Psychiatry* 6, 434–439.
- Vargas, F.R., Schuler-Faccini, L., Brunoni, D., Kim, C., Meloni, V.F., Sugayama, S.M., Albano, L., Llerena Jr., J.C., Almeida, J.C., Duarte, A., Cavalcanti, D.P., Goloni-Bertollo, E., Conte, A., Koren, G., Addis, A., 2000. Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *Am. J. Med. Genet.* 95, 302–306.
- Wallace, A.E., Anderson, G.M., Dubrow, R., 2008. Obstetric and parental psychiatric variables as potential predictors of autism severity. *J. Autism Dev. Disord.* 38, 1542–1554.
- Wen, S.W., Yang, Q., Garner, P., Fraser, W., Olatunbosun, O., Nimrod, C., Walker, M., 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 961–966.
- Whitaker-Azmitia, P.M., 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.* 56, 479–485.
- Whitaker-Azmitia, P.M., 2005. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 75–83.
- Yeargin-Allsopp, M., Rice, C., Karapurkar, T., Doernberg, N., Boyle, C., Murphy, C., 2003. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA* 289, 49–55.
- Yonan, A.L., Palmer, A.A., Gilliam, T.C., 2006. Hardy–Weinberg disequilibrium identified genotyping error of the serotonin transporter (SLC6A4) promoter polymorphism. *Psychiatr. Genet.* 16, 31–34.
- Zhong, N., Ye, L., Ju, W., Brown, W.T., Tsiouris, J., Cohen, I., 1999. 5-HTTLPR variants not associated with autistic spectrum disorders. *Neurogenetics* 2, 129–131.





## **CAPÍTULO V – ARTIGO 3**

### **Interaction between 5-HTTLPR and prenatal smoking exposure: the effect on aggression in autism spectrum disorders**

Manuscrito submetido à revista Neuroscience Letters



**Interaction between 5-HTTLPR and prenatal smoking exposure: the effect on aggression in autism spectrum disorders**

Authors: Dânae Longo <sup>1</sup>, Lavínia Schuler-Faccini <sup>1</sup>, Rudimar dos Santos Riesgo <sup>2</sup>, Claiton Henrique Dotto Bau <sup>1</sup>

1 - Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

2 - Department of Pediatrics, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

number of text pages: 17

number of tables: 1

Corresponding author:

Dr. Claiton Henrique Dotto Bau,

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS,

Caixa Postal: 15053, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Email: claiton.bau@ufrgs.br

URL adress: <http://www.ppgbm.com.br/>

Telephone: 55 51 3308-6718; Fax: 55 51 3308-7311

## **Abstract**

Autism spectrum disorders (ASD) are complex neurodevelopmental conditions with wide variability of clinical manifestations influenced by multiple genetic and environmental risk factors. The self-injury behavior and aggression towards other people are part of this phenotypic variability, and have long been associated with serotonergic dysfunctions. There is substantial evidence for a role of the serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and prenatal smoking exposure in functional and structural changes in the serotonergic system. Moreover, both 5-HTTLPR and prenatal smoking exposure have previously been directly associated with aggressive behavior, both in general population and in neuropsychiatric disorders, including ASD. However, despite the biological plausibility of an interaction between these factors, this hypothesis has never been tested. The objective of this study was to examine the possible interaction between the functionally triallelic 5-HTTLPR and prenatal smoking exposure and its influence on aggressive behaviors in 146 Brazilian ASD patients. We observed significant interaction between the 5-HTTLPR genotype and smoking exposure on aggression ( $P=0.02$ ) and self-injury ( $P=0.02$ ). Patients with the LaLa genotype that were exposed to prenatal smoking had an increased risk of presenting these outcomes. The potential relevance and biological plausibility of this interaction stimulates further investigation.

**Keywords:** developmental disorders; environmental exposure; serotonin transporter; SLC6A4; cigarette; pregnancy.

## Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) are complex neurodevelopmental conditions characterized by pervasive delay in several developmental areas, mainly communication and social interaction with caregivers and/or peers, along with ritualistic and compulsive behavior, whose onset is observed before the age of 30 months [1, 31]. ASD include three conditions, namely autistic disorder, Asperger disorder and pervasive development disorder not otherwise specified (PDD-NOS). The diagnostic judgment is based on behavior characteristics and the symptoms are grouped as three main domains: reciprocal social interaction, communication, and repetitive and stereotyped behaviors [1]. The severity of each of the core deficits, however, varies significantly among children with ASD [16,40]. The extremely heterogeneous phenotypes and wide spectrum of medical co-morbidities displayed by ASD patients in clinical practice often hamper diagnosis and management [18]. The clinical heterogeneity seen in ASD may reflect the interplay of multiple genetic and environmental risk factors [10,42].

Considering the putative genetic risk factors for ASD, several studies were focused on 5-HTTLPR (serotonin transporter gene-linked polymorphic region) [11], located in the promoter of the serotonin transporter gene (*SLC6A4*). The results, however, have been controversial, with both positive [8] and negative findings [4,14]. A possible explanation for these conflicting results is the lack of assessment of patients' prenatal environmental risk factors. Interactions between 5-HTTLPR and environmental factors have frequently been described in association studies with behavior and emotional outcomes, especially depression [6,41] and anxiety [20,37].

Brune et al. [5] reported an association between the LL genotype of 5-HTTLPR and aggression in autistic patients. The association between the LL genotype and aggressive behavior has been replicated in diverse neuropsychiatric disorders [9,12,30,38,39], as well as in general population [28]. On the other hand, studies in rats and Rhesus monkeys have shown structural [23,43] and/or functional [34,35] modifications in the serotonergic system of brains exposed to smoking during fetal development. Maternal prenatal smoking has been consistently associated with development of aggressive behavior in offspring in humans [15], including conduct disorder [2]. No studies to date, however, have tested the interaction between the 5-HTTLPR polymorphism and prenatal smoking exposure as a factor that influences aggressive outcomes in ASD patients.

The objective of this study was to examine the possible interaction between the 5-HTTLPR and prenatal smoking exposure on aggressive behaviors in ASD patients. In order to have a more precise estimate of the phenotypic expression of this polymorphism, we also evaluated the rs25531 single nucleotide polymorphism (SNP) inside 5-HTTLPR, which confers a functional triallelic structure [13,25].

## **Material and methods**

### **Subjects**

In a previous study we tested the direct associations between the 5-HTTLPR with ASD and aggression among ASD patients, with non-significant results [21]. We now present results from a subsample of the original dataset, for which the information on maternal smoking is available (n=146), focusing on the interaction effects. Patients were recruited at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and other medical and educational institutions of the State of Rio Grande do Sul, and were diagnosed using DSM-IV-TR criteria [2], and the Brazilian version [29] of the Childhood Autism Rating Scale (CARS) [33]. The selected patients fulfilled diagnostic criteria for autistic disorder, Asperger disorder or PDD-NOS. Exclusion criteria were age under three years and diagnoses of neurofibromatosis, tuberous sclerosis, fragile-X syndrome, Rett syndrome, chromosomal abnormalities or other genetic conditions, as well as cerebral palsy or other encephalopathy possibly associated with ASD, in order to analyze only idiopathic cases [22]. A more detailed description of the sample characteristics is presented in Longo et al. [21].

The study was approved by the Ethics Committees of the Hospital and Federal University of Rio Grande do Sul, Process N° 05-451, and all participants or legal representatives signed an informed consent form.

### **Clinical evaluation**

Information on maternal obstetric history, including smoking habits during pregnancy, was recovered by interview with parents and review of medical records. The presence of specific symptoms was assessed by patients' clinical examination performed by neurologists, under the supervision of one of us (RSR). The behavior outcomes evaluated in the present analysis included: (a) aggression, including unprovoked and recurrent aggressive behavior such as kicking, biting, pinching, hitting, or head-banging toward others; and (b) self-injury, defined as self-inflicted unexplained and recurrent aggressive behavior. Outcomes were considered present when patient exhibited the behaviors daily, with symptoms persisting for 6

months or more. The score obtained in the Brazilian version [32] of Autism Screening Questionnaire (ASQ) [3] was used as a general severity measure of autistic behavioral symptoms.

### **Genotyping**

Blood samples from patients were used for DNA extraction by salting out [19]. The 5-HTTLPR short (S) and long (L) alleles were genotyped following protocol described in Kaiser et al. [17] but with MgCl<sub>2</sub> concentration adjusted according to Yonan et al. [44] in order to improve genotyping accuracy. PCR products were submitted to enzymatic cleavage according to Stein et al. [36] for discrimination of the A→G substitution (rs25531) inside the L allele, matching to La and Lg alleles. Following the evidences of 5-HTTLPR functionality provided by Hu et al. [13] we considered the LaLa group as high activity genotype instead of the less precise LL group referred in previous studies.

### **Statistical analysis**

Allele frequencies were estimated by direct counting and Hardy-Weinberg equilibrium was assessed using the chi-square ( $\chi^2$ ) test. The 5-HTTLPR genotypes were classified according to their related influence in SLC6A4 expression level [13]: low expression group, SS and SLg; medium expression group, SLa and LaLg; high expression genotype, LaLa. Following the Brune et al. [5] analysis protocol, a combined genotype group corresponding to low and medium SLC6A4 expression was compared with the high expression genotype LaLa.

Multiple logistic regression analyses were carried out to assess the effect of the interaction between genotypes and prenatal smoking exposure on aggression and self-injury. Correction for multiple comparisons was not performed since individual associations were tested in the previous study [21], while this analysis focused on a specific hypothesis. These analyses included the adjustment for sex, age and ASQ score. Statistical analyses were performed using the SPSS 13.0 statistical package.

### **Results**

Of the 146 patients evaluated, 113 were males (77.4%) and 33 females, with a mean age of 10.3 years ( $\pm$  4.9 years). Fifty five patients (37.7%) presented autistic disorder, 77 (52.7%) had PDD-NOS, and 14 (9.6%) had Asperger disorder. The mean age of onset of symptoms was 17.1 months ( $\pm$  13.8 months), and mean ASQ score was 21.9 ( $\pm$  5.8). Patients

were predominantly European derived (92%). Maternal prenatal cigarette smoking was present in 26 cases. The outcomes of aggression and self-injury were present in 55 and 60 patients, respectively.

The genotypic frequencies of the triallelic 5-HTTLPR (SS, 21.9%; SLg, 6.2%; SLa, 38.4%; LaLg, 9.6% and LaLa, 24%) were distributed according to the Hardy–Weinberg equilibrium. There were no individuals with LgLg genotype. A very rare ultra-long allele was found in one patient of our sample. This finding has already been reported in other studies [7,26]. However, following the strategy of Cho et al. [7] and for the convenience of further analyses, it was included in the group of long allele variants.

Aggression and self-injury outcomes were not associated to each other. Patients with self-injury have shown significantly higher average ASQ scores (mean 24.2, 95% CI: 22.7-25.7) than patients without this characteristic (20.3, 95% CI: 19.1-21.5,  $P < 0.001$ ). The presence of aggression, on the other hand, was not associated with ASQ scores.

There are no significant main effects of prenatal smoking exposure and 5-HTTLPR genotypes on aggression or self-injury (Table 1). However, the interaction between 5-HTTLPR genotype and smoking exposure revealed a significant effect on both outcome variables (Table 1). That is, patients with the LaLa genotype that were exposed to prenatal smoking presented an increased risk of developing aggression and self-injury behaviors. On the other hand, patients with other genotypes did not present such effect, regardless of prenatal smoking exposure status.

## **Discussion**

This study presents first time evidence of gene by environment interaction on aggressive behavior in ASD patients. Aggression and self-injury outcomes were more frequent in patients with the 5-HTTLPR LaLa genotype who were also exposed to maternal prenatal smoking.

Our findings are consistent with the notion that 5-HTTLPR moderates emotional responsiveness. The LL genotype of the 5-HTTLPR polymorphism has previously been associated with aggressive behavior in autistic patients by Brune et al. [5]. This genotype was also associated with aggressive behavior in patients with schizophrenia [9], fragile X syndrome [12], attention deficit/hyperactivity disorder [30], and Alzheimer disease [38,39]. Moreover, the relationship between the high expression LL genotype and aggressive behavior is not only observed in neuropsychiatric patients, but also in the general population. Nobile et.



al. [28] observed a higher frequency of aggressive behaviors in subjects of an adolescent population sample that carried the LL genotype.

Despite the aforementioned studies on the association between the LL genotype and aggressive behavior, this is the first report of an interaction between the LL genotype and prenatal smoking exposure. This interaction is plausible in the context of previous data reporting structural and functional serotonergic system changes in animals exposed to prenatal maternal smoking [23,34,35,43]. Furthermore, aggressive behavior is a recognized outcome associated both with serotonergic dysfunctions [24,27] and with prenatal cigarette exposure [2,15].

The association between the 5-HTTLPR and aggressive behavior in a variable set of neuropsychiatric conditions suggests that the 5-HTTLPR may influence more specific symptoms in the ASD phenotypic variation rather than ASD per se. It is possible that the previous positive association findings between this polymorphism and ASD as a whole were observed preferentially in samples with a higher frequency of patients with aggressive behavior. In this way, our results may represent a possible explanation for the inconsistency of previous association findings.

Nevertheless, our study has some limitations. First of all, the number of mothers of ASD patients that smoked during pregnancy is small, obviously demanding replication before definitive conclusions are drawn. The test for interaction between 5-HTTLPR and other genetic factors, as DRD4 and serotonin receptors, as previously reported [28,45] could help to clarify the mechanisms influencing aggressive behavior. However, such studies demand a much higher sample size. A longitudinal design following up children born to women who had smoked throughout pregnancy would be better suited to analyze the role of this environmental factor in ASD symptoms. However, such approach may be unfeasible in a relatively uncommon outcome such as the one studied here. A more realistic approach to confirm this finding would be replication in a similar study.

ASD are neurodevelopmental conditions that exhibit an extensive clinical heterogeneity, probably influenced by complex gene by environment interactions. We conclude that these initial findings should be interpreted with caution, but their biological plausibility demand additional studies with the same focus in order to confirm or dismiss this information.

**Acknowledgments:** We are indebted to Sandra Leistner Segal for helping at genotyping standards; to Marcos T. Mercadante for providing the ASQ Brazilian Version; and to Bibiane Armiliato de Godoy for the kind help with laboratory procedures. This project was funded by FIPE-HCPA, CNPq, CAPES, FAPERGS, DECIT/SCTIE/MS, and CNPq-Institutos do Milênio.

Table 1 – Multiple logistic regression analyses for role of 5-HTTLPR genotypes and prenatal smoking exposure on the risk for aggression and self-injury in patients with ASD.

	B	SE	Wald (df = 1)	Odds ratio	P
Dependent variable: aggression <sup>1</sup>					
5-HTTLPR genotypes <sup>2</sup>	-0.31	0.48	0.41	0,73	0.52
Smoking exposure	-0.34	0.65	0.27	0.71	0.60
5-HTTLPR x smoking	3.09	1.32	5.45	21.94	0.02
Constant	-1.09	0.86	1.62	0.33	0.20
Dependent variable: self-injury <sup>1</sup>					
5-HTTLPR genotypes <sup>2</sup>	-1.01	0.55	3.31	0.37	0.07
Smoking exposure	-0.18	0.64	0.08	0.83	0.78
5-HTTLPR x smoking	2,72	1,18	5.3	15.2	0.02
Constant	-3.65	1.02	12.72	1.15	<0.001

1 – Adjustment for sex, age and ASQ; 2 - High SLC6A4 expression genotype (LaLa) x others (SS, SLg, SLa, LaLg).

## References

- [1] American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (fourth edition, text revision), American Psychiatric Association, Washington DC, 2000.
- [2] R.D. Baler, N.D. Volkow, J.S. Fowler, H. Benveniste, Is fetal brain monoamine oxidase inhibition the missing link between maternal smoking and conduct disorders? *J. Psychiatry Neurosci.* 33 (2008) 187-195.
- [3] S.K. Berument, M. Rutter, C. Lord, A. Pickles, A. Bailey, Autism screening questionnaire: diagnostic validity, *Br. J. Psychiatry* 175 (1999) 444-451.
- [4] C. Betancur, M. Corbex, C. Spielewoy, A. Philippe, J.L. Laplanche, J.M. Launay, C. Gillberg, M.C. Mouren-Simeoni, M. Hamon, B. Giros, M. Nosten-Bertrand, M. Leboyer, Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder, *Mol. Psychiatry* 7 (2002) 67-71.
- [5] C.W. Brune, S.J. Kim, J. Salt, B.L. Leventhal, C. Lord, E.H.Jr. Cook, 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents with Autism, *Am. J. Psychiatry* 163 (2006) 2148-2156.
- [6] A. Caspi, K. Sugden, T.E. Moffitt, A. Taylor, I.W. Craig, H. Harrington, J. McClay, J. Mill, J. Martin, A. Braithwaite, R. Poulton, Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene, *Science* 301 (2003) 386-389.
- [7] I.H. Cho, H.J. Yoo, M. Park, Y.S. Lee, S.A. Kim, Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios, *Brain Res.* 1139 (2007) 34-41.
- [8] S. Guhathakurta, S. Ghosh, S. Sinha, A. Chatterjee, S. Ahmed, S.R. Chowdhury, P.K. Gangopadhyay, S. Ghosh, M. Singh, R. Usha, Serotonin transporter promoter variants: analysis in Indian autistic and control population, *Brain Res.* 1092 (2006) 28-35.
- [9] D.H. Han, D.B. Park, C. Na, B.S. Kee, Y.S. Lee, Association of aggressive behavior in Korean male schizophrenic patients with polymorphisms in the serotonin transporter promoter and catecholamine-O-methyltransferase genes, *Psychiatry Res.* 129 (2004) 29-37.
- [10] F. Happé, A. Ronald, The 'fractionable autism triad': a review of evidence from behavioural, genetic, cognitive and neural research, *Neuropsychol. Rev.* 18 (2008) 287-304.
- [11] A. Heils, A. Teufel, S. Petri, G. Stober, P. Riederer, D. Bengel, K.P. Lesch, Allelic variation of human serotonin transporter gene expression, *J. Neurochem.* 66 (1996) 2621-2624.
- [12] D. Hessel, F. Tassone, L. Cordeiro, K. Koldewyn, C. McCormick, C. Green, J. Wegelin, J. Yuhas, R.J. Hagerman, Brief Report: Aggression and Stereotypic Behavior in Males with

Fragile X Syndrome - Moderating Secondary Genes in a “Single Gene” Disorder, *J. Autism Dev. Disord.* 38 (2008) 184–189.

[13] X. Hu, R.H. Lipsky, G. Zhu, L.A. Akhtar, J. Taubman, B.D. Greenberg, K. Xu, P.D. Arnold, M.A. Richter, J.L. Kennedy, D.L. Murphy, D. Goldman, Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder, *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 815–826.

[14] C.H. Huang, S.L. Santangelo, Autism and Serotonin Transporter Gene Polymorphisms: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Am. J. Med. Genet.* 147B (2008) 903–913.

[15] S.C.J. Huijbregts, J.R. Séguin, M. Zoccolillo, M. Boivin, R.E. Tremblay, Maternal prenatal smoking, parental antisocial behavior, and early childhood physical aggression, *Dev. Psychopathol.* 20 (2008) 437–453.

[16] C.P. Johnson, S.M. Myers, American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities, Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 120 (2007) 1183-1215.

[17] R. Kaiser, P.B. Tremblay, J. Schmider, M. Henneken, M. Dettling, B. Müller-Oerlinghausen, R. Uebelhack, I. Roots, J. Brockmüller, Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparoid and residual subtypes of schizophrenia, *Mol. Psychiatry* 6 (2001) 179-185.

[18] A. Klin, Autism and Asperger syndrome: an overview, *Rev. Bras. Psiquiatr.* 28 (2006) S3-S11.

[19] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444.

[20] M. Laucht, J. Treutlein, D. Blomeyer, A.F. Buchmann, B. Schmid, K. Becker, U.S. Zimmermann, M.H. Schmidt, G. Esser, M. Rietschel, T. Banaschewski, Interaction between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: evidence from a high-risk community sample of young adults, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20 (2009) 1-11.

[21] D. Longo, L. Schüler-Faccini, A.P. Brandalize, R.S. Riesgo, C.H.D. Bau, Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders, *Brain Res.* 1267 (2009):9-17.

[22] J.H. Miles, T.N. Takahashi, S. Bagby, P.K. Sahota, D.F. Vaslow, C.H. Wang, R.E. Hillman, J.E. Farmer, Essential Versus Complex Autism: Definition of Fundamental Prognostic Subtypes, *Am. J. Med. Genet. A.* 135 (2005) 171–180.

- [23] Muneoka, T. Ogawa, K. Kamei, Y. Mimura, H. Kato, M. Takigawa, Nicotine exposure during pregnancy is a factor which influences serotonin transporter density in the rat brain, *Eur. J. Pharmacol.* 411 (2001) 279–282.
- [24] D.L. Murphy, M.A. Fox, K.R. Timpano, P.R. Moya, R. Ren-Patterson, A.M. Andrews, A. Holmes, K.P. Lesch, J.R. Wendland, How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems, *Neuropharmacology* 55 (2008) 932-960.
- [25] M. Nakamura, S. Ueno, A. Sano, H. Tanabe, The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants, *Mol. Psychiatry* 5 (2000) 32–38.
- [26] M. Narita, N. Nishigami, N. Narita, K. Yamaguti, N. Okado, Y. Watanabe, H. Kuratsune, Association between serotonin transporter gene polymorphism and chronic fatigue syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 264–266.
- [27] R.J. Nelson, B.C. Trainor, Neural mechanisms of aggression, *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 536-546.
- [28] M. Nobile, R. Giorda, C. Marino, O. Carlet, V. Pastore, L. Vanzin, M. Bellina, M. Molteni, M. Battaglia, Socioeconomic status mediates the genetic contribution of the dopamine receptor D4 and serotonin transporter linked promoter region repeat polymorphisms to externalization in preadolescence, *Dev. Psychopathol.* 19 (2007) 1147-1160.
- [29] A.M. Pereira, M.B. Vagner, R.S. Riesgo, Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil, *J. Pediatr. (Rio J)* 84 (2008) 487-494.
- [30] W. Retz, J. Thome, D. Blocher, M. Baader, M. Rosler, Association of attention deficit hyperactivity disorder-related psychopathology and personality traits with the serotonin transporter promoter region polymorphism, *Neurosci. Lett.* 319 (2002) 133–136.
- [31] M. Rutter, Diagnosis and definitions of childhood autism, *J Autism Dev Disord.* 8 (1978) 139-161.
- [32] F.P. Sato, C.S. Paula, R. Lowenthal, E.Y. Nakano, D. Brunoni, J.S. Schwartzman, M.T. Mercadante, Instrument to screen cases of pervasive developmental disorder: a preliminary indication of validate, *Rev. Bras. Psiquiatr.* 31 (2009) 30-33.
- [33] Schopler, E., Reiehler, R.J., Roehen Renner, B.R., *The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism.* Irvington Publishers Inc, New York, 1986.

- [34] T.A. Slotkin, K.E. Pinkerton, C.A. Tate, F.J. Seidler, Alterations of serotonin synaptic proteins in brain regions of neonatal Rhesus monkeys exposed to perinatal environmental tobacco smoke, *Brain Res.* 1111 (2006) 30-35.
- [35] T.A. Slotkin, I.T. Ryde, C.A. Tate, F.J. Seidler, Lasting effects of nicotine treatment and withdrawal on serotonergic systems and cell signaling in rat brain regions: Separate or sequential exposure during fetal development and adulthood, *Brain Res. Bull.* 73 (2007) 259–272.
- [36] M.B. Stein, S. Seedat, J. Gelernter, Serotonin transporter gene promoter polymorphism predicts SSRI response in generalized social anxiety disorder, *Psychopharmacology (Berl)* 187 (2006) 68-72.
- [37] M.B. Stein, N.J. Schork, J. Gelernter, Gene-by-Environment (Serotonin Transporter and childhood Maltreatment) Interaction for Anxiety Sensitivity, an Intermediate Phenotype for Anxiety Disorders, *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 312–319.
- [38] D.L. Sukonick, B.G. Pollock, R.A. Sweet, B.H. Mulsant, J. Rosen, W.E. Klunk, K.B. Kastango, S.T. DeKosky, R.E. Ferrell, The 5-HTTPR\*S/\*L polymorphism and aggressive behavior in Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 58 (2001) 1425-1428.
- [39] R.A. Sweet, B.G. Pollock, D.L. Sukonick, B.H. Mulsant, J. Rosen, W.E. Klunk, K.B. Kastango, S.T. DeKosky, R.E. Ferrell, The 5-HTTPR polymorphism confers liability to a combined phenotype of psychotic and aggressive behavior in Alzheimer disease, *Int. Psychogeriatr.* 13 (2001) 401-409.
- [40] P. Szatmari, C. Merette, S.E. Bryson, J. Thivierge, M. Roy, M.Cayer, M. Maziade, Quantifying dimensions in autism: A factor analytic study, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 41 (2002) 467–474.
- [41] R. Uher, P. McGuffin, The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the aetiology of mental illness: review and methodological analysis, *Mol. Psychiatry*, 13 (2008)131-146.
- [42] F.R. Volkmar, M. State, A. Klin, Autism and autism spectrum disorders: diagnostic issues for the coming decade, *J. Child. Psychol. Psychiatry* 50 (2009) 108-115.
- [43] Z. Xu, F.J. Seidler, S.F. Ali, W. Slikker Jr., T.A. Slotkin, Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems, *Brain Res.* 914 (2001) 166–178.
- [44] A.L. Yonan, A.A. Palmer, T.C. Gilliam, Hardy-Weinberg disequilibrium identified genotyping error of the serotonin transporter (SLC6A4) promoter polymorphism, *Psychiatr. Genet.* 16 (2006) 31-34.

[45] K. Zhang, Q. Xu, Y. Xu, H. Yang, J. Luo, Y. Sun, N. Sun, S. Wang, Y. Shen, The combined effects of the 5-HTTLPR and 5-HTR1A genes modulates the relationship between negative life events and major depressive disorder in a Chinese population, *J. Affect. Disord.* 114 (2009) 224-231.



## **CAPÍTULO VI – ARTIGO 4**

### **Análise do gene *MECP2* em uma amostra de meninas com diagnóstico de transtornos do espectro autista**

Manuscrito em preparação para a revista *Journal of Child Neurology*



## **Análise do gene *MECP2* em uma amostra de meninas com diagnóstico de transtornos do espectro autista**

Dânae Longo <sup>1</sup>, Claiton Henrique Dotto Bau <sup>1,2</sup>, Bibiane Armiliato de Godoy <sup>1</sup>, Rudimar dos Santos Riesgo <sup>3</sup>, Fernando Regla Vargas <sup>4</sup>, Albert Nobre Menezes <sup>4</sup>, Lavínia Schuler-Faccini <sup>1,2</sup>

1 - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

2 - Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

3 – Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

4 – Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil

Correspondência:

Lavínia Schuler-Faccini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Genética

Caixa Postal 15031 – Agência Campus UFRGS

CEP 91501-970

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 33166727 Fax: (51) 33167311

E-mail: [lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

## Resumo

A Síndrome de Rett (SR) é um transtorno global de desenvolvimento caracterizado por um quadro de regressão neuropsicomotora acompanhada de microcefalia progressiva após um período inicial de 6 a 18 meses de desenvolvimento normal da criança. Embora a SR seja associada com mutações no gene *MECP2* há um número crescente de relatos de mutações encontradas em pacientes com diagnóstico de transtorno do espectro autista (TEA) sem características clínicas da SR clássica. O objetivo desse trabalho foi investigar mutações no gene *MECP2* em uma amostra de 38 meninas com diagnóstico de TEA, sem características clínicas indicativas de SR. A região codificante do gene *MECP2*, bem como as regiões de junção éxon/íntron, foram amplificadas por PCR e sequenciadas. O éxon 3 foi sequenciado em metade das pacientes, enquanto parte do éxon 4 não pode ser amplificado. Em 7 pacientes, foram encontrados 3 polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) já descritos anteriormente na população em geral, e uma mutação sinônima (p.P56P) não associada a SR. Foram encontradas 3 variações de seqüência ainda não descritas no íntron 3 e na região 5' não traduzida de duas pacientes (c.378-115C>T, c.-79T>A, c.-47T>A). Foram detectadas duas pacientes (5%) com mutações patogênicas em *MECP2*. A primeira apresentou uma mutação já descrita em SR (p.R255X) e a segunda apresentou duas regiões com mutações do tipo inserção/deleção nas posições 869 e 924 do cDNA, ainda não descritas. Apesar de não apresentarem quadro clínico indicativo de SR, ambas as pacientes apresentavam retardo de desenvolvimento e atraso de fala. Essas características também foram observadas em pacientes TEA não síndrômicos diagnosticados com mutações em *MECP2* em estudos prévios. Concluímos que o sequenciamento do gene *MECP2* deve ser considerado em casos de meninas com diagnóstico de TEA não síndrômico, especialmente se apresentarem retardo de desenvolvimento e atraso de fala.

**Palavras-chave:** *MECP2*, síndrome de Rett, transtornos do espectro autista, R255X, Rett atípico.

## Introdução

A síndrome de Rett (SR, MIM 312750), descrita primeiramente por Andreas Rett (1966), foi reconhecida internacionalmente em 1983 com o trabalho de Hagberg e cols. Dados de prevalência não são muito precisos, variando de 0.25 a 1 caso em 10.000, sendo muito mais comum em meninas (Hagberg e cols., 1985). A SR é classificada no grupo de transtornos globais do desenvolvimento juntamente com transtornos do espectro autista (TEA) (American Psychiatric Association, 2000). Tanto a SR quanto os TEA são caracterizados por prejuízos graves na comunicação e interação social, acompanhados por movimentos repetitivos e estereotipados. Os critérios diagnósticos diferenciais para SR segundo o DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000) incluem microcefalia progressiva acompanhada por regressão de habilidades sociais, comunicativas e motoras após um período inicial de desenvolvimento normal da criança de no mínimo 5 meses. Entre os dois e dez anos de idade, as pacientes podem desenvolver ataxia, apraxia, maneirismos característicos, escoliose, dificuldades de mastigação, bruxismo e anormalidades respiratórias. Depois dos 10 anos ocorre uma lenta deterioração somática e neurológica adicional e casos mais graves podem levar à necessidade de cadeira de rodas (Hagberg e Witt-Engerström, 1986). A condição geralmente estabiliza no final da adolescência ou início da vida adulta. O fenótipo resultante, no entanto, é bastante amplo, variando de pacientes com severa deterioração neurológica até casos com manutenção da fala e habilidades cognitivas (Renieri e cols., 2003).

Mutações no gene *MECP2* (*methyl-CpG-binding protein*), localizado no cromossomo Xq28, são encontradas em aproximadamente 80% dos casos de SR (Amir e cols., 1999), sendo que quase todas ocorrem *de novo* nos gametas parentais, principalmente no gameta paterno (Trappe e cols., 2001). O gene tem 4 éxons e expressa uma proteína nuclear codificada pelos éxons 2, 3 e 4 (D'Esposito e cols., 1996; Sirianni e cols., 1998) capaz de se ligar a DNA metilado e reprimir a transcrição de outros genes.

Existe uma grande variedade de mutações patogênicas já descritas no gene *MECP2*, dispersas ao longo de todo o gene (<http://MECP2.chw.edu.au/>). Diversos estudos já buscaram estabelecer correlações entre os tipos de mutações e características clínicas dos pacientes. Os resultados, entretanto, são conflitantes, incluindo relatos de fenótipos distintos associados à mesma mutação (Ham e cols., 2005; Matijevic e cols., 2009). Além disso, há um número crescente de trabalhos na literatura encontrando mutações patogênicas em *MECP2*, tradicionalmente associadas ao quadro clássico de síndrome de Rett, em pacientes com quadro

atípico (Ham e cols., 2005; Herman e cols., 2007; Kammoun e cols., 2004) ou pacientes com diagnóstico de TEA sem características clínicas da síndrome (Carney e cols., 2003; Kammoun e cols., 2004; Lam e cols., 2000; Abdul-Rahman e Hudgins, 2006; Schaefer e Lutz, 2006). Young e cols. (2008) concluem que muitos casos de SR são erroneamente diagnosticados como autismo ou TEA devido a grande sobreposição fenotípica entre essas condições, principalmente entre 1 e três anos de idade.

O objetivo desse trabalho foi investigar mutações no gene *MECP2* em uma amostra de meninas com diagnóstico de TEA e sem critérios diagnósticos diferenciais indicativos de síndrome de Rett.

## **Material e Métodos**

### **Seleção das Pacientes**

Foram selecionadas pacientes do sexo feminino com diagnóstico de transtornos do espectro autista (transtorno autista, transtorno de Asperger ou transtorno global do desenvolvimento não especificado) provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou outras instituições de ensino e tratamento do Rio Grande do Sul. O diagnóstico das pacientes baseou-se nos critérios do DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000), e/ou a versão brasileira do CARS (Childhood Autism Rating Scale; Schopler e cols., 1986; Pereira e cols., 2008). Foram excluídas do estudo pacientes com menos de três anos de idade e diagnóstico prévio de síndrome de Rett, síndrome do X frágil, alterações citogenéticas ou qualquer outra condição genética ou neurológica possivelmente associada a TEA, com o objetivo de analisar apenas casos de TEA não sindrômicos. Ao final dessa avaliação, foram selecionadas 38 pacientes com diagnóstico de TEA idiopático. Essas pacientes foram adicionalmente avaliadas para mutações de expansão no gene *FMRI* (*fragile X mental retardation 1*) através de um protocolo baseado em PCR (*polymerase chain reaction*)(O'Connell e cols., 2002). O teste foi inconclusivo para 23 pacientes, mas elas foram mantidas no estudo visto que não apresentavam sinais clínicos indicativos da síndrome de X frágil. Investigação de cariótipo foi realizada em 14 pacientes. Da mesma forma, as pacientes sem exame de cariótipo foram mantidas no estudo porque não apresentavam distúrbios significativos. Há evidências que pacientes com diagnóstico de TEA sem características dismórficas provavelmente não apresentem alterações citogenéticas (Miles e cols., 2005).

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e todos os representantes legais das pacientes assinaram o termo de consentimento.

### **Avaliação clínica**

Cada paciente foi avaliada através de um protocolo de investigação administrado por profissionais treinados. Informações foram obtidas por entrevistas com os pais, exame direto do paciente e/ou revisão de prontuário. O protocolo incluía questões sobre dados morfológicos, antecedentes familiares, histórico de desenvolvimento neuropsicomotor da paciente, presença de comorbidades médicas, bem como presença de sinais clínicos associados a síndrome de Rett conforme descrito na literatura (The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group, 1988; American Psychiatric Association, 2000).

### **Genotipagem**

DNA genômico foi obtido de amostras de sangue periférico coletadas das pacientes através do método de extração por precipitação salina (Lahiri and Nurnberger, 1991). Os éxons 2, 3 e 4, bem como as regiões de junção éxon/intron, foram amplificadas por PCR conforme descrito por Buyse e cols. (2000). Nesse protocolo, o éxon 4 é dividido em 4 fragmentos para facilitar a amplificação e posterior sequenciamento: 4A, 4B, 4CD e 4E. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFXtm PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e as reações de sequenciamento foram realizadas, de forma bidirecional, utilizando o kit *BigDye dideoxy* (Applied Biosystems) com os mesmos primers descritos por Buyse e cols. (2000). As amostras foram analisadas no sequenciador automático *ABI Prism 3730 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do manual. Os amplicons correspondentes aos éxons 2, 4A, 4B e 4E foram seqüenciados para todas as pacientes. O amplicon correspondente ao éxon 3 foi seqüenciado em metade das pacientes, enquanto o fragmento 4CD não pode ser amplificado. As seqüências obtidas, em ambas orientações, foram alinhadas e comparadas com a seqüência de referência (GenBank, NG\_007107.1) utilizando o programa GeneDoc v.2.6.002 (<http://www.psc.edu/genedoc>). As variantes de seqüência foram consideradas novas quando não referidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou no RettBASE (<http://MECP2.chw.edu.au>).

### **Resultados**

As pacientes apresentavam de 3 a 31 anos, com média de 12,3 anos. Nove pacientes apresentavam transtorno autista (24%), 4 foram diagnosticadas com síndrome de Asperger (10%) e as 25 (66%) restantes apresentavam transtorno global do desenvolvimento não especificado (TGD-NS). O desenvolvimento neuro-psicomotor antes dos 18 meses foi normal em apenas 13 pacientes (34%), e 18 (47%) apresentavam histórico de convulsões. Mais da metade das pacientes que realizaram exame de eletroencefalograma (EEG) apresentaram alguma alteração (16/29, 55%). Vinte e nove pacientes foram submetidas a exame de neuroimagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética), e apenas três apresentaram alguma alteração.

As variantes de seqüência encontradas na análise das 38 pacientes estão discriminadas na Tabela 1. No íntron 3 foram encontradas 4 variantes, sendo 3 delas já descritas como polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) em indivíduos normais e na população em geral (rs2075597, rs3850326, rs2071569). A quarta variação, encontrada no íntron 3 de apenas uma paciente (F86), corresponde a uma transição C>T, ainda não descrita, na posição g.71114. Outra variação de seqüência já descrita na região N-terminal da proteína MeCP2 (rs61754435) foi encontrada em uma paciente (F90) e corresponde a uma mutação sinônima (p.P56P) não associada a síndrome de Rett.

Na nossa amostra, duas pacientes apresentaram mutações sabidamente patogênicas em *MECP2*. A primeira, g.71614C>T, encontrada na paciente F119, cria um códon de parada prematuro na proteína (p.R255X) e é a terceira mutação mais freqüente em pacientes com síndrome de Rett (RettBASE, <http://MECP2.chw.edu.au>). Essa mesma paciente apresentou, na região 5' não traduzida do gene (5'UTR), duas variações adicionais ainda não descritas (Tabela 1). A segunda paciente, F172, apresentou duas regiões com mutações do tipo inserção/deleção (in/del), nas posições 869 e 924 do cDNA (Tabela 1). Apesar de extensão das mutações não ser precisamente estabelecida, eventos in/del na região codificadora dos genes geralmente leva a mutações de mudança de fase de leitura, que podem criar códons de parada prematuros ou mesmo peptídeos não funcionais devido a estrutura muito diferenciada.

As pacientes F119 e F172, com 8 e 6 anos de idade, respectivamente, são provenientes do HCPA e receberam diagnóstico de TGD-NS com 2 anos e 6 meses. A testagem citogenética, bem como o exame de ressonância magnética, foram normais em ambas. A Tabela 2 mostra a comparação das características clínicas das pacientes com os critérios diagnósticos para síndrome de Rett (The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group, 1988). As duas não apresentaram problemas de desenvolvimento até os seis meses de



vida. O perímetro cefálico em ambas, tanto ao nascimento quanto atual, também esteve dentro do esperado. As únicas características relacionadas com o quadro clínico de síndrome de Rett foram problemas de desenvolvimento na fala encontrados em ambas as pacientes e maneirismos estereotipados e alterações eletroencefalográficas na paciente 119 (Tabela 2). Além disso, ambas as pacientes apresentaram regressão no desenvolvimento social e comunicativo a partir dos 18 meses, mas o uso proposital das mãos não foi afetado (Tabela 2).

## **Discussão**

Nesse trabalho avaliamos o gene *MECP2* em um grupo de 38 meninas com diagnóstico de TEA e encontramos duas pacientes (5%) com mutações patogênicas. Essas pacientes, no entanto, não apresentam quadro clínico indicativo de SR. Esse resultado concorda com estudos semelhantes, nos quais foram encontrados de 0 a 4,8 % de pacientes com TEA não síndrômico portadores de mutações em *MECP2* (Lintas e Persico, 2009). Uma das pacientes apresentou a mutação c.763C>T (p.R255X) a terceira mais frequentemente descrita em pacientes com SR (<http://MECP2.chw.edu.au/>). A segunda paciente apresenta dois eventos in/del no éxon 4, ainda não descritos.

Existem poucos estudos anteriores que avaliaram especificamente a presença de mutações em *MECP2* em pacientes com TEA não síndrômicos (revisado em Lintas e Persico, 2009) e pacientes com TEA em geral (Herman e cols., 2007; Abdul-Rahman e Hudgins, 2006; Schaefer e Lutz, 2006). Além do nosso estudo, outros 4 trabalhos identificaram mutações patogênicas em pacientes com TEA não síndrômicos. Lam e cols. (2000) avaliaram 21 meninas autistas e encontraram uma paciente com uma deleção afetando o sítio de splicing 5' do íntron 2 (IVS2 + 2delTAAG). Carney e cols. (2003), avaliando 69 meninas também com diagnóstico de autismo, encontraram duas pacientes com variações patogênicas em *MECP2*: uma mutação de mudança de fase de leitura (c.1157\_1197del41), e uma mutação levando a códon de parada prematuro (p.R294X). Outros estudos sequenciaram o gene *MECP2* como parte de um protocolo de investigação genética para pacientes com TEA em geral. Abdul-Rahman e Hudgins (2006) identificaram uma paciente com códon de para prematuro (p.R270X), enquanto Schaefer e Lutz (2006) indicaram duas meninas com mutações patogênicas em *MECP2* (mutações não discriminadas).

Os demais estudos que sequenciaram o gene *MECP2* em pacientes com TEA não síndrômico ou não detectam mutações (Vourc'h e cols., 2001; Beyer e cols., 2002; Lobo-

Menendez e cols., 2003; Li e cols., 2005; Harvey e cols., 2007), descrevem apenas variações em regiões não codificantes (Shibayama e cols., 2004; Xi e cols., 2007; Coutinho e cols., 2007) ou então encontram mutações de troca de aminoácidos descritas também em indivíduos normais (Shibayama e cols., 2004; Coutinho e cols., 2007). Em nosso estudo, encontramos variações não patogênicas em *MECP2* já descritas para a população em geral: uma paciente com mutação sinônima (p.P56P) na porção N-terminal da proteína e três SNPs (rs2075597, rs3850326, rs2071569) encontrados no íntron 3 de 6 pacientes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://MECP2.chw.edu.au/>). Além disso, detectamos 3 variantes ainda não descritas, mas provavelmente não patogênicas devido a sua localização em regiões não codificantes: uma transição C>T no íntron 3 (c.378-115C>T) e duas transversões T>A na região 5'-não traduzida do gene (c.-79T>A e c.-47T>A).

Apesar de existirem poucos trabalhos relatando mutações patogênicas de *MECP2* em pacientes com TEA, é importante ressaltar que estes não apresentam características sindrômicas. Os fenótipos associados com essas mutações descritas previamente em pacientes com TEA não incluíam epilepsia, microcefalia, estereotípias peculiares (*hand washing*) ou qualquer sintoma característico de SR. As características clínicas encontradas em nossas pacientes também discordam do quadro clássico. Os critérios apresentados pelas pacientes F119 e F172, no entanto, apesar de comporem o checklist diagnóstico (The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group, 1988), não são características exclusivas da SR e são compatíveis com o diagnóstico de TEA (American Psychiatric Association, 2000). Inclusive o atraso no desenvolvimento das habilidades sociais e comunicativas observado em ambas as pacientes, caracterizado pelos pais como um quadro regressivo de perda de habilidades previamente adquiridas, é observado em 15 a 47% dos pacientes com TEA (Stefanatos, 2008). Por outro lado, ressaltamos que características mais especificamente relacionadas com a SR, como microcefalia e problemas motores e de marcha, frequentemente citadas mesmo em casos de pacientes com Rett atípico, não foram apresentadas pelas pacientes.

Analisando os critérios propostos para diagnóstico de SR (The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group, 1988) verificamos que a maioria dos itens é compatível com diagnóstico de TEA e, portanto, não são muito específicos para motivar a testagem de mutações em *MECP2* em pacientes com diagnóstico prévio de TEA. Revisando estudos anteriores observamos que a chance de detecção de mutações patogênicas em meninas com características autistas aumenta em função do atraso no desenvolvimento de habilidades sociais e comunicativas. No estudo de Kammoun e cols. (2004), que avaliou 15 meninas com

quadro de Rett atípico, duas apresentaram mutações patogênicas em *MECP2*. Ambas as pacientes exibiam comportamento autista e apraxia de marcha, mas não apresentaram evolução clínica indicativa de SR. Adicionalmente, essas pacientes apresentavam retardo no desenvolvimento e atraso de fala, características também presentes em nossas pacientes e em outros casos previamente relatados de TEA não sindrômicos com mutações em *MECP2* (Abdul-Rahman e Hudgins, 2006; Lam e cols., 2000; Carney e cols., 2003).

Na opinião de alguns autores, o sequenciamento de *MECP2* deveria ser feito para todas as meninas com diagnóstico de TEA com retardo mental, independente da presença de critérios diagnósticos para SR (Lintas e Persico, 2009). Levando em consideração as características fenotípicas das nossas pacientes portadoras de mutações patogênicas em *MECP2*, bem como em resultados de estudos prévios, sugerimos que o sequenciamento desse gene seja cogitado, senão em todas as meninas com TEA, ao menos para as que apresentem atraso no desenvolvimento social e comunicativo.

**Agradecimentos:** Ao Centro de Sequenciamento Genômico PDTIS/FIOCRUZ pela autorização do uso do sequenciador. A Leila Schuindt Monnerat pela orientação e auxílio com o protocolo de genotipagem. Este projeto foi financiado pelo FIPE-HCPA, CNPq, CAPES, FAPERGS, DECIT/SCTIE/MS e CNPq-Institutos do Milênio.

Tabela 1 – Variantes de seqüência no gene *MECP2* em 38 pacientes com diagnóstico de TEA idiopáticos.

Variante <sup>1</sup>	Identificação da paciente	Região/ Domínio	Localização <sup>2</sup>	Tipo	Código
c.377+22C>G	F86	Íntron 3	g.70494C>G	SNP	rs2075597
c.378-109A>G	F14, F18, F86, F91	Íntron 3	g.71120A>G	SNP	rs3850326
c.378-74C>T	F85, F146	Íntron 3	g.71155C>T	SNP	rs2071569
c.378-115C>T	F86	Íntron 3	g.71114C>T	nova	-
c.168C>T	F90	N-terminal	g.70263C>T	p.P56P <sup>3</sup>	rs61754435
c.763C>T	F119	TRD-NLS	g.71614C>T	p.R255X <sup>3</sup>	rs61749721
c.-79T>A	F119	5'UTR	g.10384T>A	nova	-
c.-47T>A	F119	5'UTR	g.10416T>A	nova	-
c.869_? in/del	F172	TRD	g.71720_?	nova	-
c.924_? in/del	F172	TRD	g.71775_?	nova	-

Sequências de referência (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): 1 - NM\_004992.2; 2 - NG\_007107.1; 3 - NP\_004983.1:

Tabela 2 – Critérios para diagnóstico de síndrome de Rett (SR) em comparação com as características clínicas das pacientes com diagnóstico de TEA que apresentaram mutações patogênicas em *MECP2* (The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group, 1988).

Critérios diagnósticos para síndrome de Rett	SR <sup>a</sup> clássica	Pacient e F119	Paciente F172
Critérios essenciais <sup>b</sup>			
Desenvolvimento pré-natal e peri-natal normais	+ <sup>c</sup>	+	+
Desenvolvimento psicomotor normal nos primeiros 6 meses de vida	+	+	+
Perímetro cefálico normal ao nascimento	+	+	+
Desaceleração do crescimento da cabeça entre 5 meses e 4 anos de idade	+	-	-
Perda do uso proposital das mãos associado com problemas de comunicação e isolamento social	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>
Grave atraso na linguagem expressiva e receptiva	+	+	+
Grave retardo no desenvolvimento psicomotor	+	-	-
Maneirismos estereotipados	+	+	-
Desenvolvimento de apraxia de marcha e de tronco entre 1 e 4 anos de idade	+	-	-
Suspeita diagnóstica entre 1 e 4 anos	+	-	-
Características adicionais <sup>e</sup>			
Problemas respiratórios	+/-	-	-
Alterações eletroencefalográficas	+/-	+	-
Convulsões	+/-	-	-
Espasticidade	+/-	-	-
Distúrbios vasomotores periféricos	+/-	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>
Escoliose	+/-	-	-
Retardo de crescimento	+/-	-	-
Pé pequeno hipotrófico	+/-	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>

a) SR, síndrome de Rett; b) todos precisam estar presentes para diagnóstico; c) + presente, - ausente, +/- presente ou ausente; d) ambas pacientes apresentaram regressão no contato social e comunicação a partir dos 18 meses, mas o uso proposital das mãos não foi afetado; e) geralmente presentes; f) ND, informação não disponível.

## Referências

- Abdul-Rahman OA, Hudgins L. The diagnostic utility of a genetics evaluation in children with pervasive developmental disorders. *Genet Med* 2006; 8:50-54.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23:185–188.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (fourth edition, text revision), American Psychiatric Association, Washington DC, 2000.
- Buyse IM, Fang P, Hoon KT, Amir RE, Zoghbi HY, Roa BB. Diagnostic testing for Rett syndrome by DHPLC and direct sequencing analysis of the MECP2 gene: identification of several novel mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(6):1428-1436.
- Beyer KS, Blasi F, Bacchelli E, Klauck SM, Maestrini E, Poustka A. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). Mutation analysis of the coding sequence of the MECP2 gene in infantile autism. *Hum Genet* 2002; 111:305-309.
- Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA. Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 2003; 28(3):205-211.
- Coutinho AM, Oliveira G, Katz C, Feng J, Yan J, Yang C, Marques C, Ataíde A, Miguel TS, Borges L, Almeida J, Correia C, Currais A, Bento C, Mota-Vieira L, Temudo T, Santos M, Maciel P, Sommer SS, Vicente AM. MECP2 coding sequence and 3'UTR variation in 172 unrelated autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; 144B: 475-483.
- D'Esposito M, Quaderi NA, Ciccodicola A, Bruni P, Esposito T, D'Urso M, Brown SD. Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm Genome* 1996; 7: 533–535.
- Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol* 1983;14 (4):471-479.
- Hagberg B, Goutieres F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J. Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 1985; 7:372–373.
- Hagberg B, Witt-Engerström J. Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet* 1986; 1: 47-59.

- Ham AL, Kumar A, Deeter R, Schanen NC. Does genotype predict phenotype in Rett syndrome? *J Child Neurol*. 2005; 20(9):768-778.
- Harvey CG, Menon SD, Stachowiak B, Noor A, Proctor A, Mensah AK, Mntzakanian GN, Alfred SE, Guo R, Scherer SW, Kennedy JL, Roberts W, Srivastava AK, Minassian BA, Vincent JB. Sequence variants within exon 1 of MECP2 occur in females with mental retardation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; 144B:355-360.
- Herman GE, Henninger N, Ratliff-Schaub K, Pastore M, Fitzgerald S, McBride KL. Genetic testing in autism: how much is enough? *Genet Med* 2007; 9(5):268-274.
- Kammoun F, de Roux N, Boespflug-Tanguy O, Vallée L, Seng R, Tardieu M, Landrieu P. Screening of MECP2 coding sequence in patients with phenotypes of decreasing likelihood for Rett syndrome: a cohort of 171 cases. *J Med Genet*. 2004; 41(6):e85.
- Lam CW, Yeung WL, Ko CH, Poon PM, Tong SF, Chan KY, Lo IF, Chan LY, Hui J, Wong V, Pang CP, Lo YM, Fok TF. Spectrum of mutations in the MECP2 gene in patients with infantile autism and Rett syndrome. *J Med Genet* 2000; 37:e41.
- Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
- Li H, Yamagata T, Mori M, Yasuhara A, Momoi MY. Mutation analysis of methyl-CpG binding protein family genes in autistic patients. *Brain Dev* 2005; 27:321-325.
- Lintas C, Persico AM. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet* 2009 46(1):1-8.
- Lobo-Menendez F, Sossey-Alaoui K, Bell JM, Copeland-Yates SA, Plank SM, Sanford SO, Skinner C, Simensen RJ, Schroer RJ, Michaelis RC. Absence of MeCP2 mutations in patients from the South Carolina autism project. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 117B:97-101.
- Matijevic T, Knezevic J, Slavica M, Pavelic J. Rett syndrome: from the gene to the disease. *Eur Neurol* 2009; 61(1):3-10.
- Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE. Essential Versus Complex Autism: Definition of Fundamental Prognostic Subtypes, *Am J Med Genet A* 2005; 135: 171–180.
- O'Connell CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA, Richie K. Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet* 2002; 61(1):13-20.
- Pereira AM, Vagner MB, Riesgo RS. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2008; 84: 487-494.

- Renieri A, Meloni I, Longo I, Ariani F, Mari F, Pescucci C, Cambi F. Rett syndrome: the complex nature of a monogenic disease. *J Mol Med* 2003; 81(6):346-54.
- Rett A. [On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood.] *Wein Med Wochenschr.* 1966; 116(37):723-726.
- Schaefer GB, Lutz RE. Diagnostic yield in the clinical genetic evaluation of autism spectrum disorders. *Genet Med* 2006; 8(9):549-556.
- Schopler E, Reihler RJ, Rothen Renner BR. The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism. Irvington Publishers Inc, New York, 1986.
- Shibayama A, Cook EH Jr, Feng J, Glanzmann C, Yan J, Craddock N, Jones IR, Goldman D, Heston LL, Sommer SS. MECP2 structural and 3'-UTR variants in schizophrenia, autism and other psychiatric diseases: a possible association with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 128B:50-53.
- Sirianni N, Naidu S, Pereira J, Pilloto RF, Hoffman EP. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1552–1558.
- Stefanatos GA. Regression in autistic spectrum disorders. *Neuropsychol Rev* 2008; 18(4):305-319.
- The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group. Diagnostic criteria for Rett syndrome. *Ann Neurol* 1988; 23:425-428.
- Trappe R, Laccone F, Colibanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1093–1101.
- Vourc'h P, Bienvenu T, Beldjord C, Chelly J, Barthélémy C, Müh JP, Andres C. No mutations in the coding region of the Rett syndrome gene MECP2 in 59 autistic patients. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:556-558.
- Xi CY, Ma HW, Lu Y, Zhao YJ, Hua TY, Zhao Y, Ji YH. MeCP2 gene mutation analysis in autistic boys with developmental regression. *Psychiatr Genet* 2007; 17:113-116.
- Young DJ, Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Ellaway C, Kulkarni A, de Klerk N, Kaufmann WE, Leonard H. The diagnosis of autism in a female: could it be Rett syndrome? *Eur J Pediatr* 2008; 167: 661–669.



## **CAPÍTULO VII – DISCUSSÃO**



## 7. Discussão

### 7.1 Variabilidade clínica dos TEA

A partir dos anos 60, diversos estudos científicos associando o autismo com retardo mental, síndromes genéticas, epilepsia e outras condições neurológicas, começaram a elucidar as bases orgânicas do autismo e seus transtornos correlacionados (Klin, 2006). Esses estudos contribuíram significativamente para o esclarecimento dos aspectos biológicos envolvidos nos TEA mas, ao mesmo tempo, revelaram que se tratam de condições complexas com variáveis níveis de gravidade e extensa variabilidade clínica (Rutter e cols., 1994; Keller e Persico, 2003). A idéia de que essa ampla heterogeneidade clínica reflete, na verdade, uma conjunção de etiologias distintas ganhou força na última década. A primeira distinção etiológica importante, tanto para prática clínica quanto para a pesquisa, é a diferenciação entre os subtipos idiopático e secundário (Miles e cols., 2005). Em cerca de 6 a 15% dos casos de autismo é possível diagnosticar alguma condição genética ou neurológica associada (Rutter e cols., 1994; Abdul-Rahman e Hudgins, 2006; Battaglia e Carey, 2006; Schaefer e Lutz, 2006).

Entre os 184 pacientes inicialmente referidos como TEA idiopático, 5 foram excluídos devido ao diagnóstico de TEA não confirmado. Adicionalmente, 11 pacientes foram excluídos devido a condições médicas previamente não diagnosticadas: uma menina com alteração citogenética (47, XX + 21, 16q(dup)), três meninos com mutações em *FMRI*, dois pacientes com síndrome FG e dois meninos que apresentavam quadro mais leve de paralisia cerebral. Além disso, também foram excluídas três meninas que apresentavam leves dismorfias e quadro clínico adicional compatível com síndromes metabólicas ainda não definidas. Battaglia e Carey (2006) evidenciam a importância da correta avaliação de pacientes com TEA: estabelecer o diagnóstico e a etiologia pode auxiliar no prognóstico, estabelecer o risco de recorrência, organizar a testagem laboratorial apropriada, estabelecer o tratamento e intervenções adequadas, e em muitas situações pode ser crucial para o engajamento terapêutico, além de proporcionar alívio emocional para os pais.

Dependendo do rigor clínico e dos recursos disponíveis para exames genéticos e neurológicos, a identificação de condições médicas específicas pode chegar a 40% dos pacientes com TEA (Schaefer e Lutz, 2006). Existem diversas sugestões de protocolos para avaliação clínica de pacientes com TEA (Filipek e cols., 2000; Cohen e cols., 2005; Herman e cols., 2007, Schaefer e cols., 2008; Lintas e Persico, 2009). Como pontos em comum, esses

protocolos incluem exame de cariótipo e testagem para síndrome do X frágil como rotina para todos os pacientes e, mais recentemente, sequenciamento do gene *MECP2* para as meninas. Esses exames se justificam pelos relatos cada vez mais freqüentes de pacientes com TEA com alterações nesses exames, mas sem características sindrômicas suficientes para que essas condições fossem excluídas apenas por avaliação clínica dismorfológica (Estécio e cols., 2002; Schaefer e Lutz, 2006; Marco e Skuse, 2006; Herman e cols., 2007; Abdul-Rahman e Hudgins, 2006; Schaefer e Lutz, 2006; Weiss e cols., 2008; Baker e cols., 1994, Cook e cols., 1997b, Martin e Ledbetter, 2007). Outras síndromes já identificadas em indivíduos com TEA, mas que da mesma forma não apresentavam características clínicas indicativas, incluem síndrome de Smith-Lemli-Opitz (Cohen e cols., 2005; Tierney e cols., 2001), síndrome de Angelman (Nurmi e cols., 2001; Lopez-Rangel e cols., 2006; Williams e cols., 2001), síndrome de Smith-Magenis (Cohen e cols., 2005; Park e cols., 1998), síndrome de Sotos (Morrow e cols., 1990), bem como transtornos associados aos genes *PTEN* (Butler e cols., 2005; Goffin e cols., 2001) e *ARX* (Sherr e cols., 2003).

O advento da tecnologia de hibridização genômica comparativa (array CGH) nos últimos anos tem se mostrado muito útil na identificação de alterações citogenéticas em pacientes com TEA, mesmo nos casos que não apresentam características sindrômicas indicativas (Cook e Scherer, 2008). Trata-se de uma poderosa ferramenta capaz de detectar ao mesmo tempo tanto alterações maiores (trissomias, monossomias) quanto microdeleções e microduplicações não visualizadas em um cariótipo convencional. Devido a essas características, estudos mais recentes vêm sugerindo a aplicação dessa técnica como procedimento padrão para investigação genética de indivíduos com TEA (Schaefer e Mendelsohn, 2008). Algumas plataformas de testagem, inclusive, já se encontram disponíveis comercialmente para esse fim.

## **7.2 Síndrome de Rett e TEA**

O sequenciamento do gene *MECP2* nas nossas 38 pacientes com diagnóstico de TEA idiopático revelou mutações patogênicas em duas meninas: a primeira apresentou a mutação c.763C>T (p.R255X), a terceira mais frequentemente descrita em pacientes com SR (<http://MECP2.chw.edu.au/>); a segunda paciente apresenta dois eventos in/del no éxon 4, ainda não descritos.

Zappella e cols. (2003) evidenciam que casos mais leves de SR geralmente são associados a comportamentos autistas, o que aumenta a chance de diagnóstico equivocado,

especialmente entre as idades de 1 a 3 anos. Com o passar do tempo, a maioria das crianças com mutações patogênicas em *MECP2* e inicialmente diagnosticadas como autistas geralmente desenvolvem o quadro mais clássico de SR (Zappella e cols., 2003). Nossas pacientes, uma com 6 e outra com 8 anos, apresentavam diagnóstico de TGD-NE, regressão no desenvolvimento a partir dos 18 meses e atraso grave de fala. No entanto, características mais especificamente relacionadas com a SR, como microcefalia e problemas motores e de marcha, frequentemente citadas mesmo em casos de pacientes com Rett atípico, não foram apresentadas pelas pacientes.

Até o momento ainda não se estabeleceu uma correlação entre as variações no quadro clínico de SR e os diferentes tipos de mutações identificadas em *MECP2*. (Ham e cols., 2005; Matijevic e cols., 2009; Young e cols., 2008). Nossos resultados, juntamente com casos semelhantes observados em estudos prévios (Abdul-Rahman e Hudgins, 2006; Lam e cols., 2000; Carney e cols., 2003) sugerem que o sequenciamento do gene *MECP2* seja cogitado, senão em todas as meninas com TEA, ao menos para as que apresentem atraso no desenvolvimento social e comunicativo.

### **7.3 Estudos de fatores genéticos de risco associados a TEA idiopáticos**

Mesmo com o avanço na qualidade da avaliação clínica e consequente aumento no diagnóstico de casos associados a condições médicas conhecidas, a maioria dos casos de TEA continua classificado como idiopático. Apesar da importância da contribuição de fatores genéticos para a etiologia dos TEA idiopáticos, evidenciada pelos altos índices de herdabilidade e de recorrência familiar (Fisher e cols., 1998; Shao e cols., 2002; Folstein e Piven, 1991), hoje se sabe que essa influência é complexa (Rutter, 2000). A ampla heterogeneidade clínica vista em TEA provavelmente reflete a complexidade de sua natureza multifatorial, incluindo a contribuição de múltiplos loci (Yang e Gill, 2007), heterogeneidade genética, epistasia e interações gene-ambiente (Persico e Bourgeron, 2006).

Apesar de vários loci já identificados como possivelmente envolvidos na etiologia dos TEA idiopáticos, os resultados de estudos de ligação e associação geralmente não são replicados (Yang e Gill, 2007). Vários fatores podem ser enumerados para explicar a baixa concordância entre esses estudos: pequeno tamanho amostral, estratificação genética populacional em estudos caso-controle, varreduras genômicas podem não ter usado marcadores em densidade suficiente, ou os métodos estatísticos não são adequados para lidar com a complexidade do mecanismo de herança (Szatmari e cols., 2007). Além dessas razões,

conforme discutido por Szatmari e cols. (2007) existe ainda a possibilidade de que os fenótipos utilizados nesses estudos não sejam geneticamente informativos para lidar com a heterogeneidade genética associada aos TEA idiopáticos.

Mesmo com a exclusão de casos de TEA secundários, um grupo de indivíduos com diagnóstico de TEA idiopático ainda permanece clinicamente muito heterogêneo, com a contribuição de múltiplos fatores genéticos e ambientais de risco distintos. A maioria dos estudos de ligação e associação ainda utiliza como fenótipo de análise o diagnóstico final de TEA, o que inclui uma ampla variedade de sintomas e comorbidades com origens etiológicas provavelmente distintas. Na tentativa de superar a heterogeneidade relacionada aos TEA, estudos mais recentes vêm tentando estratificar pacientes em subgrupos mais homogêneos com relação a características clínicas e comportamentais – também chamados subfenótipos ou fenótipos refinados (Hus e cols., 2007; Ingram e cols., 2008; Freitag, 2007). O estudo de fenótipos mais específicos pode auxiliar na identificação de fatores de risco pois, teoricamente, grupos fenotipicamente mais homogêneos responderiam a fatores de risco mais homogêneos (Szatmari e cols., 2007).

Entre os fatores genéticos candidatos para estudos de associação com TEA, o polimorfismo 5-HTTLPR na região promotora do gene transportador de serotonina (Lesch e cols., 1993) é um dos mais investigados. Esse polimorfismo foi inicialmente considerado funcionalmente bialélico, com um alelo curto (S) e um longo (L) mais frequentes (Lesch e cols., 1996). No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que um SNP A>G detectado no alelo L (Nakamura e cols., 2000) também interfere no nível de transcrição do gene, conferindo assim uma estrutura funcional trialélica ao polimorfismo 5-HTTLPR (Hu e cols., 2006).

Apesar das evidências funcionais provenientes de série de estudos sugerindo o envolvimento de anormalidades no sistema serotoninérgico na etiologia dos TEA (Schain and Freedman, 1961; Anderson, 2002; Whitaker-Azmitia, 2005; Croonenberghs e cols., 2005) os resultados de estudos de associação entre 5-HTTLPR e TEA são controversos, com resultados negativos e positivos, tanto com associação com o alelo S e com o L (Guhathakurta e cols., 2006; Betancur e cols., 2002; Huang e Santangelo, 2008). Nosso estudo, tanto com a metodologia de caso-controle quanto como a FBAT (teste de associação baseado em famílias), mostrou ausência de associação entre 5-HTTLPR e TEA, independente de sua estrutura bialélica ou trialélica. Nossos resultados corroboram os dados da mais recente meta-análise que também não confirma associação entre TEA e o polimorfismo 5-HTTLPR (Huang and Santangelo, 2008). Por outro lado, o genótipo LaLa, associado com maior nível de

expressão do gene transportador de serotonina, foi mais freqüente entre indivíduos com labilidade de humor. Este resultado é consistente com estudos prévios que sugerem que o polimorfismo 5-HTTLPR não está associado os TEA como um todo, mas parece influenciar a expressão fenotípica desses pacientes (Coutinho e cols., 2004; Tordjman e cols., 2001; Brune e cols., 2006).

#### **7.4 Estudos de fatores ambientais de risco associados a TEA idiopáticos**

Há controvérsias também sobre o papel de fatores ambientais na etiologia dos TEA (Cook, 2001). A idade avançada dos pais, o baixo peso ao nascimento, a hipóxia perinatal e o fumo materno durante a gestação foram relacionadas, dentre outros, como fatores de risco para TEA (Kolevzon e cols., 2007). A maioria dos estudos existentes com relação a influência de fatores ambientais na etiologia dos TEA, no entanto, avaliam apenas a associação desses fatores com o desfecho final de TEA (Rutter, 2005). Poucos estudos analisam o efeito desses fatores ambientais na manifestação de características fenotípicas de pacientes com TEA, nem sua possível interação com fatores genéticos de risco.

O comportamento agressivo, seja ele dirigido a outras pessoas (agressão), seja na forma de auto-agressão, é um importante componente na variabilidade fenotípica de pacientes com TEA. Ambos comportamentos são disruptivos, interferem negativamente nas atividades cotidianas e geralmente são sintomas alvo para tratamento medicamentoso em pacientes com TEA (Myers e cols., 2007). A agressividade é influenciada por alterações no sistema serotoninérgico (Nelson e Trainor, 2007; Murphy e cols., 2008), sendo que o polimorfismo 5-HTTLPR também tem se mostrado associado a esse comportamento (Han et al., 2004; Hessel et al., 2008; Retz et al., 2002; Sukonick et al., 2001; Sweet et al., 2001; Nobile et al., 2007). Além disso, a exposição a fumo materno durante a gestação é associada a modificações estruturais e funcionais no sistema serotoninérgico do feto (Muneoka et al., 2001; Xu et al., 2001; Slotkin et al., 2006; Slotkin et al., 2007) bem como com o aumento de agressividade nos filhos (Huijbregts et al., 2008; Baler et al., 2008). Apesar de uma justificativa biológica para existência de interação entre 5-HTTLPR e cigarro na determinação de agressividade, nosso trabalho foi o primeiro a testar essa hipótese em pacientes com TEA. Nossos resultados sugerem uma interação entre esses dois fatores, sendo que os pacientes com o genótipo LaLa concomitantemente expostos o fumo materno na gestação apresentaram maior freqüência de auto-agressão e agressão contra outras pessoas.

Adicionalmente, observamos uma frequência maior de epilepsia em pacientes com TEA cujas mães utilizaram medicações potencialmente teratogênicas durante a gestação (misoprostol, warfarin, drogas psiquiátricas). Sequelas neurológicas secundárias a exposição intrauterina a misoprostol e warfarin podem ser devidas a efeito teratogênico direto ou, indiretamente, devido a danos no sistema vascular do feto (Raghav e Reutens, 2007; Vargas e cols., 2000). Por outro lado, drogas de uso psiquiátrico teoricamente podem interferir na ação de neuromorfógenos, como a serotonina. O uso de inibidores de recaptção de serotonina durante a gestação é associada com o aumento de risco de desenvolvimento de epilepsia nos recém-nascidos (De las Cuevas and Sanz, 2006; Wen et al., 2006). Dessa forma, sugerimos a existência de uma labilidade neurológica no cérebro de pacientes com TEA, no qual epilepsia pode ser engatilhada pela exposição do feto a fatores adversos durante a gestação.



## **CAPÍTULO VIII – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**



## 8. Conclusões e Perspectivas

### 8.1 Conclusões

- 1) Os transtornos do espectro autista (TEA) são associados a uma ampla variabilidade clínica, o que reflete múltiplas etiologias. O primeiro passo para lidar com essa variabilidade é a distinção entre os casos idiopáticos e os casos secundários a condições médicas conhecidas. Essa distinção geralmente não é evidenciada nos estudos com TEA e poderia talvez aumentar o nível de concordância entre os estudos de fatores de risco, uma vez que diminuiria a heterogeneidade dos indivíduos em estudo.
- 2) A identificação de casos de TEA secundários a condições genéticas ou neurológicas é importante não apenas para a pesquisa, mas principalmente para a prática clínica. A avaliação médica rigorosa e testagem genética adequada podem aumentar a taxa de identificação de casos secundários, contribuindo tanto para o tratamento dos pacientes quanto para o aconselhamento das famílias;
- 3) TEA idiopáticos são transtornos neuropsiquiátricos influenciados por uma série de fatores genéticos e ambientais de risco. A caracterização clínica dos pacientes possivelmente auxilia a constituição de grupos mais homogêneos e contribui para o estudo do papel dos fatores de risco na etiologia dos TEA;
- 4) O polimorfismo 5-HTTLPR no gene transportador da serotonina (SLC6A4), amplamente analisado em estudos de associação prévios, não parece influenciar os TEA em si, mas contribui para sua variabilidade fenotípica. Especificamente, o genótipo LaLa, associado ao maior nível de expressão do gene SLC6A4, está associado com instabilidade de humor em pacientes com TEA.
- 5) A exposição pré-natal a substâncias teratogênicas também pode influenciar o quadro clínico de pacientes com TEA. O uso de alguns tipos de medicações durante a gestação, incluindo inibidores de recaptação de serotonina, anticonvulsivantes e anticoagulantes, foi mais freqüente entre mães de pacientes com epilepsia. Adicionalmente, pacientes com o genótipo LaLa do polimorfismo 5-HTTLPR e expostos a fumo materno durante a gestação tem mais chance de desenvolver comportamento agressivo.

## 8.2 Perspectivas

- 1) Estabelecer um protocolo de investigação clínica mais adequado para auxiliar o diagnóstico de casos de TEA secundários. Apesar da existência de várias sugestões na literatura, a implementação desse protocolo necessitaria do envolvimento de uma equipe multidisciplinar, com a criação de um banco de dados em comum. Esforços nesse sentido já estão sendo desenvolvidos pelo PROTID;
- 2) O uso de array CGH tem se mostrado promissor para investigação genética de pacientes com TEA onde não é possível encontrar etiologia definida pelos métodos genéticos tradicionalmente utilizados em clínica. Como essa tecnologia ainda não é amplamente utilizada nas pesquisas no Brasil, estamos buscando estabelecer contatos com instituições internacionais para propor trabalhos em parceria.

## **CAPÍTULO IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 9. Referências Bibliográficas

Abdul-Rahman OA and Hudgins L (2006) The diagnostic utility of a genetics evaluation in children with pervasive developmental disorders. *Genet Med* 8(1):50-4.

Ajuriahuerra J (1977) Las Psicosis Infantiles. In: Manual de Psiquiatria Infantil. 4<sup>th</sup> ed. Toray-Masson, Barcelona. p. 673-731.

American Psychiatric Association (1980) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 3rd ed. Washington DC: American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4rd ed. Washington DC: American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR. 4<sup>th</sup>ed. American Psychiatric Association, Washington DC.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23: 185–188.

Anderson GM, GutknechtL, Cohen DJ, Brailly-Tabard S, Cohen JH, Ferrari P, Roubertoux PL, Tordjman S (2002) Serotonin transporter promoter variants in autism: functional effects and relationship to platelet hyperserotonemia. *Mol Psychiatry* 7: 831-836.

Asperger H (1944) Die “Autistischen Psychopathen” im Kindesalter, *Archiv für Psychiatrie and Nervenkrankheiten*, Berline 117, pp. 76–136.

Auranen M, Vanhala R, Varilo T, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Sinsheimer JS, Peltonen L and Jarvela I (2002) A genome-wide screen for autism-spectrum disorders: Evidence for a major susceptibility locus on chromosome 3q25-27. *Am J Hum Genet* 71: 777-790.

Baler RD, Volkow ND, Fowler JS, Benveniste H (2008) Is fetal brain monoamine oxidase inhibition the missing link between maternal smoking and conduct disorders? *J Psychiatry Neurosci* 33: 187-195.

- Baker P, Piven J, Schwartz S, Patil S (1994) Brief report: duplication of chromosome 15q11-13 in two individuals with autistic disorder. *J Autism Dev Disord* 24(4): 529-535.
- Baron-Cohen S, Wheelwright S, Skinner R, Martin J and Clubley E (2001) The autism-spectrum quotient (AQ): evidence from Asperger syndrome/high-functioning autism, males and females, scientists and mathematicians. *J Autism Dev Disord* 31: 5-17.
- Battaglia A and Carey JC (2006) Etiologic yield of autistic spectrum disorders: a prospective study. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142: 3–7.
- Betancur C, Corbex M, Spielwoy C, Philippe A, Laplanche JL, Launay JM, Gillberg C, Mouren-Siméoni MC, Hamon M, Giros B, Nosten-Bertrand M, Leboyer M (2002) Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. *Mol Psychiatry* 7(1): 67-71.
- Bosa C e Callias M (2000) Autismo: breve revisão de diferentes abordagens. *Psicologia: Reflexão e Crítica* 13: 167-177.
- Bregman JD (2005) Definitions and Characteristics of the Spectrum. In: Autism spectrum disorders: identification, education, and treatment / edited by Dianne Zager.—3rd ed. P 3-46. Lawrence Erlbaum Associates, Inc., Publishers Mahwah, New Jersey, London
- Brune CW, Kim SJ, Salt J, Leventhal BL, Lord C, Cook EH Jr (2006) 5-HTTLPR genotype-specific phenotype in children and adolescents with autism. *Am J Psychiatry* 163: 2148–2156.
- Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C (2005) Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* 42(4): 318-321.
- Canli T and Lesch KP (2007) Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci* 10(9):1103-1109.
- Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA (2003) Identification of MECP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 28: 205–211.



Cho IH, Yoo HJ, Park M, Lee YS, Kim SA (2007) Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios. *Brain Res* 1139: 34-41.

Chugani DC, Muzik O, Rothermel R, Behen M, Chakraborty P, Mangner T, da Silva EA and Chugani HT (1997) Altered serotonin synthesis in the dentatohalamocortical pathway in autistic boys. *Ann Neurol* 42: 666-669.

Chugani DC, Muzik O, Behen M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J and Chugani HT (1999) Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol* 45: 287-295.

Cohen D, Pichard N, Tordjman S, Baumann C, Burglen L, Excoffier E, Lazar G, Mazet P, Pinquier C, Verloes A, Héron D (2005) Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. *J Autism Dev Disord* 35(1):103-116.

Conroy J, Meally E, Kearney G, Fitzgerald M, Gill M, Gallagher L (2004) Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population. *Mol Psychiatry* 9: 587-593.

Cook EH Jr (2001) Genetics of autism. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 10: 333-350.

Cook EH Jr, Arora RC, Anderson GM, Berry-Kravis EM, Yan SY, Yeoh HC, Sklena PJ, Charak DA, Leventhal BL (1993) Platelet serotonin studies in hyperserotonemic relatives of children with autistic disorder. *Life Sci* 52: 2005-2015.

Cook EH Jr, Courchesne RY, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, Haas R, Courchesne E, Leventhal BL (1997) Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry* 2: 247-250.

Cook EH Jr, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E (1997b) Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* 60(4): 928-934.

Cook EH Jr and Scherer SW (2008) Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 455(7215): 919-923.

Coutinho AM, Oliveira G, Morgadinho T, Fesel C, Macedo TR, Bento C, Marques C, Ataíde A, Miguel T, Borges L, Vicente AM (2004) Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. *Mol Psychiatry* 9(3): 264-271.

Croonenberghs J, Verkerk R, Scharpe S, Deboutte D, Maes M (2005) Serotonergic disturbances in autistic disorder: L-5-hydroxytryptophan administration to autistic youngsters increases the blood concentrations of serotonin in patients but not in controls. *Life Sci* 76: 2171–2183.

De las Cuevas C and Sanz EJ (2006) Safety of selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy. *Curr Drug Saf* 1: 17–24.

D’Esposito M, Quaderi NA, Ciccodicola A, Bruni P, Esposito T, D’Urso M, Brown SD (1996) Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm Genome* 7: 533–535.

Devlin B, Cook EH Jr, Coon H, Dawson G, Grigorenko EL, McMahon W, Minshew N, Pauls D, Smith M, Spence MA, Rodier PM, Stodgell C, Schellenberg GD, CPEA Genetics Network (2005) Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. *Mol Psychiatry* 10(12): 1110-1116.

Estécio MRH, Fett-Conte AC, Varella-Garcia M, Fridman C, Silva AE (2002) Molecular and Cytogenetic analyses on Brazilian youths with Pervasive Development Disorders *J Autism Develop Disorders* 32(1):35-41.

Freitag CM (2007) The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry* 12(1): 2-22.

Filipek PA, Accardo PJ, Ashwal S, Baranek GT, Cook EH Jr, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin SW, Tuchman RF, Volkmar FR (2000) Practice parameter: screening and diagnosis of autism: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Child Neurology Society. *Neurology* 55(4): 468-479.

Filipek PA, Accardo PJ, Baranek GT, Cook EH Jr, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone

- WL, Teplin S, Tuchman RF, Volkmar FR (1999) The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 29(6): 439-484.
- Fisher S, Vargha-Kadem F, Watkins K, Monaco A, Pembrey M (1998) Localization of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nat Genetics* 18: 168-170.
- Folstein S and Piven J (1991) Etiology of autism: genetic influences. *Pediatrics* 87: 767-773.
- Folstein SE and Rosen-Sheidley B (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2: 943–955.
- Fombonne E (1998) Epidemiology of autism and related conditions. In: Volkmar FR, ed. *Autism and pervasive developmental disorders*. Cambridge University Press, Cambridge. p.32-63.
- Fombonne E (2003) Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord* 33(4): 365-382.
- Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT (2004) Autism and pervasive developmental disorders. *J Pediatr (Rio J)* 80 (2 Suppl): S83-S94.
- Gillberg C (1993) Autism and related behaviours. *J Intellect Disabil Res* 37: 343-372.
- Gillberg C and Coleman M (2000) *The Biology of the Autistic Syndromes*. 3<sup>rd</sup> ed. Mac Keith Press, distributed by Cambridge University Press, London.
- Goffin A, Hoefsloot LH, Bosgoed E, Swillen A, Fryns JP (2001) PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and autism. *Am J Med Genet* 105(6): 521–524.
- Greenberg BD, Tolliver TJ, Huang SJ, Li Q, Bengel D, Murphy D (1999) Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *Am J Med Genet* 88: 83–87.
- Guhathakurta S, Ghosh S, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, Chowdhury SR, Gangopadhyay PK, Ghosh S, Singh M, Usha R (2006) Serotonin transporter promoter variants: Analysis in Indian autistic and control population. *Brain Res* 1092(1): 28-35.

Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O (1983) A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol* 14 (4): 471-479.

Hagberg B, Goutieres F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J (1985) Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 7: 372-373.

Hagberg B and Witt-Engerström J (1986) Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet* 1: 47-59.

Ham AL, Kumar A, Deeter R, Schanen NC (2005) Does genotype predict phenotype in Rett syndrome? *J Child Neurol* 20(9): 768-778.

Han DH, Park DB, Na C, Kee BS, Lee YS (2004) Association of aggressive behavior in Korean male schizophrenic patients with polymorphisms in the serotonin transporter promoter and catecholamine-O-methyltransferase genes. *Psychiatry Res* 129: 29-37.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66: 2621-2624.

Herman GE, Henninger N, Ratliff-Schaub K, Pastore M, Fitzgerald S, McBride KL (2007) Genetic testing in autism: how much is enough? *Genet Med* 9(5): 268-274.

Hessl D, Tassone F, Cordeiro L, Koldewyn K, McCormick C, Green C, Wegelin J, Yuhas J, Hagerman RJ (2008) Brief Report: Aggression and Stereotypic Behavior in Males with Fragile X Syndrome - Moderating Secondary Genes in a "Single Gene" Disorder. *J Autism Dev Disord* 38: 184-189.

Hollander E, Phillips AT, Yeh CC (2003) Targeted treatments for symptom domains in child and adolescent autism. *Lancet* 362: 732-734.

Hu X, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D (2006) Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 78: 815-826.

- Huang CH and Santangelo SL (2008) Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet* 147B: 903–913.
- Huijbregts SCJ, Séguin JR, Zoccolillo M, Boivin M, Tremblay RE (2008) Maternal prenatal smoking, parental antisocial behavior, and early childhood physical aggression. *Dev Psychopathol* 20: 437–453.
- Hus V, Pickles A, Cook EH Jr, Risi S, Lord C (2007) Using the autism diagnostic interview--revised to increase phenotypic homogeneity in genetic studies of autism. *Biol Psychiatry* 61(4):438-448.
- IMGSAC - International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (2001) Further characterization of the autism susceptibility locus AUTS1 on chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 10: 973-982.
- Ingram DG, Takahashi TN, Miles JH (2008) Defining autism subgroups: a taxometric solution. *J Autism Dev Disord* 38(5):950-960.
- Johnson CP, Myers SM, American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities (2007) Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 120(5): 1183-1215.
- Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 2: 217-250.
- Keller F and Persico A (2003) The neurobiological context of autism. *Mol Neurobiol* 28: 1-22.
- Kim SJ, Cox N, Courchesne R, Lord C, Corsello C, Akshoomoff N, Guter S, Leventhal BL, Courchesne E, Cook EH Jr (2002) Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Mol Psychiatry* 7: 278-288.
- Klauck SM, Poustaka F, Benner A, Lesch KP, Poustka A (1997) Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum Mol Genet* 6: 2233-2238.
- Klin A (2006) Autism and Asperger syndrome: an overview. *Rev Bras Psiquiatr* 28(Suppl 1): 3-11.

Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Asakura A, Aoki Y, Atsumi M, Iga T, Inomata J, Inoko H, Sasaki T, Nanba E, Kato N, Ishii T, Yamazaki K (2006) Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev* 28(4): 257-260.

Kolevzon A, Gross R, Reichenberg A (2007) Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch Pediatr Adolesc Med* 161(4): 326-333.

Lam CW, Yeung WL, Ko CH, Poon PM, Tong SF, Chan KY, Lo IF, Chan LY, Hui J, Wong V, Pang CP, Lo YM, Fok TF (2000) Spectrum of mutations in the MECP2 gene in patients with infantile autism and Rett syndrome. *J Med Genet* 37(12): e41.

Lamb JA, Moore J, Bailey A, Monaco A (2000) Autism: recent molecular genetic advances. *Hum Mol Genet* 9: 861-868.

Lauritsen MB, Als TD, Dahl HA, Flint TJ, Wang AG, Vang M, Kruse TA, Ewald H, Mors O (2006) A genome-wide search for alleles and haplotypes associated with autism and related pervasive developmental disorders on the Faroe Islands. *Mol Psychiatry* 11(1): 37-46.

Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P (1993) Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* 60(6): 2319-2322.

Lesch KP, Bebgel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-1531.

Leyfer OT, Folstein SE, Bacalman S, Davis NO, Dinh E, Morgan J, Tager-Flusberg H, Lainhart JE (2006) Comorbid psychiatric disorders in children with autism: interview development and rates of disorders. *J Autism Dev Disord* 36(7): 849-861.

Links PS, Stockwell M, Abichandani F, Simeon J (1980) Minor physical anomalies in childhood autism. Part I. Their relationship to pre- and perinatal complications. *J Autism Dev Disord* 10: 273-285.

Lintas C and Persico AM (2009) Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet* 46(1): 1-8.

Lopez-Rangel E and Lewis ME (2006) Further evidence for epigenetic influence of MECP2 in Rett, autism and Angelman's syndromes. *Clin Genet* 69(1): 23–25.

Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt J, Thorsen P, Olsen J, Melbye M (2002) A population based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *N Engl J Med* 347: 1477-1482.

Maestrini E, Lai C, Marlow A, Matthews N, Wallace S, Bailey A, Cook EH, Weeks DE, Monaco AP (1999) Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Am J Med Genet* 88(5): 492-496.

MacKenzie A and Quinn J (1999) A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15251–15255.

Marco AJ and Skuse DH (2006) Autism-lessons from the X chromosome. *SCAN* 1: 183-193.

Martin CL and Ledbetter DH (2007) Autism and cytogenetic abnormalities: solving autism one chromosome at a time. *Curr Psychiatry Rep* 9(2): 141-147.

Matijevic T, Knezevic J, Slavica M, Pavelic J (2009) Rett syndrome: from the gene to the disease. *Eur Neurol* 61(1): 3-10.

McCauley JL, Olson LM, Dowd M, Amin T, Steele A, Blakely RD, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS (2004) Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 127: 104-112.

McCauley JL, Olson LM, Delahanty R, Amin T, Nurmi EL, Organ EL, Jacobs MM, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS (2004b) A Linkage Disequilibrium Map of the 1-Mb 15q12 GABAA Receptor Subunit Cluster and Association to Autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 131: 51–59.

Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE (2005) Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A* 135(2): 171-180.

Morrow JD, Whitman BY, Accardo PJ (1990) Autistic disorder in Sotos syndrome: a case report. *Eur J Pediatr* 149(8): 567-569.

Mulder EJ, Anderson GM, Kema IP, de Bildt A, van Lang NDJ, den Boer JA, Minderaa RB (2004) Platelet serotonin in pervasive developmental disorders and mental retardation: Diagnostic group differences, withingroup distribution, and behavioral correlates. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43: 491-499.

Mulder EJ, Anderson GM, Kema IP, Brugman AM, Ketelaars CE, de Bildt A, van Lang ND, den Boer JA, Minderaa RB (2005) Serotonin transporter intron 2 polymorphism associated with rigid-compulsive behaviors in Dutch individuals with pervasive developmental disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133: 93-96.

Muller RA, Chugani DC, Behen ME, Rothermel RD, Muzik O, Chakraborty PK, Chugani HT (1998) Impairment of dentato-thalamo-cortical pathway in autistic men: language activation data from positron emission tomography. *Neurosci Lett* 245: 1-4.

Muneoka K, Ogawa T, Kamei K, Mimura Y, Kato H, Takigawa M (2001) Nicotine exposure during pregnancy is a factor which influences serotonin transporter density in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 411(3): 279-282.

Murphy DL, Fox MA, Timpano KR, Moya PR, Ren-Patterson R, Andrews AM, Holmes A, Lesch KP, Wendland JR (2008) How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* 55: 932-960.

Myers SM, Johnson CP, American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities (2007) Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 120(5): 1162-1182.

Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H (2000) The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry* 5: 32-38.



Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88: 471–481.

Nelson RJ and Trainor BC (2007) Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci* 8: 536-546.

Nobile M, Begni B, Giorda R, Frigerio A, Marino C, Molteni M, Ferrarese C, Battaglia M (1999) Effects of serotonin transporter promoter genotype on platelet serotonin transporter functionality in depressed children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 1396–1402.

Nobile M, Giorda R, Marino C, Carlet O, Pastore V, Vanzin L, Bellina M, Molteni M, Battaglia M (2007) Socioeconomic status mediates the genetic contribution of the dopamine receptor D4 and serotonin transporter linked promoter region repeat polymorphisms to externalization in preadolescence. *Dev Psychopathol* 19: 1147-1160.

Nurmi EL, Bradford Y, Chen Y, Hall J, Arnone B, Gardiner MB, Hutcheson HB, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Copeland-Yates SA, Michaelis RC, Wassink TH, Santangelo SL, Sheffield VC, Piven J, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS (2001) Linkage disequilibrium at the Angelman syndrome gene UBE3A in autism families. *Genomics* 77(1–2):105–113.

Park JP, Moeschler JB, Davies WS, Patel PI, Mohandas TK (1998) Smith-Magenis syndrome resulting from a de novo direct insertion of proximal 17q into 17p11.2. *Am J Med Genet* 77(1): 23–27.

Persico AM and Bourgeron T (2006) Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends Neurosci* 29(7): 349-358.

Persico AM, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, Melmed R, Conciatori M, Damiani V, Baldi A, Keller F (2000) Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. *Am J Med Genet* 96(1): 123-127.

Raghav S and Reutens D (2007) Neurological sequelae of intrauterine warfarin exposure. *J Clin Neurosci* 14: 10–99.

Ramoz N, Reichert JG, Corwin TE, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, Buxbaum JD (2006) Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. *Biol Psychiatry* 60(2): 186-191.

Renieri A, Meloni I, Longo I, Ariani F, Mari F, Pescucci C, Cambi F (2003) Rett syndrome: the complex nature of a monogenic disease. *J Mol Med* 81(6): 346-354.

Rett AA (1966) [On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood] (Article in German). *Wien Med Wochenschr* 116: 723-726.

Retz W, Thome J, Blocher D, Baader M, Rösler M (2002) Association of attention deficit hyperactivity disorder-related psychopathology and personality traits with the serotonin transporter promoter region polymorphism. *Neurosci Lett* 319(3): 133–136.

Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nourl N, Hinds D, Hallmayer J, Kalaydjieva L, McCague P, Dimiceli S, Pitts T, Nguyen L, Yang J, Harper C, Thorpe D, Vermeer S, Young H, Hebert J, Lin A, Ferguson J, Chiotti C, Wiese-Slater S, Rogers T, Salmon B, Nicholas P, Petersen PB, Pingree C, McMahon W, Wong DL, Cavalli-Sforza LL, Kraemer HC, Myers RM (1999) A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet* 65: 493-507.

Rutter M (1978) Diagnosis and definition of childhood autism. *J Autism Child Schizophr* 8(2): 139-161.

Rutter M (2000) Genetic studies of autism: from the 1970s into the millennium. *J Abnorm Child Psychol* 28: 3-14.

Rutter M (2005) Aetiology of autism: findings and questions. *J Intellect Disabil Res* 49(Pt 4): 231-238.

Rutter M, Bailey A, Bolton P, Le Couteur A (1994) Autism and known medical conditions: myth and substance. *J Child Psychol Psychiatry* 35: 311-322.

Sakai K, Nakamura M, Ueno S, Sano A, Sakai N, Shirai Y, Saito N (2002) The silencer activity of the novel human serotonin transporter linked polymorphic regions. *Neurosci Lett* 327: 13-16.

Sekul EA, Moak JP, Schultz RJ, Glaze DG, Dunn JK, Percy AK (1994) Electrocardiographic findings in Rett syndrome: an explanation for sudden death? *J Pediatr* 125: 80–82.

Schaefer GB and Lutz RE (2006) Diagnostic yield in the clinical genetic evaluation of autism spectrum disorders. *Genet Med* 8(9): 549-556.

Schaefer GB, Mendelsohn NJ, Professional Practice and Guidelines Committee (2008) Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders. *Genet Med* 10(4): 301-305.

Schaefer GB and Mendelsohn NJ (2008) Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. *Genet Med* 10(1):4-12.

Schain RJ and Freedman DX (1961) Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J Pediatr* 58: 315–320.

Shao Y, Wolpert CM, Raiford KL, Menold MM, Donnelly SL, Ravan SA, Bass MP, McClain C, von Wendt L, Vance JM, Abramson RH, Wright HH, Ashley-Koch A, Gilbert JR, DeLong RG, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA (2002) Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorders. *Am J Med Genet* 114: 99-105.

Sherr EH (2003) The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes. *Curr Opin Pediatr* 15(6): 567–571.

Sirianni N, Naidu S, Pereira J, Pilloto RF, Hoffman EP (1998) Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *Am J Hum Genet* 63: 1552–1558.

Slotkin TA, Pinkerton KE, Tate CA, Seidler FJ (2006) Alterations of serotonin synaptic proteins in brain regions of neonatal Rhesus monkeys exposed to perinatal environmental tobacco smoke. *Brain Res* 1111: 30-35.

Slotkin TA, Ryde IT, Tate CA, Seidler FJ (2007) Lasting effects of nicotine treatment and withdrawal on serotonergic systems and cell signaling in rat brain regions: Separate or sequential exposure during fetal development and adulthood. *Brain Res Bull* 73: 259–272.

Stokstad E (2001) Development: New hints into the biological basis of autism. *Science* 294: 34-37.

Sukonick DL, Pollock BG, Sweet RA, Mulsant BH, Rosen J, Klunk WE, Kastango KB, DeKosky ST, Ferrell RE (2001) The 5-HTTPR\*S/\*L polymorphism and aggressive behavior in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58 (9): 1425-1428.

Sweet RA, Pollock BG, Sukonick DL, Mulsant BH, Rosen J, Klunk WE, Kastango KB, DeKosky ST, Ferrell RE (2001) The 5-HTTPR polymorphism confers liability to a combined phenotype of psychotic and aggressive behavior in Alzheimer disease. *Int Psychogeriatr* 13 (4): 401-409.

Szatmari P, Maziade M, Zwaigenbaum L, Mérette C, Roy MA, Joober R, Palmour R (2007) Informative phenotypes for genetic studies of psychiatric disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144(5): 581-588.

Taylor B, Lingam R, Simmons A, Stowe J, Miller E, Andrews N (2002) Autism and MMR vaccination in North London; no casual relationship. *Mol Psychiatry* 7(suppl2): S7-S8.

Tierney E, Nwokoro NA, Porter FD, Freund LS, Ghuman JK, Kelley RI (2001) Behavior phenotype in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 98(2): 191–200.

Tordjman S, Gutnecht L, Carlier M, Spitz E, Antoine C, Slama F, Cohen DJ, Ferrari P, Roubertoux PL, Anderson GM (2001) Role of the serotonin transporter in the behavioral expression of autism. *Mol Psychiatry* 6: 434–439.

Trappe R, Laccone F, Colibanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W (2001) MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 68: 1093–1101.

Treffert DA and Wallace GL (2002) Ilhas de Genialidade. *Scientific American Brasil*, Julho: 80-89.

VanderWeele JV and Cook EH Jr (2003) Genetics of Childhood Disorders: XLVI. Autism, Part : Genetics of Autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 42: 116-118.

Vargas FR, Schuler-Faccini L, Brunoni D, Kim C, Meloni VF, Sugayama SM, Albano L, Llerena JC Jr, Almeida JC, Duarte A, Cavalcanti DP, Goloni-Bertollo E, Conte A, Koren G, Addis A (2000) Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *Am J Med Genet* 95: 302–306.

- Volkmar FR, State M, Klin A (2009) Autism and autism spectrum disorders: diagnostic issues for the coming decade. *J Child Psychol Psychiatry* 50(1-2): 108-115.
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ, Autism Consortium (2008) Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 358(7): 667-675.
- Wen SW, Yang Q, Garner P, Fraser W, Olatunbosun O, Nimrod C, Walker M (2006) Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 194: 961–966.
- Whitaker-Azmitia PM (2005) Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int J Dev Neurosci* 23: 75–83.
- Williams JG, Higgins JP, Brayne CE (2006) Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch Dis Child* 91(1): 8-15.
- Williams CA, Lossie A, Driscoll D (2001) Angelman syndrome: mimicking conditions and phenotypes. *Am J Med Genet* 101(1): 59–64.
- Wu S, Guo Y, Jia M, Ruan Y, Shuang M, Liu J, Gong X, Zhang Y, Yang J, Yang X, Zhang D (2005) Lack of evidence for association between the serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphisms and autism in the Chinese trios. *Neurosci Lett* 381(1-2): 1-5.
- Xu Z, Seidler FJ, Ali SF, Slikker WJr, Slotkin TA (2001) Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res* 914: 166–178.
- Yang MS and Gill M (2007) A review of gene linkage, association and expression studies in autism and an assessment of convergent evidence. *Int J Dev Neurosci* 25(2): 69-85.
- Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T, Fried I, Ebstein RP (2001) Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *Am J Med Genet* 105: 381-386.

Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C (2003) Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA* 289: 49-55.

Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J, Cantor RM, Geschwind DH, Gilliam TC (2003) A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 73: 886-897.

Young DJ, Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Ellaway C, Kulkarni A, de Klerk N, Kaufmann WE, Leonard H (2008) The diagnosis of autism in a female: could it be Rett syndrome? *Eur J Pediatr* 167: 661–669.

Zappella M, Meloni I, Longo I, Canitano R, Hayek G, Rosaia L, Mari F, Renieri A (2003) Study of MECP2 gene in Rett syndrome variants and autistic girls. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 119:102-107.

Zhong N, Ye L, Ju W, Brown WT, Tsiouris J, Cohen I (1999) 5-HTTLPR variants not associated with autistic spectrum disorders. *Neurogenetics* 2(2): 129-131.

Zoghbi HY, Percy AK, Schultz RJ, Fill C (1990) Patterns of X chromosome inactivation in the Rett syndrome. *Brain Dev* 12: 131–135.

## **CAPÍTULO X – ANEXOS**





## **10.1 ANEXO I**

Critérios diagnósticos para os transtornos do espectro autista

Quadro 1 – Critérios diagnósticos para transtorno autista segundo DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000).

A. Um total de seis (ou mais) itens de (1), (2), e (3), com pelo menos dois de (1), e um de cada de (2) e (3).

1. Comprometimento na interação social, manifestado por pelo menos dois dos seguintes itens:

- a) comprometimento acentuado no uso de comportamentos não-verbais múltiplos, tais como contato visual, expressão facial, postura corporal e gestos para regular a interação social.
- b) fracasso em desenvolver relacionamento de pares apropriados para o nível de desenvolvimento.
- c) ausência de tentativas espontâneas de compartilhar prazer, interesses ou realizações com outras pessoas, por exemplo: não mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse.
- d) ausência de reciprocidade social ou emocional.

2. Marcante comprometimento na comunicação, manifestada por pelo menos um dos seguintes itens:

- a) atraso ou ausência total de desenvolvimento da linguagem oral, sem ocorrência de tentativas de compensação através de modos alternativos de comunicação, tais como gestos ou mímicas.
- b) em indivíduos com fala preservada, acentuado comprometimento em iniciar ou manter uma conversa com outras pessoas.
- c) uso estereotipado e repetitivo da linguagem ou linguagem idiossincrática.
- d) ausência de jogos imaginativos espontâneos ou brincadeiras de imitação social (faz de conta).

3. Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes itens:

- a) obsessão por um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse que seja anormal tanto em intensidade quanto em foco.
- b) adesão aparentemente inflexível a rotinas ou rituais não funcionais específicos.
- c) maneirismos motores estereotipados e repetitivos, por exemplo: agitação ou torção das mãos ou dedos, ou movimentos corporais complexos.
- d) obsessão por partes de objetos.

B. Atraso ou funcionamento anormal em pelo menos uma das seguintes áreas, com início antes dos 3 anos de idade:

- 1. interação social.
- 2. linguagem usada na comunicação social.
- 3. ação simbólica ou imaginária.

C. O transtorno não é melhor classificado como transtorno de Rett ou transtorno desintegrativo da infância.

Quadro 2 – Critérios diagnósticos para transtorno de Asperger segundo DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000).

- A. Comprometimento na interação social, manifestado por pelo menos dois dos seguintes itens:
- a) comprometimento acentuado no uso de comportamentos não-verbais múltiplos, tais como contato visual, expressão facial, postura corporal e gestos para regular a interação social.
  - b) fracasso em desenvolver relacionamento de pares apropriados para o nível de desenvolvimento.
  - c) ausência de tentativas espontâneas de compartilhar prazer, interesses ou realizações com outras pessoas, por exemplo: não mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse.
  - d) ausência de reciprocidade social ou emocional.
- B. Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes itens:
- a) obsessão por um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse que seja anormal tanto em intensidade quanto em foco.
  - b) adesão aparentemente inflexível a rotinas ou rituais não funcionais específicos.
  - c) maneirismos motores estereotipados e repetitivos, por exemplo: agitação ou torção das mãos ou dedos, ou movimentos corporais complexos.
  - d) obsessão por partes de objetos.
- C. A perturbação causa comprometimento clinicamente importante nas áreas social e ocupacional ou outras áreas importantes para o desenvolvimento.
- D. Não existe um atraso geral clinicamente relevante na linguagem (utiliza palavras isoladas aos dois anos, frases comunicativas aos três anos).
- E. Não existe um atraso clinicamente importante no desenvolvimento cognitivo ou no desenvolvimento de habilidades de autocuidados próprios da idade, no comportamento adaptativo (outro que não na interação social) e na curiosidade acerca do ambiente na infância.
- F. Não são satisfeitos os critérios para outro Transtorno Global do Desenvolvimento ou Esquizofrenia.

Quadro 3 – Critérios diagnósticos para transtorno global do desenvolvimento não especificado segundo DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000).

Comprometimento grave e global do desenvolvimento da interação social recíproca ou de habilidades de comunicação verbal ou não-verbal, ou na presença de estereotipias de comportamento, interesses e atividades, sem que sejam satisfeitos os critérios para outro Transtorno Global do Desenvolvimento, Esquizofrenia, Transtorno de Personalidade Esquizotípica ou Transtorno de Personalidade Esquiva. Essa categoria inclui o Autismo Atípico – apresentações que não satisfazem os critérios para Transtorno Autista em vista da idade tardia de início, quadros com sintomatologia subliminar ou todas acima.

Quadro 4 – Critérios diagnósticos para Síndrome de Rett segundo DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000)

A. Todos os itens a seguir

- (1) Desenvolvimento prenatal e perinatal aparentemente normal
- (2) Desenvolvimento psicomotor aparentemente normal durante os primeiros 5 meses de vida
- (3) Perímetro cefálico normal ao nascimento

B. Início de todos os seguintes sintomas após o período de desenvolvimento normal

- (1) Desaceleração do crescimento da cabeça entre 5 e 48 meses
- (2) Perda de habilidades motoras previamente adquiridas entre 5 e 30 meses com desenvolvimento subsequente de maneirismos estereotipados (ex. movimento de lavar as mãos)
- (3) Perda de contato social precoce (embora geralmente recuperado mais tarde)
- (4) Aparecimento de marcha ou movimentos de tronco pouco coordenados
- (5) Desenvolvimento de retardo psicomotor grave com comprometimento na linguagem expressiva e receptiva

## **10.2 ANEXO II**

Aprovação ética e termo de consentimento livre e esclarecido



**10.3 ANEXO III**  
Protocolo de pesquisa

**LISTA DE VERIFICAÇÃO**

**Paciente** \_\_\_\_\_

1 - Termo de Consentimento

2 - Identificação

3 - Avaliação Sócio-Econômica

4 - Anamnese

5 - História Familiar e Heredograma

6 – ASQ

ESCORE: \_\_\_\_\_

8 – ATA

ESCORE: \_\_\_\_\_

9 – CARS

<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>	<b>XI</b>	<b>XII</b>	<b>XIII</b>	<b>XIV</b>	<b>XV</b>	<b>Total</b>

10 – ADI-R

11 – Teste QI

12- Coleta de sangue

- Filho \_\_\_\_\_

- Mãe \_\_\_\_\_

- Pai \_\_\_\_\_

13 - Saliva

- Filho

- Mãe

- Pai



## II – IDENTIFICAÇÃO

1- Número do caso  2 - Registro HCPA  Outro

Nome do paciente \_\_\_\_\_ 3- DN \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Endereço \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_ apt° \_\_\_\_  
Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_  
Nome da Mãe \_\_\_\_\_ DN \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Nome do Pai \_\_\_\_\_ DN \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Fones \_\_\_\_\_

4 – Data da entrevista : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### Dados do paciente:

5 – Sexo: 1 - Masculino; 2 – Feminino 6 – Idade: \_\_\_\_\_

7 - Nacionalidade: 1 - Brasileira; 2 - Estrangeira; Especifique local: \_\_\_\_\_

8 – Procedente: 1- capital RS; 2 - região metropolitana; 3 - interior RS; 4 - outras: \_\_\_\_\_

9 – Tem irmãos gêmeos? 1 - sim; 2 - não; 9 - não sabe

10 – É adotado? 1 - sim; 2 - não; 9 - não sabe

11 – Tem irmãos afetados? 1 - sim; 2 - não; 9 - não sabe

12 – Atualmente é atendido por alguma instituição?

1 - APAE; 2 - Escola Especial ou outra instituição pública; 3 - Escola Especial ou outra instituição privada; 4 - AMA; 5 - Não recebe atendimento. Nome da escola \_\_\_\_\_

13 – Já foi atendido alguma vez no Hospital de Clínicas de P. Alegre? 1 - sim; 2 - não; 9 - não sabe

14 – Etnia: 1 - européia, 2 - africana, 3 - asiático; 4 - ameríndia; 5 - mestiço, especifique: \_\_\_\_\_

15 – Cor: 1 - branca, 2 - negra, 3 - parda, 4 - outra, especifique \_\_\_\_\_

16– Encaminhado por: 1 - clínicas privadas; 2 - HCPA; 3 - outros hospitais; 4 - APAEs; 5 - escola especial;

17 – DNPM até 1 ano: (chegar idade normal de: firmar a cabeça (3 meses) ; sentar com apoio ( 5 meses) ; sentar sem apoio (6 meses) ; engatinhar (7-8 meses) ; ficar em pé com apoio (9-10 meses) ; ficar em pé sem apoio (12 meses) ; caminhar com apoio (12-13 meses) ; caminhar sem apoio (12-14 meses): 1 – normal; 2 – alterado; 3 – duvidoso; 9 – não sabe.

18 – Etiologia do TGD: 1 – idiopático; 2 – secundário a síndromes genéticas; 3 – mesopatias (asfixia, TORCH, etc); 4 – alterações lesionais; 5 – lesões pós-natais (hipoglicemia neonatal, infecção no SNC, traumatismo craniano, etc), 6 - epilepsia refratária; 7 – malformação no SNC; 8- malformações congênitas; 10 – dismorfias ; 9 – não se sabe, ainda.

19 – Perímetro cefálico atual: \_\_\_\_\_ 20 – Altura atual: \_\_\_\_\_

21 – Peso atual: \_\_\_\_\_



### III – AVALIAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA

**Dados dos pais:**

**22 - Situação conjugal:** 1 - casados; 2 - solteiros; 3 - separados/divorciados; 4 - viúva(o); 9 - NSA

**23 – Se pais separados:** 1 - guarda com a mãe; 2 - guarda com o pai; 3 - outro parente; 9 - NSA

**24 - Renda Familiar:** \_\_\_\_\_ (em salários mínimos: \_\_\_\_\_)

**25 - Idade do pai** (anos) \_\_\_\_\_

**26 - Idade da mãe** (anos) \_\_\_\_\_

**27- Grau instrução pai** (anos estudo) \_\_\_\_\_

**28 - Grau instrução mãe** (anos estudo): \_\_\_\_\_

**29 - Ocupação do Pai:** 1 - estudante; 2 - c/ocupação; 3 - s/ocup (não aposentado); 4 - do lar; 5 - aposentado; 6 - aposentado por doença, especificar: \_\_\_\_\_

**30 - Ocupação da Mãe:** 1 - estudante; 2 - c/ocupação; 3 - s/ocup (não aposentado); 4 - do lar; 5 - aposentada; 6 - aposentada por doença, especificar: \_\_\_\_\_

O critério ABIPEME é baseado na soma de pontos, conforme segue. Basta somar os pontos obtidos após a verificação de duas informações: a) grau de instrução do **chefe da família (pessoa que traz renda para a família do paciente)** + b) itens de conforto da família.

a) Instrução do chefe da família	ABIPE ME
Analfabeto primário incompleto	0
primário completo ginásial incompleto	5
ginásial completo colegial incompleto	10
colegial completo superior incompleto	15
superior completo	21

Itens de conforto familiar - critério ABIPEME							
b) Itens de posse	Não tem	Quantidade possuída					
		1	2	3	4	5	6 e+
Automóvel	0	4	9	13	18	22	26
Televisor em cores	0	4	7	11	14	18	22
Banheiro	0	2	5	7	10	12	15
Empregada mensalista	0	5	11	16	21	26	32
Rádio (excluindo o do carro)	0	2	3	5	6	8	9
Máquina de lavar roupa	0	8	8	8	8	8	8
Vídeo cassete	0	10	10	10	10	10	10
Aspirador de pó	0	6	6	6	6	6	6
Geladeira comum ou com freezer	0	7	7	7	7	7	7

**31- Classe Social:**

1 - Classe A [89 ou + pontos]

2 - Classe B [59 a 88 pontos]

3 - Classe C [35 a 58 pontos]

4 - Classe D [20 a 34 pontos]

5 - Classe E [0 a 19 pontos]



**IV – ANAMNESE**

Nome do paciente \_\_\_\_\_

**História e dados clínicos:**

**32 – Quantos meses de vida tinha seu filho quando você desconfiou que o comportamento dele era estranho (Idade de início dos sintomas) ? \_\_\_\_\_**

**33 – O início dos sintomas aconteceu após algum trauma físico ou doença? (meningite, queda, concussão, choque elétrico)?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe. (idade \_\_\_\_\_)

**34 – Qual a idade do seu filho quando recebeu o primeiro diagnóstico de autismo, traços autistas ou transtorno global do desenvolvimento? : \_\_\_\_\_**

**35 – Qual foi o tipo de diagnóstico:** 1 - Autismo; 2 – Síndrome de Asperger, 3 – Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação; 4 – Traços autistas; 5 – Síndrome de Rett; 6 – Transtorno Desintegrativo da infância; 9 – não se sabe, ainda.

**36 – Seu filho fez teste de X-Frágil?** 1 – sim, resultado negativo; 2 – sim, resultado positivo; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**37 – Seu filho fez teste de Cariótipo?** 1 – sim, resultado normal; 2 – sim, resultado alterado; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**38 – Seu filho fez a Triagem de Erros Inatos do Metabolismo?** 1 – sim, resultado normal; 2 – sim, resultado alterado; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**39 – Seu filho tem diagnóstico de alguma síndrome?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe. (\_\_\_\_\_)

**40– Onde seu filho recebe tratamento médico?** 1 – HCPA; 2 – outros estabelecimentos da rede pública de saúde da Capital; 3 – rede pública de saúde da região metropolitana; 4 – rede pública do interior; 5 – recebe atendimento privado (particular); 6 – não recebe atendimento médico; 9 – não sabe.

**41 – Seu filho recebe algum tratamento de estimulação psico-pedagógica (psicólogos, fonoaudiólogos, terapia ocupacional ou educação especial)?** 1 – sim; 2 – não; 3 – já recebeu, mas não recebe mais; 9 – não sabe.

**42 – Caso tenha recebido a estimulação acima citada, qual a idade de início do tratamento e fim do tratamento (período de tempo de tratamento)? \_\_\_\_\_**

**43 – Identifique comportamentos do seu filho ANTES de iniciar o uso de medicações neurológicas:** 1 – convulsões; 2 – epilepsia; 3 – hiperatividade; 4 – agressividade com os outros; 5 – agressividade consigo mesmo; 6 – ataques de pânico; 7 – troca de humor muito fácil; 8 – problemas para se alimentar; 9 – problemas para dormir; 10 – movimentos estranhos e repetitivos; 11 – ecolalia (repete a mesma palavra ou frases); 12 – intolerância ao toque; 13 - outros; 14 – não apresentava nada; 99 – não sabe.

**44 – Qual a idade de seu filho quando ele começou a usar medicações neurológicas?** \_\_\_\_\_

**45 – Marque os medicamentos já usados**

Medicações (nome comercial)	Idade de início do uso e tempo de uso	Escore de melhora*
1 – fenobarbital (gardenal)		EC 0 1 2 3
2 – carbamazepina (tegretol)		EC 0 1 2 3
3 – ácido valpróico (epilenil, depakene)		EC 0 1 2 3
6 – haloperidol (haldol)		EC 0 1 2 3
7 – levomepromazina (neozine, levozine)		EC 0 1 2 3
8 – propericiazina (neuleptil)		EC 0 1 2 3
9 – risperidona (risperdal)		EC 0 1 2 3
10 – clonidina (clonidil, atensina)		EC 0 1 2 3
11 – metilfenidato (ritalina, concerta)		EC 0 1 2 3
12 – clonazepam (rivotril, clonotril)		EC 0 1 2 3
13 – fluoxetina (daforin, prozac)		EC 0 1 2 3
14 –outra:		EC 0 1 2 3
		EC 0 1 2 3
15 – nunca usou medicação		
999 – não sabe		

\* Escore de melhora: EC – efeito colateral (vômitos, agitação, agressividade, sonolência, efeitos não desejados)

0 – sem melhora, 1 – pouca melhora, 2 – boa melhora, 3 – ótima melhora

**46– Seu filho apresenta algum tipo de alergia?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe.

**47 – Seu filho apresenta alergia por algum alimento?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe.

**48 – Seu filho é alfabetizado(a)?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe.

**Antecedentes gineco-obstetrícios:**

**49 – Você (mãe) tem alguma doença que necessite tratamento com medicação regular?**

1 – sim (qual doença: \_\_\_\_\_); 2 – não; 9 – não sabe.

**50 – Você teve algum aborto anterior?** 1 – sim, um aborto espontâneo; 2 – sim, um aborto induzido;

3 – sim, mais de um aborto espontâneo; 4 – sim, mais de um aborto induzido; 5 - não; 9 – não sabe.

**51 – Número de filhos:** \_\_\_\_\_ **Número de filhas:** \_\_\_\_\_

**52 – Ordem de nascimento do paciente:** \_\_\_\_\_

**53 – Você fez pré-natal da gestação do paciente?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe.

**54 – Resultado das ecografias:** 1 – normal; 2 – alterado; 3 – não fez, 9 – não sabe;.

**55 – Se houve alteração na ecografia, quando foi detectado?** 1 – 1º trimestre; 2 – 2º trimestre; 3 – 3º trimestre; 4 – não sabe; 5 – não houve alteração; 9 – não fez.

**56 – Foi realizado algum exame especial durante a gestação (Raio X, biópsia, amniocentese, etc)?**

1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe

**57 – Você tomou alguma bebida alcoólica durante a gestação?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe

**58 – Se sim, quantas doses em cada dia (1 dose - 1 lata cerveja ou 1 taça de vinho)?** \_\_\_\_\_

**59 – Se sim, quando?** 1 – 1º trimestre; 2 – 2º trimestre; 3 – 3º trimestre; 4 – toda a gestação; 5 – esporadicamente, durante toda a gestação; 6 – não sabe; 9 – não bebeu.

**60 – Você fumou durante a gestação?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe

**61 – Se sim, quantos cigarros por dia?** \_\_\_\_\_

**62 – Se fumou, quando?** 1 – 1º trimestre; 2 – 2º trimestre; 3 – 3º trimestre; 4 – toda gestação; 5 – não sabe; 9 – não fumou.

**63 – Marque as ocorrências da sua gestação na tabela seguinte:**

	Ocorrências	Período de ocorrência na gravidez (semanas ou meses)	Medicamentos utilizados
2	sangramento		
3	diabete gestacional		
4	rubéola, sarampo, caxumba, toxoplasmose ou citomegalovírus		
5	sífilis ou outras doenças venéreas		
7	pressão alta		
9	outras (especifique)		
10	Sem ocorrências		
999	Não sabe		

**64 – Marque outras substâncias usadas durante a gestação:**

	Substâncias	Período de uso na gravidez (semanas ou meses)
1	drogas de uso social (maconha, cocaína, etc)	
2	abortivos	
3	anticonvulsivantes	
4	drogas psicoativas (antidepressivos, ansiolíticos, etc)	
5	tratamento dermatológico (ácido retinóico, etc)	
6	hormônios	
7	Outros (especifique)	
8	Não usou nada	
999	Não sabe	

**Antecedentes neonatais**

**65 – Duração da gestação do paciente:** 1 – menos q 37 semanas; 2 – 37-41 semanas (38 semanas = 9 meses); 3 – mais q 41 semanas; 9 – não sabe.

**66 – Tipo parto:** 1 – normal espontâneo; 2 - normal induzido; 3 – normal induzido + fórceps; 4 – normal induzido + fórceps + anestesia regional; 5 – cesária marcada; 6 – cesária de urgência; 7 – outro tipo (especifique): \_\_\_\_\_; 9 – não sabe.

**67 – Algum problema durante o parto?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe.

**68 – Peso do paciente ao nascimento:** \_\_\_\_\_ **69 – Comprimento ao nascimento:** \_\_\_\_\_

**70 – Perímetro cefálico ao nascimento:** \_\_\_\_\_

**71 - Nota Apgar 1º min:** \_\_\_\_\_ **72 – Nota Apgar 5º min:** \_\_\_\_\_

**73 - Indique se houve algum problema após o parto:**

1	Asfixia, hipóxia, aspiração de líquido, circular de cordão	8	Problema cardíaco
2	Infecção generalizada	9	Doença cirúrgica
3	Hipoglicemia neonatal	10	Outra:
4	Água com mecônio	11	Sem intercorrência
5	Convulsões	99	Não sabe

**74 – Foi necessária alguma intervenção de emergência especial após o nascimento (oxigênio, cirurgia, antibióticos, soro)?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe. Especificar a intervenção: \_\_\_\_\_

---

**75 – Quantos dias de internação do bebê após o parto?** \_\_\_\_\_

**76 – O paciente fez o Teste do Pezinho?** 1 – sim; 2 – não; 9 – não sabe

**77 – Foi realizado exame Eletro Encéfalo Grama (EEG) ?** 1 – sim; 2 – não; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**78 – Quantos exames EEG foram realizados?** \_\_\_\_\_

**79 – Qual o resultado do primeiro exame EEG realizado?** 1 – normal; 2 – alterado; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**80 – Qual era a idade do paciente no primeiro exame EEG?** \_\_\_\_\_

**81 – Qual o resultado do último exame EEG realizado?** 1 – normal; 2 – alterado; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**82 – Qual era a idade do paciente no último exame EEG?** \_\_\_\_\_

**83 – Foi realizada Tomografia Computadorizada (TC)?** 1 – normal; 2 – alterado; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**84 – Qual era a idade do paciente no último exame TC?** \_\_\_\_\_

**85 – Foi realizada Ressonância Magnética (RM)?** 1 – normal; 2 – alterado; 3 – não fez; 9 – não sabe.

**86 – Qual era a idade do paciente no último exame RM?** \_\_\_\_\_

**87 – Idade das primeiras palavras (meses):** \_\_\_\_\_

**88 – Idade das primeiras frases (meses):** \_\_\_\_\_

**89 – Houve regressão no desenvolvimento ou a criança sempre foi atrasada em relação às outras crianças da mesma idade?** 1 – sempre foi atrasada; 2 – houve regressão; 9 – não sabe

**90 – Se houve regressão, a partir de que idade (meses)?** \_\_\_\_\_

**OBS**



## V – HISTÓRIA FAMILIAR E HEREDOGRAMA

Nome do paciente \_\_\_\_\_

**91 - Consangüinidade:** 1 - sim (especifique): \_\_\_\_\_ 2 – não; 9 - não sabe

**HEREDOGRAMA:** Desenhar toda a família, com os tios e os avós e tios-avós da criança. Identificar no desenho os indivíduos afetados, com o número correspondente da lista.

1 – Abortos espontâneos
3 - Autismo
4 – Asperger
5 – Transtorno Global do desenvolvimento não específico
6 - Rett
7 – Retardo mental
8 – hiperatividade (cuidado com os critérios)
9 – malformações físicas (lábio leporino, membros deformados)
10 – malformações do SNC (macro, micro, hidrocefalia)
11 – Síndrome de Down
12 – X-frágil
13 – doenças hereditárias, doenças genéticas (síndromes)
14 – doenças metabólicas (alimentação especial)
15 – epilepsia (convulsões repetitivas com tratamento)
16 – depressão (cuidado com os critérios)
17 – suicídio ou tentativa de
18 – alcoolismo (cuidado com os critérios)
19 – dependência de drogas
20 – esquizofrenia
21 – internação em hospital psiquiátrico
22 – comportamento violento
24 - outros

**VI – ASQ (Autism Screening Questionnaire)**

**1- Número do caso**  **2 - Registro HCPA**  **Outro**

**Nome do paciente** \_\_\_\_\_ **DN** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Por favor, responda cada questão e assinale o quadrado com a resposta. Se você não estiver seguro, escolha a melhor resposta. [Os pronomes ele/o estão sendo usados aqui, apenas para facilitar o questionário].

- |    |  | Sim                      | Não                      |
|----|--|--------------------------|--------------------------|
| 1  | Ele é capaz de conversar usando frases curtas ou sentenças?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|    | <u>Se não, prossiga para questão 9.</u>  |                          |                          |
| 2  | Ele fala com você só para ser simpático (mais do que para obter algo)?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3  | Você pode ter um diálogo (por exemplo, ter uma conversa com ele que envolva alternância, isto é, um de cada vez) a partir do que você disse?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4  | Ele usa frases estranhas ou diz algumas coisas repetidamente da mesma maneira? Isto é, ele copia ou repete qualquer frase que ele ouve outra pessoa dizer, ou ainda, ele constrói frases estranhas?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5  | Ele costuma usar socialmente perguntas inapropriadas ou declarações? Por exemplo, ele costuma fazer perguntas pessoais ou comentários em momentos inadequados?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6  | Ele costuma usar os pronomes de forma invertida, dizendo você ou ele quando deveria usar eu?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7  | Ele costuma usar palavras que parece ter inventado ou criado sozinho, ou usa maneiras estranhas, indiretas, ou metafóricas para dizer coisas? Por exemplo, diz “chuva quente” ao invés de vapor.   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8  | Ele costuma dizer a mesma coisa repetidamente, exatamente da mesma maneira, ou insiste para você dizer as mesmas coisas muitas vezes?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9  | Existem coisas que são feitas por ele de maneira muito particular ou em determinada ordem, ou seguindo rituais que ele te obriga fazer?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10 | Até onde você percebe, a expressão facial dele geralmente parece apropriada à situação particular?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 11 | Ele alguma vez usou a tua mão como uma ferramenta, ou como se fosse parte do próprio corpo dele (por exemplo, apontando com seu dedo, pondo a sua mão numa maçaneta para abrir a porta)?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 12 | Ele costuma ter interesses especiais que parecem esquisitos a outras pessoas (e.g., semáforos, ralos de pia, ou itinerários de ônibus)?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 13 | Ele costuma se interessar mais por partes de um objeto ou brinquedo (e.g., girar as rodas de um carro), mais do que usá-lo com sua função original?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 14 | Ele costuma ter interesses específicos, apropriados para sua idade e para seu grupo de colegas, porém estranhos pela intensidade do interesse (por exemplo, conhecer todos os tipos de trens, conhecer muitos detalhes sobre dinossauros)? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 15 | Ele costuma de maneira estranha olhar, sentir/examinar, escutar, provar ou cheirar coisas ou pessoas?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 16 | Ele costuma ter maneirismos ou jeitos estranhos de mover suas mãos ou dedos, tal como “um bater de asas” ( <i>flapping</i> ), ou mover seus dedos na frente dos seus olhos?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## *Estudo de fatores de risco para os Transtornos do Espectro Autista*

- |   | Sim                      | Não                      |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 17 Ele costuma fazer movimentos complexos (e esquisitos) com o corpo inteiro, tal como girar, pular ou balançar repetidamente para frente e para trás?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 18 Ele costuma machucar-se de propósito, por exemplo, mordendo o braço ou batendo a cabeça?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 19 Ele tem algum objeto (que não um brinquedo macio ou cobertor) que ele carrega por toda parte?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 20 Ele tem algum amigo em particular ou um melhor amigo?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 21 Quando ele tinha 4-5 anos ele repetia ou imitava espontaneamente o que você fazia (ou a outras pessoas) (tal como passar o aspirador no chão, cuidar da casa, lavar pratos, jardinagem, consertar coisas)? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 22 Quando ele tinha 4-5 anos ele apontava as coisas ao redor espontaneamente apenas para mostrar coisas a você (e não porque ele as desejava)?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 23 Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava usar gestos para mostrar o que ele queria (não considere se ele usava tua mão para apontar o que queria)?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 24 Quando ele tinha 4-5 anos usava a cabeça pra dizer sim?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 25 Quando ele tinha 4-5 anos sacudia a sua cabeça para dizer ‘não’?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 26 Quando ele tinha 4-5 anos ele habitualmente olhava você diretamente no rosto quando fazia coisas com você ou conversava com você?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 27 Quando ele tinha 4-5 anos sorria de volta se alguém sorrisse para ele?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 28 Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava mostrar coisas de seu interesse para chamar a sua atenção?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 29 Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava dividir coisas com você, além de alimentos?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 30 Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava querer que você participasse de algo que o estava divertindo?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 31 Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava tentar confortá-lo se você ficasse triste ou magoado?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 32 Entre as idades de 4 a 5 anos, quando queria algo ou alguma ajuda, costumava olhar para você e fazia uso de sons ou palavras para receber sua atenção?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 33 Entre as idades de 4 a 5 anos tinha expressões faciais normais, isto é, demonstrava suas emoções por expressões faciais?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 34 Quando ele estava com 4 ou 5 anos ele costumava participar espontaneamente e/ou tentava imitar ações em jogos sociais – tais como “Polícia e Ladrão” ou “Pega-Pega”?                                       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 35 Quando ele estava com 4 ou 5 anos jogava jogos imaginários ou brincava de “faz de conta”?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 36 Quando ele estava com 4 ou 5 anos parecia interessado em outras crianças da mesma idade que ele não conhecia?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 37 Quando ele estava com 4 ou 5 anos reagia positivamente quando outra criança aproximava-se dele?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 38 Quando ele estava com 4 ou 5 anos, se você entrasse no quarto e iniciasse uma conversa com ele sem chamar seu nome, ele habitualmente te olhava e prestava atenção em você?                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 39 Quando ele estava com 4 ou 5 anos ele costumava brincar de “faz de conta” com outra criança, de forma que você percebia que eles estavam entendendo ser uma brincadeira?                                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 40 Quando ele estava com 4 ou 5 anos ele brincava cooperativamente em jogos de grupo, tal como esconde-esconde e jogos com bola?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

