



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Patrícia Pereira do Nascimento

Polimorfismos dos genes *ADA* e *CNTNAP2* em indivíduos com
Transtornos do Espectro do Autismo

São José do Rio Preto - SP

2014

Patrícia Pereira do Nascimento

Polimorfismos dos genes *ADA* e *CNTNAP2* em indivíduos com
Transtornos do Espectro do Autismo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett-Conte

São José do Rio Preto - SP

2014

Nascimento, Patrícia Pereira do.

Polimorfismos dos genes ADA e CNTNAP2 em indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo / Patrícia Pereira do Nascimento. -- São José do Rio Preto, 2014

90 f. : il., tabs.

Orientador: Agnes Cristina Fett-Conte

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Polimorfismo (Genética) 3. Autismo. 4. Transtornos do espectro do autismo. 5. Genes. 6. Predisposição genética para doença. I. Fett-Conte, Agnes Cristina. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Patrícia Pereira do Nascimento

Polimorfismos dos genes *ADA* e *CNTNAP2* em indivíduos com
Transtornos do Espectro do Autismo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Agnes Cristina Fett-Conte
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
UNESP- São José do Rio Preto

Dra. Karina Griesi Oliveira
USP- São Paulo

São José do Rio Preto
20 de fevereiro de 2014

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), com auxílio na forma de bolsa de estudos CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais, Vera Lúcia e Paulo Alexandre, e a minha irmã Carolina, por estarem sempre ao meu lado em minhas escolhas e por serem torcedores fiéis de minhas conquistas como em mais esta importante etapa da minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por iluminar e guiar meus passos e minhas escolhas.

Á minha família, em especial aos meus pais Vera Lúcia e Paulo Alexandre pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão. Agradeço também à minha irmã Carolina pelo incentivo e por estar ao meu lado em todos os momentos essenciais da minha vida.

Á minha orientadora Profa. Dra Agnes Cristina Fett-Conte pela confiança, oportunidade, paciência e ensinamentos, por acreditar no meu crescimento e contribuir significativamente no desenvolvimento do meu pensamento crítico e visão científica, além da amizade construída e os momentos de cumplicidade.

Ás famílias dos pacientes que aceitaram a participar do estudo pela confiança depositada e pelo tempo disponível. Agradeço também as Instituições participantes e aos profissionais da educação e da saúde que contribuíram de alguma forma, em especial Dra. Simone Secco da Rocha e Dr. Antônio Richieri Costa.

Á minha eterna coorientadora Ana Luiza pela dedicação e paciência em ensinar e dividir comigo suas experiências, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional, pela amizade e pelos momentos únicos, exaustivos, divertidos e de muita aprendizagem que passamos juntas.

Ao meu companheiro Dante pelos momentos de aprendizagem, pela amizade construída e por estar sempre disposto a ajudar e aprender. Agradeço também aos meus companheiros de laboratório Fernanda pela amizade desde o início dessa caminhada, a Paula Curi pela companhia nos almoços e momentos inacabáveis de bancada, à Camila pelas conversas e conselhos, a Andréa, Brazilina, Cristina, Paula e Valéria pelos ensinamentos e lições de vida. Agradeço todos por dividir comigo momentos inesquecíveis ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr Luis Carlos de Mattos e Profª Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos pelo suporte na realização de parte dos meus experimentos moleculares. Agradeço também todos os integrantes do Laboratório de Imunogenética – FAMERP em especial aos técnicos Aparecida e Márcio pelo suporte, e as alunas de pós graduação Cássia e Fabiana.

Aos amigos da faculdade que dividiram comigo o início de um sonho e que de alguma forma fizeram parte de mais esta etapa da minha vida. Agradeço em especial ao Raduan, Marcela T, Rebecca, Guilherme S, Mariana T, Tales Augusto, Tarciso e Willian. Agradeço também aos amigos que fiz ao longo da Pós Graduação Gisele, Lidiane e Gustavo Capetti, por estarem sempre dispostos a dividir comigo seus conhecimentos.

Ao meu namorado e fiel companheiro Édis Belini Junior, pela amizade, paciência, carinho e dedicação, pelas experiências divididas, pelos momentos de aprendizagem, trabalho e diversão, e por estar sempre ao meu lado em minhas escolhas, motivando o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e Dra. Karina Griesi Oliveira por aceitarem participar desta etapa conclusiva e contribuir com o enriquecimento deste trabalho.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, onde foi possível iniciar meus conhecimentos científicos.

Ao programa de Pós Graduação em Genética – IBILCE / UNESP, assim como todos os professores, alunos e funcionários que contribuíram de alguma forma para minha formação.

E por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudo concedida.

“Tudo que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite nele “

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) são afecções neuropsiquiátricas graves que se caracterizam por dificuldades, de início precoce, no domínio da comunicação social, por comportamentos atípicos, repetitivos e interesses restritos. Em cerca de 10 a 25% dos casos a etiologia pode ser esclarecida, o que reflete a natureza complexa e heterogênea da doença. Embora diversos fatores ambientais estejam relacionados com a etiopatogenia, muitos estudos, inclusive com gêmeos, mostram que a participação dos fatores genéticos é inequívoca. A literatura tem revelado, de maneira progressiva, muitos genes e variantes genéticas relacionados com a predisposição a estas afecções. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido considerados marcadores genéticos de predisposição a várias doenças complexas, o que sugere que também podem estar relacionados aos TEA. Há referências da associação de variantes comuns do gene sináptico *CNTNAP2* com diferentes fenótipos neuropsiquiátricos e alterações no desenvolvimento da linguagem. SNPs do gene *ADA*, envolvido em neurotransmissão e metabolismo das purinas, também já foram associados a uma diminuição de atividade enzimática e predisposição ao fenótipo autista. Este estudo objetivou avaliar SNPs destes dois genes em autistas e controles, para investigar uma possível associação com o fenótipo comportamental. Foram avaliados dois SNPs (rs7794745 e rs2710102) do gene *CNTNAP2* e o SNP G22A do gene *ADA*, genotipados em 210 indivíduos com TEA idiopático e em 200 indivíduos controles. A análise molecular foi feita por reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Para análise estatística foi adotado nível de significância de 5%. Os resultados revelaram associação entre o SNP rs7794745 (OR=1,802, IC95%=1,054-3,083, p=0,042) em homozigose (TT) com a predisposição aos TEA na população estudada. Os indivíduos do sexo masculino afetados também mostraram uma frequência significativamente maior deste polimorfismo (p=0,021), quando comparados aos homens do grupo controle. Para nenhum dos outros SNPs estudados foi encontrada evidências de associação com TEA. No entanto, é importante que estas investigações sejam realizadas em casuísticas maiores, envolvendo indivíduos de diferentes regiões do país.

Palavras chave: Autismo; polimorfismos genéticos; genes; predisposição; *CNTNAP2*; *ADA*.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASD) are severe neuropsychiatric disorders characterized by difficulties with early onset, in the field of social communication, atypical behaviors, restricted and repetitive interests. In about 10-25% of cases the etiology can be clarified, which reflects the complex and heterogeneous nature of the disease. Although several environmental factors are related to the pathogenesis, many studies, including twins, have showed that the involvement of genetic factors is clear. The literature has revealed, progressively, many genes and genetic variants related to the predisposition to these disorders. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been considered genetic markers of predisposition to various diseases complex, suggesting that can also be related to ASD. There are references of association the common variants of the *CNTNAP2* synaptic gene with different neuropsychiatric phenotypes and changes in language development. SNPs of *ADA* gene, involved in neurotransmission and metabolism of purines, have also been associated with a decrease in enzyme activity and predisposition to autism phenotype. This study aimed to evaluate SNPs of these two genes in autistic patients to investigate a possible association with the behavioral phenotype. It was evaluated two SNPs (rs7794745 and rs2710102) of the *CNTNAP2* gene and the SNP G22A of the *ADA* gene, genotyped in 210 individuals with idiopathic ASD and 200 control subjects. Molecular analysis was performed by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). A 5% alpha error was considered significant in statistical analysis. The results revealed association between the SNP rs7794745 (OR = 1.802; 95%CI = 1.054 - 3.083; p = 0.042) in homozygous (TT) with predisposition to ASD at our study population. Affected individuals males also showed a significantly higher frequency of this polymorphism (p = 0.021) compared to men in the control group. For none of the other SNPs studied was found evidence of association with ASD. However, it is important and required these investigations in larger samples, involving individuals from different regions of the country.

Palavras chave: Autism; genetic polymorphisms; genes; predisposition; *CNTNAP2*; *ADA*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Principais características clínicas (setas pretas) e sintomas observados em indivíduos com TEA. As linhas vermelhas definem a gravidade (baixa no centro e maiores em direção á periferia). As cores representam a combinação das características clínicas (HUGUET; EY; BOURGERON, 2013, *adaptado*).....18
- Figura 2** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 6% correspondente a análise da amplificação do gene *FMRI*. Marcação com Ladder de 100pb na coluna (L) confirma o tamanho esperado das bandas de controle interno (223pb) e de expansão da trinca CGG (600pb) que caracteriza a ausência da mutação nos quatro indivíduos do sexo masculino (colunas 1-4).....33
- Figura 3** Perfil eletroforético em gel de agarose a 3,0%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para SNP rs7794745. Amostras 5 e 6 – heterozigotos (AT); Amostras 1 e 7 - homozigotos para o SNP (TT) – Amostras 2,3 e 4 homozigotas para o alelo selvagem (AA). L = marcador molecular de 100pb.....35
- Figura 4** Perfil eletroforético em gel de agarose a 3,0%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para SNP rs2710102. Amostras 1,2 e 6 – heterozigotos (CT); Amostras 3 e 4- homozigotos para o SNP (CC) – Amostras 5 homozigotos para o alelo selvagem (TT). L = marcador molecular de 100pb.....37
- Figura 5** Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para SNP G22A. Amostra 4 – heterozigotos (GA); Amostras 1,2,3,5 e 6 homozigotos para o alelo selvagem (GG). L = marcador molecular de 100pb.....38

Figura 6 Metáfase em bandamento GTG do indivíduo com Síndrome de Klinefelter. Os cromossomos circulos em vermelho representam o par de cromossomos X e o círculo azul delimita o cromossomo Y.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos <i>primers</i> f, Eag-L e Eag-U utilizados na amplificação para análise de mutação do gene <i>FMRI</i>	32
Tabela 2	Fragmentos originados na reação de PCR para mutação completa do gene <i>FMRI</i> , <i>primers</i> utilizados e classificação dos resultados.....	32
Tabela 3	Sequência dos <i>primers</i> , tamanho dos fragmentos originados, e enzimas de restrição utilizadas para reações de PCR-RFLP dos diferentes SNPs.....	34
Tabela 4	Frequências genóticas e alélicas do SNP rs7794745 em indivíduos com diagnóstico de TEA e indivíduos controles.....	42
Tabela 5	Frequências alélicas e genóticas do SNP rs2710102 em indivíduos com diagnóstico de TEA e indivíduos controles.....	43
Tabela 6	Frequências genóticas e alélicas do SNP G22A em indivíduos com diagnóstico de TEA e indivíduos controles.....	44
Tabela 7	Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos em indivíduos do sexo masculino com TEA e controles.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADA	do inglês, <i>Adenosine Deaminase</i>
Caspr2	proteína tipo 2 associada à Contactina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID-10	10ª edição da Classificação Internacional de Doenças
CNTNAP2	do inglês, <i>Contactin-associated protein-like 2</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>desoxirribonucleic acid</i>
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DSM-5	5ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria
DSM-IV	4º Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria
e cols	e colaboradores
EDTA	ácido etinoadiaminotetracético
et al.	e outros
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FRAXA	Síndrome do Cromossomo X Frágil
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina
GWAS	do inglês, <i>Genome-wide Association Studies</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
PBS	Tampão salino fosfato, do inglês <i>phosphate buffer solution</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEA	Transtornos do Espectro do Autismo
TID-SOE	Transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem Outra Especificação
UV	ultra violeta
\bar{x}	média
s	desvio padrão
χ^2	qui-quadrado
>	maior
OR	do inglês, <i>Odds Ratio</i>
IC 95%	Intervalo de Confiança de 95%
V	volts
pb	pares de base
U/L	unidades por litro
mL	mililitros
mg/mL	miligramas por mililitros
μL	microlitros
mM	mili molar
ng/ μL	nanogramas por microlitros
$^{\circ}\text{C}$	graus celsius
M	molar
pM	pico molar
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Caracterização dos Transtornos do Espectro do Autismo	17
1.2 Etiologia	19
1.3 Gene CNTNAP2	20
1.4 Gene ADA	22
2. OBJETIVOS	27
Geral:.....	27
Específicos:	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Casuística	27
3.2 Métodos.....	28
3.2.1.1 Cultura de linfócitos e bandamento GTG convencional	29
3.2.2 Genotipagem dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs).....	33
3.2.2.1 Genotipagem do polimorfismo rs7794745 do gene <i>CNTNAP2</i>	34
3.2.2.2 Genotipagem do polimorfismo rs2710102 do gene <i>CNTNAP2</i>	35
3.2.2.3 Genotipagem do polimorfismo rs73598374 (G22A) do gene <i>ADA</i>	37
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	56
8. APÊNDICES	64
8.1 Apêndice A: Artigo à ser submetido a revista BMC Psychiatry (FI: 2,23) intitulado - Single nucleotide polymorphisms in the CNTNAP2 gene in Brazilian patients with Autism Spectrum Disorder.....	64
8.2 Apêndice B: Artigo à ser submetido intitulado “Polymorphism (G22A) frequency of Adenosine Deaminase gene in individuals with Autism Spectrum Disorders”	78
8.3 Apêndice C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - grupo controle	84
9. ANEXOS	87
9.1 Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (FAMERP).....	87
9.2 Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - grupo caso	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização dos Transtornos do Espectro do Autismo

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) são afecções neuropsiquiátricas que comprometem o comportamento do indivíduo. Caracterizam-se por manifestações de início precoce, percebidas antes dos três anos de idade, que afetam o domínio da comunicação social, impõem comportamentos atípicos, repetitivos e interesses restritos (CHUTHAPISITH; RUANGDARAGANON, 2011; LAURITSEN, 2013). A variabilidade dos sinais clínicos e a gama de diagnósticos diferenciais podem resultar em diagnóstico tardio, apenas na adolescência ou na idade adulta, e interferir no processo terapêutico, embora este envolva somente medidas paliativas e sintomáticas (FARAS; ATEEQI; TIDMARSH, 2010; LAURITSEN, 2013).

Entre os diagnósticos denominados de Transtornos do Espectro Autístico (TEA), considerados pela literatura até o ano de 2012, estavam o Autismo Infantil, a Síndrome de Asperger e o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem Outra Especificação (TID-SOE). Estes, juntamente com o Transtorno Desintegrativo da Infância e Síndrome de Rett, pertenciam a uma categoria maior denominada Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (*Pervasive Developmental Disorders - PDDs*) descrita na 4ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV) e na 10ª edição da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) (WHO, 1993; APA, 1994; APA, 2000; HOFVANDER et al., 2009; CHIAPPEDI et al., 2010).

No ano de 2013, a 5ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria (APA) retirou a Síndrome de Rett do espectro, assim como denominações particulares, e passou a considerar todos os quadros autísticos como pertencentes a uma única categoria denominada Transtornos do Espectro do Autismo (APA, 2013), considerada como sinônimo de autismo, agora não mais o Autismo Infantil, por muitos autores (SKUSE, 2012; LAURITSEN, 2013).

Estes distúrbios do comportamento formam um contínuo de manifestações caracterizadas pela variação dos sinais clínicos entre os indivíduos afetados e ao longo do seu desenvolvimento, o que lhes rende a designação de espectro (LORD et al., 2012). Há desde indivíduos muito comprometidos, com ausência de fala, deficiência intelectual grave e auto-

injúrias, até aqueles com quociente intelectual acima da média e linguagem correta, apesar de apresentarem prejuízos significativos na comunicação, como uso disfuncional da linguagem, e inadequação social (LOO; GRAHAM; HUGHES, 2009; PÉRISSE et al., 2010, LAURITSEN, 2013).

Também, o conjunto de sintomas e características dos indivíduos com TEA pode incluir outras condições como epilepsia, alterações no desenvolvimento motor, déficit de atenção, hiperatividade, ansiedade exacerbada, compulsões, alterações do sono e manifestações gastrointestinais (HUGUET; EY; BOURGERON, 2013; FERNELL; ERIKSSON; GILLBERG, 2013) (Figura1).



Figura 1: Principais características clínicas (setas pretas) e sintomas observados em indivíduos com TEA. As linhas vermelhas definem a gravidade (baixa no centro e maiores em direção à periferia). As cores representam a combinação das características clínicas (HUGUET; EY; BOURGERON, 2013, *adaptado*).

A prevalência de TEA é estimada em 1:150 nascidos vivos em todos os grupos étnicos e classes sociais de diferentes regiões do mundo, com prevalência quatro vezes maior em homens (NASSAR et al., 2009; CURRENTI, 2010). Entretanto, estimativas recentes sugerem 1:110 até 1:88 (ZACHOR, 2012; ANGELIDOU et al., 2012; ELSABBAGH et al., 2012).

Não está claro se há um aumento progressivo real da prevalência destas doenças ou se este aumento é resultante do maior volume de informações que atualmente a população em

geral e os profissionais da educação e da saúde têm recebido sobre os TEA, especialmente da mídia (LIU et al., 2010). Ainda, alguns autores acreditam que mudanças nos critérios de diagnóstico ou o seu estabelecimento cada vez mais precoce, é que tem levado à notificação de um número maior de casos (MIYAUCHI; VOINEAGU, 2013).

1.2 Etiologia

Mesmo com a utilização de todas as estratégias de investigação clínica e testes laboratoriais disponíveis até o presente momento, a etiologia dos TEA pode ser determinada em cerca de 10 a 25% dos casos. Esta frequência depende consideravelmente da seleção da casuística e das técnicas laboratoriais utilizadas (FERNELL; ERIKSSON; GILLBERG, 2013).

Embora muitos fatores ambientais estejam relacionados com a etiopatogenia da doença, como o efeito disruptivo do vírus da rubéola, da ingestão de álcool, ou exposição a anticonvulsivantes no período gestacional, a participação dos fatores genéticos é certa (HERBERT et al., 2006; CURRENTI, 2010; GHAZIUDDIN; AL-OWAIN, 2013). Estudos de recorrência familiar revelam altas taxas de concordância em gêmeos monozigóticos, que variam de 60 a 90%, enquanto que entre dizigóticos e irmãos não gêmeos, a taxa varia de 5 a 31% (BAILEY et al., 1995; HALLMAYER et al., 2011; HUGUET; EY; BOURGERON, 2013). A herdabilidade também já foi estimada entre 60 e 80% com base nos estudos de gêmeos (GESCHWIND, 2011; HALLMAYER et al., 2011).

Entretanto, para a maioria dos indivíduos (90%) com fenótipo autista não existe uma única causa genética ou ambiental conhecida, o que os define como não-sindrômicos ou "idiopáticos" (CAGLAYAN, 2010). Causas genéticas podem ser identificadas em 10-20% dos indivíduos com etiologia conhecida, sendo as mais frequentes a Síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA), presente em aproximadamente 2% dos casos, e a Esclerose Tuberosa, diagnosticada em cerca de 1% (MOESSNER et al., 2007; NEWBURY et al., 2009; BETANCUR, 2011). Alterações cromossômicas visíveis pela citogenética clássica são encontradas em 2 a 6% dos casos e entre as anormalidades mais frequentes estão as duplicações em 15q11-q13 e deleções em 2q37, 22q11.2 e 22q13.3 (KUMAR; CHRISTIAN, 2009; BREMER et al., 2011). A análise do cariótipo de todos os afetados e da presença da síndrome do Cromossomo X Frágil, caracterizada por mutações no gene *FMRI*, nos

indivíduos do sexo masculino, são recomendadas como parte básica do protocolo de investigação etiológica (SHEN et al., 2010, HANTASH et al., 2011).

Apesar da heterogeneidade e complexidade genética dos TEA, a literatura tem mostrado progresso significativo na identificação de genes relacionados à predisposição a estas afecções comportamentais (BETANCUR, 2011; PEÑAGARIKANO; GESCHWIND, 2012; MIYAUCHI; VOINEAGU, 2013). Muitos dos genes propostos como candidatos atuam no sistema nervoso central (SNC), particularmente na formação e atividade sináptica, e parecem convergir em vias neuronais relacionadas com a homeostase sináptica (HUGUET; EY; BOURGERON, 2013). Diversos autores têm reforçado que o estabelecimento adequado dos circuitos neurais é crucial para a formação do SNC e anormalidades no seu desenvolvimento podem resultar em doenças neurocomportamentais como os TEA (CUSCÓ et al., 2009; ABRAHAMS; GESCHWIND, 2010; PERCHE et al., 2010; YE; LIU; WU, 2010; MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012).

Descobertas recentes advindas de análises de genomas amplos (GWAS) permitiram a identificação de variantes comuns, como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), nos genes candidatos à predisposição aos TEA. Os SNPs têm sido considerados marcadores genéticos de muitas doenças complexas e a investigação destas variantes na predisposição pode auxiliar na identificação de agentes etiológicos de efeito isolado ou aditivo (JIAO et al., 2011; SCHERER; DAWSON, 2011; MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012)

1.3 Gene CNTNAP2

O gene sináptico *CNTNAP2* (OMIM 604569) ou *Contactin-associated protein-like 2*, mapeado na região cromossômica 7q35-36, é um dos maiores genes do genoma humano, com extensão de 2,5 a 3,3 Mb (ARKING et al., 2008; SAMPATH et al., 2013). É responsável por codificar a proteína “tipo 2 associada a Contactina” (Caspr2), uma proteína transmembrânica, membro da família de neuroxinas, que atuam como moléculas de adesão celular e receptores no SNC, promovendo interações célula-célula. Confinada especialmente em regiões dos axônios, Caspr2 tem expressão restrita nos neurônios, o que sugere seu papel na diferenciação e nos domínios funcionais destas estruturas (STEIN et al., 2011; WHALLEY et al., 2011; SAMPATH et al., 2013).

Variantes comuns do gene *CNTNAP2* têm sido associadas a diferentes fenótipos neuropsiquiátricos, alterações no desenvolvimento da linguagem e alterações na morfologia do cérebro, com achados que coincidem com aqueles descritos em casuísticas com TEA. Tais observações têm levado o gene *CNTNAP2* a ser considerado como um dos mais promissores no estudo da predisposição ao autismo (ALÁRCÓN et al., 2008; PEÑAGARIKANO; GESCHWIND, 2012; CIEMM von HOHENBERG et al., 2013).

Um estudo sobre o padrão de transmissão do alelo T (alelo de risco) entre os pais e os indivíduos com autismo revelou que o SNP rs7794745 (A/T), localizado no intron 2, está associado com o aumento do risco familiar para o autismo (ARKING et al., 2008). Também, estudos de neuroimagem estrutural já mostraram alterações volumétricas de regiões cerebrais, incluindo o córtex occipital e frontal, em indivíduos não autistas homocigotos para o alelo de risco T (TT). Estas regiões já foram descritas como frequentemente alteradas em autistas (ALÁRCÓN et al., 2008; TAN et al., 2010).

Outro estudo de neuroimagem também associou um segundo SNP, o rs2710102 (C/T) localizado no intron 13 do gene *CNTNAP2*, com diferenças nos níveis de ação e conectividade na região pré-frontal e cortical em indivíduos homocigotos para o alelo C (alelo de risco) (SCOTT-VAN ZEELAND et al., 2011). Também um estudo gráfico associou indivíduos saudáveis homocigotos (CC) com índices alterados de conectividade cerebral estrutural, refletida na alteração física das conexões entre as regiões cerebrais, o que altera as funções neurotransmissoras (DENNIS et al., 2011). O padrão anormal de conectividade encontrado nesses indivíduos homocigotos possibilita sugerir a participação dessa variante na associação com disfunções das habilidades de linguagem (VERNES et al., 2008), assimetria cortical e alterações no desenvolvimento da linguagem em autistas (HERBERT et al., 2005).

Ainda, em meio aos sinais autísticos, foi descrita associação do SNP em homocigose (CC) com endofenótipos como idade tardia à primeira palavra, especialmente em indivíduos do sexo masculino (ALÁRCÓN et al., 2008). O genótipo CC também já foi associado com distúrbio específico de linguagem em indivíduos sem qualquer comprometimento psiquiátrico (VERNES et al., 2008).

1.4 Gene ADA

Outro gene sugerido como candidato na predisposição aos TEA é o *ADA* (*adenosine deaminase* - OMIM 608958), mapeado em 20q13.12. É responsável por codificar a proteína adenosina desaminase, uma enzima do metabolismo das purinas e por modular a liberação de vários neurotransmissores, como glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina. Além da sua localização intracelular, a proteína encontra-se sobre a superfície de muitos tipos celulares, incluindo neurônios, onde atua como molécula de adesão celular, com papel importante na regulação do crescimento e plasticidade neuronal (DUTRA et al., 2010; GHAZIUDDIN; AL-OWAIN, 2013).

A hiperuricosúria (níveis elevados de ácido úrico), uma alteração no metabolismo das purinas, foi descrita em 11 a 28% dos casos de autismo, assim como frequências mais elevadas de erros no metabolismo das purinas em indivíduos com TEA (NOWELL et al., 1990; PAGE; COLEMAN, 2000). Embora a frequência do comportamento autístico em pacientes com doenças metabólicas não seja conhecida, os erros inatos do metabolismo estão entre as principais condições médicas associadas ao autismo (GHAZIUDDIN; AL-OWAIN, 2013).

O polimorfismo funcional do gene *ADA*, o rs73598374 (22G/A ou ADA*2), é resultado da substituição de uma asparagina (Asn, ADA alelo*1) por um ácido aspárgico (Asp, ADA alelo*2) no códon 8. O SNP originado, localizado no éxon1, traz como consequência a diminuição de 20-30% da atividade funcional quando na presença do alelo A, refletida entre os indivíduos com genótipo GA, quando comparados com indivíduos com genótipo GG (BOTTINI et al., 2001; DUTRA et al., 2010).

Em 1982, Stubbs e cols observaram uma diminuição da atividade sérica da adenosina desaminase em 18 crianças com autismo, comparadas com um grupo controle de 19 crianças sem alterações. Alguns estudos posteriores com famílias italianas observaram um aumento da frequência do alelo A entre indivíduos com fenótipo autístico, sugerindo que a presença do genótipo GA poderia estar associado com a predisposição à doença (PERSICO et al., 2000; BOTTINI et al., 2001) e à deficiência intelectual (SACCUCI, 2006). Entretanto, esta associação não foi observada em um estudo mais recente com famílias de autistas da América do Norte (HETTINGER et al., 2008). Assim, a relevância do gene ou de suas variantes na fisiopatologia dos TEA ainda não está esclarecida.

A hipótese científica testada no presente estudo é que algumas variantes polimórficas dos genes *CNTNAP2* e *ADA* podem ser mais frequentes em autistas, especialmente no sexo

masculino, no qual o distúrbio é mais prevalente e, assim, estar associados com predisposição ao fenótipo comportamental.

Entre os sugeridos no envolvimento com a predisposição ao autismo, os genes *CNTNAP2* e *ADA* são propostos como fortes candidatos e os polimorfismos dos mesmos que foram investigados neste trabalho, além de não estarem esclarecidos em TEA, ainda não haviam sido testados em casuísticas brasileiras.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Geral:

Estudar a frequência dos polimorfismos dos genes *ADA* e *CNTNAP2* em indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo idiopático para investigação da possível associação destes marcadores com os transtornos.

Específicos:

1. Investigar a frequência dos polimorfismos *rs2710102* e *rs7794745* do gene *CNTNAP2* em autistas e em controles normais;
2. Avaliar a frequência do polimorfismo *rs73598374* do gene *ADA* no grupo caso e no grupo controle;
3. Comparar a frequência dos polimorfismos entre os sexos no grupo caso e entre os sexos nos dois grupos;
4. Estudar a possível participação dos polimorfismos na susceptibilidade aos TEA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Em conformidade com as Normas Reguladoras de Pesquisas em Seres Humanos (Resolução 196/96), este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP - 77376), o TCLE (Anexo C) foi aplicado aos indivíduos que constituíram o grupo controle. Em relação aos autistas, de acordo com aprovação do CEP-FAMERP, os responsáveis pelos afetados assinaram o TCLE (Apêndice B) aprovado no projeto mãe, de doutorado, também em desenvolvimento pelo mesmo grupo de pesquisa, intitulado “Análise de Genes Envolvidos na Neurotransmissão, Formação e Manutenção Sináptica em Indivíduos com Doenças do Espectro Autístico” (nº3306/2010) por tratar-se dos mesmos critérios de inclusão/exclusão, o que facilitou a obtenção do número proposto da casuística.

Foram estudados 410 indivíduos, divididos em dois grupos. O grupo caso foi constituído por 210 indivíduos (174 homens e 36 mulheres) com diagnóstico conclusivo de TEA idiopático e idades entre sete e 42 anos ($\bar{X} = 13,4$; $s = 8,0$). O grupo controle foi constituído por 200 indivíduos (137 homens e 64 mulheres) aparentemente saudáveis, com idades entre 22 e 41 anos ($\bar{X} = 34$ $s = 6,2$).

A investigação e conclusão do diagnóstico foram realizadas por psiquiatras, neurologistas e/ou por equipes multidisciplinares de acordo com os critérios do DSM-IV e de escalas e instrumentos variados, conforme indicado e aplicado em cada caso pelo profissional responsável. Entre os instrumentos, foram utilizados a Escala de Avaliação para Autismo Infantil – CARS (SCHOPLER et al., 1980), Entrevista Diagnóstica para Autismo Revisada – ADI-R (LORD; RUTTER; LE COUTER, 1994; BECKER, 2011) e ASQ (Questionário de Triagem para Autismo – BERUMENT et al., 1999).

Os pacientes participantes foram encaminhados do Ambulatório de Genética do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP/FUNFARME, pela psiquiatra do grupo de pesquisa, Dra. Simone Secco da Rocha, por clínicas e profissionais da saúde e da educação da cidade, e de escolas especializadas contatadas pelos pesquisadores [Escola Municipal do Autista Maria Lúcia de Oliveira (EMA) de São José do Rio Preto – SP, da Associação dos Amigos dos Autistas (AMA) de Ribeirão Preto – SP, do Recanto Tia Marlene de Votuporanga – SP (RTM) e da Associação para o Desenvolvimento dos Autistas em Campinas (ADACAMP)].

A avaliação fenotípica para verificação de possíveis síndromes associadas, assim como a investigação de possíveis fatores etiológicos ambientais, foi realizada pela orientadora do projeto, pediatras e neuropediatras, membros da equipe multidisciplinar do Serviço de Genética da FAMERP/FUNFARME, conforme rotina do próprio serviço. Também contou com a participação do Dr. Antonio Richieri Costa (USP-Bauru).

Não foram incluídos no estudo indivíduos dismórficos, com surdez, com doença genética confirmada ou presumida, ou com possível etiologia ambiental. Também não participaram aqueles indivíduos cujas famílias não concordaram em fazer parte do estudo e aqueles que, mesmo com autorização do responsável para participação, apresentaram desconforto exacerbado diante da possibilidade da punção venosa.

Inicialmente todos os indivíduos afetados foram submetidos a testes de triagem para investigação quanto à presença de alterações cromossômicas e os indivíduos do sexo masculino foram submetidos a teste molecular para investigação da síndrome do Cromossomo X Frágil – FRAXA (o que já é realizado como protocolo de investigação genética de TEA adotado no Serviço de Genética do Hospital de Base). Os indivíduos que apresentaram alterações nestes testes iniciais foram excluídos da casuística.

O grupo controle foi constituído por 200 indivíduos aparentemente saudáveis, sem queixa de afecções psiquiátricas e sem história familiar de tais afecções em pelo menos três gerações anteriores e uma posterior. Após esclarecimentos sobre o estudo os indivíduos, selecionados entre os doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto, foram convidados a participar e os que aceitaram, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram encaminhados para a coleta de sangue periférico.

3.2 Métodos

De cada indivíduo com diagnóstico de TEA, foram coletados, por profissional habilitado, 10 mL de sangue venoso periférico, distribuídos igualmente em tubo com heparina e com EDTA, que foram utilizados para cultura de curta duração de linfócitos e extração de DNA, respectivamente.

A investigação quanto à presença de cromossopatias foi realizada por meio do estudo do cariótipo convencional em metáfases obtidas de culturas de linfócitos submetidas ao bandamento GTG. O DNA obtido foi utilizado para genotipagem dos SNPs rs7794745 e

rs2710102 (gene *CNTNAP2*) e G22A (gene *ADA*) nos dois grupos e investigação molecular da mutação completa do gene *FMRI* nos indivíduos autistas do sexo masculino.

Do grupo controle foram coletados apenas 5 mL de sangue venoso periférico em tubo com EDTA que foram submetidos à extração de DNA e em seguida genotipagem dos SNPs rs7794745 e rs2710102 (gene *CNTNAP2*) e G22A (gene *ADA*).

3.2.1 Testes para triagem das amostras

3.2.1.1 Cultura de linfócitos e bandamento GTG convencional

As culturas foram desenvolvidas de acordo com o protocolo padrão utilizado pelo Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP/FUNFARME.

Em câmara de fluxo laminar asséptica, para cada indivíduo, foram montados três frascos de cultura. Em cada frasco foram colocados 5 mL do meio de cultura RPMI1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), fito-hemaglutinina (PHA-Gibco 0,3 mL/5 mL de meio) e 1,0–2,5 mL do volume contendo a série leucocitária resultante da separação do sangue total. Logo após, o material permaneceu incubado por 72 horas em estufa de CO₂ à 37°C.

Após este período, foi adicionado 0,1 mL de solução de colquicina Houndé (4x10 M), para interrupção da divisão celular, e os tubos foram reincubados durante 20 minutos. Em seguida, iniciou-se a colheita da cultura e o material foi centrifugado a 1.000 rpm durante oito minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur estéril e o sedimento foi hipotonizado de forma progressiva com 12 mL de KCl a 0,075 M por 40 minutos, a 37°C, e fixado em metanol: ácido acético (3:1).

A suspensão celular foi então gotejada em lâminas limpas, previamente armazenadas em água destilada e gelada. As lâminas com o material foram submetidas a um processo de envelhecimento em estufa a 80°C durante 20 minutos. Em seguida, para a etapa de bandamento GTG, as lâminas foram mergulhadas sequencialmente em solução de tripsina 0,2% durante dois a 10 segundos, e solução salina de PBS durante 1 minuto. Posteriormente, foram coradas em solução de Giemsa a 2% por cinco minutos e lavadas em água destilada. O

cariótipo foi analisado em 20 metáfases. Todas as análises foram realizadas por dois observadores e conferidas pela orientadora do estudo. Os achados e a descrição dos mesmos foram colocados em um laudo e seguiram os critérios contidos na ISCN (2013). As alterações encontradas foram devidamente fotografadas e discutidas com a orientadora para conclusão do caso.

Durante todo o estudo, cada caso foi identificado por um código de conhecimento apenas dos responsáveis pelo projeto.

3.2.1.2 Extração de DNA de leucócitos

O DNA de cada indivíduo foi obtido a partir de leucócitos de sangue venoso periférico segundo a técnica descrita por Miller e cols (1988), com modificações.

Em um tubo de polipropileno de 15 mL foram adicionados 3,5 mL de FICOLL PAQUE e 5 mL de sangue periférico pela parede do mesmo. O material foi centrifugado por 30 minutos a 3.500 rpm. O anel de leucócitos foi transferido com pipeta Pasteur descartável para outro tubo e o volume de 15 mL foi completado com tampão PBS 1X. Nova centrifugação foi realizada durante 12 minutos a 3.500 rpm. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur descartável deixando no tubo 1 mL no qual o “pellet” foi suspenso. Novamente o volume foi completado para 15 mL com PBS 1X e repetiu-se a centrifugação durante 12 minutos a 3.500 rpm. O sobrenadante foi recolhido com pipeta descartável, o “pellet” de leucócitos foi novamente suspenso e em seguida foram adicionados 3 mL de Lysis Buffer, 0,2 mL de SDS 10%, 50 µl de proteinase K (20 mg/mL) e 40 µl de RNase (20 mg/mL). O material foi agitado e incubado à 37°C overnight.

No dia seguinte, ao volume total foi acrescentado 1 mL de NaCl 6 M saturado. O tubo foi agitado vigorosamente até formar espuma e colocado no gelo por 20 minutos. O material foi novamente agitado e centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno de 15 mL e completado com 10 mL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. O tubo foi invertido delicadamente até a visualização do DNA precipitado. O DNA foi colocado em um microtubo de 1,5 mL com 500 µl de etanol 70% gelado. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por três minutos. Em seguida o etanol 70% foi descartado e o tubo deixado em repouso por 20 minutos. O DNA foi diluído em água ultrapura e incubado a 37°C por três a quatro dias para diluição. Após este

período, o material foi estocado a -20°C . A estimativa da concentração foi realizada pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop (ND 1000 – *Spectrophotometer*).

3.2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase para FRAXA

A amplificação e determinação no número de repetições CGG e detecção da mutação completa do gene *FMRI* foi realizada segundo a técnica de Haddad e cols (1996), com algumas modificações. Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte solução com volume final igual a $23\mu\text{L}$:

H ₂ O ultrapura.....	10,5 μL
Tampão (sem MgCl ₂) - 10x.....	2,5 μL
MgCl ₂	1,0 μL
DMSO (100%).....	2,5 μL
<i>Work solution</i>	1,0 μL
dNTP (1,25 mM) - 75% 7deaza dGTP.....	4,0 μL
DNA (50 ng/ μL).....	2 μL

O método de Hot Start foi utilizado: a solução descrita abaixo, contendo a enzima Taq Polymerase, foi adicionada no volume de $02,0\mu\text{L}$ por amostra após um único ciclo de 98°C durante 10 min.

H ₂ O ultrapura.....	1,48 μL
Tampão (sem MgCl ₂) - 10x.....	0,2 μL
<i>Taq</i> (5U/ μL).....	0,32 μL

Foi utilizado uma *work solution* contendo três *primers* (Eag-U, Eag-L, f) nas concentrações de 7,5 μM , 5 μM , 2 μM / 85,5 μL de H₂O, respectivamente, para amplificação da região de interesse. As sequencias de bases dos *primers* f (*reverse 1*), Eag-L (*reverse 2*) e Eag-U (*foward*), estão apresentadas no Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos *primers* f, Eag-L e Eag-U utilizados na amplificação para análise de mutação do gene *FMRI*.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' a 3'	Amplicon (Pb)
F	AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA	30
Eag-L	CGCTGCGGGTGTAACACTGAAACCACGTC	30
Eag-U	CGACCTGTCACCGCCCTTCAGCCTTCC	27

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C por dois minutos, ciclo de 35 repetições com desnaturação inicial durante um minuto a 65°C, anelamento durante dois minutos a 72°C, extensão de 90 segundos a 94°C e extensão final de um ciclo durante 10 minutos a 72°C.

Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% sob corrente constante de 100 V durante 40 minutos. O gel foi revelado em solução de nitrato de prata (Figura 2). Os indivíduos foram classificados de acordo com o tamanho de fragmento originado seguindo a classificação descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Fragmentos originados na reação de PCR para mutação completa do gene *FMRI*, *primers* utilizados e classificação de acordo com os possíveis resultados.

Fragmentos (pb) esperados	<i>Primers</i>	Resultado
223 pb 488 a 632 pb	Eag-U e Eag-L Eag-U e F	alelo normal
223 pb 635 a 1070 pb	Eag-U e Eag-L Eag-U e F	pré-mutação
223 pb Ausência de banda	Eag-U e Eag-L Eag-U e F	mutação completa

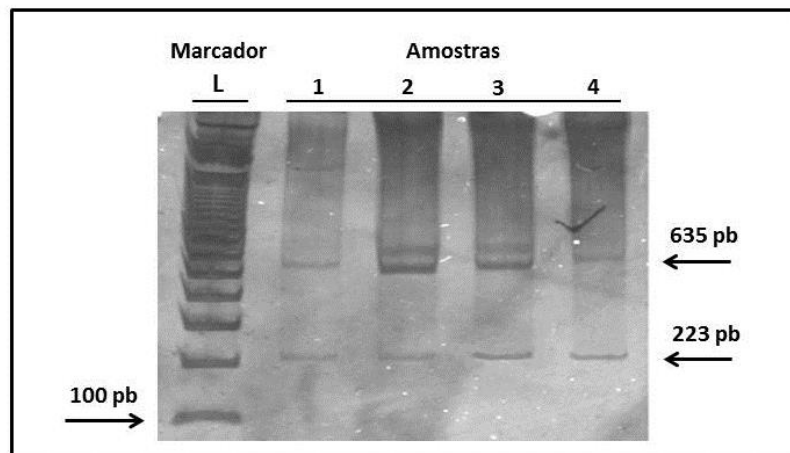


Figura 2. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 6% correspondente a análise da amplificação do gene *FMRI*. Marcação com Ladder de 100pb na coluna (L) confirma o tamanho esperado das bandas de controle interno (223pb) e de expansão da trinca CGG (600pb) que caracteriza a ausência da mutação nos quatro indivíduos do sexo masculino (colunas 1-4).

3.2.2 Genotipagem dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)

Para a análise molecular dos SNPs, segmentos específicos foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a utilização de iniciadores apropriados para cada polimorfismo, seguida da análise de restrição para sítios de clivagem específicos por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorfism*). A sequência dos *primers* utilizados, assim como as enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos originados após a clivagem estão descritos na Tabela 3

Tabela 3: Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos originados, e enzimas de restrição utilizadas para reações de PCR-RFLP dos diferentes SNPs.

SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3')	Produto (bp)	Enzima de restrição	Alelos (pb)	
rs7794745	CAACATTGATCCCTTCAGCCAT CTCACCAGTGTGCTTCAGACCA	311	Tsp509I	T (78/223)	A (311)
rs2710102	ATGGATGGACTGACCGATTG TTGTGTTGTTTGGCCATGAT	198	AvaI (Eco881)	C (43/155)	T (198)
G22A	GCCCGGCCCGTTAAGAAGAGC GGTCAAGTCAGGGCAGAAGCAGA	397	TaqI Fast Digest	G (245/152)	A (397)

3.2.2.1 Genotipagem do polimorfismo rs7794745 do gene *CNTNAP2*

Para a investigação do SNP rs7794745 foi realizada PCR seguida de análise de restrição segundo protocolo descrito por Li e cols (2010) com modificações. Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte solução com volume final igual a 25µL:

H ₂ O ultrapura.....	14,3 µL
Tampão (sem MgCl ₂) - 10x.....	2,5 µL
MgCl ₂	1,5 µL
DMSO (100%).....	0,5 µL
<i>Primer sense</i> (10 µM).....	1,0 µL
<i>Primer antisense</i> (10 µM).....	1,0 µL
dNTP (1,25 mM).....	2,0 µL
<i>Taq</i> Polimerase 5U.....	0,2 µL
DNA (50 ng/ µL).....	2,0 µL

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C por dois minutos, ciclo de 32 repetições com desnaturação inicial durante 30 segundos a 95°C, anelamento durante 40 segundos a 60,4°C, extensão de 40 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante cinco minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 311 pb foi submetido a digestão enzimática em solução com 7 μL do produto da PCR, 10,36 μL de H_2O ultrapura, 1,34 μL de tampão enzimático (“tampão green”) e 0,5 μL de enzima *Tsp509I*. A solução foi, então, incubada a 65,5°C durante 20 minutos. O sítio de clivagem enzimático ocorreu na presença do alelo T originando fragmentos de 78 e 223 pb.

Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%, sob corrente constante de 100 V durante 40 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 3).

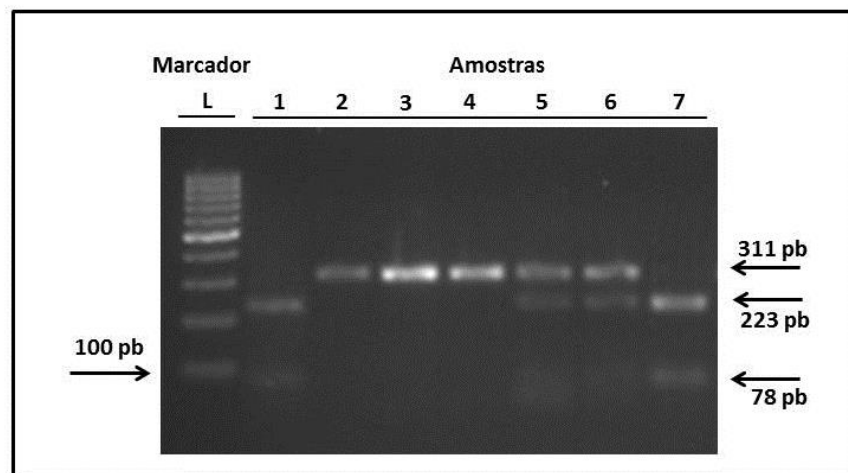


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose a 3,0%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para SNP rs7794745. Amostras 5 e 6 – heterozigotos (AT); Amostras 1 e 7 - homozigotos para o SNP (TT) – Amostras 2,3 e 4 homozigotas para o alelo selvagem (AA). L = marcador molecular de 100pb.

3.2.2.2 Genotipagem do polimorfismo rs2710102 do gene *CNTNAP2*

Para a investigação do SNP rs2710102 os segmentos iniciadores foram sintetizados a partir de análises “in sílico”, com auxílio do programa *Primer 3* e as enzima de restrição foram selecionadas a partir do programa *NEBcutter v2.0*. Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte solução com volume final igual a 20 μL :

H ₂ O ultrapura.....	9,7 µL
Tampão (sem MgCl ₂) - 10x.....	2,5 µL
MgCl ₂	0,8 µL
DMSO (100%).....	2,5 µL
<i>Primer sense</i> (10 pM).....	1,0 µL
<i>Primer antisense</i> (10 pM).....	1,0 µL
dNTP (1,25 mM).....	2,0 µL
<i>Taq</i> Polimerase 5U.....	0,2 µL
DNA (50 ng/ µL).....	2,0 µL

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C durante cinco minutos, ciclo de 35 repetições com desnaturação inicial durante um minuto a 95°C, anelamento durante 30 segundos a 59°C, extensão de 30 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante cinco minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 198 pb foi submetido à digestão enzimática em solução com 7 µL do produto da PCR, 10,36 µL de H₂O ultrapura, 1,34 µL de tampão enzimático (“tampão *green*”) e 0,5 µL de enzima *AvaI* (*Eco 881*). A solução foi, então, incubada a 37°C durante 20 minutos. O sítio de clivagem enzimático ocorreu na presença do alelo C, originando fragmentos de 43 e 155 pb.

Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%, sob corrente constante de 100 V durante 60 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 4).

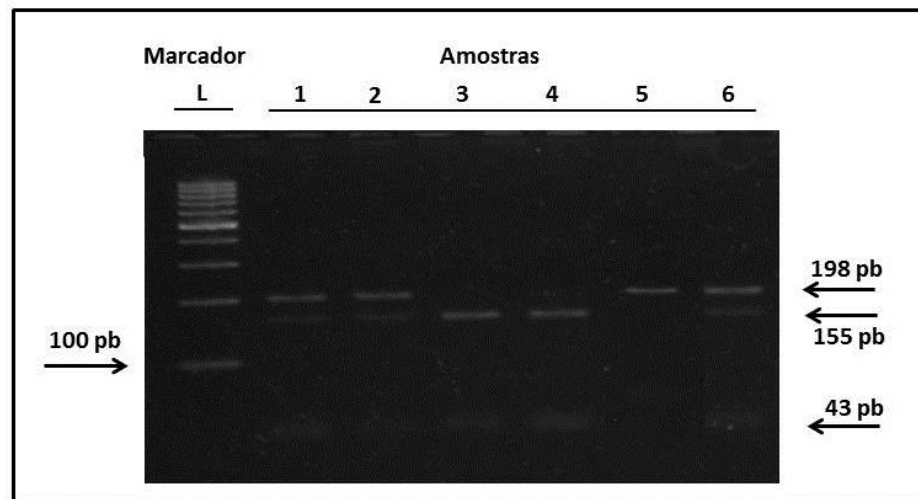


Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose a 3,0%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para SNP rs2710102. Amostras 1,2 e 6 – heterozigotos (CT); Amostras 3 e 4- homozigotos para o SNP (CC) – Amostras 5 homozigotos para o alelo selvagem (TT). L = marcador molecular de 100pb.

3.2.2.3 Genotipagem do polimorfismo rs73598374 (G22A) do gene *ADA*

As análises moleculares para genotipagem deste polimorfismo foram realizadas no Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, com a colaboração dos professores Luis Carlos de Mattos e Cinara de Cássia Brandão de Mattos.

Para investigação do SNP rs73598374 (G22A) foi realizada PCR seguida de análise de restrição segundo protocolo de Safranow e cols (2007), com modificações. Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte solução com volume final igual a 25 μ L:

H ₂ O ultrapura.....	12,0 μ L
Tampão (sem MgCl ₂) - 10x.....	2,5 μ L
MgCl ₂	0,8 μ L
DMSO (100%).....	2,1 μ L
β –mercaptoetanol.....	1,0 μ L
<i>Primer sense</i> (10 pM).....	0,2 μ L
<i>Primer antisese</i> (10 pM).....	0,2 μ L
dNTP (1,25 mM).....	4,0 μ L
DNA (50 ng/ μ l).....	2,0 μ L

O método de Hot Start foi utilizado: a enzima *Taq* Polymerase foi adicionada em cada tubo no volume de 0,2 μ L por amostra após 15 minutos do início da ciclagem, no final da etapa de ativação (94°C).

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: ativação a 94°C durante 15 minutos, ciclo de 36 repetições com desnaturação inicial durante 40 segundos a 94°C, anelamento durante 80 segundos a 66°C, extensão de 80 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante oito minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 397 pb foi submetido à digestão enzimática em solução com 7 μ L do produto da PCR, 10,36 μ L de H₂O ultrapura, 1,34 μ L de tampão enzimático (“tampão green”) e 0,7 μ L de enzima *TaqI Fast Digest*. A solução foi, então, incubada a 65°C durante 20 minutos. O sítio de clivagem enzimático ocorreu na presença do alelo A originando fragmentos de 245 e 152 pb.

Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 100 V durante 60 minutos, e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 5).

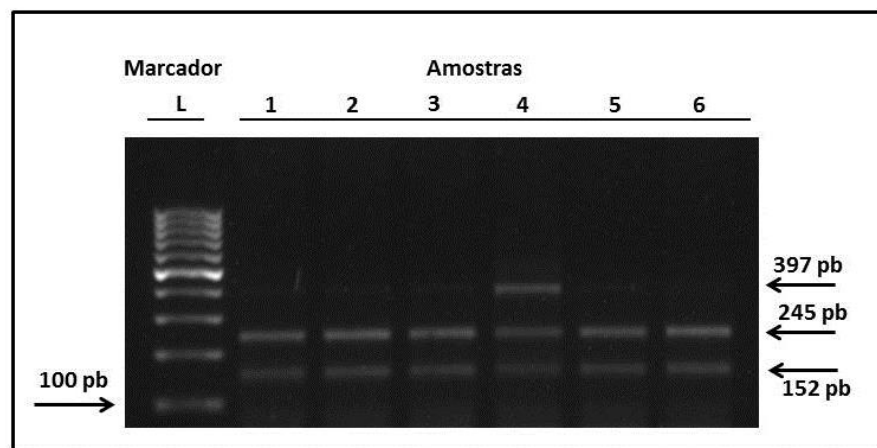


Figura 5. Foto do perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para SNP G22A. Amostra 4 – heterozigotos (GA); Amostras 1,2,3,5 e 6 homozigotos para o alelo selvagem (GG). L = marcador molecular de 100pb.

3.2.3 Análises estatísticas

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para comparar as frequências genóticas dos SNPs avaliados entre o grupo caso (indivíduos com TEA) e grupo controle (indivíduos saudáveis). O teste foi utilizado também para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg da distribuição dos genótipos dos SNPs. O teste Exato de Fisher foi utilizado para verificar a distribuição dos genótipos dos SNPs entre os grupos. A análise da possível associação entre genótipos e predisposição aos TEA foi realizada pelo cálculo do Odds Ratio, com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Para todas as análises descritas acima foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0. Erro alfa de 5% foi adotado, ou seja, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Devido à localização dos polimorfismos rs7794745 e rs2710102 no mesmo gene (*CNTNAP2*), foi calculado o desequilíbrio de ligação pelo software Haploview 4.2 para avaliar a segregação independente dos alelos.

Resultados

5. RESULTADOS

A análise do cariótipo em bandamento GTG foi realizada como teste de triagem em todos os indivíduos com diagnóstico conclusivo de TEA, em função dos critérios de inclusão adotados. Um dos indivíduos candidatos ao estudo mostrou cariótipo masculino com dissomia do cromossomo X e um Y (47,XXY) (Figura 6), achado compatível com a Síndrome de Klinefelter. Em função do achado, o mesmo foi excluído dos estudos moleculares.

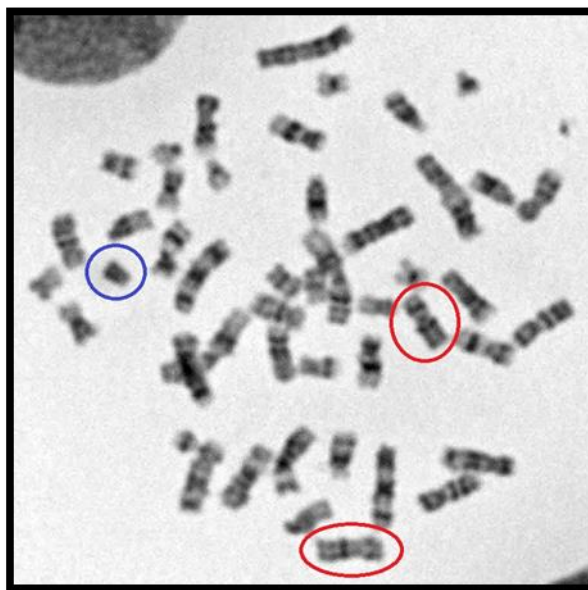


Figura 6. Metáfase em bandamento GTG do indivíduo com Síndrome de Klinefelter. Os cromossomos circundados em vermelho representam o par de cromossomos X e o círculo azul delimita o cromossomo Y.

A análise molecular por PCR para investigação da mutação completa do gene *FMR1* foi realizada nos 174 indivíduos do sexo masculino. Todos os indivíduos foram negativos para a presença da mutação e compuseram a casuística.

A investigação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foi feita nos 210 indivíduos com diagnóstico de TEA idiopático (grupo caso) e nos 200 indivíduos saudáveis (grupo controle). As frequências genóticas dos SNPs do gene *CNTNAP2*, rs7794745 e rs2710102, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os indivíduos com TEA ($\chi^2= 1$; $p= 0,316$ e $\chi^2= 3,86$; $p= 0,051$, respectivamente), e controles ($\chi^2= 0,89$; $p= 0,345$ e $\chi^2= 0,90$; $p= 0,341$). A mesma relação de equilíbrio foi encontrada entre os genótipos no SNP G22A do

gene *ADA* tanto no grupo caso ($\chi^2 = 0,18$ e $p = 0,669$) quanto no grupo controle ($\chi^2 = 0,12$ e $p = 0,726$).

A análise do SNP rs7794745 do gene *CNTNAP2* (Tabela 4) revelou entre os indivíduos afetados 43 (20,5%) casos homozigotos para o alelo de risco (TT), 96 (45,7%) heterozigotos (AT) e 71 (33,8%) de indivíduos com genótipo normal (AA). O alelo de risco T apresentou frequência de 0,43 (182/420) neste grupo, enquanto o alelo A foi observado na frequência de 0,56 (238/420) no mesmo grupo.

No grupo controle foram observados 25 (12,5%) indivíduos homozigotos para o alelo de risco (TT), 100 (50%) heterozigotos (AT) e 75 (37,5%) homozigotos normal (AA). As frequências alélicas de T e A foram respectivamente 0,37 (150/400) e 0,62 (250/400), respectivamente.

As frequências dos genótipos entre os grupos caso e controle foram similares ($\chi^2 = 4,715$; $p = 0,095$; $GL = 2$). No entanto, a análise da distribuição do genótipo TT entre os grupos mostrou uma diferença estatisticamente significante ($p = 0,034$), ou seja, este genótipo foi mais frequente entre os indivíduos afetados quando comparado aos controles. Seguindo as análises, a maior frequência entre os afetados revelou aumento de risco na associação entre TT e TEA (OR = 1,802; IC95% 1,054 – 3,083; $p = 0,042$).

Tabela 4: Frequências genotípicas e alélicas do SNP rs7794745 em indivíduos com diagnóstico de TEA e indivíduos controles.

<i>CNTNAP2</i> rs 779475	TEA	Contr.	<i>p</i> *	OR	<i>p</i>	IC 95%
	(n=210)	(n=200)				
	N(%)	N(%)				
Genótipos						
AA	71 (33,8%)	75 (37,5%)	0,470	0,852	0,498	0,568 - 1,268
AT	96 (45,7%)	100 (50,0%)	0,429	0,842	0,442	0,571 - 1,241
TT	43 (20,5%)	25 (12,4%)	0,034	1,802	0,042	1,054 - 3,083
Alelos						
A	238 (56,7%)	250 (86,8%)	0,102	0,785	0,103	0,593 - 1,038
T	182 (43,3%)	150 (62,1%)				

TEA: indivíduos com diagnóstico de TEA idiopático (grupo caso); Contr: indivíduos aparentemente saudáveis (grupo controle).

OR= *Odds Ratio*; IC 95% = Intervalo de Confiança; *p* *= calculado pelo teste Exato de Fisher.

A análise do SNP rs2710102 do gene *CNTNAP2* (Tabela 5) revelou entre os indivíduos afetados 50 (23,8%) indivíduos homozigotos para o alelo de risco (CC), 119 (56,7%) heterozigotos (CT) e 41 (19,5%) apresentaram genótipo normal (TT). A frequência do alelo de

risco C observada neste grupo foi de 0,52 (219/420) enquanto a frequência alélica de T foi de 0,48 (201/420).

No grupo controle foram observados 64 (32%) indivíduos homocigotos para o alelo de risco (CC), 104 (52%) heterocigotos (CT) e 32 (16%) apresentaram genótipo normal (TT). As frequências alélicas de C e T foram de 0,58 (232/400) e 0,42 (168/400), respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos entre os grupos ($\chi^2 = 3,596$; $p = 0,166$; GL= 2), nem na distribuição do genótipo de risco (CC) ($p = 0,077$), não sugerindo associação da presença do genótipo CC e TEA (OR= 0,664; IC95% 0,429 – 1,026; $p = 0,082$).

Tabela 5: Frequências alélicas e genóticas do SNP rs2710102 em indivíduos com diagnóstico de TEA e indivíduos controles.

<i>CNTNAP2</i> rs 2710102	TEA	Contr.	<i>p</i> *	OR	<i>p</i>	IC 95%
	(n=210)	(n=200)				
	N(%)	N(%)				
Genótipos						
TT	41 (19,5%)	32 (16%)	0,369	1,274	0,422	0,765 – 2,119
CT	119 (56,7%)	104 (52%)	0,369	1,207	0,396	0,818 – 1,781
CC	50 (23,8%)	64 (32%)	0,077	0,664	0,082	0,429 – 1,026
Alelos						
C	219 (52,1%)	232 (58%)	0,106	0,789	0,106	0,599 – 1,040
T	201(47,8%)	168 (42%)				

TEA: indivíduos com diagnóstico de TEA idiopático (grupo caso); Contr: indivíduos aparentemente saudáveis (grupo controle).

OR= *Odds Ratio*; IC 95% = Intervalo de Confiança; *p* *= calculado pelo teste Exato de Fisher.

Os polimorfismos rs7794745 e rs2710102 do gene *CNTNAP2* não relevaram evidências de desequilíbrio de ligação ($D' = 0,034$ e $r^2 = 0,001$), o que permite sugerir a segregação independente dos alelos nos grupos estudados.

A análise do polimorfismo G22A do gene *ADA* (Tabela 6) entre os indivíduos afetados revelou 12 (5,7%) dos casos com genótipo GA, 198 (94,3%) homocigoto normal (GG) e nenhum indivíduo homocigoto para o alelo de risco (AA), o que resultou em uma frequência de 0,03 (12/420) para o alelo A e frequência de 0,97 (408/420) do alelo T.

No grupo controle, 22 (11%) indivíduos apresentaram genótipo GA, 177 (88,5%) homocigoto normal (GG) e um (0,5%) indivíduo homocigoto para o alelo de risco (AA). As frequências alélicas de A e G foram respectivamente 0,06 (24/400) e 0,94 (376/400).

As frequências dos genótipos entre os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($\chi^2 = 4,876$; $p = 0,087$; $GL = 2$). A análise do genótipo GG e do alelo G (alelo “protetor”) revelou aumento de risco na associação com a predisposição de TEA ($OR > 1$). Entretanto, apenas a análise do alelo G mostrou resultados estatisticamente significantes de associação ($OR = 2,170$; $IC95\% 1,070 - 4,402$; $p = 0,039$), enquanto que para o genótipo GG os resultados não foram significativos ($OR = 2,144$; $IC95\% 1,036 - 4,435$; $p = 0,055$).

Tabela 6: Frequências genóticas e alélicas do SNP G22A em indivíduos com diagnóstico de TEA e indivíduos controles.

<i>ADA</i> G22A	TEA (n=210) N(%)	Contr. (n=200) N(%)	<i>p</i> *	OR	<i>p</i>	IC 95%
Genótipos						
GG	198 (94,3%)	177 (88,5%)	0,051	2,144	0,055	1,036-4,435
GA	12 (5,7%)	22 (11,0%)	0,072	0,490	0,078	0,236-1,019
AA	0 (0%)	1 (0,5%)	0,488	0,316	0,980	0,128-7,807
Alelos						
G	408 (97,1%)	376 (94,0%)	0,039	2,170	0,043	1,070 - 4,402
A	12 (3,0%)	24 (6,0%)				

TEA: indivíduos com diagnóstico de TEA idiopático (grupo caso); Contr: indivíduos aparentemente saudáveis (grupo controle).

OR= *Odds Ratio*; IC 95% = Intervalo de Confiança; *p* *= calculado pelo teste Exato de Fisher.

O estudo das frequências e da associação com a predisposição de TEA entre os genótipos dos SNPs dos dois genes estudados, também foi realizado separadamente entre as mulheres e os homens autistas e entre os dois sexos nos dois grupos.

As frequências genóticas dos SNPs do gene *CNTNAP2* entre os indivíduos afetados do sexo masculino e feminino, não revelaram valores estatisticamente significantes (rs7794745 - $\chi^2 = 0,48$; $p = 0,784$ e rs2710102 - $\chi^2 = 1,245$; $p = 0,537$). Para o SNP G22A do gene *ADA* os dados não foram suficientes para realização dos cálculos, em função da frequência nula do genótipo AA entre os afetados.

A Tabela 7 apresenta os cálculos relativos aos indivíduos do sexo masculino dos dois grupos estudados. As frequências genóticas do rs7794745 (gene *CNTNAP2*) nos indivíduos do sexo masculino entre os dois grupos foi estatisticamente significante ($\chi^2 = 6,083$; $p = 0,048$). A distribuição do genótipo homocigoto TT revelou maior frequência entre os indivíduos

afetados ($p= 0,021$) e aumento de risco na associação entre os autistas do sexo masculino ($OR= 2,196$; $IC95\% 1,149-4,198$; $p= 0,023$).

O polimorfismo G22A (gene *ADA*) também foi significativamente mais frequente entre os homens afetados ($\chi^2= 14,642$; $p= 0,0007$). O genótipo GG foi observado em maior frequência ($p=0,004$) entre os indivíduos afetados do sexo masculino entre os indivíduos do grupo controle. Seguindo as análises, apenas o genótipo GG apresentou aumento de risco e sugere estar associado ao fenótipo de TEA em relação a nossa casuística ($OR= 8,075$; $IC95\% 2,315-28,167$; $p= 0,0003$), embora o intervalo de confiança seja amplo. Também o alelo G foi observado em maior frequência entre os indivíduos afetados ($p= 0,0002$) e associado com a predisposição de TEA ($OR= 8,806$; $IC95\% 2.356- 27.753$; $p<0,0001$), apesar do amplo intervalo de confiança.

Tabela 7: Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos em indivíduos do sexo masculino com TEA e saudáveis.

Gene (SNP)	H-TEA	H-Contr.	P*	OR	p	IC (95%)
	(n=174)	(n=137)				
	N(%)	N(%)				
CNTNAP2						
(rs7794745)						
AA	59 (33,9%)	49 (35,7%)	0,810	0,921	0,824	0,576-1,437
AT	78 (44,8%)	73 (53,3%)	0,170	0,712	0,712	0,454-1,116
TT	37 (21,3%)	15 (10,9%)	0,021	2,197	0,023	1,149-4,198
Alelos						
A	196(56,3%)	171(62,4%)	0,139	0,777	0,147	0,562 –1,073
T	152 (43,7%)	103(37,6%)				
CNTNAP2						
(rs2710102)						
TT	33 (18,9%)	21 (15,3%)	0,452	1,293	0,490	0,796-2,355
CT	97 (55,7%)	69 (49,6%)	0,351	1,241	0,460	0,792-1,945
CC	44(25,3%)	47 (34,3%)	0,102	0,648	0,107	0,396-1,059
Alelos						
T	163 (46,8%)	111(40,5%)	0,123	1,294	0,134	0,939 –1,782
C	185 (53,2%)	163(59,5%)				
ADA (G22A)						
GG	171(98,2%)	120(87,6%)	0,004	8,075	0,0003	2,315-28,167
GA	3(1,7%)	16 (11,7%)	0,004	0,133	0,0007	0,379-0,465
AA	0 (0%)	1 (0,7%)	0,440	0,261	0,904	0,105 –6,456
Alelos						
G	345(99,1%)	256(93%)	0,0002	8,086	0,0002	2.356-27.753
A	3(0,86%)	18(6,6%)				

H-TEA: indivíduos do sexo masculino com diagnóstico de TEA idiopático; H-Contr: indivíduos do sexo masculino aparentemente saudáveis.

OR= Odds Ratio; IC 95% = Intervalo de Confiança; p *= calculado pelo teste Exato de Fisher.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas o avanço tecnológico da genética molecular permitiu a identificação de genes e regiões genômicas que indicam estar envolvidas na predisposição aos comportamentos autísticos. Apesar dos inúmeros estudos e das centenas de genes sugeridos como candidatos, nenhum deles aparece envolvido em mais de 1-2% dos casos de TEA (ABRAHAMS; GESCHWIND 2008; BETANCUR, 2011; STATE; LEVITT, 2011; MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012).

O uso dessas ferramentas moleculares também tem possibilitado a identificação de variantes comuns, como os SNPs, em alguns dos genes provavelmente envolvidos na etiologia dos TEA. Estes polimorfismos correspondem a cerca de 50% de todas as variantes conhecidas atualmente no material genético humano, sendo considerados como as variantes mais frequentes no genoma. Além disso, os SNPs são considerados marcadores genéticos que podem ser utilizados para identificar genes associados a doenças complexas, ou seja, aquelas associadas com eventos ambientais no seu aparecimento e desenvolvimento e que têm diversos genes envolvidos, mas cuja contribuição de cada evento é pouco conhecida (MALHOTRA; SEBAT, 2012).

Neste contexto, muitas pesquisas sugerem o gene *CNTNAP2* como um forte candidato para a predisposição ao autismo. Os SNPs estão entre as variantes genômicas comuns deste gene e têm sido associados com uma gama de fenótipos, que inclui comprometimento nas funções de linguagem, comportamento social atípico, deficiência intelectual, epilepsia e esquizofrenia (BAKKALOGLU et al., 2008; FRIEDMAN et al., 2008). Estas características e doenças já foram associadas com o espectro de manifestações fenotípicas que podem ocorrer em indivíduos com TEA, o que permite sugerir que, senão como evento único e talvez como efeito aditivo, os SNPs podem estar entre os eventos associados que poderiam desencadear estes transtornos (PEÑAGARIKANO; GESCHWIN, 2012; CLEMM von HOHENBERG, 2013).

A análise do SNP rs7794745 do gene *CNTNAP2* mostrou uma frequência do alelo polimórfico T entre os indivíduos com TEA de 0,43, valor semelhante à frequência de 0,47 descrita no banco de dados de polimorfismos dbSNP/MAF (*MinorAlleleCount*) do *National Center for Biothechnology Information* (NCBI). A frequência encontrada em nosso estudo assemelha-se aos dados descritos para as populações caucasoides, mas é divergente em relação á populações europeias e africanas (NCBI, 2013), o que pode ser reflexo da composição étnica diversificada da nossa população.

Interessante, é que a frequência do genótipo TT, já proposto no envolvimento na etiologia destas doenças (ARKING et al., 2008; ALÁRCÓN et al., 2008) foi significativamente maior nos indivíduos com TEA quando comparados aos indivíduos saudáveis. Este achado permite sugerir que o SNP em homozigose pode estar envolvido na predisposição aos transtornos nos pacientes aqui estudados. Tal sugestão é reforçada pelos achados de predisposição aparentemente imposta por este SNP em doenças ou aspectos de fenótipo comportamental, semelhantes aos descritos em TEA.

Um estudo de imagem estrutural, por exemplo, mostrou reduções significantes no volume das massas cinzenta e branca em regiões cerebrais de indivíduos normais homozigotos TT. O cerebelo, lobo frontal e occipital, que apresentaram alterações, também estão entre as regiões cerebrais descritas com possíveis alterações em autistas. Este mesmo estudo mostrou que os indivíduos TT do sexo masculino apresentaram níveis mais acentuados de redução da massa cinzenta na região frontal (TAN et al., 2010). O lobo frontal é responsável por uma série de funções cognitivas, incluindo planejamento, tomada de decisão e abstração e, portanto, é um candidato para transtornos do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricas (SCOTT-ZELAND et al., 2010).

Neste estudo, a investigação da frequência do genótipo TT nos indivíduos do sexo feminino e masculino afetados não mostrou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, quando comparadas às frequências deste genótipo entre indivíduos afetados e controles do sexo masculino, os resultados mostraram que o mesmo é significativamente mais comum entre os homens autistas e, portanto, sugestivo de associação entre TT e TEA no sexo masculino.

Ainda, entre os indivíduos do sexo masculino, a presença do alelo T também foi associada com autismo em um estudo com famílias multiplex (presença de dois ou três filhos afetados). A análise de transmissão estratificada por sexo dos genitores revelou uma frequência de transmissão alélica significativamente maior das mães para os filhos afetados do sexo masculino (ARKING et al., 2008).

O SNP rs7794745 já foi associado com alterações no desenvolvimento da linguagem. Indivíduos não autistas TT mostraram aumento significativo da ativação em áreas cerebrais de regiões envolvidas no desenvolvimento da linguagem o que sustenta evidências do efeito dessa variante genética no processamento da linguagem. (WHALLEY et al., 2011). É sugerido que o atraso no desenvolvimento da linguagem ocorra como consequência de uma ruptura crítica do processo de neurodesenvolvimento, o que poderia resultar em efeitos

fenotípicos como convulsões e TEA (ALÁRCÓN et al., 2008; PEÑAGARIKAN; GESCHWIN, 2012).

A frequência do alelo de risco C do SNP rs2710102 encontrada entre os afetados foi de 0,52, semelhante à frequência descrita para população europeia segundo banco de dados, mas inferior à de 0,60 descrita no SNP/MAF (NCBI, 2013). A frequência alélica menor pode ter influenciado na não associação entre o genótipo CC e TEA na casuística. Também não houve associação estatisticamente significativa entre o genótipo homozigoto para o alelo de risco (CC) em relação ao sexo dos indivíduos do mesmo grupo ou dos dois grupos estudados.

Uma relação positiva entre o genótipo em homozigose (CC) do SNP rs2710102 (gene *CNTNAP2*) com TEA ou sinais autísticos foi descrito em dois estudos (ALÁRCÓN et al., 2008; SCOTT-VAN ZEELAND et al., 2011). Outros achados mostram uma possível participação do genótipo CC com Distúrbios Específico de Linguagem (DEL) em não autistas e o propõem como fator de risco para alterações no desenvolvimento da linguagem (VERNES et al., 2008; STEIN et al., 2011, WHITEHOUSE et al., 2012).

Entretanto, tanto os resultados do presente estudo, como os de Sampath (2013), que avaliou 2.051 famílias de origem Afro-Americana, Asiática, Latina e de ascendência mista, não corroboram a relação CC e TEA.

Considerando-se os dois SNPs do *CNTNAP2* aqui investigados, os dados da associação destas variantes com TEA são variáveis e ainda inconclusivos. Enquanto Peñagarikano e Geschwin (2012) apresentaram uma revisão com mais de 10 estudos de variantes do gene *CNTNAP2* possivelmente associadas com TEA e outros transtornos psiquiátricos, Toma e cols (2013) realizaram um estudo de associação caso-controle em 322 pacientes autistas espanhóis e 524 controles e os resultados sugeriram contribuição improvável dos SNPs rs2710102 e rs7794745 na predisposição para o autismo.

A complexidade e heterogeneidade do fenótipo comportamental autístico e da etiologia reforçam a possibilidade de efeito aditivo de variantes em interação com influências ambientais (SZATMARI et al., 2007; DENNIS et al., 2011), como anteriormente referido. Futuros estudos em casuísticas maiores e com investigação de detalhes clínicos poderão esclarecer o significado destes SNPs no risco para o autismo, ou mesmo para a dificuldade de linguagem presente em autistas.

As análises do SNP G22A do gene *ADA* também não revelaram frequências que permitam associar tal variante com predisposição aos TEA. O gene, que participa da via das purinas, parece desempenhar papel importante na fisiopatologia de transtornos do neurodesenvolvimento por ser responsável pela modulação e liberação de neurotransmissores,

como glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina (GHAZIUDDIN; AL-OWAIN, 2013). Alguns estudos já associaram a presença do alelo A do SNP G22A com uma diminuição da atividade enzimática, sugerindo que indivíduos com genótipo GA apresentariam consequências funcionais deste polimorfismo na neuromodulação mediada pela enzima (DUNWIDDIE; MANSINO, 2001; DUTRA et al., 2010). Entretanto, são poucos os estudos que descreveram características autísticas em pacientes com níveis reduzidos de ADA (STUBBS et al., 1982; STATHIS et al., 2000).

A análise do polimorfismo G22A entre os afetados do presente estudo mostrou uma frequência do alelo A de 0,03, sendo esta semelhante à frequência alélica de 0,04 descrita no SNP/MAF (NCBI, 2013). Heterozigotos GA corresponderam a 5,7% da casuística, inferior até mesmo às frequências observadas em caucasianos saudáveis descritas por Persico e cols (2000), que foi de aproximadamente 8%.

Alguns estudos da mesma época associaram o SNP com a predisposição aos TEA, pois encontraram frequências do genótipo GA superiores em autistas quando comparados ao nosso estudo. Bottini e cols. (2001) e Persico e cols (2000), por exemplo, observaram este genótipo em 31,4% e 17,6% dos indivíduos afetados, respectivamente.

Entretanto, um estudo mais recente em autistas da população norte americana encontrou uma frequência do alelo A de 0,04 e o genótipo GA foi observado em 12 (9,6%) entre os indivíduos afetados (HETTINGER; LIU; HOLDEN, 2008) que, como o presente estudo, não foi estatisticamente significativa para os indivíduos com TEA. Por outro lado, o mesmo estudo citado mostrou um aumento na transmissão do alelo G de pai saudável para filho afetado. Curiosamente, no nosso estudo, a frequência do alelo G entre os indivíduos afetados do sexo masculino quando comparados aos controles do mesmo sexo, foi significativamente maior.

Também entre afetados aqui estudados do sexo masculino o genótipo GG foi observado em frequência significativamente maior, quando comparada à dos indivíduos do grupo controle, o que também foi observado no estudo com população norte americana (HETTINGER; LIU; HOLDEN, 2008). A baixa frequência do alelo de risco (A) na população estudada e na população norte americana pode ter influenciado na distribuição genotípica, até porque o genótipo GG não está relacionado a efeito fenotípico deletério, por não alterar a atividade da enzima.

Características étnicas das diferentes populações devem ser sempre consideradas quando se avalia variação genômica, pois estas podem resultar em susceptibilidade genética distinta para as mesmas doenças (PENA et al., 2011). Assim, pode ser sugerido que a não

associação entre o SNPs rs2710102 do gene *CNTNAP2* e o SNP G22A do gene *ADA* com autismo, se deveu às particularidades étnicas da população estudada, provavelmente diferentes das demais onde tal relação pôde ser sugerida.

Resultante de cinco séculos de cruzamentos entre índios americanos, europeus e africanos, a população brasileira é altamente miscigenada e apresenta níveis elevados de diversidade genômica. Um estudo de Pena e cols (2011) sugere ascendência europeia predominante em diferentes regiões, como a do Estado de São Paulo, onde o presente estudo foi realizado. Entretanto, as frequências alélicas observadas nem sempre foram semelhantes as encontrada no banco de dados em relação á população europeia, o que evidencia a miscigenação da população brasileira.

Contudo, mesmo considerando-se a heterogeneidade e miscigenação da população de autistas, os controles foram selecionados entre indivíduos não afetados da mesma população, então, para esta casuística brasileira estudada pode ser sugerido que tais SNPs não predisponham aos TEA. Claro que o número de indivíduos estudados é importante em estudos de polimorfismos (MURDOCH; STATE, 2013). Neste estudo, o tamanho amostral foi semelhante aos que descreveram associação ou não destes SNPs com autismo, embora o estudo de Sampath (2013) tenha sido realizado em 2051 famílias, um número superior a todos os demais, com resultados que também negaram esta associação.

Assim, algumas variantes comuns como os SNPs parecem desempenhar um papel importante na susceptibilidade aos TEA, entretanto, a especificidade dos achados em cada população é complexa (ABRAHAMS; GESCHWIND,2010).

Os avanços na descoberta de genes e suas variantes associadas com a predisposição de TEA têm revelado influências no diagnóstico e evolução clínica dos afetados, assim como na detecção precoce e intervenção (DEVLIN; SCHERER, 2012). Certamente o progresso em direção à identificação de marcadores genéticos será importante para melhores definições clínicas e de prognóstico (STATE; LEVITT, 2011; VANDE WYDEVEN et al., 2012).

6. CONCLUSÕES

- A presença do polimorfismo rs2710102 do gene *CNTNAP2* nos autistas estudados não é indicativa da associação do mesmo com a doença.

- A presença do polimorfismo rs7794745 do gene *CNTNAP2* em autistas indica uma possível associação do mesmo com o fenótipo comportamental.

- Não há indicações de que o polimorfismo rs73598374 (G22A) do gene *ADA* tenha predisposto ao fenótipo autístico na casuística avaliada.

- Não parece haver relação entre a presença dos polimorfismos investigados e o sexo dos afetados, entretanto, o genótipo TT, referente ao polimorfismo rs7794745 em homozigose, parece estar associado à presença de TEA nos homens.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMAS, B. S.; GESCHWIND, D H. Connecting Genes to Brain in the Autism Spectrum Disorders. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 4, p. 395-399, 2010.

ABRAHAMAS, B.S.; GESCHWIND, D.H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new Neurobiology. **Nature Review Genetics**, v. 9, n. 5, p. 341-355, 2008.

ALÁRCON, M. et al. Linkage, association, and gene-expression analyses identify *CNTNAP2* as an autism-susceptibility gene. **American Journal of Medical Genetics**, v. 82, n.1, p. 150–159, 2008.

ANGELIDOU, S. et al. Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-Review and proposal. **BMC Pediatrics**, v. 2, n. 12, p. 89, 2012.

APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. **American Psychiatric Association**: Washington (DC), 2000.

APA (American Psychiatric Association). Disponível em <http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx> . Acesso em 10 dez. 2013.

APA (American Psychiatric Association). **DSM-IV - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Retardation**. 4th ed. Washington (DC): American Psychiatric Press; 1994.

ARKING, D.E. et al. A common genetic variant in the neurexin superfamily member *CNTNAP2* increases familial risk of autism. **American Journal of Medical Genetics**, v. 82, n. 1, p. 160–164, 2008.

BAILEY, A. et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. **Psychological Medicine**, v. 25, n. 1, p. 63-77, 1995.

BAKKALOGLU, B. et al. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. **American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 1, p. 165-173, 2008.

BECKER, M.M. et al. Translation and validation of Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) for autism diagnosis in Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 70, n. 3, p. 185-190, 2011.

BERUMENT, S. et al. Autism Screening Questionnaire: Diagnostic Validity. **British Journal of Psychiatry**, v. 175, p. 444-451, 1999.

BETANCUR, C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. **Brain Research**, n. 1380, p. 42-77, 2011.

BOTTINI, N. et al. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. **Neurogenetics**, v. 3, n. 2, p. 111-113, 2001.

- BREMER, G.A. et al. Copy Number Variation Characteristics in Subpopulations of Patients With Autism Spectrum Disorders. **American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics**, v. 156, n. 2, p. 115-124, 2011.
- CAGLAYAN, A. O. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. **Developmental medicine and child neurology**, v. 52, n. 2, p. 130-138, 2010.
- CHIAPPEDI, M. et al. Autism and classification systems: a study of 84 Children. **Italian Journal of pediatrics**, v. 36, n. 10, p. 1-5, 2010.
- CHUTHAPISITH, J.; RUANGDARAGANON, N. Early Detection of Autism Spectrum Disorders. In: Deutsh, S. I and Urbano, M. R. Autism Spectrum Disorders: **The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment**. Thailand, p. 3-10. 2011.
- CLEMM von HOHENBERG, C. et al. *CNTNAP2* polymorphisms and structural brain connectivity: a diffusion-tensor imaging study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1349-1356, 2013.
- CURRENTI, S. A. Understanding and Determining the Etiology of Autism. **Cellular e Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 2, p. 161-171, 2010.
- CUSCÓ, I. et al. Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamatergic synapse in the etiology of the disorder. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 10, p. 1795-1804, 2009.
- DATA BASE SNP (dbSNP), Short Genetic Variation Center of Biology Information (NCBI). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>. Acesso em 08 jan. 2014.
- DENNIS, E.L. et al. Altered Structural Brain Connectivity in Healthy Carriers of the Autism Risk Gene, *CNTNAP2*. **Brain Connectivity**, v. 1, n. 6, p. 447-459, 2011.
- DUNWIDDIE, T.V; MANSINO, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, n. 31, p. 31-55. 2001.
- DUTRA, G.P., et al. Lower frequency of the low activity adenosine deaminase allelic variant (ADA1*2) in schizophrenic patients. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 2, n. 3, p. 275-278, 2010.
- ELSABBAGH, M. et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism Research: official journal of the International Society for Autism Research**, v. 5, n. 3, p. 160-179, 2012.
- FARAS, H.; ATEEQI, N. A.; TIDMARSH, L. Autism spectrum disorders. **Annals of Saudi Medicine**, v. 30, n. 4, p. 295-300, 2010.
- FERNELL, E.; ERIKSSON, M.A.; GILLBERG, C. Early diagnosis of autism and impact on prognosis: a narrative review. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 33-43, 2013.

FRIEDMAN, J.I. et al. CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. **Molecular Psychiatry**, v. 13, n. 3, p.261-266, 2008.

GESCHWIND, D.H. Genetics of autism spectrum disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 9, p. 409-416, 2011.

GHAZIUDDIN, M.;AL-OWAIN, M. Autism spectrum disorders and inborn errors of metabolism: an update. **Pediatric Neurology**, v. 49, n. 4, p. 49:232-236, 2013.

HADDAD, L.A. et al. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Human Genetics**, v. 97, n. 6, p. 808-812, 1996.

HALLMAYER, J. et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 11, p. 1095-1102, 2011.

HANTASH, F.M. et al. FMR1 premutation carrier frequency in patients undergoing routine population-based carrier screening: insights into the prevalence of fragile X syndrome, fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, and fragile X-associated primary ovarian insufficiency in the United States. **Genetics in Medicine: official journal of the American College Medical of Medical Genetics**, v. 13, n. 1, p. 39-45, 2011.

HERBERT, M.R. et al. Brain asymmetries in autism and developmental language disorder: A nested whole-brain analysis. **Brain: a journal of neurology**, v. 128, n. 1, p. 213-226, 2005.

HERBERT, M. R. et al. Autism and Enviromental Genomics. **Neurotoxocology**, v. 27, n. 5, p. 671-684, 2006.

HETTINGER, J.A. et al. The G22A Polymorphism of the ADA Gene and Susceptibility to Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 38, n.1, p. 14-19, 2008.

HOFVANDER, B. et al. Psychiatric and psychosocial problems in adults with normal-intelligence autism spectrum disorders. **BMC Psychiatry**, v. 9, n. 35, p 1-9, 2009.

HUGUET, E.; EY, E.; BOURGERON, T. The Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorders. **Annual Review of Genomics Human Genetics**, v. 14, p. 191-2013, 2013.

JIAO, Y. et al. Predictive models for subtypes of autism spectrum disorder based on single-nucleotide polymorphisms and magnetic resonance imaging. **Advances in Medical Sciences**, v. 56, n. 2, p. 334-342, 2011.

INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENETIC NOMENCLATURE
ISCN,2013: International System for Human Cytogenetic Nomenclature Farmington ; Karger, 2013.

KUMAR, R. A.; CHRISTIAN, S. L. Genetics of Autism Spectrum Disorders. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 9, n. 3, p. 188-197, 2009.

- LAURITSEN, M.B. Autism spectrum disorders. **European child & adolescent psychiatry**, v. 22, n.1, p. 37-42, 2013.
- LI, X. et al. Association analysis of CNTNAP2 polymorphisms with autism in the Chinese Han population. **Psychiatric Genetics**, v. 20, n. 3, p. 113-177, 2010.
- LIU, K. Y.; KING, M.; BEARMAN, P. S. Social influence and the autism epidemic. **American Journal of Sociology**, v. 115, n. 5, p. 1387-1434, 2010.
- LOO C. Y.; GRAHAM, R.M.; HUGHES, C.V. Behaviour guidance in dental treatment of patients with autism spectrum disorder. **International journal of pediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children**, v. 19, n. 6, p. 390-398, 2009.
- LORD, C. et al. A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 3, p. 306–313, 2012.
- LORD, C.; RUTTER, M.; LE COUTEUR, A. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 24, n. 5, p. 659-685, 1994.
- MALHOTRA, D.; SEBAT, J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1223-1241, 2012.
- MEFFORD, H.C.; BATSHAW, M.L.; HOFFMAN, E.P. Genomics, Intellectual Disability, and Autism. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 8, p. 733-743, 2012.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MIYAUCHI, S.; VOINEAGU, I. Autism Susceptibility Genes and the Transcriptional Landscape of the Human Brain. **International of Review Neurobiology**, v. 113, p. 303-318, 2013.
- MOESSNER, R. et al. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 6, p. 1289-1297, 2007.
- MURDOCH, J.D.; STATE, M.W. Recent developments in the genetics of autism spectrum disorders. **Current opinion in genetics & development**, v. 23, n. 3, p. 310-315, 2013.
- NASSAR, N.; DIXON, G.; BOURKE, J. et al. Autism spectrum disorders in young children: effect of changes in diagnostic practices. **International Journal of Epidemiology**, v. 38, n. 5, p. 1245-1254, 2009.
- NEWBURY, D. F. et al. Mapping of partially overlapping de novo deletions across an autism susceptibility region (AUTS5) in two unrelated individuals affected by

- developmental delays with communication impairment. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149A, n. 4, p. 588-597, 2009.
- NOWELL, M. A. et al. Varied MR appearance of autism: fifty-three pediatric patients having the full autistic syndrome. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 8, n. 6, p. 811–816, 1990.
- PAGE, T.; COLEMAN, M. Purine metabolism abnormalities in a hyperuricosuric subclass of autism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1500, n. 3, p. 291–296, 2000.
- PENA, S.D. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.
- PEÑAGARIKANO, O.; GESCHWIND, D.H. What does CNTNAP2 reveal about autism spectrum disorder? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 3, p. 156-163, 2012.
- PERCHE, O. et al. Autism, genetics and synaptic function alterations. **Pathologie-biologie**, v. 58, n. 5, p. 381-386, 2010.
- PÉRISSE, D. et al. Risk factors of acute behavioral regression in psychiatrically hospitalized adolescents with autism. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 100-108, 2010.
- PERSICO, A. et al. Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: Case-control and family-based association studies. **American Journal of Medical Genetics**, v. 96, n.6, p. 784–790, 2000.
- SACCUCCI, P., et al. Association of Adenosine deaminase polymorphism with mental retardation. **Journal of Child Neurology**, v. 21, n. 9, p. 753-756, 2006.
- SAFRANOW, K. et al. ADA*2 Allele of the Adenosine Deaminase Gene May Protect against Coronary Artery Disease. **Cardiology**, v. 108, n. 4, p. 275-281, 2007.
- SAMPATH, S. et al. Defining the Contribution of *CNTNAP2* to Autism Susceptibility. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. e77906, 2013.
- SCHERER, S.W.; DAWSON, G. Risk factors for autism: translating genomic discoveries into diagnostics. **Human Genetics**, v. 130, n. 1, p. 123-148, 2011.
- SCHOPLER, E. et al. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 10, n. 1, p. 91-103, 1980.
- SCOTT-VAN ZEELAND, A.A. et al. Altered Functional Connectivity in Frontal Lobe Circuits Is Associated with Variation in the Autism Risk Gene *CNTNAP2*. **Science Translational Medicine**, v. 2, n.56, p. 56-80, 2010.
- SHEN, Y. et al. Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders, **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. 727-735, 2010.

- SKUSE, D. H. DSM-5's conceptualization of autistic disorders. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 4, p. 344–346, 2012.
- STATE, M.W.; LEVITT, P. The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 1499-1506, 2011.
- STATHIS, S.L.; COWLEY, D.M.; BROE, D. Autism and adenylosuccinase deficiency. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 39, n. 3, p. 274-275, 2000.
- STEIN, M.B. et al. A common genetic variant in the neurexin superfamily member *CNTNAP2* is associated with increased risk for selective mutism and social anxiety-related traits. **Biology Psychiatry**, v. 69, n. 9, p. 825–831, 2011.
- STUBBS, G. et al. Adenosine deaminase activity decreased in autism. **Journal of American Academy of Child Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 71-74, 1982.
- SZATMARI, P. et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 319–328, 2007.
- TAN, G.C.Y. et al. Normal variation in fronto-occipital circuitry and cerebellar structure with an autism-associated polymorphism of *CNTNAP2*. **Neuroimage**, v. 53, n. 3, p. 1030–104, 2010.
- TOMA, C. et al. Analysis of two language-related genes in autism: a case-control association of *FOXP2* and *CNTNAP2*. **Psychiatric genetics**, v. 23, n., p. 82-85, 2013.
- VANDE WYDEVEN, K. et al. Underutilization of Genetics Services for Autism: The Importance of Parental Awareness and Provider Recommendation. **Journal of Genetic Counseling**, v. 21, n. 6, p. 803–813, 2012.
- VERNES, S.C. et al. A functional genetic link between distinct developmental language disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 22, p. 2337–2345, 2008.
- WHALLEY, H. et al. Genetic Variation in *CNTNAP2* Alters Brain Function During Linguistic Processing in Healthy Individuals. **American Journal of Medical Genetics**, v. 156B, n. 8, p. 941-948, 2011.
- WHITEHOUSE, A.J. et al. *CNTNAP2* variants affect early language development in the general population. **Genes, Brain and Behavior**, v. 10, n. 4, p. 451-456, 2011.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders: diagnostic criteria for research. **World Health Organization**: Geneva, 1993.
- YE, H., LIU, J., WU, J.Y. Cell Adhesion Molecules and Their Involvement in Autism Spectrum Disorder. **Neurosignals**, v. 18, n. 2, p. 62-71, 2010.

ZACHOR, D.A. Autism Spectrum Disorders – a syndrome on the rise: risk factors and advances in early detection and intervention. **Harefuah: Journal of The Israeli Medical Association**, v. 151, n. 3, p. 162-164, 2012.

8. APÊNDICES

8.1 Apêndice A: Artigo à ser submetido a revista BMC Psychiatry (FI: 2,23) intitulado - Single nucleotide polymorphisms in the *CNTNAP2* gene in Brazilian patients with Autism Spectrum Disorder

Single Nucleotide Polymorphisms in the *CNTNAP2* Gene in Brazilian patients with Autism Spectrum Disorder

Patrícia Pereira do Nascimento¹, Ana Luiza Bossolani Martins¹, Dante Bruno Avanzo Rosan¹, Luiz Carlos de Mattos², Cinara de Cássia Brandão de Mattos², Agnes Cristina Fett-Conte²

¹ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Abstract

Background: Autism Spectrum Disorders (ASD) are neuropsychiatric disorders with complex and heterogeneous etiology. Recently, investigations for genes and their common variants related to susceptibility of ASD has been somewhat of challenge but promising. Neurobiological, genetic and imaging data provide strong evidence that the *CNTNAP2* gene is a risk factor for ASD and other neurodevelopmental disorders. Earlier findings suggest the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CNTNAP2* gene, that were associated with language impairment and brain connectivity, can be considered genetic markers associated with predisposition to complex diseases such ASD. **Methods:** In this study we analyzed two SNPs (rs7794745 and rs2710102) located within the *CNTNAP2* gene, that were genotyped in 210 individuals with idiopathic ASD and 200 non-autistic, apparently healthy individuals without psychiatric disorders for at least three generations. We did molecular analysis by

polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analysis adopted a significance level of 5%. **Results:** The genotypic analysis revealed statistically significant differences ($p=0.034$) in the distribution of frequencies of SNP rs7794745 (TT genotype) between the groups, which was higher in ASD, suggesting an increase chance to association of the presence of this genotype with ASD (OR =1.802; 95% CI 01.054 – 3.083; $p=0.042$). None of the other variants were significantly associated with ASD. **Conclusion:** An association of individuals homozygotes with risk allele homozygosis (TT genotype) may be suggested for susceptibility in autism in this Brazilian population. However, further investigations, with larger sample sizes and individuals from different regions are required to confirm or refute this association.

Keywords: autism, *CNTNAP2*, rs7794745, rs2710102, polymorphism, predisposition.

Background

Autism Spectrum Disorders (ASD) are a set of heterogeneous neurodevelopmental conditions characterized by early-onset difficulties in social-communication domain and unusually repetitive behavior and restricted interests [1,2]. These behavioral manifestations are usually observed before three years of age with varying levels of impairment throughout the development of the individual [3]. The prevalence of ASD is around 1:100 to 1:150, it occurs in all ethnic and social groups being with males being more frequently affected (4:1) [4, 5, 6].

The etiology of ASD is complex and can be determined in 10-25% of cases in which a medical condition may be related, genetic or environmental [7]. Family studies and the estimated concordance rate for identical twins ranges from 60% to 90%, while among non-twin siblings the rate is from 5 to 31% dizygotic twins, indicating a significant genetic basis for ASD susceptibility [8, 9].

Even after 30 years of research, genetic factors of ASD remain relatively unknown [10]. Research for underlying susceptibility genes in autism is somewhat challenging but promising. Many genes proposed as candidates act on the central nervous system, particularly in its formation and on synaptic activity. The establishment of appropriate neural circuits is crucial for formation of the nervous system and abnormalities in their development may result in neurobehavioral disorders like ASD [11,12]. Moreover, recent findings of analysis of the genome has allowed that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes can be associated with predisposition to these disorders and could provide a possible explanation for the phenotypic variability [13,14].

The *CNTNAP2* – (MIM 604569), or “Contactin-associated protein-like 2”, mapped on chromosome 7q35-36, is one of the largest genes in the human genome with 2.5 to 3.3 Mb. It encodes Caspr2, a transmembrane protein and member of the neurexin family which acts as a cell adhesion molecule and receptor in the nervous system [15-17]. This protein is found in the region of axons and may play a role in the differentiation and functional domains in these structures. Genetics variants of *CNTNAP2* have been linked to different neuropsychiatric phenotypes, language impairment and brain morphology alterations, it is an excellent candidate for autism [18, 19].

Common polymorphic variants *CNTNAP2* have been associated with childhood autism with a peak of association at the SNP rs7794745 (AT) [15]. Furthermore, recent structural imaging studies reported that healthy individuals homozygous for the presumed risk allele (TT) showed significant differences in brain morphology in regions previously implicated in ASD [16, 20].

In addition, one other intronic SNP, rs2710102 (CT), when in homozygous (CC), has been associated with language impairment in autism and in non-autistic apparently healthy individuals [16, 21]. Also, a recent functional imaging study indicated differences in

connectivity and prefrontal activation between risk groups (individuals with CC genotype) and non-risk groups for this polymorphism [22].

Therefore, the biological role of *CNTNAP2* gene ASD is still much discussed. Herein, we present the results of the first investigation of the rs7794745 (AT) and rs2710102 (CT) polymorphisms performed in Brazilian individuals with ASD.

Methods

Subjects

The study protocol was approved by Ethics Research Committee of the School of Medicine in Sao Jose do Rio Preto (CEP n° 77376). Written informed consent was obtained from all the patients or their guardians and controls individuals.

The study involved 210 individuals with idiopathic ASD (174 males and 36 females) (\bar{X} = 13,4; s = 8,0).who were recruited in psychiatric clinics and specialized schools in São Paulo State, Brazil. Diagnosis of ASD was performed according to the DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 4th edition) following previously standardized criteria. All the patients were evaluated for possible associated syndromes, as well as for potential environmental etiologic factors, chromosomal abnormalities by conventional GTG-banding and the males were tested for the *FMR1* gene mutation by molecular tests. Individuals with these alterations, those who were dysmorphic or had hearing disorders were excluded.

The control group included 200 non-autistic, apparently healthy Brazilian individuals (137 males and 64 females) (\bar{X} = 34 s = 6,2)., without complaints of psychiatric disorders and no family history of such disorders for at least three generations or in the next. They were recruited among healthy blood donors from the Blood Center of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Genotyping of SNPs

Blood was obtained from the autistic probands and controls individuals. Genomic DNA was extracted from whole peripheral blood samples by the Ficoll Paque method according Miller et al [23].

We selected two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CNTNAP2* gene by *silico* analysis, rs2710102 and rs7794745. These SNPs were genotyped in all participants by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. The information on *primers* and PCR-RFLP analysis is presented in Table 1. For the SNP rs2710102, polymerase chain reaction (PCR) were carried out in 20.0 μL volume containing 9.7 μL ultrapure water, 2.5 μL reaction Buffer, 0.8 μL MgCl_2 , 0.5 μL dimethylsulfoxide (100% DMSO), 1.0 μL of each primer (sense and anti-sense) (10 pM), 2.0 μL dNTP (1.25 mM), 0.2 μL Taq Polymerase and 2.0 μL DNA (50 ng/ μL). Amplification cycles included an initial denaturation at 95° (5 min), followed by 35 cycles at 95°C (1 min), 59°C (30 s), 72°C (30 s), and a final extension at 72°C (5 min). A 7.0 μL aliquot of the PCR product was completely digested during 20 min at 37°C with 0.7 μL (five units/ μL) of the restriction enzyme. The digested DNA fragments were investigated by electrophoresis on 3% agarose gel. The conditions used for PCR amplification for the rs7794745 SNP were described by Li et al [24]. A 7.0 μL aliquot of the PCR product was completely digested during 20 min. at 65°C with 0.5 μL (five units/ μL) of the restriction enzyme and the digested DNA fragments were investigated by electrophoresis on 3% agarose gel.

Statistical analysis

GraphPad Prisma 5 computer program was used for all statistical calculations. The chi-square test (χ^2) was applied to compare the overall frequencies of SNP genotypes between ASD individuals and the control group, and verify when the distribution of the genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium. Fisher's exact test was used to detect differences in the distribution of genotypes in both SNPs of the *CNTNAP2* gene; a 5% alpha error ($p < 0.05$) was considered acceptable. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were also calculated for association analyzes.

Results

We genotyped 210 ASD patients (case group) and 200 non-autistic apparently healthy individuals (control group) from different regions of São Paulo state, Brazil.

The frequency of the T allele of the *CNTNAP2* SNP rs7794745 was 0.43 (182/420). For this polymorphism, 43 individuals were homozygous for the presumed risk allele (T) and 167 were A carriers (AA: n=71 and AT: n=96). There was no significant difference in the frequency of genotypes between the groups for rs7794745 ($\chi^2=4.715$; $p=0.095$, Degree of freedom (DF) =2). However, the distribution of homozygous individuals for the presumed risk allele (TT) between individuals with ASD and the control group showed a statistically significant difference ($p=0.034$), suggesting an increase chance to association of the presence of this genotype with ASD (OR =1.802; 95% CI 01.054 – 3.083; $p=0.042$) (Table 2).

The frequency of allele C of *CNTNAP2* rs2710102 SNP was 0.52 (219/420). For this polymorphism, 50 individuals were homozygous for the presumed risk allele (CC) and 160 were T carriers (CT: n=119 and TT: n=41). The frequencies of the genotypes were similar and showed no statistically significant differences between the groups ($\chi^2=3.596$; $p=0.166$; DF=2), even to the distribution of genotype with the risk genotype (CC) ($p=0.077$),

suggesting that there was no chance of association between this genotype and ASD (OR=0.664; 95% IC 0.429 – 1.026; p=0.082) (Table 3).

The distributions of the rs7794745 and rs2710102 genotypes were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium in ASD individuals ($\chi^2 = 1$, p=0.316 and $\chi^2 = 3.86$, p=0.051 respectively) as well as in the control group ($\chi^2 = 0.89$, p=0.345 and $\chi^2 = 0.90$, p=0.341). There was no also evidence of linkage disequilibrium ($D' = 0.034$ and $r^2 = 0.001$) between the SNPs which are 1Mb distance each other.

Discussion

Converging evidence, several researches suggest that the *CNTNAP2* gene is a strong candidate for predisposition to autism [17; 19]. Common genomic variants of *CNTNAP2* have been associated with a range of phenotypes, including impaired language function, abnormal social behavior, intellectual deficiency, epilepsy and schizophrenia [25,26] and all them have already been associated with spectrum of phenotypic manifestations that can occur in ASD individuals [27,28].

The frequency of the T allele of *CNTNAP2* SNP rs779475 in this study (0.43) was similar to others published in the HapMap database for the European (CEU – 0.31) and Asiatic populations (HCB – 0.45) and the Chinese Han population (0.43) studied by Li et al [24].

In this current study we found a significant higher frequency of the TT genotype in individuals diagnosed with ASD when compared to healthy subjects. The presence of the risk allele T in homozygous has been associated with changed activation of brain areas responsible for language in non-autistic individuals [21]. Language deficits are also a core feature in ASD. Genetic variations and abnormal gene expressions of *CNTNAP2* may alter risk for specific language impairment by altering brain function during linguistic processing, which

could result in phenotypic effects such as ASD [29]. A positive association between the TT genotype and predisposition for autism has been observed by other authors [15; 20] Thus, based on the results of our study we can suggest that one common variant of *CNTNAP2* (genotype TT for rs7794745) is likely to contribute to the susceptibility for autism, in agreement with previous findings.

The frequency of the C allele (0.52) of *CNTNAP2* SNP rs2710102 was similar to others published in the HapMap database such as those for European (CEU – 0.52) and Asiatic populations (HCB – 0.55).

The relationship between the genotype rs2710102 in homozygosis and ASD or clinical signs in autism was proposed in some studies [22; 16] but was not corroborated by others [30; 21].

However, the data of association of common variants of the *CNTNAP2* gene with ASD are very variable according to the literature. For example, Toma et al. [31] performed a case-control association study in 322 Spanish autistic patients and 524 controls. The results suggested that the rs2710102 and rs7794745 are unlikely to contribute to the susceptibility for autism.

Ethnic characteristics of populations may result in distinct genetic susceptibility for the same diseases [32]. According to this scenario we could suggest that the non-significant association between the SNP rs2710102 with autism could be attributed to the ethnic particularities of our population. The Brazilian population is highly miscegenated. As a result of five centuries of cross-breeding between Amerindians, Europeans and Africans, the Brazilian population displays very high levels of genomic diversity, with a predominant European ancestry in different regions [32], as the one studied here (São Paulo State). Considering the heterogeneity and admixture of Brazilians which may have important implications in studies of genetic markers including SNPs and susceptibility to complex

diseases like ASD, studies with these possible markers in different populations could be important in the practice of clinical genetics and the etiology of these diseases.

Rare, common and *de novo* mutations in synaptic genes like *CNTNAP2*, have been definitively established as responsible in playing a substantial role in population risk for ASD. The role of single nucleotide polymorphisms is an open question as the relative contribution of genes and environment. Moreover, the frequency of individual alleles is influenced by the sizes in the cases groups [33]. It must be considered that the small size of our sample may have affected the findings.

The clinically and genetically heterogeneous nature of ASD has led to the study of ASD endophenotypes, research genetics and pathophysiology of the disorder. A recent review identified over 103 genetic mutations and 44 genomic loci among subjects with ASD or autistic behavior [34]. Similar to these genes, it is suggested that SNPs play a role in susceptibility for ASD, but individually they are associated with very small effects and are widely distributed across the genome [35]. Certainly, with the progress toward identifying these genetic markers, improved clinical definitions and diagnostic tools will be important [36, 37].

Conclusion

The SNP rs7794745 of the *CNTNAP2* gene, when in homozygous (genotype TT), may be associated with predisposition to autism in this Brazilian population. It can at least increase the risk to ASD, considering that SNPs in complex diseases generally have combined effects. Moreover, the relatively small size of sample suggests further investigations, with larger sample sizes are required to confirm this association.

Competing interests: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Author's contributions: PPN Conceptualized and designed the study, participated of data collection, carried out the molecular genetic studies, karyotype analysis and statistical analysis, drafted the initial manuscript, reviewed the manuscript and approved the final manuscript as submitted. ALBM participated of data collection, carried out the karyotype and molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. DBAR participated of data collection and karyotype analysis and approved the final manuscript as submitted. LCM and CCBM participated at the support the implementation of part of molecular analysis and statistical analysis. ACFC conceptualized and designed the study, supervised data collection, participated in the investigation and review of the diagnoses, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

Acknowledgement

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and BAP/FAMERP (Grant 2013/2014). The authors would like to acknowledge all the participants in this study and families.

References

- 1- Lauritsen MB: **Autism spectrum disorders**. *European child & adolescent psychiatry* 2013, **22**: 37-42.
- 2- Chuthapisith J, Ruangdaraganon N. **Early Detection of Autism Spectrum Disorders**. *Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment*. 1 st edition Edited by Deutsch S, InTeech; 2013: 3-14
- 3- Faras H, Ateeqi NA, Tidmarsh L: **Autism spectrum disorders**. *Annals of Saudi Medicine* 2010, **30**:295-300.
- 4- Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S: **Autism**. *Lancet* 2013, [Epub ahead of print]
- 5- Nassar N, Dixon G, Bourke J, Bower C, Glasson E, de Klerk N, Leonard H. **Autism spectrum disorders in young children: effect of changes in diagnostic practices** : *International Journal of Epidemiology* 2009, **38**:1245-1254.

- 6- Currenti SA: **Understanding and Determining the Etiology of Autism.** *Cellular e Molecular Neurobiology* 2010, **30**:161-171.
- 7- Devlin B, Scherer SW: **Genetic architecture in autism spectrum disorder.** *Current Opinion in Genetics & Development* 2012, **22**:229-237.
- 8- Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L, Croen LA, Ozonoff S, Lajonchere C, Grether JK, Risch N: **Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism.** *Archives of General Psychiatry* 2011, **68**:1095-1102.
- 9- Geschwind DH: **Genetics of autism spectrum disorders.** *Trends in Cognitive Sciences* 2011, **15**:409-416.
- 10- Sokolowsky M, Fakra E, Azorin JM: **Endophenotypes and autism spectrum disorders.** *L'Encéphale* 2012, **38**: 67-69.
- 11- Perche O, Laumonnier F, Baala L, Ardourel MY, Menuet A, Robin V, Mortaud S, Montécot-Dubourg C, Richard O, Pichon J, Briault S: **Autism, genetics and synaptic function alterations.** *Pathologie-biologie* 2010, **58**:381-386.
- 12- Ye H, Liu J, Wu JY: **Cell Adhesion Molecules and Their Involvement in Autism Spectrum Disorder.** *Neurosignals* 2010, **18**:62-71.
- 13- Abrahams BS, Geschwind DH: **Advances in autism genetics: on the threshold of a new Neurobiology.** *Nature Reviews Genetics* 2008, **9**:341-355.
- 14- Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP: **Genomics, Intellectual Disability, and Autism.** *The New England Journal of Medicine* 2012, **366**:733-743.
- 15- Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, Rea A, Guy M, Lin S, Cook EH, Chakravarti A: **A common genetic variant in the neurexin superfamily member *CNTNAP2* increases familial risk of autism.** *American Journal of Medical Genetics* 2008, **82**:160–164.
- 16- Alarcón M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH: **Linkage, association, and gene-expression analyses identify *CNTNAP2* as an autism-susceptibility gene.** *American Journal of Medical Genetics* 2008, **82**:150–159.
- 17- Stein MB, Yang BZ, Chavira DA, Hitchcock CA, Sung SC, Shipon-Blum E, Gelernter J: **A common genetic variant in the neurexin superfamily member *CNTNAP2* is associated with increased risk for selective mutism and social anxiety-related traits.** *Biology Psychiatry* 2011, **69**:825–831.
- 18- Clemm von Hohenberg C, Wigand MC, Kubicki M, Leicht G, Giegling I, Karch S, Hartmann AM, Konte B, Friedl M, Ballinger T, Eckbo R, Bouix S, Jäger L, Shenton ME, Rujescu D, Mulert C: ***CNTNAP2* polymorphisms and structural brain connectivity: a diffusion-tensor imaging study.** *Journal of psychiatric research* 2013, **47**:1349-1356.
- 19- Peñagarikano O, Geschwind DH: **What does *CNTNAP2* reveal about autism spectrum disorder?** *Trends in Molecular Medicine* 2012, **18**:156-163.

- 20-Tan GC, Doke TF, Ashburner J, Wood NW, Frackowiak RS: **Normal variation in fronto-occipital circuitry and cerebellar structure with an autism-associated polymorphism of *CNTNAP2***. *Neuroimage* 2010, **53**:1030–104.
- 21-Whalley HC, O'Connell G, Sussmann JE, Peel A, Stanfield AC, Hayiou-Thomas ME, Johnstone EC, Lawrie SM, McIntosh AM, Hall J: **Genetic Variation in *CNTNAP2* Alters Brain Function During Linguistic Processing in Healthy Individuals**. *American Journal of Medical Genetics* 2011, **156B**: 941-948.
- 22-Scott-Van Zeeland AA, Abrahams BS, Alvarez-Retuerto AI, Sonnenblick LI, Rudie JD, Ghahremani D, Mumford JA, Poldrack RA, Dapretto M, Geschwind DH, Bookheimer SY: **Altered Functional Connectivity in Frontal Lobe Circuits Is Associated with Variation in the Autism Risk Gene *CNTNAP2***. *Science Translational Medicine* 2010, **2**:56-80.
- 23-Miller S.A, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**. *Nucleic Acids Research* 1988, **16**:1215.
- 24-Li X, Hu Z, He Y, Xiong Z, Long Z, Peng Y, Bu F, Ling J, Xun G, Mo X, Pan Q, Zhao J, Xia K: **Association analysis of *CNTNAP2* polymorphisms with autism in the Chinese Han population**. *Psychiatric Genetics* 2010, **20**:113-177.
- 25-Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW: **Molecular Cytogenetic Analysis and Resequencing of Contactin Associated Protein-Like 2 in Autism Spectrum Disorders**. *The American Journal of Human Genetics* 2008, **82**:165-173.
- 26-Friedman JI, Vrijenhoek T, Markx S, Janssen IM, van der Vliet WA, Faas BH, Knoers NV, Cahn W, Kahn RS, Edelmann L, Davis KL, Silverman JM, Brunner HG, van Kessel AG, Wijmenga C, Ophoff RA, Veltman JA: ***CNTNAP2* gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy**. *Nature* 2008, **13**:261-266.
- 27-Miles JH: **Autism spectrum disorders-a genetics review**. *Genetics in Medicine* 2011, **13**:278-294.
- 28-Angelidou A, Asadi S, Alysandratos KD, Karagkouni A, Kourembanas S, Theoharides TC: **Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-Review and proposal**. *BMC Pediatrics* 2012, 12189.
- 29-Rodenas-Cuadrado P, Ho J, Vernes SC: **Shining a light on *CNTNAP2*: complex functions to complex disorders**. *European journal of human genetics: EJHG* 2011, [Epub ahead of print]
- 30-Sampath S, Bhat S, Gupta S, O'Connor A, West AB, Arking DE, Chakravarti: **Defining the Contribution of *CNTNAP2* to Autism Susceptibility**. *Plos One* 2013, **10**: e77906.
- 31-Toma C, Hervás A, Torrico B, Balmaña N, Salgado M, Maristany M, Villela E, Martínez-Leal R, Planelles MI, Cuscó I, del Campo M, Pérez-Jurado LA, Caballero-Andaluz R, de Diego-Otero Y, Pérez-Costilhas L, Ribasés M, Bayés M, Cormand B: **Analysis of two language-related genes in autism: a case-control association of *FOXP2* and *CNTNAP2***. *Psychiatric genetics* 2013, **23**: 82-85.

- 32-Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G: **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected.** *PLoS One* 2011, **6**:e17063
- 33-Murdoch JD, State MW: **Recent developments in the genetics of autism spectrum disorders.** *Current opinion in genetics & development* 2013, **23**:310-315.
- 34-Betancur C: **Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting.** *Brain Research* 2011, **1380**:42-77.
- 35-Huguet G, Ey E, Bourgeron T: **The genetic landscapes of autism spectrum disorders.** *Annual review of genomics and human genetics* 2013, **14**: 191-213.
- 36-State MW, Levitt P: **The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders.** *Nature Neuroscience* 2011, **14**:1499-1506.
- 37-Vande Wydeven K, Kwan A, Hardan AY, Bernstein JA: **Underutilization of Genetics Services for Autism: The Importance of Parental Awareness and Provider Recommendation.** *Journal of Genetic Counseling* 2012, **21**:803–813.

Tables and captions

Table 1: Information of the *primers* and PCR-RFLP Analysis

SNP	Primer sequence (5' - 3')	Product (bp)	Restriction enzyme	Allele pb	
rs2710102	ATGGATGGACTGACCGATTG TTGTGTTGTTTGGCCATGAT	198	AvaI (Eco881)	C (43/155)	T (198)
rs7794745	CAACATTGATCCCTTCAGCCAT CTCACCAGTGTGCTTCAGACCA	311	Tsp509I	T (78/223)	A (311)

PCR-RFLP, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; SNP, single nucleotide polymorphism.

Table 2: The frequencies of rs7794745 genotypes in ASD individuals and no autistic healthy individuals.

rs 7794745	ASD (n=210)		Control (n=200)		OR**	IC 95%	p**
Genotype	N	%	N	%			
AA	71	33.8	75	37.5	0.852	0.568-1.2676	0.470
AT	96	45.7	100	50.0	0.842	0.571 – 1.241	0.429
TT	43	20.47	25	12.5	1.802	01.054 – 3.083	0.034

* Odds ratio.

**Calculated by Fisher's exact test.

Table 3: The frequencies of rs 2710102 genotypes in ASD individuals and no autistic healthy individuals.

rs 2710102	ASD (n=210)		Controls (n=200)		OR**	IC 95%	p**
Genotype	N	%	N	%			
TT	41	19.5	32	16.0	1.274	0.765 – 2.119	0.369
CT	119	56.7	104	52.0	1.207	0.818 – 1.781	0.372
CC	50	23.8	64	32.0	0.664	0.429 – 1.026	0.077

**Odds ratio.

*Calculated by Fisher's exact test.

8.2 Apêndice B: Artigo à ser submetido intitulado “Polymorphism (G22A) frequency of Adenosine Deaminase gene in individuals with Autism Spectrum Disorders”

Polymorphism (G22A) frequency of adenosine deaminase gene in individuals with Autism Spectrum Disorders

Patrícia Pereira do Nascimento¹, Ana Luiza Bossolani Martins¹, Dante Bruno Avanzo Rosan¹, Luiz Carlos de Mattos², Cinara de Cássia Brandão de Mattos², Agnes Cristina Fett-Conte²

¹ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Abstract

Objective: Autism Spectrum Disorders (ASD) are neuropsychiatric disorders with complex and heterogeneous etiology. Recent investigations revealed genes and their common variants like nucleotide single polymorphisms in the susceptibility the ASD. The gene Adenosine Deaminase (*ADA*) seems to play a role in the pathophysiology of ASD once it modulates release of several neurotransmitters and participates in purine metabolism. Some studies with Italian families suggested that the presence of genotype GA of the most frequent functional polymorphism of *ADA*, the G22A, could be associated with predisposition to ASD. This study aimed to evaluate the G22A polymorphism in individuals with ADS from a Brazilian population and evaluate their possible association with the autistic phenotype predisposition. **Methods:** The genotypes of the G22A of *ADA* gene were identified with PCR-RFLP analyses in 210 individuals with idiopathic ASD and 200 apparently healthy individuals. **Results** The frequency of distribution the GA genotype observed in affected individuals (12/210 – 5,7%) when compared to the control group (22/200 – 11%) was not significant ($p= 0.072$). However, the frequency of G allele was found at higher frequency among affected individuals ($p= 0.039$) who showed increased risk in association with ASD (OR= 2,170; IC95% 1,070-4,402; $p= 0.043$). **Conclusion** Thus our findings suggest that the G22A polymorphism is not associated with predisposition for autism in the Brazilian population studied, but it is necessary to increase the sample size, including patients from other regions.

Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASD) are neuropsychiatric disorders characterized by difficulties in social communication domain, unusually repetitive behavior and restricted interests. These manifestations, of early onset, are usually observed before three years of age with varying levels of impairment throughout the development of the individual. The prevalence varies by region, but it is believed to be around 1:150 individuals, including all ethnic and social classes. Males are more frequently affected (4:1) (LAURITSEN, 2013; NASSAR et al., 2009).

Although many environmental factors have already been related with the pathogenesis of the disease, the involvement of genetic factors is certain (DEVLIN; SCHERER, 2012). Recent researches showed that search for genes involved in susceptibility autism is somewhat challenging but promising, in special those that act on the central nervous system and neurotransmission pathways. Moreover, recent findings of analysis of the genome has allowed that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes to be associated with predisposition in these disorders and could provide a possible explanation for the phenotypic variability (PERCHE et al., 2010; MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012)

The ADA gene (adenosine deaminase – OMIM 608958) that is mapped in 20q13 and encodes the protein adenosine deaminase, an enzyme of purine metabolism, has been implicated as a candidate for susceptibility to autism. Responsible to modulate the release of several neurotransmitters such as glutamate, dopamine, serotonin and acetylcholine, the protein is located on the surface of many cell types, including neurons, acting as a cell adhesion molecule with an important role in growth regulation and neuronal plasticity (DUTRA et al., 2010; GHAZIUDDIN; AL-OWAIN, 2013).

The most common functional polymorphism of the ADA gene, the SNP G22A (rs73598374), results from substitution of asparagine (Asn, ADA * 1 allele) for aspárgico acid (Asp, ADA * 2 allele) at codon 8. The originated SNP, located in éxon1, displays a decrease of 20-30% of functional activity in the presence of the A allele, reflected among those with genotype GA, when compared to subjects with GG genotype (BOTTINI et al., 2001; DUTRA et al, 2010). Some studies with Italian families observed an increased frequency of the A allele among individuals with autism phenotype, suggesting that the presence of genotype GA could be associated with predisposition to the disease (PERSICO, 2000; BOTTINI, 2001).

Inborn errors of purine metabolism have been implicated as a cause for some cases of autism (STUBBS et al., 1982). This hypothesis is supported by the finding of decreased

adenosine deaminase (ADA) activity in the sera of some children with autism although the frequency of autistic behavior in patients with metabolic diseases is not known (DUTRA et al., 2009; GHAZIUDDIN; OWAIN AL-2013).

This study aimed to evaluate the G22A polymorphism frequency in individuals with ADS from a Brazil population and evaluate their possible association with the autistic phenotype predisposition.

Subjects and method

The study protocol was approved by Ethics Research Committee of the School of Medicine in Sao Jose do Rio Preto (CEP n° 77376). All subjects received a full explanation of the procedures and written informed consents were obtained.

The study involved 210 individuals with idiopathic ASD (174 males and 36 females) who were recruited in psychiatric clinics and specialized schools in São Paulo State, Brazil. Diagnosis of ASD was performed according to the DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 4th edition) following previously standardized criteria. All the patients were evaluated for possible associated syndromes and for potential environmental etiologic factors, chromosomal abnormalities by conventional GTG-banding. The males were tested too for the *FMRI* gene mutation by molecular tests. Individuals with some of these alterations, those who were dysmorphic or had hearing disorders were excluded.

The control group included 200 non-autistic, apparently healthy individuals (137 males and 64 females), without complaints of psychiatric disorders and no family history of such disorders for at least three generations or in the next. They were recruited among healthy blood donors from the Blood Center of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Genomic DNA was extracted from whole peripheral blood samples by the Ficoll Paque method according to the Miller et al (1988) with modifications. The SNP G22A of *ADA* gene was genotyped in all participants by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis following the protocol of Safranow et al (2007). The fragments were analyzed by electrophoresis (constant current of 100V for 60 minutes) on a 2% agarose gel, and visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

GraphPad Prism 5 software was used for all statistical calculations. The chi-square test (χ^2) and Fisher's exact test was applied to compare the genotype frequencies and distribution between ASD individuals and the control group. Odds ratio with 95% confidence intervals was calculated to estimate the association between genotype and ASD. The HardyWeinberg

equilibrium was calculated in both groups. Alpha error of 5% ($P < 0.05$) was considered acceptable to all analyses.

Results

We genotyped the *ADA* SNP G22A in 210 ASD patients (case group) and in 200 non-autistic apparently healthy individuals (control group) from different regions of São Paulo state, Brazil.

Table 1 shows the frequencies and distribution of *ADA* genotypes in patients with ASD and healthy individuals. There was no significant difference in the frequency of genotypes between the groups ($\chi^2 = 4.876$; $p = 0.087$; $GL = 2$). The distribution of GA genotype observed in the affected individuals when compared with controls was not significant ($p = 0.072$).

Analysis of GG genotype and G allele showed possible association ($OR > 1$) with ASD. However, only the analysis of the G allele showed statistically significant results ($OR = 2.170$; $IC95\% 1.070 - 4.402$; $p = 0.043$), while for the genotype GG the results was not statistically significant ($OR = 2.144$; $IC95\% 1.036 - 4.435$; $p = 0.055$).

The frequency of the risk allele A was 0,03 (12/420) compared with 0,06 (24/400) in control group. The AA genotype was not found in affected individuals. Genotype distributions of controls and affected individuals do not deviate from those expected on the basis of Hardy-Weinberg equilibrium.

Discussion

Studies have linked the presence of the A allele of SNP G22A with decreased enzyme activity between 20-30%, and it is suggested that subjects with genotype GA have functional consequences of this polymorphism in the neuromodulation mediated by the enzyme (DUTRA et al, 2010). Thus, a direct involvement of adenosine neurotransmission in autism cannot be excluded considering that the protein adenosine is a regulator of dopaminergic and serotonergic transmission in CNS. However, few studies have described autistic features in patients with low levels of *ADA* (STUBBS et al, 1982; STATHIS et al, 2000). Moreover, in 1982, Stubbs and colleagues investigated serum activity of enzymes of purine metabolism, and found that *ADA* activity was reduced only in the sera of autistic children when compared with normal controls.

Analyses of SNP G22A of *ADA* gene revealed no frequencies that allow associating such variant with predisposition to ASD. Genotypic frequencies found among our affected

individuals - GG (94.3%), GA (5.7%), AA (0%) - were similar to the frequencies of the genotypes of the Caucasian population of healthy individuals: GG (88-92%), GA (8-12%) and AA (<1%) (PERSICO et al., 2000).

The studies with autistic Italian descent individuals that had already associated the GA genotype with the predisposition of ASD showed frequencies of the allele A higher compared with that found in our study population. Bottini et al (2001) and Persico et al (2000) reported an allelic frequency 18.2% and 8.7% respectively among affected individuals. In our study the frequency of the A allele found among affected individuals was 3%, similar to that found in the study with North American population (4.8%) (HETTINGER; LIU; HOLDEN, 2008) that also no revealed significant increase in the frequency of genotype GA and allele A among affected individuals. The lowest allelic frequency in our and American northern population may have influenced the genotype distribution.

However, this study showed an increased transmission of allele G in healthy parents to affected children. Interestingly, in our study, the frequency of G allele among affected compared to controls, was significantly higher.

Ethnic characteristics of populations may result in distinct genetic susceptibility for the same diseases. The Brazilian population displays very high levels of genomic diversity (PENA et al., 2011). However, the families of Italian descent studied by Persico et al (2000) and Bottini et al (2001) may represent a more homogeneous group than our affected group which could explain the possible association between genotype GA of SNP G22A and ASD.

Thus, the role of *ADA* in autism remains controversial. The heterogeneity and admixture of Brazilian population may have important implications for studies of genetic markers, including SNPs and susceptibility to complex diseases such as ASD. Studies with these potential markers in different populations may be important in the practice of clinical genetics and etiology of diseases.

References

Lauritsen MB. Autism spectrum disorders. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2013, 22: 37-42.

Nassar N, Dixon G, Bourke J, Bower C, Glasson E, de Klerk N, Leonard H. Autism spectrum disorders in young children: effect of changes in diagnostic practices. Int J Epidemiol. 2009, 38:1245-1254

Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder Curr Opin Genet Dev 2012, 22:229-237

Perche O, Laumonnier F, Baala L, Ardourel MY, Menuet A, Robin V, Mortaud S, Montécot-Dubourg C, Richard O, Pichon J, Briault S. Autism, genetics and synaptic function alterations. *Pathol Biol (Paris)* 2010, 58:381-386.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011, 6:e17063

Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP: Genomics, Intellectual Disability, and Autism. *N Engl J Med* 2012, 366:733-743.

Dutra GP, Ottoni GL, Lara DR, Bogo MR. Lower frequency of the low activity adenosine deaminase allelic variant (ADA1*2) in schizophrenic patients. *Rev Bras de Psiquiatr*, 2010, 32: 275-278.

Ghaziuddin M, Al-Owain M. Autism spectrum disorders and inborn errors of metabolism: an update. *Pediatr Neurol* 2013, 49:232-236.

Bottini N, De Luca D, Saccucci P, Fiumara A, Elia M, Porfirio MC., et al. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics* 2001, 13:111-113.

Persico AM, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Montecchi F, et al. Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: Case-control and family-based association studies. *Am J Med Genet* 2000, 96:784–790.

Safranow K, Rzeuski R, Binczak-Kuleta A, Czyzycka E, Skowronek J, Jakubowska K, et al. ADA*2 Allele of the Adenosine Deaminase Gene May Protect against Coronary Artery Disease. *Cardiology*. 2007, 108:275-281.

Stubbs G, Litt M, Lis E, Jackson R, Voth W, Lindberg A, Litt R. Adenosine deaminase activity decreased in autism. *J Am Acad Child Psychiatry* 1982, 21:71–74.

Stathis SL, Cowley DM, Broe D. Autism and adenylosuccinase deficiency. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000; 39:274-275.

Tables

Table 1: The frequencies of SNP G22A genotypes in ASD individuals and no autistic healthy individuals.

<i>ADA</i> G22A	TEA (n=210) N(%)	Contr. (n=200) N(%)	<i>p</i> *	OR**	<i>p</i>	IC 95%
Genótipos						
GG	198 (94.3%)	177 (88.5%)	0.051	2.144	0.055	1.036-4.435
GA	12 (5.7%)	22 (11.0%)	0.072	0.490	0.078	0.236-1.019
AA	0 (0%)	1 (0.5%)	0.488	0.316	0.980	0.128–7.807

**Odds ratio.

*Calculated by Fisher's exact test.

8.3 Apêndice C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - grupo controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Para uma investigação científica honesta e segura, a pessoa que vai participar do estudo, ou o seu responsável legal, deve dar seu consentimento livremente, após ter sido muito bem esclarecido sobre os riscos e benefícios do estudo. É da responsabilidade do pesquisador dar toda e qualquer informação necessária e solicitada. Este documento, portanto, tem a finalidade de proteger o participante do estudo.

Este documento tem o objetivo de convidar o (a)....., para participar do Projeto de Pesquisa “**Polimorfismos dos genes *ADA* e *CNTNAP2* em Indivíduos com Transtornos do Espectro Autístico**”, que está sob a responsabilidade das pesquisadoras **Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte** (Depto de Biologia Molecular – FAMERP) e **Patrícia Pereira do Nascimento** (mestranda – IBILCE/UNESP), cujos telefones para contato são: (17)32015000, ramal 1931 (Serviço de Genética) e (17)32015000 ramal 5813 (Comitê de Ética em Pesquisa/FAMERP) .

O **objetivo** é avaliar algumas regiões específicas do material genético, denominadas genes, e as alterações que podem estar presentes, que participam de sinapses (região de interação entre células nervosas) em pacientes com doenças do espectro autístico (doenças comportamentais), e comparar com um grupo controle, constituído de pessoas saudáveis, sem história de doenças psiquiátricas na família, do qual o (a) senhor (a) fará parte. Estas regiões podem estar relacionadas com a causa desta doença e é isso que será estudado.

Para atingir este objetivo, será necessária a coleta de um pouco (5mL) de sangue da veia do seu braço, sem necessidade de estar em jejum, que será coletado por profissional especializado. O seu sangue será utilizado única e exclusivamente para atingir o objetivo deste estudo e após a sua utilização será descartado.

Os **riscos** para a saúde incluem dor, ardência, infecção ou mancha roxa no braço no local da retirada do sangue, mas todas as medidas de proteção serão tomadas.

Para esclarecimento de dúvidas as pesquisadoras responsáveis podem ser contatadas pelo telefone ou pessoalmente. Como seu material genético será utilizado como controle normal, não serão entregues laudos de exames ou resultados. Também, todas as informações obtidas da sua participação serão consideradas confidenciais, ficando a sua identidade mantida em segredo, em qualquer situação. Se decidir não participar ou interromper a sua participação, em qualquer época, você não terá nenhum tipo de prejuízo, e não precisará dar justificativas da sua atitude.

Ao assinar esse documento, você estará confirmando que o leu, recebeu informações claras sobre este estudo, que teve oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas, que **está de acordo em participar livre e espontaneamente** e sabe que, sob hipótese alguma receberá qualquer tipo de gratificação pela participação.

Este estudo poderá contribuir para o conhecimento das causas e das manifestações envolvidas no comportamento autístico.

Eu dou o meu consentimento para participação do projeto de pesquisa:

Nome:

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios desta investigação. Coloquei-me à disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para qualquer outro esclarecimento pelo telefone (17)3201-5000 ramal 1931.

Pesquisador:.....

RG:.....

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

9. ANEXOS

9.1 Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (FAMERP)



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/04

Parecer n.º 77376

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE 05188712.5.000.5415 sob a responsabilidade de Patrícia Pereira do Nascimento, com o título "Polimorfismos dos Genes ADA e CNTNAP2 em indivíduos com Transtornos do Espectro Autístico" está de acordo com a resolução da CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 20 de agosto de 2012.


Prof. Dr. Fernando Batigália
Presidente do CEP/FAMERP

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - CEP 15090-000 - São José do Rio Preto - SP - Brasil
Tel. (17) 3201-5700 - Fax (17) 3229-1777 - www.famerp.br

9.2 Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - grupo caso

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Para uma investigação científica honesta e segura, a pessoa que vai participar do estudo, ou o seu responsável legal, deve dar seu consentimento livremente, após ter sido muito bem esclarecido sobre os riscos e benefícios do estudo. É da responsabilidade do pesquisador dar toda e qualquer informação necessária e solicitada. Este documento, portanto, tem a finalidade de proteger o participante do estudo.

Este documento tem o objetivo de convidar o (a)....., **pelo qual o (a) senhor (a) é responsável legal**, a participar do Projeto de Pesquisa “**Análise de Genes Envolvidos na Neurotransmissão, Formação e Manutenção Sináptica em Indivíduos com Doenças do Espectro Autístico**”, que está sob a responsabilidade das pesquisadoras **Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte** (orientadora - Depto de Biologia Molecular – FAMERP) e **Ana Luiza Bossolani Martins** (doutoranda – IBILCE/UNESP), cujos telefones para contato são: (17)32015000, ramal 1931 (Serviço de Genética) e (17)32015000 ramal 5813 (Comitê de Ética em Pesquisa/FAMERP)

O **objetivo** é avaliar algumas regiões específicas do material genético, denominadas genes, que participam de sinapses (região de interação entre células nervosas) em pessoas com doenças do espectro autístico, que são doenças comportamentais, como a que seu (sua) filho (a) apresenta. Estas regiões podem estar relacionadas com a causa destas doenças e é isso que será estudado.

Para participar, será necessária a coleta de um pouco (10mL) de sangue da veia do braço do (a) seu (sua) filho (a), sem necessidade de estar em jejum, que será coletado por profissional especializado. O sangue do paciente será utilizado única e exclusivamente para atingir o objetivo deste estudo e após a sua utilização será descartado.

Os possíveis **riscos** para a saúde incluem dor, ardência, infecção ou mancha roxa no braço no local da retirada do sangue, mas todas as medidas de proteção serão tomadas.

Para **esclarecimento de dúvidas** as pesquisadoras responsáveis podem ser contatadas pelo telefone ou pessoalmente. Em caso de ser detectada alguma alteração nos exames, os resultados e todas as informações/esclarecimentos serão oferecidos a você em sessão de Aconselhamento Genético, que será realizada pela pesquisadora orientadora deste estudo.

Também, todas as informações obtidas da sua participação serão consideradas confidenciais, ficando a identidade de toda sua família mantida em segredo, em qualquer situação. As informações obtidas desta pesquisa só poderão ser divulgadas em reuniões ou revistas científicas e sem revelar o nome do (a) seu (sua) filho (a). Se decidir não participar ou interromper a sua participação, em qualquer época, você não terá nenhum tipo de prejuízo, não perderá nenhum benefício e não precisará dar justificativas da sua atitude.

Ao assinar este documento, você estará confirmando que o leu, recebeu informações claras sobre este estudo, que teve oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas, que **está de acordo em participar livre e espontaneamente** e sabe que, sob hipótese alguma receberá qualquer tipo de gratificação pela participação.

Este estudo poderá contribuir para o conhecimento das causas e das manifestações envolvidas no comportamento autístico e que, dependendo do resultado, no seu caso, poderá auxiliar no diagnóstico e orientação genética para a sua família.

Eu dou o meu consentimento para participação do (a) meu (minha) filho (a).

Nome do responsável legal:

Vínculo: Pai() mãe() outro().....

Quero receber os resultados dos exames? Sim () Não ()

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

.....

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios desta investigação. Coloquei-me à disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para qualquer outro esclarecimento pelo telefone (17) 3201-5000 ramal 1931.

Pesquisador:.....

RG:.....

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ___/___/___

Assinatura