

Carina Tatiana Glunco

**“ESTUDO GENÉTICO - CLÍNICO, INVESTIGAÇÃO DA
SÍNDROME DO CROMOSSOMO X FRÁGIL E
POLIMORFISMOS DA APOLIPOPROTEÍNA
E EM AUTISMO”**



1910001551



Carina Tatiana Giunco

**“ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO,
INVESTIGAÇÃO DA SÍNDROME DO
CROMOSSOMO X FRÁGIL E
POLIMORFISMOS DA
APOLIPOPROTEÍNA E EM AUTISMO”**

Tese apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Genética
da Universidade Estadual
Paulista, campus de São José do
Rio Preto, para obtenção do título
de Doutor em Genética.



São José do Rio Preto

2006

1576.3: 575

G 537e

22/11/2006

Doação

Autor(a)

Giunco, C.T.

Estudo Genético-Clínico, Investigação da Síndrome do Cromossomo X Frágil e Polimorfismos da Apolipoproteína E em autismo. – São José do Rio Preto : [s.n.] , 2006
154f. ; 30 cm.

Orientador: Agnes Cristina Fett-Conte

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Assunto. 2. Assunto. 3. Assunto. I. Fett-Conte, A. C., II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título. Estudo Genético-Clínico, Investigação da Síndrome do Cromossomo X Frágil e Polimorfismos da Apolipoproteína E em autismo

CDU –

Orientadora: *Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte*

Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São

José do Rio Preto - FAMERP



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Hospital de Base de São José do Rio Preto, na Escola do Autista de São José do Rio Preto e Associação Amigos do Autista de Ribeirão Preto.

Foi escrito na forma de Artigos Científicos, de acordo com as recomendações do Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, SP.

Carina Tatiana Giunco

**“ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO, INVESTIGAÇÃO DA SÍNDROME
DO CROMOSSOMO X FRÁGIL E POLIMORFISMOS DA
APOLIPOPROTEÍNA E EM AUTISMO”**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador

São José do Rio Preto, ____/____/____.

Dedicação

*Eu Sou aquele que não tem nome nem forma.
Não te importes tanto se vivi há muito ou há pouco,
Se no Oriente ou no Ocidente
Importa que eu viva aqui e agora, dentro do teu coração.*

Autor desconhecido

Agradecimentos

Dedicação

Dedico este trabalho à todas as famílias que muito pacientemente reviveram comigo a sua história de aceitação e superação dos obstáculos dessa vida e me fez entender, a cada nova conversa, o sentido do que parece (só parece) não fazer sentido.

Dedico este trabalho à minha avó Soledade (in memoriam), que deixou muita saudade, mas também toda força e estrutura necessária para realização de todos os projetos da minha vida.

Dedico este trabalho à minha mãe que ensinou toda aceitação necessária para superar as adversidades dessa vida.

Agradecimentos

Agradeço a minha filhinha *Aímê, amada*, que nasceu durante esse projeto por
me fazer entender melhor a vida.

Agradeço a meu marido *juny, cumplicidade*, por tudo que passamos e
passaremos juntos.

Agradeço à minha orientadora *Agnes, inspiração*, por todo conhecimento e
compreensão.

Agradeço à doutoranda *Adriana, amiga*, por fazer mais do que valer,
entender o sentido da palavra.

Agradeço à equipe do Laboratório de Genética *Brasilina, Valéria, Cristina*
e Paula, colegas, que me deram o ambiente e incentivo necessário o
desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Equipe do Laboratório de Biologia Molecular, *Dra. Andrea*
Borduchi e o Biomédico Fábio, profissionais, que me ajudaram a
resolver os problemas.

Agradeço à Equipe do Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular,
Dra. Dorotéia e Bióloga Marcela e pelo apoio durante o projeto.

Agradeço à *Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*,
estrutura, necessária na minha formação profissional e na realização deste
projeto.

Agradeço ao Setor de Pós-Graduação do IBILCE-UNESP , em nome da
funcionária *Rosana, gentil*, por todas as informações e dúvidas sempre
prontamente atendidas.

Agradeço ao *Programa de Pós-Graduação em Genética do IBILCE-*
UNESP pela compreensão:

Agradeço sobretudo à vida por ter me dado *amor, cumplicidade*,
inspiração, amigos, colegas, profissionais, apoio, estrutura,
gentileza e compreensão para mais esta realização.

Sumário

Capítulo I: Introdução.....	1
I.1 Autismo Definições e Características	2
I.2 Dados Epidemiológicos.....	4
I.3 Fatores Etiológicos e Associações.....	4
I.4 Genes de Susceptibilidade.....	8
I.5 Alterações Morfológicas.....	12
I.6 Apresentação da Tese.....	14
I.7 Objetivos.....	14
Referências Bibliográficas.....	15
Capítulo II: Material e Métodos.....	21
II.1 Casuística.....	22
II.2 Métodos.....	24
II.2.1 Caracterização da Classe Social.....	24
II.2.2 Antecedentes Familiares e Psiquiátricos.....	24
II.2.3 Avaliação das Características Físicas.....	28
II.2.4 Cultura de Linfócitos e Bandamento GTG.....	29
II.2.5 Extração de DNA de Leucócitos.....	31
II.2.6 Polimorfismo do Gene <i>APOE</i>	31
II.2.7 Investigação da Síndrome do Cromossomo X Frágil.....	32
II.2.8 Considerações Éticas.....	34
Referências Bibliográficas.....	36
Capítulo III: Genética de Susceptibilidade ao Espectro Autista.....	38

Capítulo IV : Apoliproteína E e Autismo.....	62
Capítulo V : Autismo e Síndrome do X Frágil.....	80
Capítulo VI :Antecedentes Familiais de Manifestações Psiquiátricas	92
Capítulo VII : Característica Físicas de Pacientes Autistas.....	111
Considerações Finais.....	132
Conclusões.....	142
Resumo.....	143
Anexo I.....	146
AnexoII.....	148
Anexo III.....	153
Abstract.....	154

Introdução

1.1. Antecedentes - Definição e características

Este capítulo tem como objetivo apresentar a importância da introdução em um trabalho acadêmico, bem como as características que a tornam uma seção fundamental para a compreensão do texto. A introdução deve ser clara, concisa e direta ao ponto, permitindo que o leitor tenha uma visão geral do conteúdo antes de mergulhar nos detalhes. Ela também deve estabelecer o contexto da pesquisa e justificar a relevância do tema abordado.

Em geral, a introdução é a primeira seção de um trabalho acadêmico e tem a função de orientar o leitor sobre o que será discutido no texto. Ela deve ser escrita de forma que seja fácil de ler e entender, mesmo para quem não é especialista na área. A introdução também deve ser interessante e atrativa, para que o leitor queira continuar lendo o trabalho. Para isso, é importante usar uma linguagem clara e objetiva, evitando termos técnicos desnecessários e frases longas e complicadas. Além disso, é importante usar exemplos e analogias para facilitar a compreensão dos conceitos apresentados.

Em suma, a introdução é uma seção fundamental para qualquer trabalho acadêmico. Ela deve ser escrita com cuidado e atenção, para que seja capaz de captar a atenção do leitor e orientá-lo sobre o que será discutido no texto. Uma boa introdução é aquela que é clara, concisa e direta ao ponto, permitindo que o leitor tenha uma visão geral do conteúdo antes de mergulhar nos detalhes.

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

I.1 Autismo – Definições e características

O autismo é uma das doenças mais complexas que envolvem diferentes mecanismos genéticos e influência ambiental. Sua sintomatologia também é complexa e envolve a tríade de deficiências qualitativas nas áreas de comunicação, interação social, interesses e atividades restritas, com uma variação fenotípica ampla, que engloba desde portadores com desempenho escolar superior e dificuldade de relacionamento até crianças com prejuízo cognitivo e comportamento autoagressivo (CAVALHEIRA et al., 2004).

Faz parte de um grupo de afecções psiquiátricas denominado “Transtornos Invasivos do Desenvolvimento” que inclui cinco diagnósticos: a Síndrome de Rett, o Transtorno Desintegrativo da Infância, Síndrome de Asperger, o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação e o Autismo (APA, 1994, CID-10, 1994). Os três últimos, por sua similariedade de sinais e sintomas, são mais comumente descritos como “Transtornos do Espectro Autista” (KLAUCK, 2006). Em todos eles a dificuldade de interação social é marcante e o que varia é a capacidade de comunicação e de interesses e atividades. O diagnóstico é clínico e baseado em um critério de pontuação que avalia as três áreas de prejuízo (Anexo 1).

O autismo é classificado no eixo III do DSM IV, que corresponde aos “distúrbios e condições físicas”. Neste item estão enfatizadas as dificuldades de estudo da doença considerando que, mesmo com pesquisa diagnóstica acurada, a

inespecificidade dos dados obtidos é marcante, embora a associação com fatores biológicos seja indiscutível (STEFFENBURG, 1991).

Por ser uma afecção que inclui agentes multicausais, o diagnóstico exige a presença de equipe multidisciplinar e inclui entrevistas com os pais, observação sistemática, e exames complementares, para subsidiar o raciocínio clínico e excluir outras possíveis doenças genéticas ou ambientais. Entretanto, esses instrumentos de mensuração não são suficientes, por si, para estabelecer um diagnóstico. A aplicação desses testes e escalas exige profissionais muito experientes (LIPPI, 2005).

A epidemiologia do autismo tem sido o foco de diversos estudos a partir dos anos 80, já que a frequência da doença tem aumentado consideravelmente. A introdução do termo autismo na literatura psiquiátrica data de 1906, e foi feita por Eugene Bleuler que o usou para descrever pacientes que se fecharam em um mundo próprio. Quase quarenta anos depois, em 1943, Léo Kanner usou o termo autismo infantil para descrever um grupo de onze crianças com características similares, descrevendo-os como isolados socialmente, com insistência na mesmice e linguagem anormal. Essa definição passou por múltiplas alterações, sendo primariamente descrita como psicose infantil ou uma forma precoce de esquizofrenia. Estudos posteriores consagraram a tríade como uma entidade separada e desde então, estudos acerca do tema têm demonstrando aumento na prevalência em concordância com as melhorias nas definições diagnósticas (FOMBONNE et al., 1999). Mas, embora a prevalência de autismo tenha aumentado, a prevalência de retardo mental tem caído na mesma proporção,

sugerindo uma mudança na categorização destes indivíduos. Assim, pode ser prematuro concluir que tenha havido um aumento do autismo no último século.

I.2 Dados Epidemiológicos

Quando o autismo é rigorosamente definido, em geral são relatadas taxas de prevalência de dois casos para cada 10.000 habitantes; definições menos rígidas sugeriam taxas de quatro a cinco casos por 10.000 (GILLBERG, 1991). Atualmente são estimados aproximadamente 13 casos para cada 10.000, com cerca de quatro homens para cada mulher afetada, podendo variar em função do tamanho da casuística e localização geográfica (RUTTER, 2005). Portanto, o aumento na prevalência parece ser real. Entretanto, particularmente no Brasil não há estatísticas oficiais e faltam profissionais preparados para o reconhecimento dos casos e orientação das famílias, o que pode influenciar os estudos epidemiológicos.

I.3 Fatores Etiológicos e Associações

O aumento na prevalência também tem sido discutido com base em variações ambientais, como a vacinação. Existem duas hipóteses que sugerem a vacinação como um agente importante na patologia do autismo. A primeira envolve a vacinação da rubéola e questões imunológicas, dada a alta comorbidade do autismo com a Síndrome Rubéólica Fetal, principalmente porque



alguns pais relataram sintomas temporários de autismo após a vacinação. A segunda sugere a impregnação por thimerosal, um componente de mercúrio orgânico presente na maioria das vacinas multidoses que agiria como um agente neurotóxico, pois a impregnação de metais pesados no sistema nervoso central caracteriza quadros de distúrbios de comportamento semelhantes. Contudo, esses estudos têm sido refutados e mostram resultados contraditórios (MADSEN et al., 2002; COHLY; PANJA, 2005; BURGESS et al., 2006).

Estudos de neuroimagem funcional e anatômica têm indicado várias áreas cerebrais contribuindo para a sintomatologia autista, embora estejam presentes em uma pequena porcentagem dos casos (MILLES et al., 2000).

Essas áreas incluem o sistema límbico, lobos temporais, corpo caloso e mais frequentemente o cerebelo (SEARS et al., 1999; HARDAN et al., 2000; HAZNEDAR et al., 2000; SCHULTZ et al., 2000; STARKSTEIN et al., 2000; Saioth et al., 2001).

Os estudos clínicos mostram que causas orgânicas estão envolvidas em torno de 11 a 37% dos casos, mas essa taxa pode variar de acordo com condições médicas consideradas e chegam a diminuir para cerca de 10% em outros estudos (GILLBERG; BILLSTEDT, 2000).

O autismo tem sido relacionado a uma grande variedade de ocorrências pré e pós-natais, assim como complicações obstétricas, mas que juntas somam apenas uma pequena parcela dos casos. (GILLBERG; COLEMAN, 1996; FOMBONNE, 2002).

A epilepsia é reportada em cerca de um terço dos casos na vida adulta, mas é particularmente mais freqüente nos outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (KURITA, 1991; CHAKRABARTI; FOMBONNE, 2001).

Embora a ligação do autismo com outras condições médicas diagnosticáveis seja convincente, o número total de indivíduos que têm uma condição genética conhecida ou não genética associada é muito pequeno e não há uma condição universal associada. Na verdade os estudos familiares mostram que a causa do autismo na maioria dos portadores é idiopática (RUTTER, 2000).

Ao mesmo tempo, há pelo menos duas fortes evidências de que o autismo sem causa diagnosticável seja um distúrbio hereditário. A primeira é que a taxa de recorrência em irmãos de afetados é de 2% a 8% (CHAKRABARTI; FOMBONNE, 2001), muito maior do que na da população em geral. Segundo, que em estudos com gêmeos a taxa de concordância para monozigóticos (MZ) é de cerca de 60%, contra 0% para dizigóticos (DZ). Se forem consideradas as três doenças do espectro autista, as taxas sobem de 60% para 92% em MZ e de 0% para 10% em DZ (BAILEY et al., 1995; Le COUTER et al., 1996).

Esse componente genético também é sugerido quando é analisada a taxa de outros distúrbios psiquiátricos encontrados em familiares de portadores da síndrome autística, como depressão, transtorno obsessivo-compulsivo, ou mesmo sinais e sintomas isolados, conhecido como *broader phenotype*, onde essas pessoas apresentam fobias sociais e prejuízo na comunicação (HOLLANDER et al., 2006). Essas características observadas em familiares fazem um paralelo com os três critérios básicos de diagnóstico do autismo (PIVEN et al., 1997) e esse fenômeno poderia estar relacionado à antecipação genética, ou seja, a

segregação de genes independentes que conferiram fenótipos mais brandos, mas que culminariam, em gerações posteriores, em portadores da síndrome completa ou síndrome autística (BISHOP et al., 2004).

Problemas de fala e linguagem também têm sido freqüentemente encontrados e há evidências de que mais de um locus de susceptibilidade ao autismo esteja relacionado ao desenvolvimento da fala (BRADFORD et al., 2001).

A variabilidade fenotípica provavelmente é consequência de mais de um mecanismo biológico envolvido e a inclusão das variantes menores no fenótipo autista pode ajudar a reduzir a taxa de falsos negativos. Entretanto, inevitavelmente, pode aumentar a taxa de falsos positivos ou fenocópias (PICKLES et al., 1995; BAILEY et al., 1998;). Portanto, são necessários estudos que definam o fenótipo e estimem as taxas de risco. Inclusive, são importantes os estudos para definir o estilo cognitivo dos familiares e auxiliar na compreensão do espectro fenotípico (BRISKMAN et al., 2001).

Há comorbidade do autismo com doenças genéticas bem definidas em apenas 6% dos casos, sendo as mais freqüentes a Síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA) e a Esclerose Tuberosa (OLIVEIRA, 2006; WONG, 2006).

A FRAXA é a causa mais freqüente de retardo mental herdável em homens, e é sugerida como a etiologia de maior comorbidade com o autismo, presente em cerca de 10% a 30% dos casos. Tem na sua etiopatogenia a ausência de uma proteína que é essencial para a formação e função cerebral normais (STOYANOVA et al., 2004). O gene que codifica esta proteína, o *FMR-1* se expressa em altos níveis no cérebro adulto e fetal, principalmente em áreas envolvidas no processo de aprendizagem (BAILEY, 2004).



Outras associações também têm sido descritas, como com a Síndrome de Turner, Cornélia de Langue, Síndrome de Cohen, entre outras, enquanto o retardo mental está presente em cerca de 75% dos casos de autismo (GIUNCO, 2002; REDDY, 2005; RENDTORFF et al., 2005).

Ainda em 1994, Rutter et al., sugeriram que múltiplos fatores genéticos são determinantes da maioria dos casos de autismo, o que tem sido confirmado com os estudos biomoleculares mais recentes que mostram diversas alterações genéticas associadas com o autismo (KLAUCK, 2006). Mesmo alterações cromossômicas com envolvimento de todos os cromossomos autossômicos e sexuais já foram descritas em portadores de autismo (GIUNCO et al., 2001) como mostra a Tabela 1.

I.4 Genes de Susceptibilidade

Na tentativa de indicar regiões de susceptibilidade genética para o autismo, alguns laboratórios se uniram na formação do International Molecular Genetics Study of Autism Consortium (IMGSAC), que desde 1995, tem revelado importantes avanços na identificação de genes que aumentam o risco de desenvolvimento do autismo. De acordo com resultados o cromossomo 7 é um dos mais importantes envolvidos na etiologia (IMGSAC, 1998), e o primeiro locus descrito de susceptibilidade ao autismo, o *AUTS1*, está mapeado em 7q (IMGSAC, 2001-a).

Tabela 1. Alterações cromossômicas encontradas em portadores de Distúrbios do Espectro Autista.

Cromossomo	Anormalidade
1	del(1)(q43)
2	del 2q37 inversão pericêntrica
3	t(3;12)(p26.3;q23.3)
4	4p desequilíbrio de ligação
5	5pter→5p15.3 del(5)(q15q22.3)
6	6p- trissomia parcial
7	(inv(7)(q22-q31.2)) 7q desequilíbrio de ligação
8	46,X,t(X;8)(p22.13;q22.1) del 8q
9	del(9)(p)
11	t(5,11;q,q)
12	t(3;12)(p26.3;q23.3) t(4;12)(q21.3;q15)
13	trisomia 13 del(13)(p)
15	inv dup15q11q13
16	del 16q23.1 invdup16q13q22
17	[Ins(17)(p11.2q11.2q21.3)] del(17)(p11.2)
18	18q- del(18)(p11.3) e dup18q
19	t(17;19)
20	45,XY,- 22,+der(20),t(20;22)(q13.3 ;q11.2) del 20p11.22-p11.23
22	r(22) del 22q13
X	45,X del Xp
Y	47,XXY Duplicação parcial de Yq

Em 7q, entre outros, também estão localizados os genes da família WNT, mais especificamente o *WNT2*, que influencia o desenvolvimento do sistema nervoso central. Nesse caso, os autores sugerem que uma mutação rara neste gene, quando presente em heterozigossidade, aumentaria a susceptibilidade para o autismo (WASSINK et al., 2001). Os estudos confirmam uma grande heterogeneidade genética e apontam de três a dez genes envolvidos, com provável expressão diferencial e epistasia (BRADFORD et al., 2001; VEENSTRA-VANDERWEELE et al., 2004).

Entretanto, como é comum em doenças genéticas complexas, o resultado de um pesquisador, muitas vezes não são replicados por outros pesquisadores. Mesmo assim, principalmente os loci sugeridos nos cromossomos 7 e 2 tem sido confirmados em vários estudos (BACHELLI et al., 2003). Outros genes de susceptibilidade também indicados incluem transportador de serotonina (*5-HTT*), o receptor beta três do neurotransmissor GABA (*GABRB3*) (MAESTRINI et al., 1999), alguns da região 16p (IMGSAC, 2001-b) e o gene *REELIN* (BONORA et al., 2003). Outros possíveis genes têm sido descritos e estão mapeados em 3q, 4p, 13q, 16p e no cromossomo X (VORSTMAN et al., 2006).

A região 15q é a que possui maior número de publicações que mostra uma variação muito ampla de alterações relacionadas ao quadro autista, quando de origem materna. Essas alterações incluem duplicações, translocações, inversões e cromossomos isodicêntricos (SAHOO et al., 2005). Essa região contém genes que atuam no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central, como as subunidades do GABA. Acredita-se que as disrupções

fenotípicas (HUSSMAN, 2001) observadas em autismo podem estar ligadas a supressão GABAminérgica e essa hipótese é sustentada por duas observações: (1) alterações nos receptores GABA são comuns em vários casos de autismo, e (2) a supressão GABAminérgica resulta em patologias nas quais o autismo é observado entre as características.

Inclusive, segundo alguns autores as alterações do cromossomo 15 resultariam em uma síndrome distinta, caracterizada por atraso do desenvolvimento neuro-psico-motor, retardo mental, sinais neurológicos e outros distúrbios de comportamento, como hiperatividade, comportamento agressivo, baixa tolerância à frustração, comportamento ritualístico, movimentos estereotipados e auto mutilações, ou seja, um subtipo de autismo (STURM et al., 2004). Esses achados indicam que a duplicação desta região leva a uma ampla variedade de problemas de desenvolvimento e não necessariamente só ao autismo (BOLTON, et al., 2001).

Mais recentemente, outro gene importante tem sido estudado em autismo, o gene para a apoliproteína E (apoE). A apoE esta associada ao metabolismo lipídico, ao nível sérico de colesterol e triglicerídios e é considerada fator de risco para doença arterial coronariana, além de estar implicada no risco para desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA) e de outras demências. Alguns polimorfismos nos alelos *APOE2* (E2) e *APOE4* (E4) alteram o nível de expressão gênica e predisõem ao desenvolvimento de demências (BEYER, et al., 2002). O alelo E4 tem sido reportado com frequência aumentada também em indivíduos com dificuldade de memória e em mulheres com depressão (LAWS et al., 2002; MULLER-THOMSEN et al., 2002). Além disso, dois outros receptores da apoE, o

receptor VLDL e o apoER2, também funcionam como receptores para a proteína Reelin, uma proteína sinalizadora que regula a migração neuronal durante o desenvolvimento cerebral, também atua no cérebro adulto e já foi descrita como envolvida na susceptibilidade ao autismo.

Reelin é expressa pelos interneurônios GABAminérgicos, sugerindo função moduladora desse neurotransmissor (WEEBER et al., 2002). Embora estudos sobre frequência dos polimorfismos da apoE parecem ter importância significativa na etiologia e prevenção de doenças com comprometimento mental, os mesmos são muito escassos na literatura e não apresentam um consenso.

I.5 Alterações Morfológicas

Outro aspecto importante descrito nos pacientes com transtornos invasivos do desenvolvimento, particularmente no autismo, é a frequência elevada de malformações físicas menores (GIUNCO, 2002). O estudo morfológico é um importante indicador de alterações durante o desenvolvimento embrionário, e as características referidas na literatura, principalmente dos olhos e orelhas, sugerem que alterações possivelmente envolvidas com a formação do tubo neural, no primeiro mês de gravidez (aproximadamente do 20-24 dias) poderiam também causar ou contribuir para o aparecimento do autismo (RODIER et al., 1997; LONDON, 2000). Outros achados fenotípicos comumente encontrados em

estudos antropométricos são baixo peso e altura, mãos e pés pequenos, hipertelorismo ocular, entre outros (GIUNCO, 2002).

Alguns estudos discutem a definição de subgrupos homogêneos de indivíduos com ou sem alterações fenotípicas. O grupo sem outras características associadas pode ter uma etiologia geneticamente distinta daqueles com malformações físicas menores. Essa diferença pode ser explicada por diferentes padrões de expressão gênica no fenótipo clínico e comportamental, dada a heterogeneidade da doença. A identificação de sinais clínicos que façam parte do espectro fenotípico dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento e a identificação de subgrupos relacionados aos mesmos, podem auxiliar no diagnóstico e na identificação de "marcadores" físicos dos eventos relacionados à etiologia destes distúrbios tão complexos (MILES, 2000).

Essa amplitude de sinais e sintomas e os diferentes mecanismos etiopatológicos descritos no autismo têm dificultado as pesquisas em torno do tema, mas apontam para alguns fatores certamente envolvidos que precisam ser estudados. Seria o autismo uma causa ou o efeito de diversos fatores etiológicos?



I.6 Apresentação da Tese

De acordo com as normas vigentes, esta tese está apresentada na forma de artigos científicos. O capítulo III apresenta um artigo de revisão sobre a susceptibilidade genética ao espectro autista e os capítulos IV, V, VI e VII apresentam artigos elaborados de acordo com os resultados dos objetivos propostos.

I.7 Objetivos

Diante da complexidade do autismo e da indicação de diferentes mecanismos genéticos envolvidos na sua etiologia, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar as características físicas e os antecedentes familiares e pessoais de indivíduos autistas;
2. Analisar o cariótipo dos indivíduos, por bandamento GTG, para investigação de cromossomopatias;
3. Analisar a frequência da Síndrome do Cromossomo X Frágil na casuística;
4. Investigar os polimorfismos da apoE, considerando as frequências alélicas e genotípicas;
5. Relacionar os resultados com possíveis fatores etiológicos envolvidos no autismo.

Referências Bibliográficas

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. APA: **Diagnostic and statistical manual of mental retardation**, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.

BACCHELLI, E. et al. Screening of nine candidate genes for autism on chromosome 2q reveals rare nonsynonymous variants in the cAMP-GEFII gene. **Mol. Psychiatry.**, v. 8, n. 11, p. 916-924, 2003.

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

BAILEY, A. et al. Autism: the phenotype in relatives. **J. Autism Dev. Disorders**, v. 28, n. 5, p. 369-392, 1998.

BAILEY JUNIOR, D. B. Newborn screening for fragile X syndrome. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, v. 10, n. 1, p. 3-10, 2004.

BEYER, K. et al. The Th1/E47cs-G apolipoprotein E (APOE) promoter allele is a risk factor for Alzheimer disease of very later onset. **Neurosci. Lett.**, v. 326, n. 3, p. 187-190, 2002.

BISHOP DV., MAYBERY M, MALEY A., et al. Using self-report to identify the broad phenotype in parents of children with autistic spectrum disorders: a study the Autism-Spectrum Quotient. **J Child Psychol Psychiatry.**, v. 45(8), p.1431-62, 2004.

BOLTON, P. F. et al. Association between idiopathic infantile macrocephaly and autism spectrum disorders. **Lancet**, v. 358, n. 9283, p. 726-727, 2001

BONORA, E. et al. Analysis of reelin as a candidate gene for autism. **Mol. Psychiatry.**, v. 8, n. 10, p. 885-892, 2003.

BRADFORD, Y. et al. Incorporating language phenotypes strengthens evidence of linkage to autism. **Am. J. Med. Genet.**, v. 105, n. 6, p. 539-47, 2001.

BRISKMAN, J.; HAPPÉ, F.; FRITH, U. Exploring the cognitive phenotype of autism: weak "central coherence" in parents and siblings of children with autism: I experimental test. **J. Child Psychol. Psychiatry**, v. 42, n. 3, p. 309-316, 2001.

BURGESS, D.C.; BURGESS, M.A.; LEASK, J. The MMR vaccination and autism controversy in United Kingdom 1998-2005: inevitable community outrage or a failure of risk communication? **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3921-3928, 2006.

CARVALHEIRA, G.; VERGANI, N.; BRUNONI, D. Genética do autismo. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 26, n. 4, p. 270-272, 2004.

CID 10. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID 10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Organização Mundial da Saúde. OMS: Porto Alegre, Artes Médicas, 1994.

CHAKRABARTI, S.; FOMBONNE, E. Pervasive developmental disorders in preschool children. **JAMA**, v. 285, n. 24, p. 3093-3099, 2001.

COHLY, H. H; PANJA, A. Immunological findings in autism. **Int. Rev. Neurobiol.**; v. 71, p. 317-341, 2005.

FOMBONNE, E. et al. Microcephaly and macrocephaly in autism. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 29, n. 2, p. 113-119, 1999.

FOMBONNE, E. Is exposure to alcohol during pregnancy a risk factor for autism? **J Autism Dev. Disord.**, v. 32, n. 3, p. 243, 2002.

GILLBERG C. Debate and argument: is autism a pervasive developmental disorder? **J. Child. Psychol. Psychiatry**, v. 32, n. 7, p. :1169-1170, 1991.

GILLBERG, C.; COLEMAN, M. Autism and medical disorders: a review of the literature. **Dev. Med. Child. Neurol.**, v. 38, n. 3, p. 191-202, 1996.

GILLBERG, C.; BILLSTEDT, E. Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders. **Acta. Psychiatr. Scand.**, v. 102, n. 5, p. 321-330, 2000.

GIUNCO C. T.; FETT-CONTE A. C.; TAJARA E. H. Aspectos genéticos do autismo e outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento –**HB Científica**, vol. 8 (2), p. 103-108, 2001.

GIUNCO, C. T. **Estudo Genético-Clinico e Citogenética Molecular das Regiões 7q31-q33 e 15q11-q13 em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento**. 2002. 113f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002 .

HARDAN, A. Y.; MINSHEW, N. J.; KESHAVAN, M. S. Corpus callosum size in autism. **Neurology**, v. 55, n. 7, p. 1033-1036, 2000.

HAZNEDAR, M. M. et al. Limbic circuitry in patients with autism spectrum disorders studied with positron emission tomography and magnetic resonance imaging. **Am. J. Psychiatry**, v. 157, n. 12, p. :1994-2001, 2000.

HOLLANDER, E. et al. Divalproex sodium vs. placebo in the treatment of repetitive behaviours in autism spectrum disorder. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 9, n. 2, p. 209-213, 2006.

HUSSMAN, J. P. Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 31, n. 2, p. 247-248. 2001.

International Molecular Genetics Study of Autism Consortium. A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. **Hum. Mol. Genet.**, v. 7, p. 571-578, 1998.

International Molecular Genetics Study of Autism Consortium-a. Further characterization of the autism susceptibility locus AUTS1 on chromosome 7q. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, p. 973-982, 2001.

International Molecular Genetics Study of Autism Consortium. A Genome Wide screen for Autism -b: Strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q and 16p. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 69, p. 570-581, 2001.

KLAUCK, S.M. Genetics of autism spectrum disorder. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 14, n. 6, p. 714-720, 2006.

KURITA, H. School refusal in pervasive developmental disorders. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 1991.

LAWS, S. M. et al. APOE-epsilon4 and APOE- 491 polymorphisms in individuals with subjective memory loss. **Mol. Psychiatry.**, v. 7, n. 7, p.768-775, 2002.

Le COUTEUR, A., et al, A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. **J. Child Psychol. Psychiatry.**, v. 37, n. 7, p. 785-801, 1996.

LIPPI J. R. S. Autismo e Transtornos Invasivos do Desenvolvimento: Revisão Histórica e Classificação (dissertação) Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005

LONDON, E. A: The environment as an etiologic factor in autism: a new direction for research. **Environ. Health. Perspect.**, v. 108, supl. 3, p. 401-404, 2000.

MADSEN K.M., et al. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 19, p. 1477-1482, 2002.

MAESTRINI, E. et al. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. **Am. J. Med. Genet.**, v. 88, n. 5, p. 492-496, 1999.

MILES, J. H., et al. Head circumference is a independent clinical finding associated with autism. **Am. J. Med. Genet.**, v. 95, n. 4, p. 339-350, 2000.

MULLER-THOMSEN, T. et al. Depression in Alzheimer's disease might be associated with apolipoprotein E epsilon 4 allele frequency in women but not in men. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.**, v. 14, n. 2, p. 59-63, 2002

OLIVEIRA, A. B. **Investigação molecular por PCR e clínica da síndrome do cromossomo X frágil em homens com transtornos invasivos do desenvolvimento.** 2006. 64f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto, 2006.



PICKLES, A. et al. Latent-class analysis of recurrence risk for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. **Am. J. Med. Genet.**, v. 57, n. 3, p. 717-726, 1995.

PIVEN, J. et al. Broader autism phenotype: evidence from a family study of multiple-incidence autism families. **Am. J. Psychiatry**, v. 154, n. 2, p. 185-190, 1997.

REDDY, K. S. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. **BMC Med. Genet.**, v. 6, n. 3, 2005.

RENDTORFF, N. D. et al. Analysis of 65 tuberous esclerosiscoplex (TSC) patients by TSC2 DGGE, TSC1/TSC2 MLPA, and TSC1 long-range PCR sequencing, and report of 28 novel mutations. **Hum. Mutat.**, v. 26, n. 4, p. 374-383, 2005.

RODIER, P. M.; BRYSON, S. E.; WELCH, J. P. Minor malformations and physical measurements in autism: data from Nova Scotia. **Teratology**, v. 55, n. 5, p. 319-325, 1997

RUTTER, M. Genetic studies of autism: from the 1970s into the millennium. **J. Abnorm. Child. Psychol.**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 2000.

RUTTER M. Autism research: lessons from the past and prospects for the future. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 35, n. 2, p. 241-57, 2005.

SAHOO, T. et al., Array-based comparative genomic hybridization analysis of recurrent chromosome 15q rearrangements. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 139, n. 2, p. 106-113, 2005.

SAITOH O, KARNS CM, COURCHESNE E. Development of the hippocampal formation from 2 to 42 years: MRI evidence of smaller area dentata in autism. **Brain**. 2001 Jul;124(Pt7):1317-24.

SCHULTZ, R. T, et al. Abnormal ventral temporal cortical activity during face discrimination among individuals with autism and Asperger syndrome. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 57, n. 4, p. 331-340, 2000.

SEARS, L. L., et al. An MRI study of the basal ganglia in autism. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 23, n. 4, p. 613-624, 1999.

STARKSTEIN, S.E., et al. SPECT findings in mentally retarded autistic individuals. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v. 12, n. 3, p. 370-375, 2000.

STEFFENBURG, S. Neuropsychiatric assessment of children with autism: a population-based study. **Dev. Med. Child. Neurol.**, v. 33, n. 6, p. 495-511, 1991.

STOYANOVA, V. et al. Loss of FMR1 hypermethylation in somatic cell heterokaryons. **FASEB J.**, v. 18, n. 15, p. :1964-1966, 2004.

STURM, H.; FERNELL, E.; GILLBERG, C. Autism spectrum disorders in children with normal intellectual levels: associated impairments and subgroups. **Dev. Med. Child Neurol.**, v. 46, n. 7, p. 444-447, 2004.

VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; CHRISTIAN, S. L.; COOK JR, .E. H. Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 5, p. 379-405, 2004.

VORSTMAN, J. A. et al. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. **Mol Psychiatry.**, v. 11, n. 1, p. 18-28, 2006.

WASSINK, T. H. et al. Evidence supporting WNT2 as an autism susceptibility gene. **Am. J. Med. Genet.**, v. 105, n. 5, p. 406-413, 2001.

WEEBER, E. J. et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 42, p. 39944-39952, 2002.

WONG, V. Study of the relationship between tuberous sclerosis complex and autistic disorder. **J. Child Neurol.**, v. 21, n. 3, p. 199-204, 2006.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. CASUÍSTICA

Os dados foram coletados em uma pesquisa de campo realizada em 2010, com o objetivo de avaliar a qualidade da água potável fornecida pela Companhia Saneamento de São Paulo (CSAP) em 10 pontos de coleta distribuídos em diferentes regiões da cidade de São Paulo. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais.

A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais.

A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais. A pesquisa foi realizada em 10 pontos de coleta, sendo 5 pontos de coleta em áreas urbanas e 5 pontos de coleta em áreas rurais.

Capítulo II

Material e Métodos

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1 CASUÍSTICA

Em conformidade com as Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos, após a aprovação do projeto pelo CEP e CONEP, e após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido obtido pela própria pesquisadora responsável pelo trabalho (Anexo 2), foram estudados 60 indivíduos com diagnóstico de Autismo, rigorosamente segundo os critérios do DSM-IV (APA,1994), provenientes de escolas especializadas e diagnosticados por psiquiatras e psicólogos especialistas na afecção (Grupo 1). A Tabela 2 apresenta as características dos autistas estudados.

Foram excluídos do estudo pacientes com outros distúrbios psiquiátricos da infância, como psicóticos, além daqueles com os demais Transtornos Invasivos do Desenvolvimento, como Síndrome de Asperger. Pacientes cujas famílias não concordaram em participar e aqueles que, mesmo com autorização do responsável para participação no projeto, apresentarem desconforto exacerbado diante da possibilidade do exame físico e/ou da punção venosa, de acordo com orientação dos psiquiatras e psicólogos, também foram excluídos.

Para comparação das características físicas e dos antecedentes familiares, foi constituído um grupo controle (Grupo 2) composto por indivíduos saudáveis, pareados por sexo, idade e classe social, da população em geral, a maioria proveniente de escolas localizadas nos mesmos bairros que os das escolas

Tabela 1. Caracterização da casuística quanto a idade, sexo, etnia e classe

	Idade	sexo	etnia	classe		Idade	sexo	etnia	classe
caso 1	9	M	A	4	caso 36	18	M	B	2
caso 2	5	m	B	4	caso 37	10	M	B	4
caso 3	10	F	B	5	caso 38	17	M	N	4
caso 4	13	M	B	6	caso 39	16	M	B	3
caso 5	25	M	B	6	caso 40	16	M	N	6
caso 6	30	M	B	6	caso 41	33	M	B	3
caso 7	21	M	B	4	caso 42	27	M	B	4
caso 8	25	M	B	2	caso 43	10	M	B	2
caso 9	24	M	B	4	caso 44	11	M	B	4
caso 10	22	F	B	4	caso 45	11	M	B	3
caso 11	16	M	B	6	caso 46	10	M	B	4
caso 12	12	M	B	3	caso 47	22	M	B	3
caso 13	5	M	B	4	caso 48	14	M	A	3
caso 14	23	F	B	4	caso 49	8	M	B	4
caso 15	16	M	B	4	caso 50	18	F	B	4
caso 16	10	M	B	4	caso 51	10	M	N	4
caso 17	9	M	B	4	caso 52	21	M	B	4
caso 18	24	F	B	3	caso 53	24	M	B	3
caso 19	8	M	B	4	caso 54	24	M	B	4
caso 20	14	M	N	4	caso 55	14	M	N	4
caso 21	4	M	B	3	caso 56	17	M	B	4
caso 22	24	M	B	2	caso 57	9	F	B	4
caso 23	18	M	B	2	caso 58	9	M	B	4
caso 24	7	M	B	4	caso 59	21	M	B	4
caso 25	23	M	B	2	caso 60	10	M	N	4
caso 26	9	M	B	3	caso 61	10	M	B	4
caso 27	14	M	B	3	caso 62	4	M	B	3
caso 28	15	M	B	4	caso 63	12	M	B	3
caso 29	17	M	B	4	caso 64	23	M	B	4
caso 30	22	M	B	4	caso 65	26	M	B	5
caso 31	6	M	N	2	caso 66	15	M	B	4
caso 32	17	M	B	4	caso 67	18	F	B	4
caso 33	10	M	B	4	caso 68	14	F	B	6
caso 34	11	M	B	4	caso 69	14	F	B	6
caso 35	5	M	B	6	caso 70	23	F	B	4
					caso 71	27	F	B	6

M = masculino; F = feminino; B =branco; N = negro; A = amarelo; 1= burguesia; 2 = nova pequena burguesia; 3 = pequena burguesia tradicional; 4 = proletariado não típico; 5 = proletariado típico e 6 = sub-proletariado.

especializadas, após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

Cada caso e família foram avaliados individualmente no Ambulatório de Genética do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), ou na instituição de origem.

II.2 MÉTODOS

II.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA CLASSE SOCIAL

Para inclusão dos indivíduos e controles em classes sociais foram adotados os critérios de Lombardi et al.(1998), para a população brasileira, que basearam sua classificação no processo saúde-doença. Esse estudo define as seguintes classes sociais: (1) burguesia; (2) nova pequena burguesia; (3) pequena burguesia tradicional; (4) proletariado não típico; (5) proletariado típico e (6) sub-proletariado, respectivamente definidas conforme Figuras 1, 2 e 3.

II.2.2 ANTECEDENTES FAMILIAIS PSIQUIÁTRICOS

Para a investigação de antecedentes familiares psiquiátricos foi feita uma entrevista com a família de cada paciente e controle.

Foram considerados como distúrbios psiquiátricos (DP) os referidos como



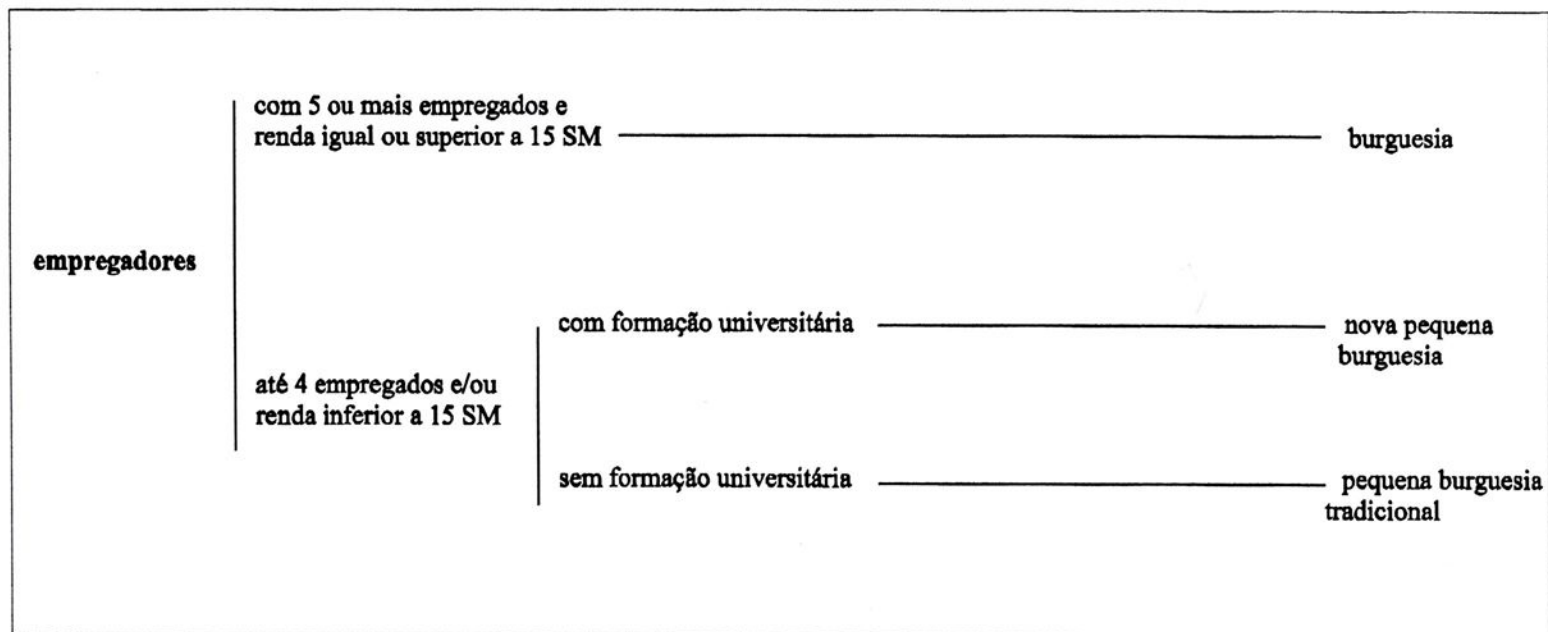


Figura 3. Esquema de operacionalização de burguesia, nova pequena burguesia e pequena burguesia tradicional, segundo Lombardi *et al.* (1998).

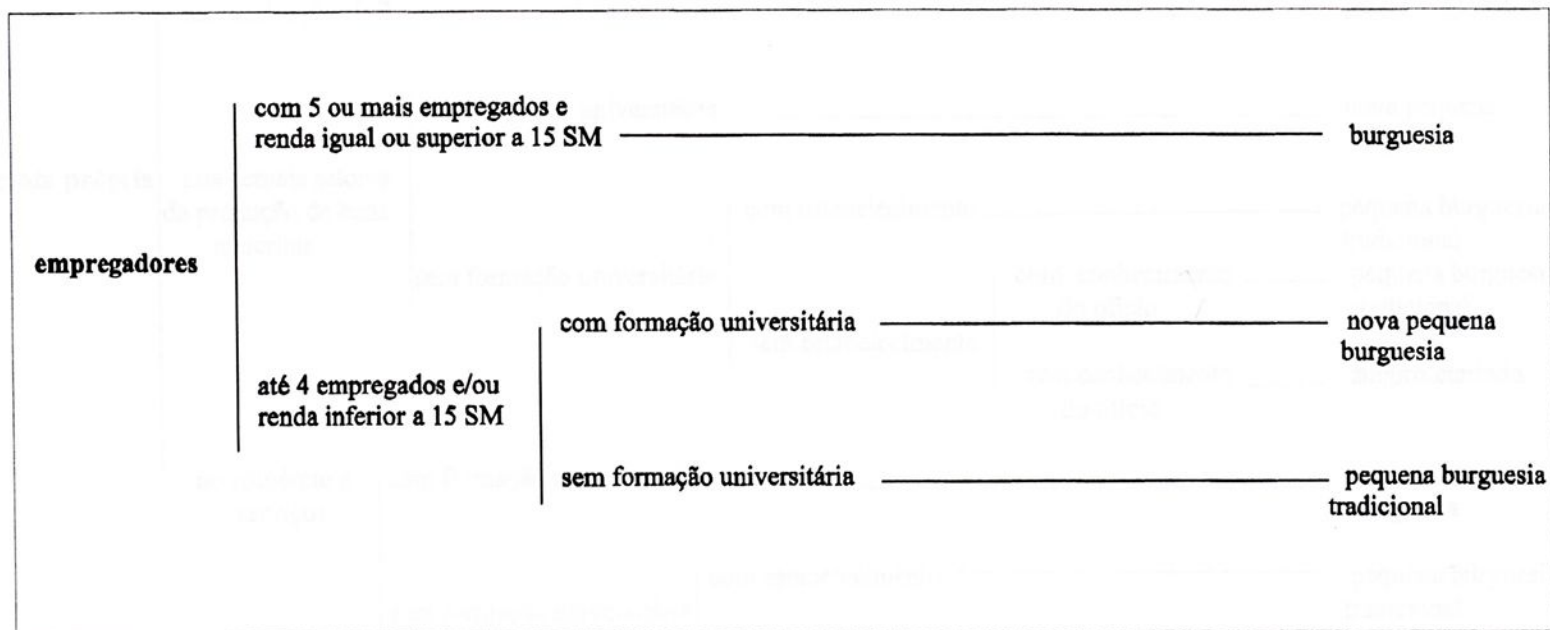


Figura 3. Esquema de operacionalização de burguesia, nova pequena burguesia e pequena burguesia tradicional, segundo Lombardi *et al.* (1998).

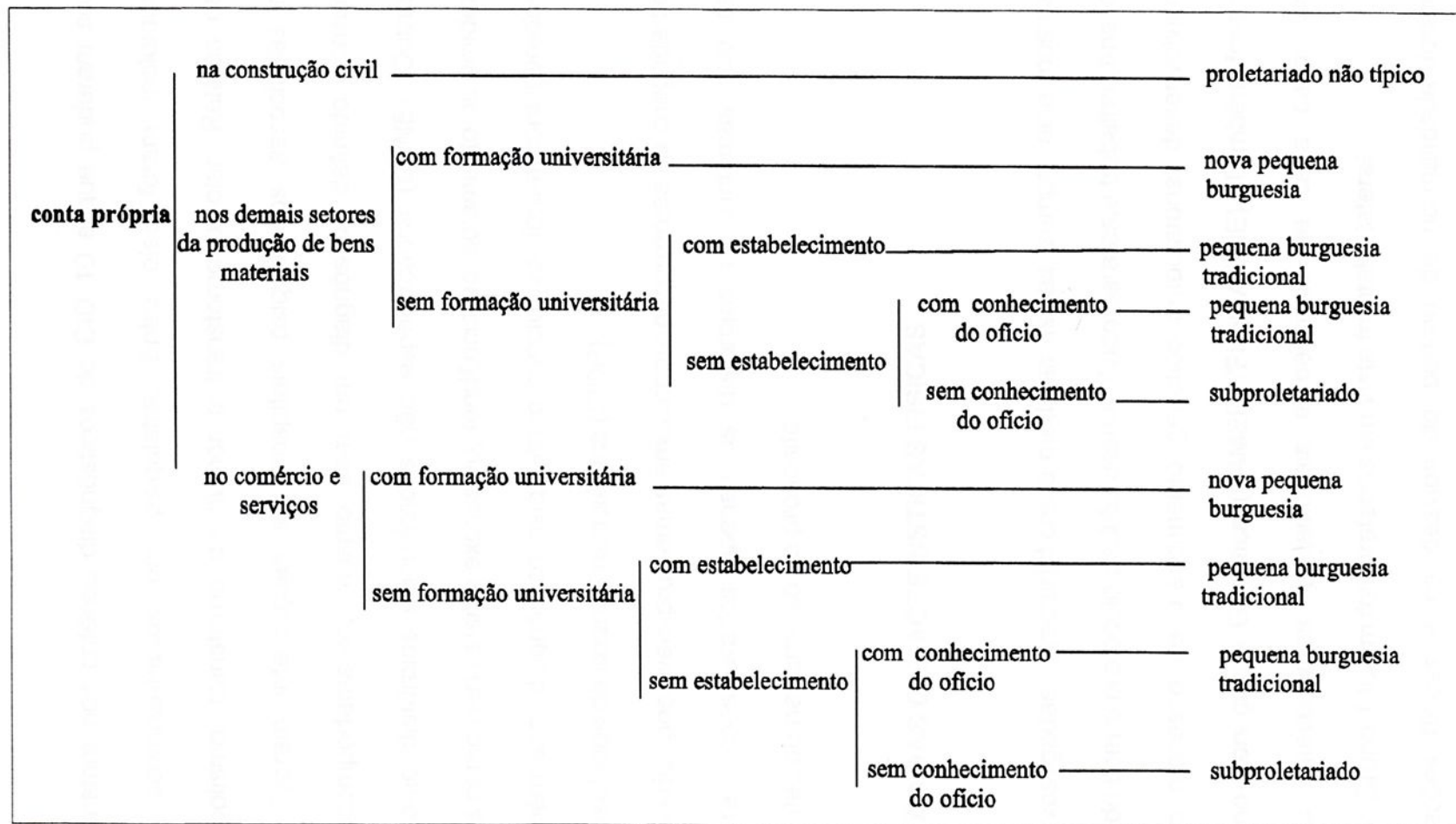


Figura 1. Esquema de operacionalização de nova pequena burguesia, pequena burguesia tradicional, proletariado não típico e subproletariado, segundo Lombardi et al. (1998).

aqueles que constam nos critérios diagnósticos do CID 10 e que puderam ser confirmados e acompanhados por psiquiatra. Entre eles foram incluídos depressão, alcoolismo, transtorno de humor e transtorno bipolar. Relatos de pacientes que tiveram internações em hospitais psiquiátricos associadas a alterações de comportamento, mesmo sem um diagnóstico definido, foram considerados como distúrbios psiquiátricos não especificados (DPNE). Outras queixas isoladas como nervosismo excessivo, tendência ao isolamento ou timidez excessiva, também sem diagnóstico psiquiátrico conclusivo, foram considerados como sintomas isolados de doença psiquiátrica (SIDP).

Em função dos possíveis problemas emocionais decorrentes da chegada do filho autista foram considerados apenas os distúrbios ou sintomas que se manifestaram antes do nascimento do propósito.

II.2.3 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Foram investigadas características e medidas físicas, sempre pela mesma equipe, de acordo com o protocolo padrão desenvolvido para este trabalho (Anexo 2), baseado no processo de atendimento genético ambulatorial desenvolvido rotineiramente no Serviço de Genética (FAMERP/FUNFARME). Também foram investigados os antecedentes gestacionais e pessoais de cada caso. Os componentes do Grupo 1 foram fotografados em vista frontal e lateral.

As alterações físicas e os desvios do padrão de normalidade foram considerados de acordo com os critérios descritos por Jones (1998). Os valores

normais esperados para um indivíduo foram obtidos com a utilização das curvas de normalidade, construídas à partir de valores observados em grandes grupos amostrais tomados ao acaso, respeitando-se sexo e idade. Foi considerado anormal todo valor que superou dois desvios padrões da curva média, pelo fato deste intervalo de confiança incluir 98% do universo populacional. Percentis menores que 2% e maiores que 98% foram considerados como desviantes.

Para análise estatística dos resultados obtidos, foi realizada a comparação das proporções encontradas no grupo controle com as respectivas proporções esperadas provenientes do grupo de autistas. Foi utilizado o teste para comparação de uma proporção com valor fixo (esperado = grupo autistas), incluindo o teste de Fisher, quando indicado, para comparação de duas proporções, o teste não paramétrico de Krush-Wallis para comparação de medidas e o Qui-quadrado para independência e tabelas cruzadas. Para o teste de Fisher foi utilizado o programa S-Plus para Windows, versão 3.3. Outros testes foram feitos pelo MINITAB para Windows, versão 12.23. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$, ou seja, o nível de significância de 5%.

II.2.4 CULTURA DE LINFÓCITOS E BANDAMENTO GTG

Todos os pacientes do grupo 1 foram investigados quanto à presença de cromossomopatias. Para o estudo citogenético foram utilizadas metáfases obtidas de culturas de linfócitos obtidos a partir da coleta de cerca de 5mL de sangue venoso periférico, que foi realizada com seringa estéril descartável, por profissional qualificada (enfermeira). Tais culturas foram mantidas por 72 horas,



segundo a técnica de Moorhead et al. (1960), com modificações, de acordo com o protocolo padrão utilizado pelo Laboratório de Genética da FAMERP/FUNFARME.

Para cada indivíduo foram montados três frascos de cultura. Cada frasco continha 5mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina (100U/mL) e fito-hemaglutinina (PHA-Gibco-0,2 mL).

Para interrupção da divisão celular foi adicionado 0,1mL de solução de colquicina a $4 \times 10^{-6}M$ em cada réplica, 30 minutos antes da colheita. Após o bloqueio celular, o material foi centrifugado, o sedimento hipotonizado com KCl a $0,075M$ por 10 minutos, a $37^{\circ}C$, e fixado em metanol: ácido acético (3:1). A suspensão celular foi, então, gotejada em lâminas limpas, molhadas e geladas. Cada caso foi identificado durante toda a execução do projeto por um código do conhecimento apenas dos responsáveis pela pesquisa.

De cada paciente foi realizada a análise do cariótipo em 20 metáfases submetidas ao bandamento GTG, segundo a técnica de Grouchy & Turleau (1977), com modificações. A lâmina foi mergulhada sequencialmente em tampão Sörensen pH6,8; solução de tripsina 0,2% e solução salina de PBS, respectivamente, por 15 minutos, 2 a 10 segundos e 1 minuto. Posteriormente, foi corada em solução de Giemsa 2% por 3 minutos e lavada em água destilada.

Os achados e a descrição dos mesmos foram apresentados de acordo com os critérios contidos na ISCN (ISCN, 2005).



II.2.5-EXTRAÇÃO DO DNA DOS LEUCÓCITOS

Para a investigação de mutações no gene *FMR-1* e dos polimorfismos da apoE, a extração do DNA de cada paciente foi realizada a partir de leucócitos de sangue periférico (5ml) coletados com EDTA. A extração foi realizada em três etapas de acordo com a técnica descrita por Gustincich *et al.* (1991), compreendendo: 1) lise das células sanguíneas e desnaturação com solução de brometo dodeciltrimetilamonio (DTAB); 2) desproteinização com clorofórmio; 3) precipitação do DNA e ressuspensão via brometo cetilmetrimetilamonio (CTAB).

O DNA foi quantificado no espectrofômetro e mantido à temperatura de -2°C.

II.2.6 POLIMORFISMO DO GENE *APOE*

O segmento do gene *APOE* foi amplificado pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para amplificação do segmento polimórfico por PCR foram utilizados os seguintes *primers* complementares:

P1:5' - ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC - 3'

P2:5' - TAAGCTTGGCAGGGCTGTCCAAGGA - 3'

Os *primers* são complementares às regiões próximas aos códons polimórficos 112 e 158, localizados no exon 4 do *APOE*. A amplificação do fragmento polimórfico foi realizada com desnaturação inicial do DNA obtida a 90°C por cinco minutos. A mistura da reação foi submetida a 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 65°C por dois minutos, com ciclo final de 72°C por sete minutos. O produto de amplificação da PCR foi submetido ao corte enzimático com a enzima

de restrição *Hha I*, em banho-maria a 37°C *overnight*, para clivagem das seqüências amplificadas dos alelos E2, E3 e E4 em regiões específicas (GCGC). Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% não desnaturado, sob corrente constante de 200V. Como marcador em cada experimento foi utilizada uma amostra de DNA padrão (pBR322), digerido pela enzima de restrição *Msp I*, que gera fragmentos de 110, 90, 76 e 67 pares de base. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo e os fragmentos de DNA visibilizados sob luz ultravioleta.

II.2.7 ESTUDO MOLECULAR DO GENE FMR-1

Todos os indivíduos do sexo masculino do Grupo 1 foram estudados quanto à presença de mutações por amplificação do gene *FMR-1*. Esta investigação foi realizada com a colaboração da bióloga Adriana Barbosa de Oliveira.

A investigação do polimorfismo de repetições de trinucleotídeos, presente neste gene, responsável pela Síndrome do X Frágil, foi realizada segundo a técnica de Haddad et al.(1996), com modificações. Tal técnica consistiu na amplificação da região do gene que contém as repetições CGG, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Tal protocolo baseia-se no fato de que as mutações completas não sofrem amplificação sob as condições da técnica, que é, portanto, indicativa da presença ou ausência da mutação. Para tanto, foram utilizados três *primers*, de seguintes nomes e seqüência:

f= 5'agccccgcacttcaccaccagctcctcca 3'

Eag-U= 5' cgacctgtcaccgcccttcagccttc 3'



Eag-L= 5' cgctgcggggtgtaaactgaaaccacgtc 3'

O resultado da amplificação foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 7,5% e o gel corado segundo o método descrito por Santos et al.(1993), com modificações.

Os indivíduos portadores da Síndrome do X Frágil são identificados pela ausência da banda polimórfica, de cerca de 550pb, que sugere a presença da mutação completa. A exclusão do falso-positivo foi definida pela presença do controle interno (banda de 223pb). Os *primers* Eag-U e *f* flanqueiam a região de polimorfismo das repetições CGG, produzindo um fragmento de amplificação de 550pb nos indivíduos normais. Quando ocorre a mutação completa, esse fragmento não é obtido, pois as condições da reação de PCR são ineficientes para a amplificação de seqüências longas de DNA. Um fragmento de 223pb é resultante da amplificação da região não-polimórfica flanqueada pelos *primers* Eag-U e Eag-L, interna ao segmento de interesse e que serve como controle da reação de PCR para cada caso.

Casos positivos na PCR, para confirmação/exclusão, foram submetidos à técnica de Southern blot, gentilmente realizada pela Profa. Angela M. Vianna Morgante, do Instituto de Biociências / USP-SP.

II.2.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O termo de consentimento livre e esclarecido só foi obtido diretamente pela autora do projeto (doutoranda Carina Tatiana Giunco) após a aprovação deste projeto pelo CEP e CONEP.

Os riscos para o paciente incluíam dor, ardência ou hematoma no local de retirada do sangue, procedimento que foi realizado por profissional competente (enfermeira), no Ambulatório do Hospital de Base ou na escola de procedência, nos casos de outras cidades, onde os pacientes foram avaliados e suas famílias entrevistadas.

Por se tratar de uma doença psiquiátrica com problemas de relacionamento social e de comportamento, durante a coleta de sangue podem ser esperadas reações dos pacientes que vão desde a total indiferença no momento da retirada do sangue ao desconforto emocional exacerbado e agressão. Nestes últimos casos, o paciente cujas manifestações não puderam ser controladas não foram incluídos no estudo.

Os procedimentos de avaliação e coleta de sangue ocorreram invariavelmente na presença dos pais ou responsáveis.

Os resultados dos exames genéticos foram entregues diretamente aos pais ou responsáveis mediante esclarecimentos de quaisquer dúvida.

Os resultados obtidos puderam ajudar a elucidar a etiologia nos casos de autismo, auxiliar na conduta terapêutica e Aconselhamento Genético da família, além de identificar marcadores de susceptibilidade para estudos futuros.

Reforço As informações obtidas foram tratadas como confidenciais e a identidade de todos os indivíduos foi preservada em publicações científicas originadas partir deste estudo. Quanto aos demais aspectos éticos, este projeto seguiu às instruções contidas na Resolução 196/96.



Referências Bibliográficas

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. APA: **Diagnostic and statistical manual of mental retardation**, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.

GROUCHY, J. D. E.; TURLEAU, C. **Atlas des maladies chromosomiques**, Paris Expasion Scientifique Francise, 1997.

GUSTINCICH S, MANFIOLETTI G, DEL SAL G, ET AL. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques** v.11, p. 298-300, 1991.

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

ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. d. Karger, Farmington, 130p., 2005.

JONES, K. L. **Padrões reconhecíveis de malformações congênitas**. São Paulo. Editora Manole, 1998.

LOMBARDI, C. et al. Operacionalização do conceito de classe social em estudos epidemiológicos. **Rev. Saúde Publ.**, v. 22, n. 4, p. 253-265, 1988.

MOORHEAD, P.S. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheal blood. **Exp. Cell. Res.**, v. 20 , p. 613-616, 1960.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repet DNA polymorphism with a simple non-isotopique. **Hum. Genet.**, v. 90, p.655-656, 1993.

A Susceptibilidade Genética Ao Espectro Autista

Carina Tatiana Giunco ¹, Agnes Cristina Fett-Conte²

1. Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil
2. Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondências:

Carina Tatiana Giunco

End. Av. Parque Belvedere, 505- Barcelona casa 85

Parque Belvedere - São José do Rio Preto- SP - Brasil

15057-460

Email: carinagiunco@unip.br

A ser submetido para Arquivos de Ciências da Saúde



Resumo

O autismo é uma doença heterogênea e complexa sem etiologia definida, mas com fatores genéticos certamente participantes. Os mecanismos genéticos envolvidos e sua interação com o ambiente também não estão esclarecidos. Entretanto, diversos genes têm sido sugeridos como responsáveis pelo aparecimento da doença, a maioria deles relacionadas à morfogênese e funcionamento do sistema nervoso central. Este artigo apresenta uma revisão sistemática sobre os aspectos da susceptibilidade genética para as Doenças do Espectro Autista. Foi elaborado a partir de uma busca na base de dados *Lilacs* e *Medline* com os unitermos genes, autismo, susceptibilidade e genética. Embora a literatura sobre o tema seja ampla, os resultados sobre susceptibilidade são ainda escassos e contraditórios, com muitos aspectos etiopatológicos a serem esclarecidos.

Palavras – Chaves: autismo, genes, genética, susceptibilidade.

Introdução

Caracterização do Distúrbio do Espectro Autista

Em 1942, Kanner descreveu sob o nome “distúrbios autísticos do contacto afetivo” um quadro clínico caracterizado por autismo extremo, obsessividade, estereotipias e ecolalia. Esse conjunto de sinais foi interpretado por ele como uma doença específica relacionada a fenômenos da linha esquisofrênica. Em 1956, Kanner descreveu tal quadro como uma psicose e referiu que todos os exames clínicos e laboratoriais foram incapazes de fornecer dados consistentes no que se relacionava à sua etiologia, diferenciando-o dos quadros deficitários sensoriais, como a afasia congênita, e dos quadros ligados às oligofrenia ⁽¹⁾.

As primeiras alterações dessa concepção surgiram a partir de RITVO⁽²⁾, que relacionou o autismo a um déficit cognitivo, considerando-o não como uma psicose, mas como um distúrbio do desenvolvimento. Outros autores, como BURACK ⁽³⁾, reforçaram a idéia do déficit cognitivo e enfatizaram que o autismo poderia estar relacionado com a deficiência mental, uma vez que cerca de 70-86% dos autistas são deficientes mentais.

O autismo faz parte do grupo dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento no qual também estão incluídas as Síndromes de Asperger, de Rett, o Transtorno Desintegrativo da Infância e o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação. São doenças graves, de etiologia complexa, heterogênea e pouco conhecida, cujos tratamentos são apenas paliativos e sintomáticos. Entre elas, o autismo se destaca pela sua precocidade e frequência elevada na população ⁽⁴⁾.

O autismo é considerado uma síndrome de aparecimento precoce, presente desde o nascimento, que se manifesta antes dos 30 meses de idade. Caracteriza-se por respostas anormais a estímulo auditivos ou visuais e apresenta fala ausente ou pouco desenvolvida. Ocorrem problemas graves de relacionamento social e o comportamento é ritualístico, agregado a rotinas anormais e resistência a mudanças. A capacidade para pensamentos abstratos e simbólicos ou para jogos imaginativos é diminuída, enquanto a inteligência pode ser subnormal, normal ou acima do normal ⁽⁵⁾.

Pesquisas recentes têm examinado traços autísticos em populações de gêmeos e mostrado que os prejuízos sociais seguem uma distribuição unimodal sem demarcação clara que diferencie os casos clássicos (quadros clínicos mais graves) dos traços autísticos. Por esta razão tem sido mais apropriada a designação Distúrbios do Espectro Autístico (DEA) para definir a variação dos fenótipos comportamental relacionada às três áreas de comprometimento: interação social, comunicação e comportamento. Estão incluídas nas DEA o autismo, a síndrome de Asperger e o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (PDD-NOS) ⁽⁶⁾.

Alguns estudos epidemiológicos mostram um aumento na frequência de DEA que poderia ser explicado pela mudança dos critérios diagnósticos ocorrida nos últimos anos. Também tem sido considerado que a incidência dos distúrbios pode ser maior do que a documentada e que muitos casos são subdiagnosticados ⁽⁷⁾.

Fatores ambientais, como a vacinação contra a rubéola ou a impregnação por mercúrio - hipóteses levantadas devido à alta comorbidade da síndrome rubeólica fetal com autismo e os sintomas provocados pela impregnação de metais pesados no sistema nervoso central - já foram indicados como responsáveis, entretanto, os estudos mostram resultados contraditórios ^(8,9). Contudo, o aumento do número de casos é real e pode resultar, ainda, de alterações epigenéticas em determinados genes ⁽¹⁰⁾.

A frequência das DEA na população em geral é de cerca de 30/60:10.000, com a prevalência do autismo clássico estimada em cerca de 13:10.000, um aumento considerável uma vez que nos últimos 40 anos a prevalência estimada era de 4:10.000. O processo de avaliação diagnóstica, o tamanho das casuísticas, a época da publicação e a localização geográfica dos estudos, podem justificar, em parte, as diferenças nas estimativas, mas a elucidação pode estar na dependência da combinação de estudos epidemiológicos com pesquisas laboratoriais ⁽¹¹⁾. A proporção de aproximadamente quatro homens para cada mulher afetada é encontrada em quase todas as populações estudadas ⁽¹²⁾ e, embora indiquem genes de susceptibilidade relacionados ao cromossomo X, as regiões indicadas não são sempre as mesmas ⁽¹³⁾.

A fisiopatologia das DEA não está esclarecida e há inúmeros estudos que abordam desde aspectos neuroquímicos, dados de autopsias, imagens radiológicas, possíveis influências ambientais, até fatores genéticos, que possam estar envolvidos na predisposição à doença. A etiologia é múltipla e complexa, com influência de fatores peri e neonatais, ambientais e genéticos, e em muitos casos não é possível distinguir se a DEA é causa ou efeito^(14,15).

As evidências de predisposição genética decorrem da recorrência maior entre irmãos de afetados, que é de 0,1% a 0,2% para autismo e 0,6% para as DEA, e dos estudos com gêmeos, que mostram concordâncias que chegam a 91% entre monozigóticos e de 10% para dizigóticos. O padrão de herança na maioria dos casos é compatível com herança poligênica, com interação de múltiplos *loci* não ligados, mas similares que juntos resultariam nos fenótipos comportamentais⁽⁹⁾.

A abordagem para identificar as regiões cromossômicas e os genes de susceptibilidade inclui avaliação citogenética, estudos de ligação com *screening* genômico de parentes afetados e estudos de associação gênica com genes candidatos. Em 10% dos casos de autismo, por exemplo, alguma alteração cromossômica é observada⁽¹⁶⁾ e os achados indicam regiões candidatas em potencial.

Abordagens indiretas, como os estudos de síndromes de etiologia conhecida e comorbidade de sintomas, como a Síndrome do Cromossomo X Frágil, Síndrome de Turner e a Esclerose Tuberosa, podem ajudar a elucidar genes únicos ou cascatas de efeitos protéicos que levam às DEA⁽¹⁷⁾.

Mais de 50 genes já foram referidos como candidatos, e os estudos apontam 6 *locis* de susceptibilidade nos cromossomos autossômicos e três no cromossomo X. Nesta revisão são apresentados os principais *locis* e regiões cromossômicas considerados pela literatura especializada como possivelmente relacionados ao aparecimento das DEA.

Seleção e Análise dos Dados

Foi realizado um levantamento bibliográfico retrospectivo, por meio dos bancos de dados *MEDLINE* (*National Library of Medicine*) e *Lilacs* (*Literatura Latino Americana e Caribe em Ciências da Saúde*) e foram selecionados artigos que possuíam em seu título e/ou em seu resumo os unitermos *autism*, *genes*, *susceptibility* e *genetics*.

Foram analisados os artigos científicos publicados no período de 1990 a 2006, que tiveram como sujeito de pesquisa seres humanos e foram preferencialmente publicados em inglês. O critério de exclusão foi a não conformidade do conteúdo ou do tema com o assunto pesquisado, ou a existência de artigo mais recente com conteúdo semelhante.

Do ponto de vista da abordagem quantitativa, para cada trabalho estudado, foram investigadas as seguintes variáveis: ano de publicação, procedência do artigo, idioma em que foi escrito, metodologia utilizada, tipos de genes envolvidos e mecanismos de ação. Na seleção dos artigos por tipo, optou-se pela seguinte classificação:

- Estudo exploratório: estudo de algum fenômeno de interesse, onde se busca observar e registrar sua incidência além de explorar suas dimensões, a maneira pela qual ele se manifesta e os outros fatores com os quais ele se relaciona;
- Estudo descritivo: descrição de fenômenos relativos à doença, baseados em observação, descrição e classificação dos fenômenos observados. Subdivide-se em pesquisa de campo e pesquisa bibliográfica;
- Estudo de caso clínico: estudo de casuística.

Neste contexto foram incluídos 80 artigos divididos de acordo com o tipo de gene envolvido, em seis sessões: aspectos clínicos e epidemiológicos, genes do cromossomo 15, do cromossomo 7, do cromossomo X, serotonina e outros genes candidatos à susceptibilidade do autismo.



Genes Candidatos da Região 15q11-q13

As anormalidades cromossômicas mais freqüentemente observadas nas DEA envolvem a região 15q11-q13, denominada de *AUST4*, com alterações encontradas em cerca de 1% a 4% dos casos. Estão descritas translocações, inversões, deleções e duplicações envolvendo esta região em diferentes estudos populacionais. As duplicações ocorrem intersticialmente ou como um cromossomo isodicêntrico extranumerário, que resulta em tri ou tetrassomia, geralmente de origem materna. Neste caso, o cromossomo extra não sofre *imprinting* e, portanto, não é silenciado, o que estaria relacionado ao fenótipo comportamental autista. As mesmas duplicações, quando de origem paterna, levam a um fenótipo mais leve, mas já foi demonstrado que o *imprinting* dos alelos paternos é mantido^(18,19).

O fenótipo predominante das duplicações de 15q11-q13 inclui atraso do desenvolvimento neuro-psico-motor, retardo mental, sinais neurológicos e outros distúrbios de comportamento, como hiperatividade, comportamento agressivo, baixa tolerância à frustração, comportamento ritualístico, movimentos esteriotipados e auto mutilações. Esses achados indicam que a duplicação leva a uma variedade ampla de problemas de desenvolvimento, e não só ao autismo clássico⁽²⁰⁾. Por outro lado, pelos sintomas autísticos estarem sempre associados, a presença desta alteração define o que alguns autores consideram como um subtipo de autismo⁽²¹⁾.

A região 15q11-q13 está diretamente associada as Síndromes de Angelman e de Prader-Willi⁽²²⁾ e, embora vários estudos reportem desequilíbrio de ligação⁽²³⁾, outros não mostram resultados significativos. Os genes candidatos mapeados em 15q11-q13 incluem o gene do receptor *GABA A5*, *UBE3A*, *SNRPN*, *HERC2*, *NDN* e o mais estudado, o *GABRB3*⁽²⁴⁾.

O GABA é o neurotransmissor inibitório cerebral mais importante no homem e age pelos receptores *GABA-A*, que são canais de ligação de cloro. Os canais iônicos são componentes moleculares básicos, com os quais são construídos os dispositivos neuronais sofisticados para a sinalização celular. A condução do cloro por esses canais é modulada por agentes como benzodipínicos, que se ligam ao receptor. Ions de zinco regulam os receptores *GABA-A* por inibição da função do receptor, que é

criticamente dependente da composição da subunidade do receptor. Existem pelo menos 13 subunidades destes receptores já identificadas. As subunidades *GABRB3* e *GABA A5* são as mais estudadas. São separadas por menos que 100kb e expressas exclusivamente quando os alelos são de origem paterna. Os estudos para averiguar interações gênicas complexas deste *cluster* em autismo mostram interação também com *GABRB1* e *GABRB4*, suportando a hipótese de que os receptores GABAminérgicos estão envolvidos na etiologia da doença⁽²⁵⁾.

O gene *UBE3A* codifica um membro de uma família de proteínas que reconhece e degrada, por sistemas proteolíticos, outras proteínas desnaturadas ou erroneamente dobradas, além das que contém aminoácidos oxidados, processo conhecido por ubiquitinação. O aumento da dosagem gênica aumenta diretamente os níveis de *UBE3A* e pode levar a desregulação do processo de ubiquitinação, ou seja, a degradação poderia ocorrer de forma indiscriminada, o que resultaria em alterações das funções cerebrais⁽²⁶⁾. Este gene tem função bialélica, entretanto, os sinais maternos são consistentemente mais intensos em células precursoras neuronais⁽²⁷⁾. Já foram descritas, também, evidências de desequilíbrio de ligação para esta região⁽²³⁾.

O gene *SNRPN* é caracterizado por seu polimorfismo e é monoalelicamente expresso no cérebro fetal e adulto⁽³⁰⁾. A análise de DNA materno desse gene confirmam que o alelo materno não é expresso no cérebro fetal. Este *imprinting* materno de *SNRPN* sustenta a hipótese de que a falta do alelo paterno poderia ser responsável pela Síndrome de Prader-Willi, ou ainda contribuir para o fenótipo comportamental dos distúrbios autísticos. Esse gene, juntamente com o *SNURF* formam um *cluster* que parece coordenar o *imprinting* do cromossomo 15⁽²⁹⁾. Alterações na expressão deste *cluster* poderiam alterar o *imprinting* deste cromossomo e silenciar genes importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso central ou ativar a expressão de genes silenciados, desregulando cascatas protéicas importantes relacionadas ao funcionamento cerebral normal.

Os genes da família *HERC*, também mapeados em 15q11-q13, codificam um grupo de proteínas grandes que contém múltiplos domínios estruturais. Todos os membros dessa família têm pelo menos uma cópia da região N-terminal em homologia com proteínas que participam do ciclo de regulação celular além de uma região C-

terminal encontrada nas proteínas ubiquitinas ligases. Análises de *northern blot* revelaram expressão do gene *Herc2* em altos níveis nos tecidos cerebrais fetais e adultos⁽³⁰⁾. Esse gene foi apontado para estudos de susceptibilidade a DEA, pois duplicações e inversões envolvendo este locus já foram descritas em alguns pacientes, além da localização da sua expressão protéica ser muito sugestiva, apesar da ação de seu produto gênico não ser completamente conhecida⁽³¹⁾.

A proteína do gene *Necdin* atua no núcleo das células neuronais iniciais, está expressa na maioria dos neurônios pós-mitóticos do sistema nervoso central e aparentemente está envolvida na diferenciação neuronal. A expressão do gene é limitada ao alelo paterno, com altos níveis de expressão no cérebro, sugerindo que a perda de expressão poderia contribuir para o desenvolvimento da síndrome de Prader-Willi⁽³²⁾. Segundo Chibuk⁽³³⁾, é possível o envolvimento do gene *Necdin* na etiologia da DEA.

A região 15q11-q13 contém, portanto, genes envolvidos com a formação e sinalização do sistema nervoso, além de um *cluster gênico* que comanda o *imprinting* de todo o cromossomo. O silenciamento ou super expressão desses genes resulta em alterações no processamento de informações pelo sistema nervoso central, o que poderia justificar o aparecimento do espectro autista.

Genes Candidatos das Regiões 7q21-q22 e 7q32-q36

Um dos primeiros estudos de *screening* genômico realizado em autismo envolveu o braço longo do cromossomo 7. Muito estudada pelo International Molecular Study of Autism Consortium, tal região foi relacionada com a susceptibilidade à doença e denominada *AUTS1*⁽³⁴⁾.

Mapeados em 7q, especialmente nas regiões 7q21-q22 e 7q32-q36, já foram descritos vários genes possivelmente associados ao quadro clínico das DEA^(35,36,37).

O *NPTX2* esta envolvido na sinaptogeneses dos neurônios e esta localizado em 7q22.1⁽³⁸⁾. Alterações na sua expressão poderiam alterar a passagem da

informação sináptica e alterar a capacidade de percepção e de resposta do sistema nervoso central.

O gene *FOXP2* está mapeado em 7q31 e codifica um fator de transcrição. Aparece mutado em pacientes com problemas de fala e de linguagem, e já foi descrito, como responsável por uma forma monogênica severa de prejuízo nestas áreas^(39,40). Alguns autores refutam sua ligação com autismo, pois não há relatos de alterações nesse gene em portadores de DEA⁽⁴¹⁾. Outros, entretanto, sugeriram que tais alterações podem aumentar a susceptibilidade para o autismo ou para formas mais comuns de prejuízo de comunicação, uma vez que as alterações de fala e linguagem compõem uma das áreas de comprometimento relacionada ao diagnóstico da doença⁽⁴²⁾.

Alterações no gene *RELN*, mapeado em 7q22, são apontadas como um fator de risco para o desenvolvimento do autismo⁽³⁷⁾. Este gene codifica uma proteína que faz a ligação da lipoproteína de baixa densidade (VLDL) com os receptores da apoE2 e coordena a migração neuronal durante o desenvolvimento do sistema nervoso central⁽⁴³⁾. Mutações nesse gene são responsáveis por uma doença autossômica recessiva, a Lisencefalia de Robert, uma afecção que resulta de falha da migração neuronal⁽⁴⁴⁾. Alterações na expressão protéica deste gene poderiam resultar na não formação do complexo da lipoproteína com o receptor da apoE, e conseqüentemente, alterar o processo de migração neuronal, levando a fenótipos comportamentais.

Os estudos sobre o envolvimento deste gene ainda são controversos e evidenciam desequilíbrio de ligação para a região⁽⁴⁵⁾. Também já foram descritas translocações cromossômicas envolvendo o gene *RELN* em portadores de autismo^(46,35). Ainda, sua expressão foi investigada em cortes de tecidos cerebrais obtidos de autópsia de portadores de autismo e demonstram prejuízos no sistema de sinalização que resultam em defeitos cerebrais estruturais (hipoplasia cerebelar e redução no número das células de Purkinje) e em déficit cognitivo, que são observados em autistas^(47,48).

O envolvimento do gene *EN2* em autismo foi proposto com base em estudos realizados em camundongos. Está mapeado em 7q36 e quando inativo leva a um fenótipo de anormalidades cerebelares muito semelhantes às reportadas em indivíduos

autistas. Contudo os estudos sobre seu mecanismo de ação ainda são escassos e também apontam para desequilíbrio de ligação^(49,50).

O gene *IMMP2L* está localizado em 7q31 e codifica a subunidade 2 peptidase da membrana mitocondrial interna. Participa do complexo de sinalização para que proteínas produzidas no citoplasma possam entrar na mitocôndria. Uma mutação neste gene foi relatada em um portador de autismo e de Síndrome de Tourette em comorbidade⁽⁵¹⁾. Interessante é que a Síndrome de Tourette é definida como um distúrbio neurológico caracterizado por movimentos involuntários, abruptos e rápidos que também podem ser observados em portadores de DEA com ecolalia e hábito de se machucar ou morder⁽⁵²⁾.

O *RAY1/ST7* é um supressor de tumor que está mapeado em 7q31.1. Sua inativação foi observada como resultado de uma translocação detectada em um menino autista, entretanto, a relação entre a falta da expressão protéica e o fenótipo comportamental não é conhecida⁽⁵³⁾.

Outro gene de susceptibilidade, mapeado em 7q31.3-q32.1 é o gene *GRM8*, um receptor de glutamato que interage com os neurotransmissores L-glutamato⁽⁵⁴⁾. O glutamato é encontrado na maioria dos alimentos e esta presente no tecido hepático, cardíaco, muscular, renal, sanguíneo e, principalmente, no tecido cerebral. A descarboxilação do glutamato leva à formação de um neurotransmissor já discutido anteriormente, o GABA. Alterações no receptor do glutamato podem levar à sua depleção, ou ainda, causar uma subprodução do GABA, o que sabidamente desencadeia crises epiléticas. Danos cerebrais são comuns em DEA, assim como as crises epiléticas, o que faz deste gene um forte candidato à doença.

CADPS2, mapeado em 7q32.3, é um ativador protéico dependente de cálcio que tem alta expressão no cérebro, principalmente no cerebelo. Embora referido por alguns autores como candidato ao autismo, sua relação com os sinais e sintomas relacionados à doença não estão definidos^(55,56).

O gene *WNT*, mapeado em 7q31, codifica uma família de glicoproteínas conservadas que têm um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso central. Há sugestões de que uma rara mutação dominante neste gene aumentaria a susceptibilidade para autismo⁽⁵⁷⁾, entretanto faltam estudos conclusivos.

Dada a quantidade de genes na região AUTS1 encontrados alterados em portadores de DEA e uma vez que todos esses genes têm relação com o desenvolvimento ou sinalização do sistema nervoso, sua participação na susceptibilidade a estes fenótipos é certa.

Genes Ligados ao Cromossomo X

Dois outros *loci* de susceptibilidade ao autismo, *AUTSX1* e *AUTSX2* foram identificadas no cromossomo X e possuem genes relacionados a síndromes que mostram comorbidade alta com a doença⁽⁵⁸⁾.

Os genes são o *NLGN3* e *NLGN4* que estão localizados em Xq13 e, em Xp22.23, respectivamente. São responsáveis por proteínas que mediam a interação celular entre os neurônios. Embora seus produtos gênicos ainda não sejam conhecidos, mutações nesses genes afetam a adesão celular de moléculas localizadas nas sinapses. A presença destas mutações já foi observada em autistas, o que sugere que estejam envolvidas na susceptibilidade à doença⁽⁵⁹⁾.

A primeira mutação em *NLGN4* foi identificada em dois irmãos autistas, mas não em sua mãe não afetada⁽⁶⁰⁾. Outra mutação foi encontrada em uma família de portadores de retardo mental leve ligado ao X. Os homens portadores da mutação manifestavam um fenótipo variável, de retardo mental até espectro autista, sem retardo mental⁽⁶¹⁾. A penetrância completa para autismo ou retardo mental sugere que essa é uma síndrome relativamente menos complexa relacionada a DEA, embora a participação de outros fatores genéticos nesta variabilidade não tenha sido descartada⁽⁶²⁾.

Estudos mais recentes também identificaram mutações em *NLGN3* e *NLGN4*, mas os dados indicam que essas mutações são raras em DEA e alguns autores consideram improvável que as variações nesses genes aumentem os fatores de risco para autismo^(63,64).

Mutações no gene da angiotensina, *AGTR2*, localizado em Xq22-q23 também já foram encontradas em famílias com retardo mental ligado ao X e consideradas na

susceptibilidade ao espectro autista⁽⁶⁵⁾. Deleções deste *locus* já foram descritas em portadores do espectro autista⁽⁶⁶⁾. A angiotensina é um potente regulador da pressão sanguínea e do equilíbrio hidroeletrolítico, e apresenta um papel importante nas funções do sistema nervoso central mediado pelo sistema angiotensina-renina⁽⁶⁷⁾.

O aumento do número de repetições do trinucleotídeo (CGG) na região promotora do gene *FMR1*, mapeado em Xq27.3, que codifica uma proteína envolvida na diferenciação neuronal, leva a uma síndrome conhecida como Síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA).

FRAXA é considerada a causa principal de retardo mental herdado em homens⁽⁶⁸⁾. Há inúmeros relatos de comorbidade com o autismo, em frequências variáveis nos diferentes estudos, o que sugere ser a etiologia mais comum da doença^(69,70,71).

ABITBOL⁽⁷²⁾ e colaboradores demonstraram que a proteína *FMRP* é expressa desde os estágios precoces de proliferação e migração das células do sistema nervoso central, em vários outros tecidos e é produzida em altos níveis no cérebro fetal por volta da 25ª semana. A transcrição precoce deste gene e a localização da proteína mostram que as alterações contribuem para a patogênese de FRAXA, especialmente do retardo mental, que é a manifestação mais comum da síndrome. Indivíduos mais sensíveis desenvolveriam o fenótipo comportamental autístico como uma outra consequência da falta de expressão do gene *FMR1*.

Transportador e Receptor da Serotonina

VEENSTRA-VANDERWELLE e COOK⁽⁶²⁾, definiram os genes transportador (*SLC6A4*) e receptor (*HTR2A*) da serotonina, mapeados respectivamente em 17q11.1-q12 e 13q14-q21, como candidatos ao autismo baseados no aumento sérico de 30% a 50% da serotonina em autistas e em seus parentes de primeiro grau. A serotonina é um neurotransmissor excitatório, contudo, a base fisiológica desta associação ainda não está definida.

É sabido que a serotonina é fundamental durante o desenvolvimento cerebral. Alterações nos seus níveis levam a anomalias cerebrais estruturais, o que poderia contribuir para o fenótipo comportamental das DEA^(73,74) mas, os trabalhos que buscam associação entre autismo e os genes responsáveis pela recepção e transporte deste neurotransmissor mostram resultados contraditórios e não reproduzíveis em todas as populações.

Por exemplo, alguns estudos mostraram um desequilíbrio de ligação de variantes destes genes em portadores e seus familiares^(75,76), enquanto outros não o encontraram mas relataram a associação de uma variante com quadros clínicos mais graves⁽⁷⁷⁾.

Outros polimorfismos de VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) descritos no promotor da serotonina parecem afetar a transcrição e estarem associados com nervosismo e ansiedade⁽⁷⁸⁾. Também, variantes funcionais de um outro gene transportador da serotonina, o *HTT* aumentam o risco de adultos desenvolverem depressão associada ao estresse⁽⁷⁹⁾, o que é muito comum em familiares de portadores de autismo mesmo quando considerada apenas a ocorrência do primeiro episódio antes do nascimento do afetado⁽⁸⁰⁾.

Este neurotransmissor tem sido muito estudado e há inúmeras sugestões sobre sua participação em outras doenças psiquiátricas, considerando seus níveis séricos em afetados. Uma vez que o autismo não tem cura, sua participação na etiologia da doença pode ocorrer mais precocemente, afetando a formação cerebral.

Considerações Finais

A literatura sobre DEA é ampla e aborda diversos aspectos biológicos envolvidos na etiopatogenia da doença. Apesar de algumas regiões específicas do genoma serem apontadas como regiões de susceptibilidade, principalmente dos cromossomos 7, 15 e X e dos genes envolvidos com a serotonina, os dados disponíveis são escassos e contraditórios.

Embora a DEA possa estar associada a síndromes de etiologia relativamente simples ou mutações pontuais, na maioria dos casos não há etiologia definida, e estes

parecem resultar da ação de variantes de múltiplos genes em conjunto com a exposição ambiental que resultaria em fenótipos comportamentais variáveis.

Aparentemente são necessários vários *loci* com efeitos aditivos e não interativos. Cada gene poderia contribuir com a sua fração para a susceptibilidade, todos com um efeito relativamente pequeno. A dificuldade desta hipótese de herança poligênica, uma das mais consideradas na literatura, é que múltiplos genes com efeitos pequenos necessitam de casuísticas muito grandes para serem detectados.

Por outro lado, a interação com o ambiente (herança multifatorial) significa que os alelos de efeito aditivo só serão relevantes se o fator ambiental estiver presente e, se esse fator for raro, detectar o efeito do alelo pode ser extremamente difícil. Por isso pesquisas com pequenas casuísticas também podem ser relevantes, desde de que a exposição ambiental possa ser identificada.

Estudos de associação também devem ser estimulados por examinarem polimorfismos de genes candidatos sem a necessidade de evidências citogenéticas ou análise genômica.

O estudo de variantes genéticas e ambientais responsáveis pelo quadro clínico das doenças do espectro autista (DEA) às vezes é muito desencorajador, o que é esperado para as doenças complexas. Estudos de meta análise são necessários para a compreensão dos mecanismos ambientais e genéticos envolvidos, além de novas estratégias e metodologias que poderão elucidar a complexidade das relações que culminam no fenótipo comportamental autístico, um fenótipo grave e freqüente na população mundial, que por isso deve ser exaustivamente investigado.



Referências Bibliográficas

1. Lippi J. R. S. Autismo e Transtornos Invasivos do Desenvolvimento: Revisão Histórica e Classificação (dissertação) Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.
2. Ritvo ER, Ornitz EM. Autism: diagnosis, current research and management. New York: Spectrum; 1976. Bocker D, Block M, Isbruch F, Wietholt D, Hammel D, Borggreffe M, et al. Do patients with an implantable defibrillator live longer? J Am Coll Cardiol 1993;21(2):1638-44.
3. Burack JA. Debate and argument: clarifying developmental issues in the study of autism. J Child Psychol Psychiatry. 1992 Mar;33(3):617-21.
4. Smalley SL, Asarnow RF, Spence MA. Autism and genetics. A decade of research. Arch. Gen Psychiatry 1998; 45(10): 953-961.
5. ABRA: Associação Brasileira de Autismo. Política de atenção à pessoa portadora da síndrome. ABRA, 2ª edição, 1994.
6. Dosreis S, Weiner C.L, Johnson L, Newschaffer CJ. Autism spectrum disorder screening and management practices among general pediatric providers. J Dev Behav Pediatr. 2006; Apr; 27 (2 Suppl 2):S88-S94.
7. Fombonne E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. J Clin Psychiatry. 2005; 66 Suppl 10:3-8.
8. Burgess DC, Burgess, MA, Leask J. The MMR vaccination and autism controversy in United Kingdom 1998-2005: inevitable community outrage or a failure of risk communication? Vaccine. 2006; Mar 3.
9. Cohly HH, Panja A. Immunological findings in autism. Int Rev Neurobiol. 2005; 71:317-41.
10. Gottesman II, Hanson DR. Human development: biological and genetic processes. Annu Rev Psychol. 2005;56:263-86.



11. Rutter, M. Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning. *Acta Paediatr.* Jan;94(1):2-15, 2005.
12. Yeargin-Allsopp, M. Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA.* 2003; 289(1):49-55.
13. Shao Y, Wolpert CM, Raiford KL, Menold MM, Donnelly SL, et al. Genomic follow-up analysis for autistic disorder. *Am J Med screen and Genet.* Jan 8;114(1):99-105, 2002.
14. Stein D, Weizman A, Ring A, Barak Y. Obstetric complications in individuals diagnosed with autism and in healthy controls. *Compr Psychiatry.* 2006; 47(1):69-75.
15. Suresh R, Ambrose N, Roe C, Pluzhnikov A, Wittke-Thompson JK, Wu X, et al. New complexities in the genetics of stuttering: significant sex-specific linkage signals. *Am J Hum Genet.* 2006;78(4):554-63.
16. Folstein, S. E.; Rosen-Sheidley, B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet.* 2001;:943-55.
17. Caffery P, Deutsch Ck. Macrocephaly and the control of brain growth n autistic disorders. *Prog Neurobiolol.* 2005;77:38-56.
18. Estecio M, Fett-Conte AC, Varella-Garcia M, Fridman C, Silva AE. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian Youths with pervasive developmental disorders *J Autism Dev Disord.* 2002 Feb;32(1):35-41.
19. Battaglia A. The inv dup(15) or idic(15) syndrome: a clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain Dev.* 2005;27(5):365-9.
20. Bolton PF, Dennis NR, Browne CE, Thomas NS, Veltman MW, Thompson RJ, et al., The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet.* Dec 2001;105(8):675-85.
21. Sturm, H.; Fernell, E.; Gillberg, C. Autism spectrum disorders in children with normal intellectual levels: associated impairments and subgroups. *Dev Med Child Neurol.* 2004; 46(7): 444-7.

22. Sahoo T, Shaw CA, Young AS, Whitehouse N L, Schroer RJ, RE. et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of recurrent chromosome 15q rearrangements. *Am J Med Genet A*. 2005;139(2):106-13.
23. Nurmi EL, Bradford Y, Chen Y, Hall J, Amone B, Gardiner MB, et al. Linkage disequilibrium at the Angelman syndrome gene UBE3A in autism families. *Genomics*. 2001;77(1-2):105-13.
24. Slopian A, Rajewski A, Budny B, Czerski P. Evaluation of q11-q13 locus of chromosome 15 aberrations and polymorphisms in the B3 subunit of the GABA-A receptor gene (GABRB3) in autistic patients *Psychiatr Pol*. 2002;36(5):779-91.
25. Ma DQ, Whitehead PL, Menold MM, Martin ER, Ashley-Koch AE, et al. Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism. *Am J Hum Genet*. 2005; 77(3):377-88.
26. Baron C A. Genomic and functional profiling of duplicated chromosome 15 cell lines reveal regulatory alterations in UBE3A-associated ubiquitin-proteasome pathway processes. *Hum Mol Genet*. 2006;15(6):853-69.
27. Herzing LB, Cook Jr E H, Ledbetter D. H. Allele-specific expression analysis by RNA-FISH demonstrates preferential maternal expression of UBE3A and imprint maintenance within 15q11- q13 duplications. *Hum Mol Genet*. 2002;11(15):1707-18.
28. Reed ML, Leff SE. Maternal imprinting of human SNRPN, a gene deleted in Prader-Willi syndrome. *Nature Genet*. 1994; 6: 163-167.
29. Runte, M.; Huttenhofer, A.; Gross, S.; Kieffmann, M.; Horsthemke, B.; Buiting, K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet*. 2001;10(23):2687-700.
30. Stefan M, Portis T, Longnecker R. Nicholls RD. A nonimprinted Prader-Willi syndrome (PWS)-region gene regulates a different chromosomal domain in trans but the imprinted pws loci do not alter genome-wide mRNA levels. *Genomics*. 2005; 85(5):630-40.

31. Pujana M A, Nadal M, Guitart M, Armengol L, Gratacos M. Estivill X human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(1):26-35.
32. Macdonald H R, Wevrick R. The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum. Molec. Genet.* 1997; 6:1873-1878.
33. Chibuk TK, Bischof JM, Wevrick RA. Necdin/MAGE-like gene in the chromosome 15 autism susceptibility region: expression, imprinting, and mapping of the human and mouse orthologues. *BMC Genet.* 2001;2:22.
34. International molecular genetic study of autism consortium (IMGSAC): mutation screening and imprinting analysis of four candidate genes for autism in the 7q32 region. *Mol Psychiatry.* 7(3):289-301, 2002.
35. Scherer SW, Cheung J, Macdonald J R. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science.* 2003;3000:767-772.
36. Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH. Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Molec. Psychiat.* 2004; 9: 474-484.
37. Skaar DA, Shao Y, Haines JL, Stenger JE, Jaworski J, Martin ER, et al. Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Compr Psychiatry.* 2005; 47(1):64-75.
38. Xu D, Hopf C, Reddy R, Cho RW, Guo L, Lanahan A, et al. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron.* 2003; 39: 513-528.
39. Folstein SE, Mandoski RE. Chromosome 7q: where autism meets language disorder? *Am. J Hum. Genet.* 2001;67:278-281.
40. Li J, Nguyen L, Gleason C, Lotspeich L, Spiker D, Risch N, et al. Lack of evidence for an association between WNT2 and RELN polymorphisms and autism. *Am. J. Med. Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;126(1):51-7.
41. Newbury DF, Bonora E, Lamb JA, Fisher SE, Lai CS, Baird G, et al. P. International molecular genetic study of autism consortium: FOXP2 is not a

- major susceptibility gene for autism or specific language impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70: 1318-1327.
42. Gauthier J, Joober R, Mottron L, Laurent S, Fuchs M, De Kimpe V, et al. Mutation screening of FOXP2 in individuals diagnosed with autistic disorder. *Mol Psychiatry.* 2005;10(6):563-71.
43. Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* 2000; 26(1):93-6.
44. Kato M, Dobyns WB. Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet.* 2003;12.
45. International molecular genetic study of autism consortium (IMGSAC): further characterization of the autism susceptibility locus AUTS1 on chromosome 7q. *Hum Mol Genet.* 2001;10(9):973-82.
46. GILBERG. C. Chromosomal disorders and autism. *J Autism Dev Disord.* 1998; 28: 415-425.
47. FATEMI, S. H.; et al. Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry.* Apr 1;57(7):777-87, 2005.
48. Fatemi SH, Stary JM, Halt AR, Realmuto GR. Dysregulation of reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *J. Autism Dev. Disord.* 2004; 31:529-35.
49. Petit E, Herault J, Martineau J, Perrot A, Barthelemy C, Hameury L, et al. Association study with two markers of a human homeogene in infantile autism. *J. Med. Genet.* 1995; 32: 269-274,.
50. Zhong H, Serajee FJ, Nabi R, Huq AH. No association between the EN2 gene and autistic disorder. *J. Med Genet* 2003;30: e 4.
51. Petek E, Windpassinger C, Vincent JB, Cheung J, Boright AP, Scherer SW, Kroisel PM, Wagner K. et al. Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 64: 848-858.

52. Verkerk AJ, Cath DC, Van der Linde HC, Both J, Heutink P, Breedveld G, et al. Genetic and clinical analysis of a large Dutch Gilles de la Tourette family. *Mol Psychiatry*. 2006;Aug 8.
53. Vincent JB, Herbrick JA, Gurling HM, Bolton PF, Roberts W, Scherer SW. Identification of a novel gene on chromosome 7q31 that is interrupted by a translocation breakpoint in an autistic individual. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: 510-514.
54. Serajje FJ, Zhong H, Nabi R, Huq AH. The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism. *J Med Genet.* 2003;40:e 42.
55. Nagase T, Kikuno R, Nakayama M, Hirose M, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 2000;7: 273-281.
56. Cisternas Fa, Vincent Jb, Scherer Sw, Ray Pn Cloning and characterization of human CADPS and CADPS2, new members of the Ca²⁺-dependent activator for secretion protein family. *Genomics*. 2003;81(3):279-91.
57. Wassink TH, Piven J, Patil SR. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatr Genet.* 2001;11(2):57-63.
58. Bacchelli E, Maestrini E. Autism spectrum disorders: molecular genetic advances. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006;142(1):13-23.
59. Talebizadeh Z, Lam DY, Theodoro MF, Bittel DC, Lushington GH, Butler MG. Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism. *J Med Genet.* 2006;43(5):e2.
60. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, et al. Paris autism research international sibpair study: mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet.* 2003;34(1):27-9.
61. Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, F. et al. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in

- the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;74:552-557.
62. veenstra-Vanderweele J, Cook EH Jr. Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry.* 2004;9(9):819-32.
63. Ylisaukko-oja T, Rehnstrom K, Auranen M, Vanhala R, Alen R, Kempas E, . et al. Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(12):1285-92.
64. Blasi F, Bacchelli E, Pesaresi G, Carone S, Bailey AJ, Maestrini E; Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4 in individuals with autism from the IMGSAC collection. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141(3):220-1.
65. Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, et al. AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science.* 2002; 296:2401-2403.
66. Thomas NS, Sharp AJ, Browne CE, Skuse D, Hardie C, Dennis NR. Xp deletions associated with autism in three females. *Hum. Genet.* 1999; 104:43-48.
67. Ramirez, M.; Prieto, I.; Vives, F.; De Gasparo, M.; Alba, F. Neuropeptides, neuropeptidases and brain asymmetry. *Curr Protein Pept Sci.* 2004; 5(6):497-506.
68. Garcia-Nonell C, Rigau-Ratera E, Artigas-Pallares J. Autism in fragile X syndrome. *Rev Neurol.* 2006;42 Suppl 2:S95-8.
69. Fombonne E., Du Mazaubrun C. Prevalence of infantile autism in four french regions. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 1999; 27:203-210.
70. Roger SJ, Whener D E, Hagerman R. The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorder. *J. Dev Behav Pediatr.* 2001; 22:409-417.
71. Farzin F, Perry H, Hessel D, Loesch D, Cohen J, Bacalman S, et al., Autism Spectrum Disorders and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Boys with the Fragile X Premutation. *J Dev Behav Pediatr.* 2006;27(Suppl 2):S137-S144.

72. Abitbol M, Menini C, Delezoide AL, Rhyner T, Vekemans M, Mallet J. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nature Genet.* 4: 147-153, 1993.
73. ANDERSON GM. Genetics of childhood disorders:XLIV: autism, part 4: serotonin in autism. *J. Am. Acad. Child adolesc Psychiatry.* 2002; 41:1513-1516.
74. Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev.* 2006;28(4):257-60.
75. Cook EH Jr, Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, et al. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry;* 1997;2(3):247-50,.
76. Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T, Fried I, et al. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *Am J Med Genet.* 2001;105(4):381-6.
77. Tordjman S, Gutknecht L, Carlier M, Spitz E, Antoine C, Slama F, C. et al. Role of the serotonin transporter gene in behavioral expression of autism. *Mol Psychiatry.* 2001;6:434-439.
78. Max MB, Wu T, Atlas SJ, Edwards RR, Haythornthwaite JA, Bollettino AF, et al. A clinical genetic method to identify mechanisms by which pain causes depression and anxiety. *Mol Pain.* 2006;2(1):14.
79. Sanders AR, Duan J, Gejman PV. Complexities in psychiatric genetics. *Int Rev Psychiatry.* 2004;16(4):284-93.
80. Giunco C. Investigação Genético Clínica e Citogenética Molecular das Regiões 15q11-q13 e 7q31-q33 em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2002. 103 f. Dissertação de Mestrado em Genética – Universidade Estadual Paulista, 2002.

APOLIPROTEÍNA E EM AUTISMO

Luciana Tassi, M. C. Barros¹, Adriana R. de Oliveira²

Profa. Dra. Cibele de Jesus³, M. C. Barros⁴, R. Souza⁵, Agnes C. Fari-Correa⁶

¹ Pós-graduada em Física, UNESP, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil
² Pós-graduada em Física, UNESP, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil
³ Pós-graduada em Física, UNESP, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil
⁴ Pós-graduada em Física, UNESP, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil
⁵ Pós-graduada em Física, UNESP, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil
⁶ Pós-graduada em Física, UNESP, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

Capítulo IV

Capítulo IV

Capítulo IV

Capítulo IV

Capítulo IV

Capítulo IV

Capítulo IV

Capítulo IV

Apolipoproteína E em Autismo

Δ POLIPROPOTEÍNA E EM AUTISMO

Carina Tatiana Giunco ¹, Adriana B. de Oliveira¹,

Andréa B. Carvalho-Salles², Dorotéia S. R. Souza³, Agnes C Fett-Conte³

1. Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

2. Hemocentro de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), SP, Brasil

3. Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
(FAMERP/FUNFARME), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondências:

Carina Tatiana Giunco

End. Av. Parque Belvedere, 505- Barcelona casa 85

Parque Belvedere - São José do Rio Preto- SP - Brasil

15057-460

Email: carinagiunco@unip.br

A ser submetido para a revista *Psychiatric Genetics*

Introdução

A apolipoproteína E (*apoE*) tem um papel importante no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central e alguns polimorfismos já foram relacionados à doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Em autismo, os resultados são preliminares e escassos, mas sugerem uma freqüência aumentada de isoforma E2. Este trabalho observou uma freqüência elevada do alelo E2 em 67 autistas brasileiros, o que reforça os dados descritos e sugere uma possível relação entre apolipoproteína E2, proteína Reelin e sistema gabaaminérgico na predisposição do autismo.

Palavras-chaves: autismo, apoE, reelin

Introdução

A primeira descrição da apolipoproteína E (apoE) foi feita em 1979 por Utermann, que diferenciou os fenótipos +/- por análise isoelétrica e concluiu que polimorfismos desta proteína no plasma humano seriam determinados por dois alelos codominantes, possivelmente relacionados com a disbetalipoproteinemia primária e com a hiperlipidemia familiar. Em 1981, Zannis & Breslow concluíram que um único *locus* com três alelos seria responsável pelos padrões isoelétricos diferentes e esses alelos foram denominados $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. Um ano depois, foi publicada a sequência gênica demonstrando que era codificada por 299 aminoácidos Rall et al. (1982).

O gene da apolipoproteína E (*APOE*) está localizado em 19q13.2 e codifica uma molécula multifuncional envolvida na ligação e sinalização de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LBD). As LBD representam um exemplo da adaptação de receptores de superfície celular que divergiram de função Qiu et al. (2006). A apoE está relacionada com o crescimento e manutenção de axônios e da bainha de mielina durante o crescimento do sistema nervoso central (SNC). Estudos genéticos, bioquímicos e comportamentais têm sugerido que este sistema de sinalização apoE/LBD está relacionado com a predisposição a um grande número de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas que envolvem perda da habilidade cognitiva, como Alzheimer e esquizofrenia Blaquez et al. (2006); Van der Flier et al. (2006).

A associação da apoE com lipoproteínas tem como função primária realizar o transporte e o metabolismo de colesterol no plasma via endocitose. Também

tem ação no SNC onde funciona como um componente das lipoproteínas, produzida primariamente pelos astrócitos, mas, sob certas circunstâncias, também é secretada por oligodentrócitos e neurônios. A apoE secretada pelo SNC é muito mais dinâmica na regulação da expressão, na associação com moléculas e na sinalização de cascatas enzimáticas. ApoE provavelmente também desempenha um papel no SNC em associação com muitos membros das famílias dos receptores LDL e, conseqüentemente, pode afetar a função sináptica Wahrele & Holtzman, (2003); Ladu et al. (2000)

A três isoformas humanas mais conhecidas da apoE são atualmente chamadas de E2, E3 e E4. Apresentam padrões isoeletricos diferentes, além de diferenças na homeostase lipídica e neurobiológica Geda et al., (2006). As diferenças ocorrem por substituição na seqüência de aminoácidos em dois sítios, 112 e 158, que podem conter cisteína/cisteína, cisteína/arginina e arginina/arginina, respectivamente. Acredita-se que a mudança desses aminoácidos afetam diferencialmente a interação entre os domínios N- e C-terminal, o que pode afetar a afinidade da lipoproteína e a interação com seus receptores Lund-Katz et al. (2001).

O alelo E3 é o mais freqüente (alelo selvagem), com uma variação de 40% a 90% em várias populações estudadas, seguido pela variante E4 que é encontrada em 6% a 37% dos indivíduos de diferentes populações e esta relacionada a níveis baixos de apolipoproteína E e níveis altos de colesterol plasmático. E4 é considerado como um fator de risco para predisposição à doença de Alzheimer, embora haja controvérsias. Há também sugestões da relação de E4 com o desenvolvimento da demência em portadores do mal de

Parkinson Huang, (2006); Murell et al. (2006). A isoforma E2 é a menos freqüente, com cerca de 3% a 13% de portadores. Parece ter um efeito protetor contra o desenvolvimento de depressão maior, sua expressão é restrita ao SNC e representa o único membro da família de lipoproteínas de baixa densidade cujo receptor faz ligação com a proteína Reelin Fan et al. (2006).

O genótipo E3/3 é observado em 60% da população, seguido de E3/4 (22%), E2/3 (12%), E4/4 (3%), E2/4 (2%) e E2/2 (1%) Davignon *et al.*, (1988); Gooch *et al.*, (1996).

Reelin é uma proteína produzida pelos interneurônios GABAminérgicos e codificada pelo gene *RELN*, mapeado em 7q22. Faz a ligação da lipoproteína de baixa densidade (VLDL) com os receptores da ApoE 2 e coordena a migração neuronal durante o desenvolvimento do SNC Hong *et al.*, (2000). Mutações em *RELN* são responsáveis por uma doença autossômica recessiva, a Lisencefalia, que resulta da falha da migração neuronal Kato & Dobyns (2003) e já foram sugeridas como fator de risco para o autismo Skarr *et al.*, (2005). Alterações na expressão do *RELN* poderia levar a não formação do complexo lipoproteína com o receptor da ApoE e, conseqüentemente, alterar o processo de migração neuronal levando à fenótipos comportamentais.

Anormalidades na expressão de *RELN* já foram observadas em tecidos cerebrais obtidos de necrópsia de portadores de autismo, que demonstraram prejuízos no sistema de sinalização, que resultam em defeitos cerebrais estruturais (hipoplasia cerebelar e redução no número das células de Purkinje) e em déficit cognitivo. Fatemi *et al.*, (2001); Barillet *et al.* (2005); Fatemi, (2005).

O autismo é uma doença psiquiátrica grave e comum na população mundial com prejuízos na interação social, comunicação e comportamento anormal Smalley et al. (1998). Entretanto, embora diversos fatores de risco tenham sido relacionados à predisposição, sua etiologia, aparentemente complexa e heterogênea, não está esclarecida Gosttesman & Hanson (2005); Gupta & State (2005).

Mesmo os estudos sobre a relação entre apoE, Reelin e autismo são escassos e os resultados contraditórios Pérsico et al, (2004); Raiford et al, (2004).

Este artigo descreve um estudo sobre os diferentes polimorfismos de APOE em uma população de autistas brasileiros.

Casuística e Metodologia

Casuística

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FAMERP) e obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido foram avaliados 67 indivíduos com diagnóstico de autismo segundo o DSM-IV (CID-10), provenientes de escolas especializadas da cidade de São José do Rio Preto e de Ribeirão Preto, interior do estado de São Paulo, Brasil. Deles, 56 eram do sexo masculino e 11 do sexo feminino. Os portadores foram diagnosticados por psiquiatras das instituições de origem. Foram incluídos apenas os que seguiam os critérios diagnósticos do CID-10 e excluídos aqueles com outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento. Para comparação das freqüências dos genótipos observados foram utilizados os dados inferidos para a população geral Silva et al.,1998, e

utilizado o teste estatístico qui-quadrado, considerado o nível de significância de 5%.

Estudo Molecular

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico (5ml) coletados com EDTA. A extração foi realizada em três etapas de acordo com a técnica descrita por Gustincich *et al.* (1991), compreendendo: 1) lise das células sangüíneas e desnaturação com solução de brometo dodeciltrimetilamonio (DTAB); 2) desproteinização com clorofórmio; 3) precipitação do DNA e ressuspensão via brometo cetilmetrimetilamonio (CTAB).

Amplificação do DNA e ação da Enzima HhaI

Os segmentos polimórficos do gene *APOE* foram amplificados pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Em cada reação utilizou-se 0,5µL de cada desoxinucleotídeo (0,8mM); 2,5µL de tampão PCR 10X; 2,5µL de dimetilsulfóxido 10%; 2,5µL de cada primer (2,5mM); 0,2 µL de Taq polimerase (5U/µL); 11µL de água Milli Q; 2µL de DNA genômico diluído (0,2 µg).

Para amplificação do segmento polimórfico foram utilizados os primers

P1:5' – ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC -3' e

P2:5' – TAAGCTTGGCAGGGCTGTCCAAGGA – 3',

complementares às regiões próximas aos códons polimórficos 112 e 158 , localizados no exon 4 de *APOE*. A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 94°C por cinco minutos e a mistura da reação foi submetida em seguida a 40 ciclos de



94°C por 30 segundos e 65°C por dois minutos, com ciclo final a 72°C por sete minutos Hixon & Vernier, (1990) com modificações.

Ação da Enzima *Hha* I e Análise dos Polimorfismos

O produto de amplificação da PCR foi submetido à enzima de restrição *Hha* I (5U por tubo de reação) em banho-maria a 37°C, *overnight*, para clivagem das seqüências amplificadas dos alelos E2, E3 e E4 em regiões específicas (GCGC), separando fragmentos com 91pb e 83pb (E2), 91pb e 48pb (E3) e 72pb e 48pb (E4). A apoE3 contém cisteína na posição 112 e arginina na posição 158. Na apoE2, um resíduo de cisteína substitui a arginina na posição 158, enquanto a apoE4 contém arginina em ambas as posições Smit et al., (1990).

Os fragmentos de DNA, referentes aos alelos E2, E3 e E4, obtidos pela ação da enzima de *Hha* I foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% não desnaturado, sob corrente constante de 200V por 1 hora e 30 minutos.

Como controle foi utilizada uma amostra de DNA padrão (pBR 322-Gibco), digerido pela enzima de restrição *Msp* I que gera fragmentos de 110pb, 90pb, 76pb e 67pb.

Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,2mg/L) por 10 minutos e os fragmentos de DNA visibilizados sob iluminação ultravioleta, seguido de análise do material por fotodocumentação. A Figura 1 apresenta um esquema de genotipagem para as possíveis combinações que podem ser encontradas.

Resultados

Entre os 67 autistas estudados, o genótipo 3/3 foi observado em 27 casos (40%), seguido do genótipo 3/4 em 21 casos (31%), o genótipo 2/3 em 10 (15%) e 2/4 em 9 casos (14%). Nenhum apresentou os genótipos 2/2 ou 4/4. Quanto às frequências alélicas, o alelo E3 foi observado em 58 casos (87%), o alelo E4 em 49 e o alelo E2 em 19 (28%). A Figura 2 apresenta a fotografia de um gel de poliacrilamida com alguns polimorfismos encontrados.

A Tabela 1 apresenta as frequências genotípicas e alélicas observadas e esperadas e os valores de p.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos 2/3 e 3/4 ($p=0,01$ e $p=0,05$, respectivamente), e as frequências alélicas E2 e E4 também diferiram estatisticamente ($p=0,00001$ e $p=0,0000001$).

Discussão

Existem apenas dois estudos na literatura que investigaram polimorfismos do gene *APOE* em autismo. O primeiro foi descrito por Raiford et al. (2004). Ele analisou 322 famílias de autistas e não observou associação significativa de qualquer dos polimorfismos, sugerindo não haver relação com entre autismo e *APOE*. Ainda em 2004, Pérsico et al., observaram um desequilíbrio de ligação do alelo E2 em 223 famílias estudadas e referiram os estudos anteriores que mostravam a relação entre a proteína Reelin com as alterações cerebrais

observadas em autistas. Sugeriram que apoE2 funcionaria como um antagonista competitivo de Reelin. Mais recentemente, Qiu et al., 2006, em um estudo de revisão sobre os receptores de lipoproteínas sugeriu que o autismo é um dos distúrbios neuropsiquiátricos possivelmente relacionados com polimorfismos do gene *APOE*.

Neste estudo as frequências de alguns genótipos diferiram das anteriormente descritas e mostraram um aumento do alelo E2. Diferentemente dos estudos anteriores, não foram estudadas famílias e sim uma casuística de autistas que, embora pequena, aponta para possível relação entre este polimorfismo e a predisposição do autismo.

É sabido que Reelin tem relação com apoE2 e com os receptores gabaminérgicos. Alterações no sistema gabaminérgico e mutações nos genes dos receptores GABA tem sido frequentemente descritos em doenças do espectro autista Vincent et al. (2006); Dykens et al. (2004); Slopian et al. (2002). Não há, entretanto, hipóteses que expliquem a relação entre estas alterações e o fenótipo comportamental autístico, mas sim sugestões de que resultem em desenvolvimento e funcionamento cerebral anormal.

A relação apoE/Reelin/GABA pode ser um dos fatores envolvidos na complexidade etiológica do autismo. Estudos com casuísticas grandes e que esclareçam o verdadeiro papel de apoE2 no sistema nervoso central serão fundamentais para o entendimento desta relação.



Referências bibliográficas

- Bartlett W.C., Gharani N., Millonig J.M., Brzustowicz L.M. (2005) Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int. J. Devl. Neuroscience* **23**:221-234.
- Blazquez L, Otaegui D, Saenz A, Paisan-Ruiz C, Emparanza JI, Ruiz-Martinez J, et al., (2006) Apolipoprotein E varepsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. Aug 1.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **8(1)**:1-21.
- Dykens EM, Sutcliffe JS, Levitt P. (2004) Autism and 15q11-q13 disorders: behavioral, genetic, and pathophysiological issues. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **10(4)**:284-91.
- Fan PL, Chen CD, Kao WT, Shu BC, Lung FW. (2006) Protective effect of the apo epsilon2 allele in major depressive disorder in Taiwanese. *Arch Neurol. Mar* **63**:435-40.
- Fatemi SH, Stary JM, Halt AR, Realmuto GR. (2001) Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *J Autism Dev Disord.* **31**:529-35.
- Fatemi, S. H. (2005) Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry* **57**:777-87.
- Geda YE, Knopman DS, Mrazek DA, Jicha GA, Smith GE, Negash S. et al., (2006) Depression, apolipoprotein E genotype, and the incidence of mild cognitive impairment: a prospective cohort study. *Arch Neurol. Mar* **63**:435-40.

- Gooch MD, Stennett DJ. (1996) Molecular basis of Alzheimer's disease *Am J Health Syst Pharm* **53**:1545-57.
- Gottesman II, Hanson DR (2005) Human development: biological and genetic processes. *Annu Rev Psychol* **56**:263-86.
- Gupta AR, State MW. (2006) Autism: genetics *Rev Bras Psiquiatr* **28** :S29-38.
- Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. (1991) A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* **11**:298-300.
- Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* **31**:545-8.
- Hong, S. E. Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, et al. (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* **26**:93-96.
- Huang Y. (2006) Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Acta Psychiatr Scand* **113**:48-53.
- Kato M, Dobyns WB. (2003) Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet.* **1**:R89-96.
- Ladu, M.J. Reardon, C., Van Eldik, L., Fagan, A.M., Bu, G., Holtzman, D., et al. (2000) Lipoproteins in the central nervous system. *Annals of New York Academy of Science*, **903**, 167-175.

Lund-Katz S, Wehrli S, Zaiou M, Newhouse Y, Weisgraber KH, Phillips MC. (2001) Effects of polymorphism on the microenvironment of the LDL receptor-binding region of human apoE. *J Lipid Res* **42**:894-901.

Murrell JR, Price B, Lane KA, Baiyewu O, Gureje O, Ogunniyi A, Unverzagt FW, Smith-Gamble V, Gao S, Hendrie HC, Hall KS. (2006) Association of apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease in African Americans. *Arch Neurol* **63**:431-4.

Pérsico AM, D'Agruma L, Zelante L, Militeri R, Bravaccio C, Schneider C, et al. (2004). Enhanced APOE2 transmission rates in families with autistic probands. *Psychiatr Genet* **14**:73-82.

Qiu S, Korwek KM, Weeber EJ. (2006) A fresh look at an ancient receptor family: emerging roles for low density lipoprotein receptors in synaptic plasticity and memory formation. *Neurobiol Learn Mem* **85**:16-29.

Raiford KL, Shao Y, Allen IC, Martin ER, Menold MM, Wright HH, et al. (2004). No association between the APOE gene and autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. **125**:57-60.

Rall, S. C., Jr.; Weisgraber, K. H.; Mahley, R. W. (1982). Human apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **257**: 4171-4178. .

Slopien A, Rajewski A, Budny B, Czerski P. (2002) Evaluation of q11-q13 locus of chromosome 15 aberrations and polymorphisms in the B3 subunit of the GABA-A receptor gene (GABRB3) in autistic patients *Psychiatr Pol* **36**:779-91.

Skaar DA, Shao Y, Haines JL, Stenger JE, Jaworski J, Martin ER, et al., (2005). Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Compr Psychiatry* **47**:64-75.

Smalley, S.L., Asarnow, R.F, Spence, M.A. (1998) Autism and genetics. A decade of research. *Arch. Gen Psychiatry* **45**, 953-961.

Smit, M.; De Knijff, P.; Van Der Kooij-Meijis, E.; Groenendijk, C.; Van Den Maagdenberg, A. M., et al. (1990) Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia: the E2(lys146-to-gln) variant results in a dominant mode of inheritance. *J. Lipid Res.* **31**: 45-53.

SOUZA, D. R. S.; (1998) Polimorfismo da apolipoproteína E na doença de Alzheimer tipo tardio. *Revista de Psiquiatria Clínica* **25**: 98-103.

Van der Flier WM, Schoonenboom SN, Pijnenburg YA, Fox NC, Scheltens P. (2006) The effect of APOE genotype on clinical phenotype in Alzheimer disease. *Neurology* **67**:526-7.

Vincent JB, Horike SI, Choufani S, Paterson AD, Roberts W, Szatmari P. (2006) An inversion inv(4)(p12-p15.3) in autistic siblings implicates the 4p GABA receptor gene cluster *J Med Genet.* **43**:429-34.

Wahrele, S.E. & Holtzman, D.M. (2003) Differential metabolism of ApoE isoform in plasma and CSF. *Experimental Neurology* **183**: 4-6.

Zannis VI, Breslow JL (1981) Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* **17**:1033-41.

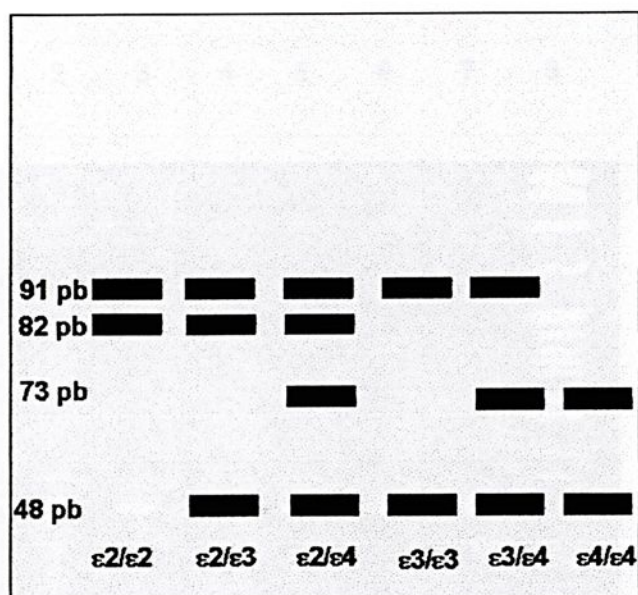


Figura 1. Esquema das combinações de alelos da *APOE* após digestão enzimática com *HhaI*. Coluna à esquerda o tamanho de cada fragmento e na linha abaixo as combinações possíveis.

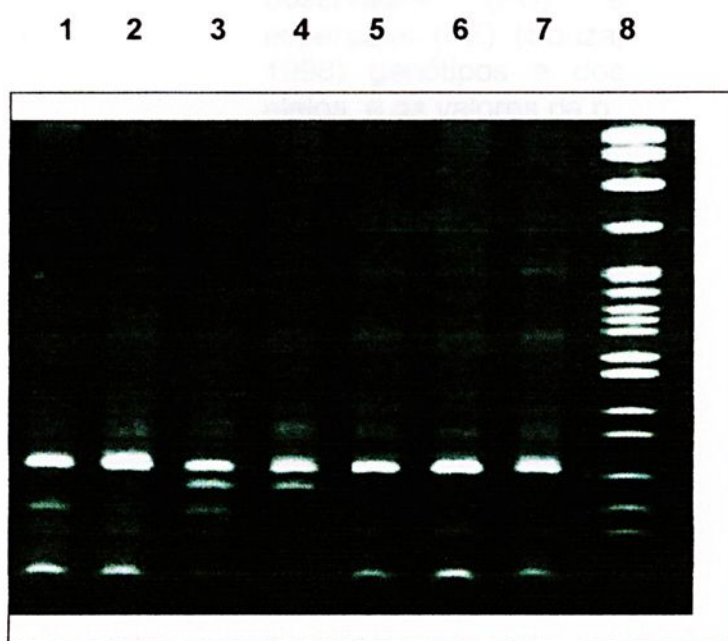


Figura 2. Fotografia de gel de poliacrilamida submetido a eletroforese mostrando bandas eletroforéticas para o polimorfismo apo *E-Hha* I. Notam-se os genótipos: E3/E3 nas colunas 2, 5-7; E3/E4 na coluna 1; E2/E4 na coluna 3 e E2/E3 na coluna 4. A coluna 8 apresenta uma amostra de DNA padrão (100 pb).

Tabela 1. Frequências relativas (%) observadas (FO) e esperadas (FE) (Souza, 1998) genótipos e dos alelos, e os valores de p.

genótipos	FO	FE	P
2/2	0	0	1,0
2/3	15	4	0,01*
2/4	14	0	1,0
3/3	40	88	1,0
3/4	31	8	0,05*
4/4	0	0	1,0
alelos			
E2	28	2	0,00001*
E3	87	94	0,9
E4	73	4	0,0000001*

*= estatisticamente significativa.

Autismo e Síndrome do Cromossomo X Frágil

Adriana Barboza de Oliveira ¹, Carina Tatiana Guzzo ², Angela Maria Vienna Morgante³,
Agneta Cristina L. S. Costa³

- 1. Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil
- 2. Departamento de Genética - Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP, Brasil
- 3. Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMED, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondência:
Carina Tatiana Guzzo
End. Av. Parque Belvedere, 505- Belvedere casa 85
Parque Belvedere - São José do Rio Preto-SP - Brasil
13067-460
E-mail: carinaguzzo@fmed.unesp.br

Capítulo V Autismo e Síndrome do Cromossomo X Frágil

A ser submetido para Genetics and Molecular Biology

Short Communication

Autismo e Síndrome do Cromossomo X Frágil

Adrina Barbosa de Oliveira ¹, Carina Tatiana Giunco ², Angela Maria Vianna Morgante²,
Agnes Cristina Fett-Conte³

1. Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

2. Departamento de Genética – Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP, Brasil

3. Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondências:

Carina Tatiana Giunco

End. Av. Parque Belvedere, 505- Barcelona casa 85

Parque Belvedere - São José do Rio Preto- SP - Brasil

15057-460

Email: carinagiunco@unip.br

A ser submetido para *Genetics and Molecular Biology*

Resumo

O autismo é uma doença complexa, sem etiologia definida e que apresenta heterogeneidade de sinais e sintomas. Pode ocorrer em comorbidade com várias síndromes genéticas, mais freqüentemente com a Síndrome do Cromossomo X Frágil. Este trabalho discute a comorbidade entre Autismo e a Síndrome do X Frágil, da qual é um sintoma não patogênico. Este trabalho descreve a freqüência de 0% de indivíduos positivos para esta síndrome entre 60 autistas do sexo masculino. O resultado sugere que a Síndrome do X Frágil deve ser investigada em todos os transtornos invasivos do desenvolvimento e não só em autismo.

Palavras-chave: Autism, FRAXA, CGG repetition, Polymerase Reaction Chain

Introdução

O autismo é uma doença definida comportamentalmente de diagnóstico difícil, baseado na história clínica e no fenótipo comportamental (APA, 1994), para o qual não há biomarcadores estabelecidos. Os critérios diagnósticos incluem a presença, antes dos três anos de idade, de prejuízo na linguagem, déficit na reciprocidade social e comportamento ritualístico e repetitivo. É freqüente na população, com estimativas atuais que variam de 1:500 a 1:166 (Blaxill, 2004; Newschaffer et al, 2005). Afeta quatro vezes mais homens do que mulheres, o que indica *loci* de susceptibilidade no cromossomo X (OMIM, 2006)

Mais recentemente, pela dificuldade no estabelecimento dos limites diagnósticos entre autismo, Síndrome de Asperger e Transtornos Invasivos do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (PDD-NOS), as três doenças têm sido referidas na literatura como Doenças do Espectro Autista (DEA).

As DEA são consideradas etiológica, biológica e fenotipicamente heterogêneas, mas a participação dos fatores genéticos e ambientais na etiopatogenia destas doenças é indiscutível. Há alta concordância em gêmeos monozigóticos, em torno de 92%, quando se considera anormalidades cognitivas e sociais (Bailey et al., 1995), estão fortemente associadas com deficiência mental - cerca de 75% dos casos, (Rutgers et al., 2004) e possuem diversos genes descritos como de susceptibilidade a estas doenças (Castermans et al., 2004).

Embora as DEA ocorram como parte do quadro clínico de muitas doenças genéticas, gênicas e cromossômicas, a Síndrome do X Frágil (FRAXA) é a que apresenta maior comorbidade com os quadros autísticos, sendo considerada a etiologia principal da

doença (Bailey, 2004). FRAXA é a maior causa de retardo mental herdado em homens e resulta de mutações no gene *FMR1*, localizado em Xq27.3 (Visootak et al., 2005).

A identificação desta comorbidade é importante em função dos riscos de recorrência. Além disso, a identificação de subgrupos de DEA baseados em associações com outras doenças e nos padrões neuropsicológicos pode auxiliar na compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no fenótipo comportamental e no Aconselhamento Genético das famílias.

Este estudo investigou a frequência de FRAXA em 60 indivíduos autistas do sexo masculino, por equipe especializada, segundo os critérios do DSM-IV. Os pacientes são provenientes de escolas de diferentes cidades do interior do Estado de São Paulo especializadas em DEA. Foram excluídos indivíduos com outras DEA e com outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento, além daqueles com distúrbios psiquiátricos da infância, como psicóticos.

Foi realizada a extração do DNA genômico de cada indivíduo, obtido a partir de leucócitos de sangue venoso periférico, segundo a técnica descrita por Gustincich (1991), com modificações. A investigação do polimorfismo de repetições de trinucleotídeos CGG, presente no gene *FMR1*, responsável pela Síndrome, foi realizada segundo as técnicas descritas por Haddad et al. (1996) e de Fu et al. (1991), com modificações.

Todas as amostras foram submetidas a, pelo menos, duas reações e aquelas positivas em qualquer das técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram submetidas à técnica de *Southern blot* para confirmação ou exclusão do resultado.

Na casuística estudada, a frequência de FRAXA foi de 0%, ou seja, nenhum autista era portador do gene *FMR-1*.

No Brasil, a frequência de FRAXA entre indivíduos do sexo masculino institucionalizados é de 8% (Glover and Guilen, 2006). Na população autista, os estudos mostram uma variação de 0% a 37% (Roger *et al.*, 2001). Quando considerados todos os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento ou DEA são encontrados frequências entre 4% e 6% (Oliveira, 2006; Randi *et al.*, 2006). A frequência encontrada neste estudo está, portanto, de acordo com os dados da literatura. Frequências maiores seriam esperadas, em função da associação dos sinais autísticos com FRAXA, uma vez que entre 15 e 30% dos homens afetados preenchem critérios diagnósticos para o autismo (Baumgardner, 1995). Contudo, a casuística aqui apresentada não é grande, foram seguidos critérios rígidos de diagnóstico de autismo clássico e não foram incluídos quadros clínicos mais leves ou sintomas autísticos isolados.

Meninos com FRAXA têm um risco grande de manifestar problemas comportamentais comuns nas DEA, como hiperatividade, ecolalia, esteriotipias, auto-agressão, diminuição do contato tátil (Kau *et al.*, 2000; Lachiewicz *et al.*, 2000), ansiedade exagerada, (Baumgardner *et al.*, 1995), pobre contato visual (Cohen *et al.*, 1988), movimentos esteriotipados e anormalidades qualitativas de linguagem (Teisl *et al.*, 1999).

Até pouco tempo as pesquisas se limitavam a correlacionar ou comparar FRAXA e autismo sem considerar a expressão sérica e os efeitos cerebrais que resultariam no comportamento autista. Pesquisas recentes mostram que este comportamento pode ser influenciado pelos danos cerebrais decorrentes da diminuição ou falta de produção da proteína FMRP, que está envolvida na formação e função cerebral normal (Visootak *et al.*, 2005).

A proteína FMRP é encontrada primariamente nas células sanguíneas, nos dentritos e nas sinapses e testículos. Nos neurônios, a FMRP está predominantemente associada com a atividade de tradução ribossômica durante a síntese protéica (Khandjian et al., 1996). Está envolvida na atividade de regulação sináptica pelo transporte de RNAm transcrito de vários genes para os dentritos neuronais em resposta à estimulação nervosa (Brown et al., 2001). Então, durante o desenvolvimento normal, FMRP seria produzida nas sinapses em resposta à ativação sináptica e aumentaria no cérebro de acordo com a sinaptogenese, em resposta ao ambiente (Reiss and Christopher, 2003).

Em indivíduos com FRAXA, a redução ou a falta da proteína causaria mudanças no desenvolvimento neuronal, prejuízo na maturação de neurônios e falha nas ligações sinápticas. RNAm, alvos da proteína FMRP incluiriam aqueles envolvidos na plasticidade e desenvolvimento neuronal, maturação sináptica e vias axônicas (Irwin et al., 2000).

O *vermis* cerebelar está envolvido no processamento da informação sensorial, modulação da atenção, emoção, coordenação de movimentos e na linguagem (Bobee, 2000). Há hipóteses de que alterações nesta estrutura podem ser responsáveis por algumas das anormalidades comportamentais observadas em portadores de FRAXA, particularmente naqueles que exibem autismo. Inclusive diminuição do volume do *vermis* cerebelar já foi relatado em autistas (Kauffman, 2003).

Assim, FRAXA pode ser menos freqüente entre autistas, cujo diagnóstico é difícil de ser concluído, mas certamente, apresenta freqüências maiores em populações com critérios diagnósticos de DEA.

Estudos longitudinais prospectivos em casuísticas amplas são necessários para a elucidação dos fatores biológicos e ambientais que influenciam a cognição e o

comportamento, especialmente para elaboração de estratégias de intervenções específicas e precoces (Reiss & Dante, 2003).

APA Novas técnicas e metodologias têm surgido como uma promessa para as pesquisas dos fatores envolvidos na etiologia complexa da DEA, portanto os trabalhos multidisciplinares ou estudos de consórcio poderão nos dar um melhor panorama das doenças de espectro autístico. Sendo o FRAXA a síndrome de maior comorbidade e de etiologia conhecida, o estudo dessa associação deve revelar, num futuro próximo o entendimento de pelo um subgrupo etiológico do autismo.

Res Rev. 10(1):3-10

Beauregarder TL, Reiss AL, Freund LA, and Abrera MT (1995) Specification of the neural circuitry phenotype in males with fragile X syndrome. *Psychiatr* 32(5):744-52.

Shenil MS (2004) Study aids to establish diagnostic distinction in a large in increased rate of autism. *Pharmacotherapy* 24(8):812-2 author reply 813-5

Baker S, Marote E, Tumbay-Lopez H, and Canton J (2009) Effects of early medical cerebral lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behav Brain Res* 112(1-2):107-117.

Brown V, Jin P, Carter S, Darnell JC, O'Donnell WT, Hetherington SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keane JD, Lovell AD and Vitarin SI. Aberrant identification of FMR1-associated brain mRNAs and altered mRNA functional profiles in fragile X syndrome (2007). *Cell* 107(4):477-487

Casagrande C, Vilques V, Stoyard J, Wan, de Van W, Frye JP, and Duvicenti K (2004) Chromosomal anomalies in individuals with autism: a strategy towards the identification of genes involved in autism. *Autism* 8(2):145-151.

Referências Bibliográficas

- APA (American Psychiatric Association): (1994). Diagnostic and Statistical Manual of mental Retardation. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Bailey A; Le Couteur A; Gottesman I; Bolton P; Simonoff E; Yuzda E; and Rutter M. (1995) Autism as strongly genetic disorder evidence from a British twin study. Psychol Med 25(1):63-77.
- Bailey DB Jr. (2004) Newborn screening for fragile X syndrome. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 10(1):3-10.
- Baumgardner TL, Reiss AL, Freund LS, and Abrams MT (1995) Specification of the neurobehavioral phenotype in males with fragile X syndrome. Pediatrics 95(5):744-52.
- Blaxill MF (2004) Study fails to establish diagnostic substitution as a factor in increased rate of autism. Pharmacotherapy 24(6):812-3; author reply 813-5.
- Bobee S, Mariette E, Tremblay-Leveau H, and Caston J (2000) Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. Behav Brain Res 112(1-2):107-117.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jim X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Danell RB and Warren ST. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome (2001). Cell 107(4):477-487.
- Castermans D, Wilquet V, Steyaert J, Van de Ven W, Fryns JP, and Devriendt K (2004) Chromosomal anomalies in individuals with autism: a strategy towards the identification of genes involved in autism. Autism 8(2):141-161.

CID-10 (1994) Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID 10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Organização Mundial da Saúde (OMS), Porto Alegre, Artes Médicas.

Cohen DJ, Paul R, and Vollmar FR (1988) The classification of pervasive developmental disorders and other disorders: toward the DSM-IV. *Psychiatr Infant* 31(1):151-172.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, and Richards S (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67(6):1047-58.

Glover-Lopez G, and Guillen-Navarro E. (2006) Fragile X syndrome. *Rev Neurol* 42(supl1):s51-4.

Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Caminci P. (1991) A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11:298-300.

Haddad LA, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, and Pena SDJ (1996) A PCR based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum. Genet.* 97:808-812.

Irwin SA, Swain RA, Christmon CA, Chakravarti A, Weiler IJ, and Greenough WT (2000) Evidence for altered Fragile-X mental retardation protein expression in response to behavioral stimulation. *Neurobiol Learn Mem* 74(1):87-93.

Kau AS, Reider EE, Payne L, Meyer WA, and Freund L (2000) Early behavior signs of psychiatric phenotypes in fragile X syndrome. *Am J Ment Retard* 105(4):286-299.

Kaufmann WE, Cooper KL, Mostofsky SH, Capone GT, Kates WR, Newschaffer CJ, Bukelis I, Stump MH, Jann AE, and Lanham DC (2003) Specificity of cerebellar vermian

abnormalities in autism: a quantitative magnetic resonance imaging study. *J. Child Neurol* 18(7):463-470.

Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, and Rousseau F (1996) The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* 12(1):91-93.

Lachiewicz AM, Dawson DV, and Spiridigliozzi GA (2000) Physical characteristics of young boys with fragile X syndrome: reasons for difficulties in making a diagnosis in young males. *Am J Med Genet* 5;92(4):229-236.

Newschaffer CJ, Falb MD, and Gurney JG (2005) National autism prevalence trends from United States special education data. *Pediatrics* 115(3):e277-282.

Oliveira AB Investigação molecular por PCR e clínica da síndrome do cromossomo X frágil em homens com transtornos invasivos do desenvolvimento. 2006. 64f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto-SP.

OMIM 209850 (Online Mendelian Inheritance in Man) consultado Ago. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Randi JH. (2006) Lessons from Fragile X regarding neurobiology, autism, and neurodegeneration. *Developmental and Behavioral Pediatrics* 27(1): 63-74.

Reiss AL and Dant CC (2003) The behavioral neurogenetics of fragile X syndrome: analyzing gene-brain-behavior relationships in child developmental psychopathologies. *Dev Psychopathol* 15(4):927-268.

Rogers SJ, Wehner DE, Hagerman R (2001) The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr* 22(6):409-417.

Santos FR, Pena SDJ, and Epplen JT (1993) Genetic and population study of na Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 90(6):655-6.

Teisl JT, Reiss AL, and Mazzocco MM (1999) Maximizing the sensitivity of a screening questionnaire for determining Fragile X at-risk status. *Am J Med Genet* 83(4):281-285.

Visootsak J, Warren ST, Anido A, and Graham JM Jr (2005) Fragile X syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)* 44(5):371-381.



ALTIISMO E ANTECEDENTES FAMILIAIS DE MANIFESTAÇÕES PSIQUIÁTRICAS

Carla Patrícia Guzzo¹, Agnês Gervásio Felli Lora²

1. Departamento de Psicologia - Faculdade de Psicologia, Letras e Ciências Exatas, UNICOP/UNESP, São João do Rio Preto, SP, Brasil

2. Departamento de Odontologia Médica - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, UNESP, São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondência:

Carla Patrícia Guzzo

Rua A, Parque Belvedere, 100, Nazaré, São José

Parque Belvedere, São José do Rio Preto, SP, Brasil
13051-630

E-mail: carla_guzzo@yahoo.com

Capítulo VI

Autismo e Antecedentes Familiais
de Manifestações Psiquiátricas

Resumo

O autismo é uma síndrome comportamental, com incidência elevada na população e que resulta em prejuízos sérios de comunicação e relacionamento social.

AUTISMO E ANTECEDENTES FAMILIAIS DE MANIFESTAÇÕES PSIQUIÁTRICAS

Carina Tatiana Giunco ¹, Agnes Cristina Fett-Conte ²

1. Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

2. Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP/FUNFARME, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondências:

Carina Tatiana Giunco
End. A. Parque Belvedere, 505- Barcelona casa 85
Parque Belvedere - São José do Rio Preto- SP- Brasil
15057-030
Email: carinagiunco@unic.br
Telefone: 17] 3223 5251

A ser submetido para Revista Brasileira de Psiquiatria

Introdução

Resumo

O autismo é uma síndrome comportamental, com incidência elevada na população e que resulta em prejuízos sérios de comunicação e relacionamento social para seu portador. A existência de um fenótipo mais brando em parentes de autistas sugere antecipação genética da doença. Este estudo apresenta as frequências de manifestações psiquiátricas encontradas em 71 famílias de autistas comparadas com as observadas em 71 famílias de indivíduos normais, pareados por sexo, etnia e classe social, que constituíram o grupo controle. Foram consideradas somente queixas psiquiátricas que se manifestaram antes do nascimento do autista. Houve diferença significativa entre os grupos, o que reforça a hipótese da antecipação genética e de herança poligênica na maioria dos casos da doença.

Palavras Chaves: autismo, pais, psiquiátricos, antecipação genética, fenótipo

Introdução

Autismo é um distúrbio comportamental complexo que ocorre tipicamente até o terceiro ano de vida. Atualmente reconhecido como uma patologia neurobiológica, o diagnóstico de autismo requer um critério clínico específico que envolve as áreas de comunicação, reciprocidade das interações sociais e comportamento estereotipado e repetitivo¹. A incidência na população é alta, com estimativas que variam de 1:500 a 1:166 indivíduos e não parece sofrer influência de etnia, do nível sócio-econômico, ou do estilo de vida^{2,3}.

Desde as primeiras descrições feitas por Kanner, são notados traços particulares da personalidade de parentes de indivíduos autistas. Landa⁴, observou que parentes de autistas mostram comportamento mais pragmático e “atípico” comparados com controles. Entretanto, isso foi interpretado por alguns especialistas como possível consequência do aparecimento da doença em um membro da família.

Nos anos 50 acreditava-se que o autismo era causado pela maneira como os familiares se relacionavam com a criança. Até o final dos anos 60 as “mães frias” eram consideradas as responsáveis pela inabilidade das crianças se relacionarem com o mundo à sua volta⁵.

Nesta época, alguns estudos que compararam a fala e linguagem de pais de crianças afetadas com aqueles de crianças não afetadas ou com os de crianças com outras anormalidades do desenvolvimento, mas não foram conclusivos^{6,7}.

Posteriormente, foram descritas freqüências altas de convulsões em autistas⁸, alterações da morfologia cerebral^{9, 10}, além da forte participação de fatores genéticos na etiologia da doença dada a concordância alta em gêmeos monozigóticos^{11,12 13},



comorbidade com outras doenças genéticas, gênicas e cromossômicas^{14,15} e mapeamento de genes candidatos à predisposição¹⁶.

O risco de recorrência do autismo é estimado em 6-8%, o que é cerca de 200 vezes maior do que o da população em geral¹⁷.

Já foram propostos diferentes mecanismos genéticos envolvidos na etiologia do autismo, entre eles a antecipação genética, epistasia e interação gênica com fatores ambientais^{18,19}, mas os dados disponíveis não são conclusivos. Além disso, a definição da variação fenotípica da doença também não está estabelecida, tanto que a literatura atual tem incluído autismo, por dificuldade de aplicação dos critérios diagnósticos e de realização diagnóstico diferencial, entre as Doenças do Espectro Autístico (DEA), que também incluem a Síndrome de Asperger e o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento²⁰.

Quando são considerados fenótipos mais brandos, isto é, a presença de alguns sinais e sintomas das DEA, que não completam o diagnóstico, há um aumento significativo nas taxa de concordância para gêmeos DZ e MZ¹². Assim, é possível que muitos genes contribuam com uma pequena parcela para o fenótipo comportamental²¹.

A existência de fenótipos mais leves (*broader phenotype*) em parentes de autistas foi relatada por vários autores^{15,22}, entretanto, muitas questões permanecem não respondidas. Os estudos utilizaram métodos diferentes de avaliação, incluindo observação e entrevista, que tem sido usados para postular sinais cognitivos^{4,24,25,26,27}.

Sinais tipicamente associados com as DEA podem ocorrer em outras condições. Por exemplo, prejuízos sociais são visto em praticamente todas as doenças psiquiátricas. Portanto, é necessário investigar nos parentes não só os sinais característicos, mas também outros como déficit de atenção, depressão, ansiedade e

demais manifestações psiquiátricas que possam resultar da ação de genes responsáveis pelo espectro autista, que, de acordo com o número herdado poderiam variar do fenótipo mais brando (*broader phenotype*) até autismo clássico com fenótipos mais graves nas gerações mais recentes, de acordo com o fenômeno da antecipação genética.

Este trabalho descreve uma análise da presença de diferentes manifestações psiquiátricas em famílias de autistas, considerando apenas aquelas que se iniciaram antes do nascimento da criança afetada, um critério não descrito em publicações anteriores.

Métodos

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP/FAMERP) e da CONEP, foram estudadas 70 famílias de indivíduos autistas provenientes de escolas especializadas das cidades de São José do Rio Preto e Ribeirão Preto, interior de São Paulo, Brasil. Ambas funcionam como centros de triagem e diagnóstico e contam com equipe interdisciplinar especializada em transtornos globais do desenvolvimento.

As famílias foram selecionadas de acordo com o diagnóstico conclusivo de autismo descrito dos prontuários dos portadores e realizado segundo os critérios do CID-10, em conformidade com o DSM-IV²⁸.

Foram excluídas famílias cujos filhos apresentaram quadros inconclusivos, famílias de portadores de outros transtornos invasivos do desenvolvimento, de psicóticos ou de portadores de doenças genéticas. Para exclusão destes últimos, todos

os pacientes foram avaliados por geneticista clínica e submetidos ao estudo de cariótipo e análise molecular da Síndrome do Cromossomo X Frágil.

De 78 famílias selecionadas, 70 consentiram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, segundo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Estas constituíram o grupo de estudos, denominado Grupo 1.

Para avaliação e comparação dos dados, foi constituído um grupo controle (Grupo 2) composto por 70 famílias de indivíduos saudáveis, pareados com os autistas das famílias do Grupo 1 por sexo, idade e classe social, provenientes da população em geral, após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido. Aqueles em idade escolar foram provenientes de escolas públicas/particulares das mesmas cidades e bairros, de acordo com o pareamento. Para tanto, foram contatados diretores de escola, exposto o projeto e, após a concordância dos mesmos, fornecidas as informações sobre as características necessárias (sexo, idade e classe social) dos indivíduos cujas famílias comporiam o grupo controle. Estes identificaram os indivíduos e as famílias dos mesmos foram convidadas a participar do estudo. Nenhuma se recusou e todos os responsáveis assinaram o termo de consentimento. As famílias dos indivíduos que não estavam em idade escolar foram selecionadas entre as dos funcionários/proprietários das escolas e seus parentes, considerando-se os mesmos critérios de pareamento.

As famílias dos Grupos 1 e 2 foram submetidas a uma entrevista com duração de cerca de duas horas. De acordo com um protocolo de avaliação contendo um questionário semi-estruturado com perguntas abertas e fechadas que abordavam as seguintes variáveis: idade, escolaridade, etnia, profissão, renda mensal, antecedentes

familiais e queixas atuais relacionadas com transtornos psiquiátricos em parentes maternos e paternos do afetado, até o terceiro grau. Também foram coletados dados sobre o número de filhos, consangüinidade parental e recorrência de autismo na família.

Após coleta dos dados foi confeccionado o heredograma até a terceira geração anterior e duas posteriores do probando.

Para a investigação de antecedentes familiares psiquiátricos foram consideradas três categorias: distúrbios psiquiátricos definidos, distúrbios psiquiátricos não especificados e sintomas isolados de distúrbios psiquiátricos.

Foram considerados como distúrbios psiquiátricos (DP) aqueles que constam nos critérios do CID 10 e que foram confirmados e acompanhados por um psiquiatra. Entre eles foram incluídos, depressão, alcoolismo, transtorno de humor e transtorno bipolar. Relatos de internações psiquiátricas associadas a alterações de comportamento, sem diagnóstico definido, foram considerados como distúrbios psiquiátricos não especificados (DPNE). Outras queixas isoladas como crises nervosas, tendência ao isolamento, timidez excessiva, também sem diagnóstico psiquiátrico conclusivo, foram considerados sintomas isolados de doença psiquiátrica (SIDP).

Para análise estatística foi utilizado o teste de Fisher para comparar porcentagens encontradas nos dois grupos e qui-quadrado para comparar tabelas independentes. Diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor que 0.05.



Resultados

Os dados estão sumarizados na Tabela 1. Foram obtidas evidências (significância estatística) de que retardo mental e sintomas isolados de doenças psiquiátricas ocorrem mais frequentemente em familiares de autistas, seguidos por convulsão e recorrência da doença. Outras condições, como a presença de síndrome de Down, dificuldade de fala, hiperatividade, distúrbio bipolar e distúrbios psiquiátricos não especificados, apesar de ocorrerem nestas famílias, não mostraram significância nos testes estatísticos.

Foram mais freqüentes entre os familiares de autistas: alcoolismo ($p= 0,011$), depressão ($p= 0,008$), convulsão ($p= 0,002$), sintomas isolados de doenças psiquiátricas ($p= 0,00003$), recorrência ($p= 0,002$), retardo mental ($p= 0,000001$) e distúrbios psiquiátricos não especificados ($p= 0,033$).



Discussão

Este estudo descreve uma freqüência significativamente maior de alterações psiquiátricas, ocorridas antes do nascimento de uma criança autista em seus familiares, considerando irmãos, pais, avós, primos, tios e tias de até 2ª grau, o que corrobora a existência de antecipação genética no autismo.

Estudos anteriores analisaram entre 23 e 698 famílias^{29,30,31}. Embora o número de famílias aqui estudadas possa ser considerado pequeno, o critério de pareamento das variáveis sexo, idade e nível sócio econômico dos probandos – não adotado nos trabalhos previamente descritos, diminui possíveis diferenças entre os grupos e aumenta a confiabilidade nos possíveis resultados.

Trabalhos anteriores já demonstraram a segregação de um *broader phenotype* em parentes de autistas e outras DEA, o que indica vários genes relacionados ao fenótipo autista, como já observado por Rutter¹⁵.

Yirmiya & Shaked²⁷ compararam as freqüências de doenças psiquiátricas entre pais de autistas e de portadores da Síndrome de Down. Os primeiros tiveram mais freqüência de condições psiquiátricas, entretanto, quando estes foram comparados com pais de crianças sem condições médicas associadas, não houve diferença significativa. Micali e colaboradores²⁶ investigaram desordens médicas e condições psiquiátricas nas famílias de crianças com Transtornos Invasivos do Desenvolvimento e encontraram freqüências elevadas principalmente de depressão e de ansiedade nas mães dos portadores.

Desde o primeiro estudo sobre características psiquiátricas dos familiares dos autistas tem se observado um paralelo com os três critérios básicos de diagnóstico do autismo. O primeiro critério é a inabilidade para relações sociais e os parentes de



T. 1551/06

afetados são socialmente mais reservados e têm poucos amigos²⁴. O segundo é a falta ou anormalidade no desenvolvimento da linguagem e estes parentes freqüentemente têm problemas de linguagem ou linguagem pragmática⁴. O terceiro critério é a resistência a mudanças, como mostrado pelos comportamentos repetitivos e baixa gama de interesses, e os parentes de autistas já foram descritos por eles mesmos como inflexíveis nos seus atos, preferências e opiniões¹⁸.

É certo que diferentes mecanismos biológicos estão envolvidos na variação da gravidade dos fenótipos intra e interfamiliares. Isso justifica a dificuldade na conclusão dos diagnósticos que compõem os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento, especialmente das DEA.

Provavelmente há o envolvimento de muitos genes em interação com fatores ambientais, o que justifica a complexidade e heterogeneidade destas doenças. Por outro lado, a determinação de subgrupos e suas características podem dar maior validade aos resultados e diminuir a disparidade encontrada nos estudos de ligação, considerados a melhor ferramenta para estudo da segregação dos genes possivelmente envolvidos³².

A definição do *broader phenotype* deve incluir não só prejuízos nas áreas de comunicação, linguagem e esteriotipias, mas também outras condições psiquiátricas que também são mais freqüentes em famílias de afetados, conforme observado neste estudo.

Outro fator importante é que os estudos de antecipação genética que avaliam a dificuldade social, depressão, ansiedade, entre outros, principalmente materna, devem considerar apenas manifestações que ocorreram antes do nascimento do propósito, pois após o nascimento de uma criança autista, muitas situações difíceis decorrentes

da adaptação da família ao quadro clínico do filho pode resultar em estresse e predispor seus membros à psicopatologias. Torna-se quase impossível reproduzir normas e valores sociais e, conseqüentemente, se manter no mesmo contexto social. A família sente-se, então, frustrada e diminuída frente ao meio, e seus membros refletem as dificuldades com a mudança de seus comportamentos³³. Entretanto, a estratégia de enfrentamento de cada familiar também pode depender do seu genótipo, ou seja, o estresse causado pela criança autista pode desencadear condições psiquiátricas em indivíduos predispostos e representar um fenótipo comportamental mais brando do mesmo espectro^{19,34}.

Alguns autores sugerem, o fenômeno de antecipação genética envolvendo cerca de quatro a dez genes e da epistasia, na expressão do fenótipo comportamental^{18,35}.

Portanto, estudos que definam todas as características da doença, seus mecanismos de predisposição e estimem taxas de risco e definam testes que possam avaliar o estilo cognitivo dos familiares são fundamentais para a compreensão do espectro fenotípico autista^{35,36}.



Conclusões Bibliográficas

Manifestações psiquiátricas são as mais freqüentes em familiares de autistas. A antecipação genética, relacionada à ação de vários genes de efeito aditivo e a participação de fatores ambientais, pode explicar o espectro fenotípico da doença.

2. Seltzer MM, Porten ES. Making and breaking serotonin neurons and autism. *Int J Dev Neurosci*. 2003;21(2-3):307-85.
3. Baker HL. A comparative study of autism spectrum disorder referrals 1987 and 1999. *J Autism Dev Disord*. 2002; Apr;32(7):121-5.
4. Lerner R, Rivett J, Victorin MM, Gayle JO, Lerner GA, Folstein SE. Social language loss in parents of autistic individuals. *Psychol Med*. 1992; v.22(1): 215-216.
5. Lippi J. K. S. Autismo é Transmissão Inerente do Desenvolvimento. *Revista História e Clínica (Mestrado)*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
6. Dattyer MK, Garon S, Nelson JA. A comparison of adaptive, verbal, and motor profiles of psychotic and non-psychotic abnormal children. *J Autism Child Schizophr*. 1972; 2(4):349-77.
7. Cantwell DP, Feller L, Rutter M. Families of autistic and dysphasic children. I. Family life and interaction patterns. *Arch Gen Psychiatry*. 1974; 30(7):682.
8. Oeyan EY, MacMahon S. The incidence of seizures among children with autistic symptoms. *Am J Psychiatry*. 1973; 130(10):1310-2.

Referências Bibliográficas

1. APA (American Psychiatric Association) Diagnostic and Statistical Manual of mental Retardation, 4º edição, Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.
2. Scott MM, Deneris ES. Making and breaking serotonin neurons and autism. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23(2-3):277-85.
3. Baker HC. A comparison study of autism spectrum disorder referrals 1997 and 1989. *J Autism Dev Disord*. 2002 ; Apr;32(2):121-5.
4. Landa, R. Piven J, Wzorek MM, Gayle JO, Chase GA, Folstein SE. Social language use in parents of autistic individuals. *Psychol Med.*, 1992; v.22(1): 245-254.
5. Lippi J. R. S. Autismo e Transtornos Invasivos do Desenvolvimento: Revisão Histórica e Classificação (dissertação) Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.
6. DeMyer MK, Barton S, Norton JA. A comparison of adaptive, verbal, and motor profiles of psychotic and non-psychotic subnormal children. *J Autism Child Schizophr*. 1972; 2(4):359-77.
7. Cantwell DP, Baker L, Rutter M. Families of autistic and dysphasic children. I. Family life and interaction patterns. *Arch Gen Psychiatry*. 1979; 36(6):682.
8. Deykin EY, MacMahon B. The incidence of seizures among children with autistic symptoms. *Am J Psychiatry*. 1979;136(10):1310-2.

9. Hashimoto T, Tayama M, Miyazaki M, Sakurama N, Yoshimoto T, Murakawa K, Kuroda Y. Reduced brainstem size in children with autism. *Brain Dev.* 1992;14(2):94-7.
10. Courchesne E. Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7(2):269-78.
11. Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs *J Child Psychol Psychiatry.* 1977;18(4):297-321.
12. Bailey A; Le Couteur A; Gottesman I; Bolton P; Simonoff E; Yuzda E; Rutter M. Autism as strongly genetic disorder evidence from a British twin study. *Psychol Med.* 1995;25(1):63-77.
13. Le Couteur A, Bailey A, Goode S, Pickles A, Robertson S, Gottesman I, Rutter M. A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. *J Child Psychol Psychiatry.* 1996;37(7):785-801.
14. Pallarés JA., Gabau-Vila E., Guitart-Feliubadaló M. El autismo síndrome: II. Síndromes de base genética asociados a autismo. *Rev Neurol.* 2005; 40 (Supl1): S151-62.
15. Rutter M. Autism research: lessons from the past and prospects for the future. *J Autism Dev Disord.* 2005;35(2):241-57
16. Ruiz-Opazo N, Tonkiss J. Genome-wide scan for quantitative trait loci influencing spatial navigation and social recognition memory in Dahl rats. *Physiol Genomics.* 2006; 6(2):145-51.
17. Ritvo ER, Freeman BJ, Pingree C, Mason-Brothers A, Jorde L, Jenson WR, McMahon WM, Petersen PB, Mo A, Ritvo A. 1The UCLA-University of Utah

- epidemiologic survey of autism: prevalence *Am J Psychiatry*. 1989 Feb;146(2):194-9.
18. Piven, J., Palmer P, Jacobi D, Childress D, Arndt S. Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. *Am. J. Psychiat.*, 1997; 154:185-190.
19. Bradford, Y., Haines J, Hutcheson H, Gardiner M, Braun T, Sheffield V, Cassavant T, Huang W, Wang K, Vieland V, Folstein S, Santangelo S, Piven J. Incorporating language phenotypes strengthens evidence of linkage to autism. *Am. J. Medical Genetics*. 2001;105:539-547.
20. Veenstra-Vanderweele J, Christian SL, Cook EH Jr. Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:379-405.
21. Gottesman II, Hanson DR. Human development: biological and genetic processes. *Annu Rev Psychol*. 2005;56:263-86.
22. Bailey, A., Palferman S, Heavey L, Le Couteur A. Autism: the phenotype in relatives. *J. Autism Dev. Disorders* 1998; 8(5):369-392.
23. Folstein SE, Santangelo SL, Gilman SE, Piven J, Landa R, Lainhart J, Hein J, Wzorek M. Predictors of cognitive test patterns in autism families. *J Child Psychol Psychiatry*. 1999 ;40(7):1117-28
24. Piven,J.; Wzorek,M.; Landa, R.; Lainhart, J.; Bolton, D.; Chase, G. A.; Folstein,S. Personality characteristics of the parents of autistic individuals. *Psychol. Med*. 1994;24(3):783-795.
25. Giunco, CT. Estudo Genético-Clinico e Citogenética Molecular das Regiões 7q31-q33 e 15q11-q13 em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento 2002.Dissertação. Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto.

26. Micali N, Chakrabarti S, Fombonne E. The broad autism phenotype: findings from an epidemiological survey. *Autism*. 2004;8(1):21-23.
27. Yirmiya N, Shaked M. Psychiatric disorders in parents of children with autism: a meta-analysis *J Child Psychol Psychiatry*. 2005; 46(1):69-83.
28. CID 10. *Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID 10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas*. Coord. Organiz. Mundial da Saúde; Trad. Dorgival Caetano, Porto Alegre, Artes Médicas, 1994.
29. Constantino JN, Lajonchere C, Lutz M, Gray T, Abbacchi A, McKenna K, Singh D, Todd RD. Autistic social impairment in the siblings of children with pervasive developmental disorders. *Am J Psychiatry*. 2006 Feb;163(2):294-6.
30. Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, Schendel D, Thorsen P, Mortensen PB. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status *Am J Epidemiol*. 2005;161(10):916-25.
31. Bishop DV., Maybery M, Maley A., Wong D., Hill W., Hallmayer J. Using self-report to identify the broad phenotype in parents of children with autistic spectrum disorders: a study the Autism-Spectrum Quotient. *J Child Psychol Psychiatry*. 2004; 45(8):1431-6.
32. Sahoo T, Shaw CA, Young AS, Whitehouse NL, Schroer RJ, Stevenson RE, Beaudet AL. Array-based comparative genomic hybridization analysis of recurrent chromosome 15q rearrangements. *Am J Med Genet* . 2005;139(2):106-13.
33. Sprovieri MH, Assumpcao FB Jr. Family dynamics of autistic children *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(2-A):230-7.

34. Szatmari, P., et al. The familial aggregation of the lessser variant in biological and nonbiological relatives of PDD probands: a family history study. *J. Chil. Psychol. Psychiat*, 2000; 41(5): 579-586.

35. Pickles, A., Bolton P, Macdonald H, Bailey A, Le Couteur A, Sim CH, Rutter M. Latent-class analysis of recurrence risk for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. *Am. J. Med. Genet.* 1995;57: 717-726.

36. Happé, F. Briskman, J. Frith,. Exploring the Cognitive Phenotype of Autism: Weak "Central Coherence" in Parents and Siblings of Children with Autism: I Experimental Test . *J. Child Psychol. Psychiat. U.* 2001;42(3): 299-307.

* = estatisticamente significativo



Tabela 1. Condições psiquiátricas encontradas em familiares de portadores de autismo

	Autismo(n=71)		Controle(n=71)		p
	N	%	N	%	
Alcoolismo					
Não	43	30,28	57	40,14	0.011*
Sim	27	19,01	14	9,86	
Depressão					
Não	37	26,06	51	35,92	0.008*
Sim	34	23,94	20	14,08	
Convulsão					
Não	53	37,32	66	46,48	0.002*
Sim	18	12,68	5	3,52	
Dm					
Não	61	42,96	66	46,48	0.078
Sim	10	7,04	5	3,52	
Síndrome de Down					
Não	68	47,89	70	49,30	0.31
Sim	3	2,11	1	0,70	
Sintomas Isolados					
Não	52	36,62	69	48,59	0.00003*
Sim	19	13,38	2	1,41	
Dificuldade de Fala					
Não	69	48,59	66	46,48	0.09
Sim	2	1,41	5	3,52	
Hiperatividade					
Não	70	49,30	71	50,00	0.067
Sim	1	0,70	0	0,00	
Recorrência					
Não	64	45,07	71	50,00	0.002*
Sim	7	4,93	0	0,00	
Retardo Mental					
Não	50	35,21	71	50,00	0.000001*
Sim	21	14,79	0	0,00	
Distúbio Bipolar					
Não	68	47,89	70	49,30	1
Sim	2	1,41	1	0,70	
Distúrbios psiquiátricos não especificados					
Não	35	0,00	47	33,10	0.033*
Sim	35	0,00	24	16,90	

* = estatisticamente significativa

Características Físicas De Pacientes Autistas

Carina Tatiana Glunco¹, Agnês Cristina Fett-Conte²

- 1. Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil
- 2. Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARMEX), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondências:

Carina Tatiana Glunco
End. Av. Parque Belvedere, 505 - Barcelona casa 88
Parque Belvedere - São José do Rio Preto- SP - Brasil
16057-460
Email: carinaglunco@unirp.br

A ser submetido para: *Pediatrics Digital Journal of The American Academy of Pediatrics*

Capítulo VII Características Físicas de Pacientes Autistas

Resumo

Características Físicas De Pacientes Autistas

Carina Tatiana Giunco ¹, Agnes Cristina Fett-Conte²

1. Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil
2. Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondências:

Carina Tatiana Giunco
End. Av. Parque Belvedere, 505- Barcelona casa 85
Parque Belvedere - São José do Rio Preto- SP - Brasil
15057-460
Email: carinagiunco@unip.br

A ser submetido para Pediatrics- Oficial Journal OF The American Academy of Pediatrics



Resumo

O autismo é uma síndrome comportamental que já foi relacionada com alguns sinais dismorfológicos sugestivos de alterações no desenvolvimento fetal. Este estudo analisou a frequência de malformações físicas menores e maiores e medidas antropométricas de 71 indivíduos autistas e de 71 indivíduos saudáveis não autistas, pareados por sexo, idade e classe social. Os resultados mostraram frequências significativamente maiores de alterações físicas entre os autistas, o que corrobora dados previamente descritos. Os resultados podem oferecer subsídios para o entendimento da ação de fatores ambientais e genéticos envolvidos na alteração da embriogênese que culmina no fenótipo comportamental autístico.

Malformações físicas menores e maiores foram encontradas em crianças com diagnóstico de autismo desde os anos 30, quando Segal e Rapoport¹, avaliaram um grupo de 100 crianças, entre as 28 com "características autistas", que mostraram um número maior destas anomalias quando comparadas com um grupo controle saudável.

Em 1977, Walker² estudou 74 crianças pareadas por sexo e idade com um grupo controle e encontrou 10 vezes de malformações físicas menores e maiores, incluindo anomalias da face, do sistema digestivo, do sistema urinário, do sistema respiratório, do sistema circulatório e do sistema musculoesquelético.

Introdução

O autismo tem sido definido como uma condição sistêmica geneticamente influenciada por fatores ambientais e que afeta o desenvolvimento cerebral¹. A literatura demonstra uma incidência de cerca de 10-30% de associação com epilepsia, 75% com retardo mental uma pequena porcentagem de alterações de estruturas cerebrais². Esses endofenótipos seriam marcadores para o estudo das etapas do desenvolvimento embrionário ou fetal relacionadas com o aparecimento do fenótipo autista.

Em função da variabilidade fenotípica do autista, alguns autores sugeriram subgrupos com características comuns, que provavelmente compartilham do mesmo “defeito primário”. Esses subgrupos têm sido formados com base em alterações genéticas específicas, condições psiquiátricas e distúrbios metabólicos associados e na presença de malformações físicas³.

Malformações físicas menores têm sido descritas em crianças com diagnóstico de autismo desde os anos 70, quando Steg & Rapoport⁴, analisaram um grupo de 108 meninos, entre eles 28 com “condições autistas”, que mostraram um número maior destas anomalias quando comparados com um grupo controle saudável.

Em 1977, Walker⁵ estudou 74 crianças pareadas por sexo e idade com um grupo controle e encontrou 16 tipos de malformações mais freqüentes nas crianças autistas, com destaque para implantação baixa das orelhas, hipertelorismo e sindactilia.

Caso Em 1978, Campbell⁶ examinou três grupos de crianças quanto à presença de anomalias físicas menores e demonstrou a presença de anomalias desviantes entre autistas, que poderiam estar relacionadas com alterações no desenvolvimento de sistema nervoso central em alguns indivíduos.

Na década de 80, alguns autores sugeriram associações das malformações com complicações na gravidez⁷, mas sem relação com a idade materna⁸ e outros referiram que estas malformações são mais freqüentes em crianças hiperativas e esquizofrênicas sugerindo influência genética ou exposição tóxica em períodos precoces da vida intrauterina⁹.

Nos anos 90, continuou a tentativa de caracterizar um padrão de malformações reconhecíveis em autismo e Rodier¹⁰ e colaboradores comparam autistas com um grupo controle de crianças saudáveis e observaram a rotação posterior do pavilhão auricular como a anormalidade mais freqüentemente encontrada em autistas, entre outras. A macrocefalia está presente em 45% das crianças autistas e está relacionada com uma menor severidade do quadro, mas não está presente desde o nascimento, e seria o resultado do aumento da taxa de crescimento cefálico nos primeiros meses de vida¹¹.

Estudos posteriores mostraram ainda outros sinais clínicos fortemente associados à condição autística¹².

Este trabalho investigou medidas físicas e a presença de malformações físicas menores em autistas.

Casuística

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FAMERP), foram estudadas 71 crianças autistas segundo os critérios do DSM-IV¹³, diagnosticados por equipe multidisciplinar especializada, 11 do sexo feminino e 60 do sexo masculino provenientes de duas escolas das cidades de São José do Rio Preto e Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil, especializadas em atendimento de indivíduos com Transtornos Invasivos do Desenvolvimento.

Na constituição da casuística não foram incluídos outros casos de Transtornos Invasivos do Desenvolvimento ou psicoses infantis. Aqueles que no exame físico tiveram sinais clínicos sugestivos de outras síndromes associadas também foram excluídos da amostra. Todos os indivíduos realizaram exame do cariótipo e os do sexo masculino realizaram o exame para detectar a presença de Síndrome do Cromossomo X Frágil. Nenhum resultado positivo foi encontrado. No total, foram excluídos seis casos, dois com Esclerose Tuberosa, um com Cornélia de Lange, um com Blefarofimose, um com suspeita de Síndrome de Williams e um com Síndrome Alcoólica Fetal.

Metodologia

A coleta de dados foi realizada no Ambulatório de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP ou na instituição de origem. Foi utilizado um protocolo padrão especialmente elaborado para esse projeto contendo dados de identificação, antecedentes gestacionais, pessoais, familiares, heredograma e exame físico. As informações foram fornecidas pelos familiares que relataram

sobre gravidez, possíveis complicações obstétricas, intercorrências ao nascimento e desenvolvimento neuro-psicomotor da criança. Foram consideradas como intercorrências ou complicações, o parto prematuro, necessidade de incubadora, cianose, necessidade de oxigenoterapia, transfusão sanguínea, anóxia neonatal, uso de fórceps, convulsões e parada cardio-respiratória, entre outros.

Foram tomadas as medidas antropométricas de cada paciente incluindo peso, altura, perímetro cefálico, perímetro torácico, distância intercantal interna, comprimento do dedo médio das mãos, mãos e pés. Esses dados foram cruzados com a idade de cada portador e localizado o percentil de desenvolvimento para cada variável, baseado em Jones¹⁴. O exame físico e a observação de malformações físicas menores foram realizados por profissional qualificado incluindo geneticista e seguiu a ordem de exame físico céfalo-caudal. Todos os pacientes foram fotografados em vista frontal e lateral.

Para comparação dos dados foi estabelecido um grupo controle pareado por sexo, idade e nível sócio econômico, de indivíduos saudáveis da população de São José do Rio Preto. Para estabelecimento das classes sociais foi utilizado o critério de Lombardi¹⁵.

Para análise estatística foi utilizado o teste de Fisher para comparar porcentagens encontradas nos dois grupos e qui-quadrado para comparar tabelas independentes. Diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor que 0.05.

Resultados

Os resultados estão apresentados sumarizados em tabelas. A Tabela 1 mostra os sinais dismorfológicos encontrados nos dois grupos estudados, autistas e controles com suas respectivas frequências e valores de significância, partindo da hipótese nula. Para cada item avaliado, correspondente a uma parte de corpo, foi colocado o sinal dismorfológico mais frequentemente encontrado. Os autistas apresentaram significativamente mais sinais clínicos dismorfológicos de maneira geral e as frequências de cada sinal em autistas foram significativamente maior do que nos controles, exceto quanto ao prognatismo, alterações torácicas e alterações de coluna em geral.

A Tabela 2 mostra as medidas antropométricas dos autistas e seus controles pareados, em percentis, realizado pelo cruzamento da idade com a medida obtida. Os autistas foram significativamente mais baixos, apresentaram perímetro cefálico maior e aumento da distância intercantal interna em relação ao seu par.

O número de sinais clínicos dismórficos encontrados nos grupos estudados, por indivíduo, estão dispostos no Gráfico 1. Autistas apresentaram um número maior de malformações por indivíduo.

Quanto à complicações obstétricas, estas foram significativamente mais frequentes em autistas ($p=0,00000000008$). As demais características não diferiram estatisticamente entre os grupos.

Não houve influência do gênero na frequência de malformações e em 5,6% dos casos apresentaram outro autista na família.

Discussão

Aproximadamente 5-10% das crianças com autismo são diagnosticadas como tendo autismo secundário, ou seja, relacionado a alguma alteração genética ou condição clínica associada. O restante (90-95%) tem o chamado autismo idiopático e cerca de 30% destes apresentam o “autismo complexo”, isto é, com sinais clínicos dismorfológicos, associados a micro/macrocefalia e/ou alterações da estrutura cerebral. Os casos que não apresentam dismorfologias são chamados de “autismo essencial”¹⁶. Todas as crianças estudadas apresentaram autismo idiopático, pois aquelas com doenças associadas foram excluídas.

O autismo complexo indica alguma alteração na morfogênese precoce e esta associado a um prognóstico pobre, uma taxa menor da distribuição proporcional masculino-feminina, e risco menor de recorrência entre irmãos¹⁷. Este revelou que o autismo complexo parece ser mais freqüente na população do que tem sido estimado, em função do elevado número de indivíduos com sinais clínicos dismórficos, em relação a indivíduos saudáveis.

Segundo Miles & Hillman¹⁸, dismorfologias significantes são encontradas em 25% dos autistas. Embora os critérios diagnósticos não incluam sinal dismorfológicos, sistema ou região cerebral alterada, há evidências de que a doença se origina de injúrias no período do fechamento do tubo neural, que estariam relacionadas a alterações principalmente de crânio e face e se constituiriam em um subgrupo de autismo.

Talvez o fenótipo do autismo complexo ocorra mais por uma influência ambiental do que genética, diferentemente dos casos de autismo essencial. A isso chama-se modelo de disfunção adaptativa, que implica em alterações no desenvolvimento inicial do cérebro como um passo determinante do qual dependeriam os futuros¹⁹. Os proponentes deste modelo acreditam que essas perturbações do desenvolvimento são limitadas ao início do desenvolvimento e não são contínuas, e que essas anormalidades não são necessariamente a causa da falha adaptativa, mas aumentariam a vulnerabilidade para disfunções futuras²⁰.

Realmente, os dados demonstram que alterações de crânio e face são as mais comumente encontradas na população autista, como presença de macrocefalia e microcefalia^{21,22}, que também mostraram freqüências maiores e significativas neste estudo. Quanto às alterações de face, orelha e olhos estas também são mais freqüentes em autistas e em outros transtornos invasivos do desenvolvimento²³. Entre os sinais mais freqüentes relatados, a orelha rotada para trás é a mais encontrada e também são referidas de implantação baixa e dismórficas²³, de acordo com o que foi observado neste estudo.

Por outro lado, neste e em outros estudos morfológicos, diversas outras alterações físicas também são identificadas, o que mostra o comprometimento de outros locais, além do SNC, e que, portanto, essa pode ser uma síndrome com anormalidade físicas menores. Em estudo anterior, Giunco¹⁹, mostrou freqüências elevadas de malformações físicas menores em uma população de 48 indivíduos portadores de outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID), além do

autismo. Uma vez que esta casuística foi composta apenas por indivíduos com diagnóstico de autismo, que apresentaram freqüências elevadas de sinais dismorfológicos em boca, maxilar, pescoço, coluna, abdômen, genitais, musculatura e pele, pode ser sugerido que o autista tem mais sinais dismorfológicos que os portadores de outros transtornos invasivos.

Baseado em um sistema de classificação que considera a dismorfologia importante quando se tem seis ou mais sinais, incluindo anomalias menores e medidas antropométricas¹⁷, pode-se considerar que 25% da casuística corresponde a esse modelo. Outras hipóteses testadas, como a relação de sinais clínicos e sexo, e relação com a idade parental, não mostraram consistência neste estudo. Houve sim, uma freqüência significativamente maior de complicações obstétricas entre os autistas.

Estudos anteriores demonstraram que uma ou mais complicações obstétricas estão relacionadas com o aumento do risco para autismo, e não há consenso de que isso seja consequência ou causa¹.

Embora o método de entrevista tenha suas restrições, os resultados deste trabalho mostraram concordância com dados da literatura, inclusive com os dados dos trabalhos que utilizaram bases de dados sistemáticos, como o de Larsson²⁵, que realizou um estudo prospectivo com uma grande população obtida do Danish Psychiatric Central Register. Além disso, o critério de pareamento com o grupo controle, que foi adotado aqui aproxima as populações e diminui as possíveis variantes interferentes. Portanto, características clínicas dismórficas, maiores ou menores, são mais freqüentes em autistas.

Referências Bibliográficas

1. Herbert MR, Russo JP, Yang S, Roohi J, Blaxill M, Kahler SG, Cremer L, Hatchwell E. Autism and environmental genomics. *Neurotoxicology*. 2006 Mar 28.
2. Smalley SL. Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet*. 1997 Jun;60(6):1276-82.
3. Verte S, Geurts HM, Roeyers H, Rosseel Y, Oosterlaan J, Sergeant JA. Can the Children's Communication Checklist differentiate autism spectrum subtypes? *Autism*. 2006;10(3):266-87.
4. Steg JP, Rapoport JL. Minor physical anomalies in normal, neurotic, learning disabled, and severely disturbed children. *J Autism Child Schizophr*. 1975;5(4):299-307.
5. Walker HA. Incidence of minor physical anomaly in autism. *J Austim Child Schizophr* 1997; 7(2): 165-76.
6. Campbell M, Geller B, Samll AM, Petti TA, Ferri SH. Minor Physical anomalies in young psychotic children *Am j Psychiatry*. 1978; 135(5): 573-5.
7. Links PS. Minor physical anomalies in childhood autism. Part II. Their relationship to maternal age. *J Autism Dev Disord*. 1980 Sep;10(3):287-92.
8. Links PS, Stockwell M, Abichandani F, Simeon J. Minor physical anomalies in childhood autism. Part I. Their relationship to pre- and perinatal complications. *J Autism Dev Disord*. 1980;10(3):273-85.

9. Gualtieri CT, Adams A, Shen CD, Loiselle D. Minor physical anomalies in alcoholic and schizophrenic adults and hyperactive and autistic children. *Am J Psychiatry*. 1982;139(5):640-3.
10. Rodier, P.M.; Bryson, S.E.; Welch, J.P. Minor malformations and physical measurements in Autism: data from Nova Scotia. *Teratology*, 1997; 55:319-325.
11. Lainhart JE, Piven J, Wzorek M, Landa R, Santangelo SL, Coon H, Folstein SE. Macrocephaly in children and adults with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997 Feb;36(2):282-90.
12. Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2005 Apr-May;23(2-3):189-99.
13. CID 10. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID 10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Coor. Organiz. Mundial da Saúde; Trad. Dorgival Caetano, Porto Alegre, Artes Médicas, 1994.
14. LOMBARDI, C., Lombardi Cintia, Bronfman Mario, Facchini Luiz A., Victora Cesar G., Barros Fernando C., Béria Jorge U. Operacionalização do conceito de classe social em estudos epidemiológicos. *Rev. Saúde Publ.* 1988; 22(4): 253-265.
15. JONES, K.L. Padrões reconhecíveis de malformações congênitas. São Paulo. Editora Manole, 1998.
16. Miles JH, Hillman RE. Value of a clinical morphology examination in autism. *Am J Med Genet*. 2000 Apr 10;91(4):245-53

17. Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE.. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A*. 2005;135(2):171-80
18. Miles JH, Hadden LL, Takahashi TN, Hillman RE. Head circumference is an independent clinical finding associated with autism. *Am J Med Genet*. 2000; 95(4):339-50.
19. Lord C, Wagner A, Rogers S, Szatmari P, Aman M, Charman T, Dawson G, Durand VM, Grossman L, Guthrie D, Harris S, Kasari C, Marcus L, Murphy S, Odom S, Pickles A, Scahill L, Shaw E, Siegel B, Sigman M, Stone W, Smith T, Yoder P. Challenges in evaluating psychosocial interventions for Autistic Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*. 2005 Dec;35(6):695-708.
20. Lewis MH. Environmental complexity and central nervous system development and function. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2004;10(2):91 5.
21. DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci*. 2006 ;26(26):6897-906.
22. Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic determination of childhood developmental delay. *Brain Dev*. 2001 Jul;23(4):228-35.
23. McCaffery P, Deutsch CK. Macrocephaly and the control of brain growth in autistic disorders. *Prog Neurobiol*. 2005;77(1-2):38-56.

24. Giunco, CT. Estudo Genético-Clinico e Citogenética Molecular das Regiões 7q31-q33 e 15q11-q13 em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento 2002
Dissertação. Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto.
25. Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, Schendel D, Thorsen P, Mortensen PB. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status *Am J Epidemiol.* 2005;161(10):916-25.

Tabela 1. Continuação

Tabela 1. Frequência de sinais dismorfológicos encontrados nos dois grupos, por região do corpo.

Sinais dismorfológicos	Autismo(n=71)		Controle(n=71)		p
	N	%	N	%	
CRANIO					
A	16	11,27	51	35,92	0,015*
P	55	38,73	20	14,08	
ORELHA EXTERNA					
A	27	19,01	46	32,39	0.0009*
P	44	30,99	25	17,61	
Rotadas para baixo					
A	27	19,01	66	49,03	0,000005*
P	44	30,99	5	0,70	
Implantação baixa					
A	62	43,66	68	95,7	0,01*
P	9	6,34	5	4,3	
OLHOS					
A	10	7,04	27	19,01	0.0004*
P	61	42,96	44	30,99	
Hipertelorismo					
A	52	36,62	70	49,30	0.00002*
P	19	13,38	1	0,70	
Microftalmia					
A	62	43,66	71	50,00	0.0008*
P	9	6,34	0	0,00	
Fenda palpebral obliqua para baixo					
A	64	43,66	71	50,00	0.002*
P	7	6,34	0	0,00	
NARIZ					
A	27	19,01	41	28,87	0.008*
P	44	30,99	30	21,13	
Filtrum Naso-Labial Curto					
A	67	47,18	71	50,00	0.01*
P	4	2,82	0	0,00	
Ponte Nasal Alta					
A	63	44,37	71	50,00	0,001*
P	8	2,83	0	0,00	
BOCA					
A	35	24,65	47	33,10	0.01*
P	36	25,35	24	16,90	

Continua

Tabela 1. Continuação

Palato estreito					
A	67	47,18	71	50,00	
P	4	2,82	0	0,00	0.01*
Problemas. Ortodonticos.					
A	67	47,18	71	50,00	
P	4	2,82	0	0,00	0.01*
MAXILAR					
A	40	28,17	54	38,03	
P	31	21,83	17	11,97	0.008*
Prognatia					
A	60	42,25	66	46,48	
P	11	7,75	5	3,52	0.2
Macrognatia					
A	64	45,07	66	49,03	
P	7	4,93	5	0,70	0,004*
PESCOÇO					
A	58	40,85	71	50,00	
P	13	9,15	0	0,00	0.00009*
TÓRAX					
A	44	30,99	49	34,51	
P	27	19,01	22	15,49	0.4*
COLUNA					
A	60	42,25	66	46,48	
P	11	7,75	5	3,52	0.05
Cifose					
A	66	46,48	71	50,00	
P	5	3,52	0	0,00	0.007*
ABDOMEN					
A	62	43,66	70	49,30	
P	9	6,34	1	0,70	0.004*
GENITAIS					
A	58	40,85	71	49,30	
P	13	9,15	0	0,70	0.0004*
Macrogenitalismo					
A	64	45,07	70	49,30	
P	7	4,93	1	0,70	0.0008*
Criptorquidia					
A	68	47,89	71	50,00	
P	3	2,11	0	0,00	0.02*

Continua

Tabela 1. Continuação

SISTEMA MUSCULAR					
A	59	41,55	68	47,89	
P	12	8,45	3	2,11	0.004*
Hipotônia					
A	61	42,96	71	50,00	
P	10	7,04	0	0,00	0,0005*
PELE					
A	56	39,44	65	45,77	
P	15	10,56	6	4,23	0.015*
Displasia Ungueal					
A	69	48,59	71	50,00	
P	2	1,41	0	0	0.041*
Acne					
A	65	45,77	71	50,00	
P	6	4,23	0	0	0.004*

A= ausência de alteração; P= presença de alteração; *= estatisticamente significante

Tabela 2. Medidas antropométricas dos autistas e controles de acordo com cada percentil.

Medidas	Autismo(n=71)		N	Controle(n=71)		p
	N	%		%	95%-IC	
Peso						
>3	14	9,86	9	6,34		
3 - 25	14	9,86	15	10,56		
25 - 50	7	4,93	3	2,11		
50	3	2,11	11	7,75		
50 - 75	9	6,34	10	7,04		
75 - 97	9	6,34	14	9,86		
97	15	10,56	9	6,34	441, 40	0,1
Altura						
>3	13	9,15	11	7,75		
3 - 25	15	10,56	13	9,15		
25 - 50	9	6,34	11	7,75		
50	8	5,63	7	4,93		
50 - 75	10	7,04	8	5,63		
75 - 97	12	8,45	16	11,27		
97	4	2,82	5	3,52	-2.54, -0.075	0.038*
Perímetro Cefálico						
-2DP	5	3,52	1	0,70		
-2DP - 50	6	4,23	19	13,38		
50	5	3,52	8	5,63		
50 - +2DP	26	18,31	28	19,72		
+2DP	27	19,01	15	10,56	0.069, 0.889	0.023*
Perímetro Torácico						
>3	1	0,70	0	0,00		
3 - 25	9	6,34	14	9,86		
25 - 50	14	9,86	7	4,93		
50	3	2,11	4	2,82		
50 - 75	5	3,52	21	14,79		
75 - 97	11	7,75	12	8,45		
97	28	19,72	13	9,15	-0.29, 1.047	0.259
Distância Intercantal Interna						
>3	4	2,82	2	1,41		
3 - 25	7	4,93	4	2,82		
25 - 50	5	3,52	26	18,31		
50	7	4,93	15	10,56		
50 - 75	11	7,75	4	2,82		
75 - 97	18	12,68	15	10,56		
97	19	13,38	5	3,52	0.297, 1.506	0,004*

continua

Mão Direita					
>3	11	7,75	2	1,41	
3 - 25	7	4,93	7	4,93	
25 - 50	15	10,56	12	8,45	
50	8	5,63	8	5,63	
50 - 75	7	4,93	13	9,15	
75 - 97	9	6,34	18	12,68	
97	14	9,86	11	7,75	-1.29, 0.019 0,057
Mão Esquerda					
>3	12	8,45	2	1,41	
3 - 25	6	4,23	13	9,15	
25 - 50	14	9,86	10	7,04	
50	7	4,93	8	5,63	
50 - 75	9	6,34	9	6,34	
75 - 97	9	6,34	21	14,79	
97	14	9,86	8	5,63	-1.02, 0.285 0,266
Pé Direito					
>3	10	7,042	16	11,27	
3 - 25	13	9,155	14	9,86	
25 - 50	11	7,746	3	2,11	
50	10	7,042	16	11,27	
50 - 75	7	4,930	9	6,34	
75 - 97	12	8,451	10	7,04	
97	8	5,634	3	2,11	-0.26, 1.083 0,232
Pé Esquerdo					
>3	10	7,042	13	9,15	
3 - 25	16	11,268	16	11,27	
25 - 50	8	5,634	3	2,11	
50	12	8,451	15	10,56	
50 - 75	6	4,225	10	7,04	
75 - 97	11	7,746	10	7,04	
97	8	5,634	4	2,82	-0.50, 0.895 0,575

IC=intervalo de confiança

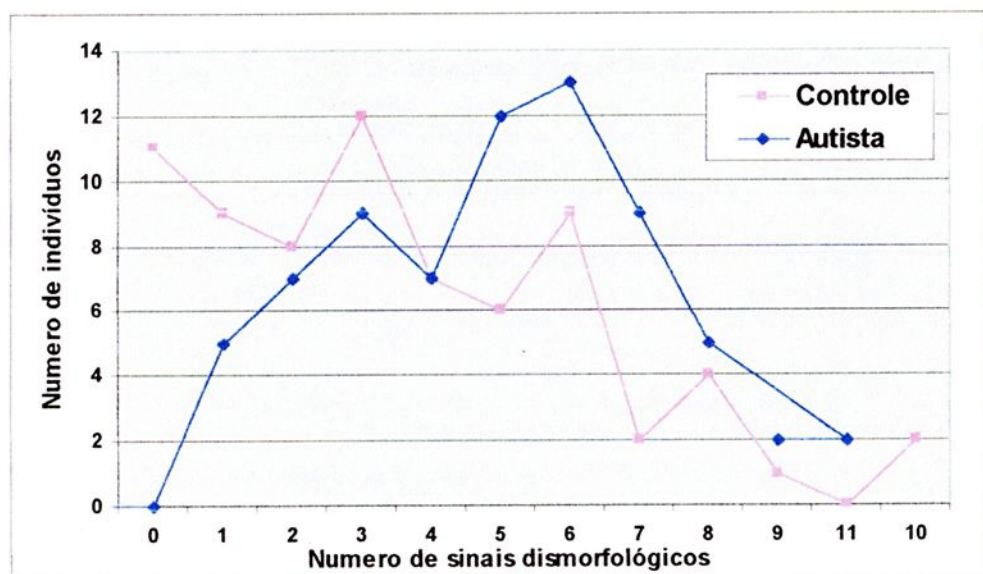


Gráfico 1. Total de sinais dismorfológicos por indivíduo, encontrados nos dois grupos

Considerações Finais

Este trabalho investiga os aspectos do desenvolvimento da linguagem em crianças com síndrome de Down, mas a linguagem é um fenômeno complexo e heterogêneo.

Malformações físicas maiores ou menores (dismorfologias) são encontradas em 25% dos autistas. Embora os critérios diagnósticos de autismo não incluam sinais clínicos específicos, há uma tendência a considerar as alterações físicas que alguns casos de doença se originam no período embrionário, que se acentua no início do desenvolvimento da linguagem. Isso sugere a possibilidade de uma relação entre as alterações físicas e a linguagem. (MILLER & MILLER, 2000). Talvez o tempo entre a ocorrência da dismorfologia e o início da linguagem seja mais curto em crianças com alterações físicas. A linguagem é um fenômeno complexo e heterogêneo, que implica em alterações no desenvolvimento do cérebro como um todo, o que pode ser observado em casos de autismo (LEWIS, 2004). Assim, os resultados de pesquisas sobre o desenvolvimento do cérebro e o desenvolvimento da linguagem são limitados no início do desenvolvimento e não são conclusivos. Portanto, há a necessidade de pesquisas mais abrangentes e não apenas sobre a linguagem, mas também sobre o desenvolvimento do cérebro e a linguagem.

Os dados da literatura sobre a hipótese de que alterações no desenvolvimento da linguagem são mais comuns em crianças com alterações físicas são mais consistentes em crianças com alterações físicas maiores ou menores (DICKSON & MILLER, 2000; SHEVELL et al., 2001). Os dados da presente pesquisa são semelhantes aos dados da literatura sobre a hipótese de que alterações no desenvolvimento da linguagem são mais comuns em crianças com alterações físicas maiores ou menores.

Considerações Finais

Considerações Finais

Este trabalho investigou abordagens do autismo, um distúrbio freqüente na população, mas do qual a fisiopatologia é pouco conhecida e a etiologia heterogênea e complexa.

Malformações físicas maiores ou menores (dismorfologias) são encontradas em 25% dos autistas. Embora os critérios diagnósticos de autismo não incluam sinais clínicos dismórficos, sistema ou região cerebral alterada, há evidências de que alguns casos da doença se originam de injúrias no período embrionário, que estariam relacionadas a alterações principalmente de crânio e face e se constituiriam em um subgrupo de autismo (MILES & HILLMAN, 2000). Talvez o fenótipo autista com dismorfologia ocorra mais por influência ambiental do que genética. A isso chama-se modelo de disfunção adaptativa, que implica em alterações no desenvolvimento inicial do cérebro como um passo determinante do qual dependeriam os futuros (LEWIS, 2004), ou seja, essas perturbações do desenvolvimento são limitadas ao início do desenvolvimento e não são contínuas e não são necessariamente a causa da falha adaptativa, mas aumentam a vulnerabilidade para disfunções futuras (LORD et al., 2005).

Os dados da literatura reforçam esta hipótese uma vez que alterações de crânio e face são as mais comumente encontradas em autistas, incluindo macrocefalia e microcefalia (DICICCO-BLOO et al., 2006, SHEVELL et al., 2001) e orelhas rotadas pra trás. Os dados do presente estudo forma semelhantes dos previamente descritos pois, as freqüências de alterações de face, orelha e olhos

foram as mais elevadas e diferiram estatisticamente das observadas no grupo controle.

Também neste e em outros estudos morfológicos, várias outras alterações físicas também foram identificadas, com comprometimento de outros locais além do SNC, que pode sugerir uma síndrome com anormalidades físicas menores.

Baseado em um sistema de classificação que considera a dismorfologia importante quando se tem seis ou mais sinais, incluindo anomalias menores e medidas antropométricas (MCAFFERY, 2005), pode-se considerar que 25% da casuística está nessa classificação. Não foram observadas relações entre sinais clínicos e sexo, ou idade parental na casuística estudada, mas a frequência de complicações obstétricas entre os autistas foram significativamente maior. Estudos anteriores mostraram que uma ou mais complicações obstétricas estão relacionadas com o aumento do risco para autismo e não há consenso de que isso seja consequência ou causa.

Os resultados deste trabalho mostraram concordância com dados da literatura, inclusive com os dados dos trabalhos que utilizaram bases de dados sistemáticos, como o de Larsson et al, 2005, que realizou um estudo prospectivo com uma grande população obtida do Danish Psychiatric Central Register. Além disso, o critério de pareamento com o grupo controle, adotado aqui aproxima as populações e diminui as possíveis variantes interferentes. Portanto, características clínicas dismórficas, maiores ou menores, são mais frequentes em autistas.

Foram identificadas outras manifestações psiquiátricas de parentes de autistas em frequências significativamente maiores (pais, irmãos, avós, primos, tios e tias de até 2ª grau), o que corrobora a existência do fenômeno de

antecipação genética em autismo. Trabalhos anteriores já demonstraram a segregação de um *broader phenotype* em parentes de autistas e outras DEA, o que indica a participação de vários genes relacionados ao fenótipo autista, como já observado por Rutter, 2005. É provável que mecanismos biológicos diferentes estejam envolvidos na variação intra e interfamiliares dos fenótipos. Provavelmente há o envolvimento de muitos genes em interação com fatores ambientais, o que explicaria a complexidade, heterogeneidade e a dificuldade de conclusão diagnóstica das doenças. Por outro lado, a determinação de subgrupos e suas características podem dar maior validade aos resultados e diminuir a disparidade encontrada nos estudos de ligação, considerados a melhor ferramenta para estudo da segregação dos genes possivelmente envolvidos.

A definição do *broader phenotype* deve incluir não só prejuízos nas áreas de comunicação, linguagem e estereotípias, mas também outras condições psiquiátricas que também são mais frequentes em famílias de afetados, conforme observado neste estudo.

Outro fator importante é que os estudos de antecipação genética que avaliam a dificuldade social, depressão, ansiedade, entre outros, principalmente materna, devem considerar apenas manifestações que ocorreram antes do nascimento do propósito, pois após o nascimento de uma criança autista, muitas situações difíceis decorrentes da adaptação da família ao quadro clínico do filho podem resultar em estresse e predispor seus membros à psicopatias. Entretanto, a estratégia de enfrentamento de cada familiar também pode depender do seu genótipo, ou seja, o estresse causado pela criança autista pode desencadear condições psiquiátricas em indivíduos predispostos o que representaria um

fenótipo comportamental mais brando do mesmo espectro (BRADFORD et al., 2001).

Não foram encontradas alterações cariotípicas ou comorbidade com a Síndrome do X Frágil entre os portadores de autismo analisados.

Na população autista, os estudos mostraram uma variação de 0% a 37% da presença da Síndrome de X Frágil (ROGER et al., 2001). Quando considerados todos os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento ou DEA são encontrados freqüências entre 4% e 6% (OLIVEIRA, 2006; RANDI et al., 2006). A freqüência de 0% encontrada neste estudo está, portanto, de acordo com os dados da literatura. Realmente há uma associação já conhecida entre sinais autísticos com FRAXA e 15 a 30% dos homens afetados preenchem critérios diagnósticos para o autismo (BAUMGARDNER, 1995). Contudo, a casuística aqui apresentada não é grande, foram seguidos critérios rígidos de diagnóstico de autismo clássico e não foram incluídos quadros clínicos mais leves ou sintomas autísticos isolados.

Até pouco tempo, as pesquisas se limitavam a correlacionar ou comparar FRAXA e autismo sem considerar a expressão sérica e os efeitos cerebrais que resultariam no comportamento autista. Pesquisas recentes mostram que este comportamento pode ser influenciado pelos danos cerebrais decorrentes da diminuição ou falta de produção da proteína FMRP, que está envolvida na formação e função cerebral normal (VISOOTAK et al., 2005).

Em indivíduos com FRAXA, a redução ou a falta da proteína causaria mudanças no desenvolvimento neuronal, prejuízo na maturação de neurônios e falha nas ligações sinápticas. RNAm, alvos da proteína FMRP incluiriam aqueles envolvidos na plasticidade e desenvolvimento neuronal, maturação sináptica e

vias axônicas (IRWIN et al., 2000). Assim, FRAXA pode ser menos freqüente entre autistas, cujo diagnóstico é difícil de ser concluído, mas pode apresentar freqüências maiores em populações com critérios diagnósticos de outras DEA.

Novas técnicas e metodologias têm surgido como uma promessa para as pesquisas dos fatores envolvidos na etiologia complexa das DEA. Trabalhos multidisciplinares ou estudos de consórcio poderão dar um melhor panorama das doenças de espectro autístico. Sendo o FRAXA a síndrome de maior comorbidade e de etiologia conhecida, o estudo dessa associação deve revelar, num futuro próximo, o entendimento de pelo um subgrupo etiológico do autismo.

A análise do polimorfismo do gene *APOE* entretanto, mostra uma aumento da freqüência do alelo *E2*. Existem apenas dois estudos na literatura que investigaram polimorfismos deste gene em autismo. O primeiro foi descrito por Raiford et al. (2004), que analisou 322 famílias de autistas e não observou associação significativa de qualquer dos polimorfismos, sugerindo não haver relação entre autismo e *APOE*. Ainda em 2004, Pérsico et al., observaram um desequilíbrio de ligação do alelo *E2* em 223 famílias estudadas e referiram os estudos anteriores que mostravam a relação entre a proteína Reelin com as alterações cerebrais observadas em autistas. Sugeriram que apoE2 funcionaria como um antagonista competitivo de Reelin. Mais recentemente, Qiu et al. (2006), em um estudo de revisão sobre os receptores de lipoproteínas sugeriu que o autismo é um dos distúrbios neuropsiquiátricos possivelmente relacionados com polimorfismos do gene *APOE*.

Diferentemente dos estudos anteriores, não foram estudadas famílias e sim uma casuística de autistas que, embora pequena, aponta para possível relação entre este polimorfismo e a predisposição do autismo.

É sabido que Reelin tem relação com apoE2 e com os receptores gabaminérgicos. Alterações no sistema gabaminérgico e mutações nos genes dos receptores GABA tem sido freqüentemente descritos em doenças do espectro autista (VINCENT et al., 2006; DYKENS et al., 2004; SLOPIEN et al., 2002). Não há, entretanto, hipóteses que expliquem a relação entre estas alterações e o fenótipo comportamental autístico, mas sim sugestões de que resultem em desenvolvimento e funcionamento cerebral anormais.

A relação apoE/Reelin/GABA pode ser um dos fatores envolvidos na complexidade etiológica do autismo. Estudos com casuísticas grandes e que esclareçam o verdadeiro papel de apoE2 no sistema nervoso central serão fundamentais para o entendimento desta relação.

Este trabalho mostrou, que diferentes aspectos e mecanismos realmente parecem estar envolvidos na etiologia do autismo. Dessa maneira Estudos longitudinais prospectivos em casuísticas amplas são necessários para a elucidação dos fatores biológicos e ambientais que influenciam a cognição e o comportamento, especialmente para elaboração de estratégias de intervenções específicas e precoces.

Referências Bibliográficas

- Baumgardner TL, Reiss AL, Freund LS, and Abrams MT (1995) Specification of the neurobehavioral phenotype in males with fragile X syndrome. **Pediatrics** 95(5):744-52.
- Bradford, Y., Haines J, Hutcheson H, Gardiner M, Braun T, Sheffield V, Cassavant T, Huang W, Wang K, Vieland V, Folstein S, Santangelo S, Piven J. Incorporating language phenotypes strengthens evidence of linkage to autism. **Am. J. Medical Genetics**. 2001;105:539-547.
- DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. **J Neurosci**. 2006 ;26(26):6897-906.
- Dykens EM, Sutcliffe JS, Levitt P. (2004) Autism and 15q11-q13 disorders: behavioral, genetic, and pathophysiological issues. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev** 10(4):284-91.
- Irwin SA, Swain RA, Christmon CA, Chakravarti A, Weiler IJ, and Greenough WT (2000) Evidence for altered Fragile-X mental retardation protein expression in response to behavioral stimulation. **Neurobiol Learn Mem** 74(1):87-93.

Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, Schendel D, Thorsen P, Mortensen PB. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status **Am J Epidemiol.** 2005;161(10):916-25.

Lewis MH. Environmental complexity and central nervous system development and function. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev.** 2004;10(2):91-5.

Lord C, Wagner A, Rogers S, Szatmari P, Aman M, Charman T, Dawson G, Durand VM, Grossman L, Guthrie D, Harris S, Kasari C, Marcus L, Murphy S, Odom S, Pickles A, Scahill L, Shaw E, Siegel B, Sigman M, Stone W, Smith T, Yoder P. Challenges in evaluating psychosocial interventions for Autistic Spectrum Disorders. **J Autism Dev Disord.** 2005 Dec;35(6):695-708.

McCaffery P, Deutsch CK. Macrocephaly and the control of brain growth in autistic disorders. **Prog Neurobiol.** 2005;77(1-2):38-56.

Miles JH, Hadden LL, Takahashi TN, Hillman RE. Head circumference is an independent clinical finding associated with autism. **Am J Med Genet.** 2000;95(4):339-50.

Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE.. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. **Am J Med Genet A.** 2005;135(2):171-80.

Oliveira AB Investigação molecular por PCR e clínica da síndrome do cromossomo X frágil em homens com transtornos invasivos do desenvolvimento. 2006. 64f. **Dissertação** (mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto-SP.

Pérsico AM, D'Agruma L, Zelante L, Militeri R, Bravaccio C, Schneider C, et al. (2004). Enhanced APOE2 transmission rates in families with autistic probands. **Psychiatr Genet** 14:73-82.

Qiu S, Korwek KM, Weeber EJ. (2006) A fresh look at an ancient receptor family: emerging roles for low density lipoprotein receptors in synaptic plasticity and memory formation. **Neurobiol Learn Mem** 85:16-29.

Raiford KL, Shao Y, Allen IC, Martin ER, Menold MM, Wright HH, et al. (2004). No association between the APOE gene and autism. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**.125:57-60.

Randi JH. (2006) Lessons from Fragile X regarding neurobiology, autism, and neurodegeneration. **Developmental and Behavioral Pediatrics** 27(1): 63-74.

Rogers SJ, Wehner DE, Hagerman R (2001) The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. **J Dev Behav Pediatr** 22(6):409-417.

Rutter M. Autism research: lessons from the past and prospects for the future. **J Autism Dev Disord.** 2005;35(2):241-57

Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic determination of childhood developmental delay. *Brain Dev.* 2001 Jul;23(4):228-35.

Slopien A, Rajewski A, Budny B, Czerski P. (2002) Evaluation of q11-q13 locus of chromosome 15 aberrations and polymorphisms in the B3 subunit of the GABA-A receptor gene (GABRB3) in autistic patients **Psychiatr Pol** 36:779-91.

Szatmari, P., et al. The familial aggregation of the lessser variant in biological and nonbiological relatives of PDD probands: a family history study. **J. Chil. Psychol. Psychiat,** 2000; 41(5): 579-586.

Vincent JB, Horike SI, Choufani S, Paterson AD, Roberts W, Szatmari P. (2006) An inversion inv(4)(p12-p15.3) in autistic siblings implicates the 4p GABA receptor gene cluster **J Med Genet.**43:429-34.

Visootsak J, Warren ST, Anido A, and Graham JM Jr (2005) Fragile X syndrome: an update and review for the primary pediatrician. **Clin Pediatr (Phila)** 44(5):371-381.

Conclusões

Diante dos resultados observados neste estudo, conclui-se que:

- Manifestações psiquiátricas são mais freqüentes em familiares de autistas, portanto, a antecipação genética relacionada à ação de vários genes de efeito aditivo e a participação de fatores ambientais, poderia explicar o espectro fenotípico da doença na maioria dos casos;
- Características clínicas dismórficas, maiores e menores, são frequentemente observadas entre autistas e podem oferecer subsídios para o entendimento da ação de fatores ambientais e genéticos envolvidos na alteração da embriogênese que culmina no fenótipo comportamental autístico;
- A relação apoE/Rellin/GABA pode ser um dos fatores envolvidos na complexidade etiológica do autismo. Estudos que esclareçam o verdadeiro papel de apoE2 no sistema nervoso central serão fundamentais para o entendimento desta relação;
- FRAXA pode ser menos freqüente entre autistas e apresentar freqüências maiores em populações com critérios diagnósticos de doenças do espectro autista.

Resumo *Relação entre Autismo e a Síndrome do X Frágil, o que pode ser explicado*

O autismo é uma síndrome comportamental complexa, sem etiologia definida, que apresenta heterogeneidade de sinais e sintomas. Possui uma incidência elevada na população e resulta em prejuízos sérios de comunicação e relacionamento social para seu portador. Pode ocorrer em comorbidade com várias síndromes ou condições genéticas, mais freqüentemente com a Síndrome do Cromossomo X Frágil. Também esta relacionada com alguns sinais dismorfológicos sugestivos de alterações no desenvolvimento fetal e é certa a existência de um fenótipo mais brando, com manifestações psiquiátricas em parentes de autistas, o que sugere antecipação genética da doença. Este estudo objetivou a investigação de malformações físicas, manifestações psiquiátricas em familiares, alterações kariótípicas, presença da Síndrome do X Frágil e polimorfismos do gene *apoE*. Foram estudados 71 autistas e familiares e os dados foram comparados com os obtidos de 71 indivíduos normais, pareados por sexo, etnia e classe social, que constituíram o grupo controle. Foram consideradas somente queixas psiquiátricas que se manifestaram antes do nascimento do autista. Os resultados mostram uma que condições psiquiátricas são significativamente mais frequentes em familiares de autistas, o que reforça a hipótese da antecipação genética e de herança poligênica na maioria dos casos. Foram observadas freqüências significativamente maiores de alterações físicas entre os autistas o que corroborou dados previamente descritos. Não foi observada

a comorbidade entre Autismo e a Síndrome do X Frágil, o que pode ser explicado pelo tamanho da casuística. Foi encontrada uma frequência elevada do alelo *E2* em 67 autistas, o que reforça a sugestão de uma possível relação entre apolipoproteína *E2*, proteína Reelin e sistema gabaaminérgico na predisposição do autismo.



CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO AUTISMO

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

1. Marcante lesão na interação social, manifestada por pelo menos dois dos seguintes itens:

a. diminuição ou ausência de reciprocidade social, tais como contato visual, compartilhamento de interesses, respostas sociais e gestos para atrair a atenção;

b. dificuldade em desenvolver relações de reciprocidade adequadas para o nível de desenvolvimento;

c. falta de procura espontânea por atividades, interesses ou realizações de outras pessoas; por exemplo, dificuldade em trazer um objeto de interesse para compartilhar;

d. ausência de intenção de compartilhar de experiências;

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

a. atraso ou ausência de desenvolvimento da linguagem verbal, com ausência de tentativa de comunicação verbal ou uso de palavras sem significado;

b. ausência de desenvolvimento de habilidades de linguagem não verbal, tais como gestos, ou ausência de tentativa de comunicação não verbal;

c. presença de linguagem estereotipada e ecológica, ausência de linguagem social adequada para o nível de desenvolvimento;

ANEXOS

ANEXO I**CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO AUTISMO**

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

1. Marcante lesão na interação social, manifestada por pelo menos dois dos seguintes itens:

a. destacada diminuição no uso de comportamentos não-verbais múltiplos, tais como contato ocular, expressão facial, postura corporal e gestos para lidar com a interação social.

b. dificuldade em desenvolver relações de companheirismo apropriadas para o nível de comportamento.

c. falta de procura espontânea em dividir satisfações, interesses ou realizações com outras pessoas, por exemplo: dificuldades em mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse.

d. ausência de reciprocidade social ou emocional.

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

a. atraso ou ausência total de desenvolvimento da linguagem oral, sem ocorrência de tentativas de compensação através de modos alternativos de comunicação, tais como gestos ou mímicas.

b. em indivíduos com fala normal, destacada diminuição da habilidade de iniciar ou manter uma conversa com outras pessoas.

c. ausência de ações variadas, espontâneas e imaginárias ou ações de imitação social apropriadas para o nível de desenvolvimento.



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

a. obsessão por um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse que seja anormal tanto em intensidade quanto em foco.

b. fidelidade aparentemente inflexível a rotinas ou rituais não funcionais específicos.

c. hábitos motores estereotipados e repetitivos, por exemplo: agitação ou torção das mãos ou dedos, ou movimentos corporais complexos.

d. obsessão por partes de objetos.

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

1. interação social.

2. linguagem usada na comunicação social.

3. ação simbólica ou imaginária.



ANEXO II**PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO****I. Identificação**

Nome		RGHB
Sexo	Naturalidade	Cor
Data de nascimento		
Endereço		
Telefone		
Diagnóstico		

II. Dados familiares

Nome do Pai		
Data de nascimento		Escolaridade
Naturalidade	Cor	
Profissão	Renda mensal	
Antecedentes pessoais		
Queixas atuais		

Nome do Mãe	
Data de nascimento	Escolaridade
Naturalidade	Cor
Profissão	Renda mensal
Antecedentes pessoais	
Queixas atuais	

III. Antecedentes Pessoais**IV. Antecedentes Familiares**

Gestação			
Patologias na gravidez			
Fatores químicos/físicos/biológicos			
Número de gravidez	Nativos	Natimortos	Abortos
Parto			
Recém nascido: peso		Estatura	
Cuidados adicionais			
Patologias			

DNPM
Dificuldades na primeira infância
Comportamento
Sono
Medicamentos
Exames complementares já realizados

IV. Antecedentes Familiares

Patologias
Recorrência da doença
Consaguinidade
Heredograma: verso

V. Exame Físico

Sinais vitais			
Peso	Estatura	PC	PT
Crânio e face			
Orelhas			
Olhos			
Nariz			
Maxilar e mandíbula			
Boca			
Pescoço			
Tórax			
Coluna			
Abdome			
MMSS			
MMII			
Genitais			
Musculatura			
Pele e anexos			

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

VI. Outras Hipóteses Diagnósticas

VII. Observações

INVESTIGADORES RESPONSÁVEIS: Profa. Dra. Agnes Carlos Fort Lima, Chair do Serviço de Genética - FCMSP; Profa. Dra. Ana Cláudia Silva, Departamento de Patologia - IBC/UNESP.

FINALIDADES DO PROJETO: O objetivo desse projeto científico é avaliar a prevalência de mutações genéticas em indivíduos afetados por doença de Alzheimer, bem como a presença de alterações genéticas em indivíduos não afetados. Este estudo pretende avaliar as características clínicas e genéticas de indivíduos com diagnóstico de doença de Alzheimer, bem como a presença de alterações genéticas em indivíduos não afetados. A investigação desta pesquisa pode auxiliar na compreensão das causas e mecanismos das doenças de Alzheimer, bem como na identificação de indivíduos em risco de desenvolver a doença.

ESCLARECIMENTOS E INFORMAÇÃO: Foi esclarecido que os dados obtidos neste estudo são confidenciais e os dados coletados em nome de estudos científicos, sempre preservando a privacidade dos dados. Se decidir não participar do momento de participação em qualquer época, não há nenhum tipo de prejuízo e não haverá qualquer justificativa.

1) Este termo, sendo informado, é para aderir a pesquisa investigativa e para o acordo em participar livre e voluntariamente deste estudo, e se que não hipoteca alguma condição ou qualquer tipo de gratificação pela desta participação.

Desportista, sem comprometimento.

PACIENTE/ RESPONSÁVEL LEGAL
RG.

INVESTIGADOR RESPONSÁVEL

ANEXO III

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, seu pai, mãe ou tutor legal, deve dar seu consentimento livremente, após ter sido muito bem informado sobre os riscos e benefícios do estudo.

É de responsabilidade do pesquisador lhe dar toda e qualquer informação necessária e solicitada. Este termo foi aprovado por um comitê de ética e tem a finalidade de proteger o participante do estudo.

TÍTULO DE PESQUISA: “ ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO, PERFIL de METILAÇÃO DO DNA GENÔMICO E INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DA ENZIMA APOE EM AUTISMO”

INVESTIGADORES RESPONSÁVEIS: Profª. Dra. Agnes Cristina Fett Conte, Chefe do Serviço de Genética - FAMERP; Profª. Dra. Ana Elisabete Silva, Depto. de Biologia - IBILCE/UNESP.

FINALIDADES DO PROJETO: O autismo é uma doença psiquiátrica pouco conhecida quanto à sua origem e manifestações clínicas.. sabe-se que está relacionado a certas regiões do material genético, bem como a algumas característica físicas. Este estudo pretende avaliar as características físicas e o material genético de autistas quanto ao padrão de metilação, polimorfismo da enzima APOE e cariótipo convencional. A investigação destes aspectos pode auxiliar na compreensão das causas e manifestações físicas destas doenças, com implicação direta na orientação das famílias.

ESCLARECIMENTOS E INFORMAÇÃO: Fui esclarecido que as informações obtidas neste estudo são confidenciais e só serão divulgadas em reuniões ou revistas científicas, sempre preservando a minha identidade. Se decidir não participar ou interromper a participação, em qualquer época, não terei nenhum tipo de prejuízo e não precisarei dar justificativas.

Li este termo, recebi informações claras sobre a presente investigação e estou de acordo em participar livre e espontaneamente deste estudo, e sei que, sob hipótese alguma, receberei qualquer tipo de gratificação pela minha participação.

Dou portanto, meu consentimento.

PACIENTE/ RESPONSÁVEL LEGAL
RG.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Abstract

Autistic disorder is a complex behavioral syndrome, with no defined etiology, which presents genetic heterogeneity of symptoms and signals. It is presented at a high incidence in the population and results in serious social relationship and communication damage to the carrier. It may occur in comorbidity with many other syndromes and genetic conditions, more frequently with the Fragile X Syndrome. It is also related to some dimorphic features that are suggested by alteration in fetal development, and it is certain that there is a softer phenotype with psychiatric manifestations in autistics' relatives, which suggests genetic anticipation of the disease. This study has aimed at the investigation of physical malformation, psychiatric manifestations in relatives, karyotypic alterations, presence of the Fragile X syndrome and polymorphism of the *E gene frequency*. 71 autistics and relatives have been studied and the data was compared to those of 71 normal individuals, pared by sex, ethnic group and social class, forming the control group. Only psychiatric complains dating before the birth of the autistic were considered. The results show that psychiatric conditions are significantly more frequent in autistics' relatives, which reflects the hypotheses of genetic anticipation and multifactorial inheritance in most of the cases. Significantly larger frequencies of physical alterations among autistics were observed, which explained the previously described data. The comorbidity of autistic disorder and Fragile X Chromosome was not observed, which may be explained through the casuistry measures. The E2 gene frequency was found at a large frequency in 67 autistics, which stresses a possible relation between abetalipoproteinemia, Reelin protein and gabaergic system in predisposition in autistic disorder.

