

Marcos Roberto Higinio Estécio

**Avaliação Citogenética e Molecular em
Autismo e Outros Transtornos Invasivos
do Desenvolvimento**



1910000878



MARCOS ROBERTO HIGINO ESTÉCIO

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM
AUTISMO E OUTROS TRANSTORNOS INVASIVOS
DO DESENVOLVIMENTO**



878/99

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

for xerocado

São José do Rio Preto - SP

1999

Orientadora: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
Departamento de Biologia
IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto-SP

Co-orientadora: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett-Conte
Departamento de Biologia Molecular
FAMERP - Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto-SP



O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP – campus de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FUNDUNESP.



Este trabalho é dedicado a uma pessoa
que demonstra seu amor em todas as suas
atitudes. À senhora Tereza, minha mãe,
com todo meu carinho e admiração.

Agradecimentos

A realização do presente trabalho somente foi possível devido a contribuição de várias pessoas, as quais agradeço sinceramente. Meu agradecimento especial:

À Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, orientadora desde a minha iniciação científica, por sua presença amiga e profissional durante todo nosso contato, auxiliando não apenas na execução e redação deste trabalho, como também na moldagem de minha conduta profissional, através de uma postura sempre ética.

À Profa. Dra. Agnes Cristina Fett-Conte pela co-orientação deste trabalho, auxiliando significativamente na elaboração desta dissertação.

À Profa. Dra. Regina Célia Mingroni-Netto, do Departamento de Biologia - IB/USP-SP, pela análise da pro-forma desta dissertação e por sua participação na banca examinadora.

À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, do IBILCE/UNESP-SJRP, a quem, por ter sido seu aluno na graduação e pós-graduação, agradeço tanto por sua participação na banca examinadora, como pelos valiosos ensinamentos passados.

Às profissionais Valéria, Paula e Brasilina, da FAMERP-SJRP, pela realização da coleta das amostras de sangue.

Aos funcionários do Departamento de Biologia deste Instituto, especialmente Josué Rodrigues dos Santos, Simone Carvalho Fernandes e Neusa Hissae Murai, fontes inesgotáveis de paciência e dedicação.

Aos Profs. Drs. Carlos Daglian e James Robert Coleman, pela correção do *summary*.

À psiquiatra Simone Secco da Rocha, por suas explicações referentes ao quadro psiquiátrico dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Lazslo Àvila e à psicóloga Marli Terra Verdi, pioneiros no enfoque científico do autismo junto a Escola Municipal do Autista.

À Diretoria da Escola Municipal do Autista e aos familiares dos pacientes estudados, por sua colaboração no momento da coleta das amostras de sangue.

Às amigas de laboratório Flávia, Rosa, Érika e Andréa, que acompanharam atenciosamente meus primeiros experimentos em Biologia Molecular.

À estagiária Jucimara Colombo, companheira incansável de laboratório.

À Profa. Dra. Marileila Varela Garcia, da Universidade do Colorado, Denver, pela documentação fotográficas do ensaios de FISH.

À Profa. Dra. Ângela Viana Morgante, do Departamento de Biologia - IB/USP-SP, pela realização dos *Southern blotting* nos indivíduos com suspeita da síndrome do cromossomo X frágil

À Profa. Dra. Célia P. Koiffmann e à doutoranda Cintia Fridman, do Departamento de Biologia - IB/USP-SP, pela investigação da origem parental do cromossomo marcador.

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, exemplo irretocável de sensibilidade, com quem tive contato mais próximo em um momento extremamente difícil em minha vida.

Às Profas. Dras. Cláudia M. Ap. Carareto, Joseli M. P. Brigheti, Lilian Madi-Ravazzi e Mary M. Otoyama, que sempre foram ouvintes pacientes, tanto de meus sucessos quanto de minhas angústias.

Aos amigos do Departamento de Biologia, Juliana, Patrícia, Luciana e Mariângela, que acompanharam todo o desenvolver de meu mestrado.

Aos queridos amigos Fabiano, Valéria, Andrea e Sueli, com quem divido momentos de pura descontração e felicidade.

Agradeço com carinho especial à minha mãe, Tereza, e minha irmã, Tânia, que sempre tiveram ao meu lado, incentivando-me irrestritamente.

A Deus, por me dar as ferramentas necessárias para a vida.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado.

(Deus) ... "Faze com que eu não te indague demais,
porque a resposta seria tão misteriosa quanto a
pergunta, faze com que eu receba o mundo sem
medo, pois para esse mundo incompreensível nós
fomos criados e nós mesmos também
incompreensíveis, então é que há uma conexão
entre esse mistério do mundo e o nosso, mas essa
conexão não é clara para nós enquanto
quisermos entendê-la..."

(Clarice Lispector)

"O consciente ampliado não é mais o conjunto egoísta de desejos, receios, esperanças, anseios pessoais, que exige sempre a compensação e a correção por meio do inconsciente: ao contrário, é o processo de relação com o mundo-objeto, que conduz o indivíduo para a interação com os outros. As complicações transformam-se de conflitos egóicos em dificuldades que envolvem a coletividade e exigem mais uma compensação coletiva que uma compensação pessoal"

(C.G.Jung)

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Aspectos Gerais do Autismo e Outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento.....	1
I.2. Alterações Cromossômicas em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento	9
I.3. Associação entre Autismo e Síndrome do Cromossomo X Frágil.....	13
I.4. Marcadores Genéticos em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento.....	19
II. OBJETIVOS.....	22
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
III.1. Casuística.....	23
III.2. Métodos.....	27
III.2.1. Estudo citogenético.....	27
III.2.1.1. Citogenética convencional.....	27
III.2.1.2. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	30
III.2.2. Estudo molecular.....	32
III.2.2.1. Extração de DNA de leucócitos.....	32
III.2.2.2. Investigação de polimorfismo no gene <i>FMR-1</i>	33
IV. RESULTADOS.....	37
IV.1. Avaliação citogenética.....	37
IV.2. Avaliação molecular.....	46
V. DISCUSSÃO.....	48
VI. CONCLUSÕES.....	70
VII. RESUMO.....	71
VIII. SUMMARY.....	73
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXO I	94

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos Gerais do Autismo e Outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento

Os transtornos invasivos do desenvolvimento (Pervasive Developmental Disorders – PDDs) caracterizam-se por prejuízo severo de áreas do desenvolvimento, como a capacidade de interação social recíproca e de comunicação, ou presença de comportamento estereotipado, interesses e atividades restritas. As deficiências qualitativas características dessas condições manifestam-se através do desvio acentuado em relação ao nível de desenvolvimento ou idade mental do indivíduo. Como parte desse grupo de transtornos encontram-se o autismo, as síndromes de Rett e de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e quaisquer outras condições que levem aos mesmos distúrbios de relacionamento, denominados transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação (CID 10, 1993; APA, 1994). Nessas condições normalmente observam-se associação com retardo mental ou outras condições clínicas, por exemplo, infecções congênitas e anormalidades estruturais do sistema nervoso central.

Entre os transtornos invasivos do desenvolvimento, destaca-se o autismo, não por ser o distúrbio mais freqüente, mas pela sua precocidade de manifestação. Esse transtorno afeta cerca de dois a cinco indivíduos em cada 10.000 na população geral. Há desvio na taxa sexual, com três a quatro homens afetados para cada mulher, o que sugeriu inicialmente a presença de pelo menos um loco ligado ao cromossomo X relacionado à sua manifestação (Tranebjaerg & Kure, 1991).



As crianças autistas apresentam, desde seus primeiros meses de vida, comportamento retraído e tímido, sendo comum a rejeição à amamentação e ao toque. A manifestação dessa afecção ocorre invariavelmente antes dos três anos de idade, o que é considerado um fator diagnóstico fundamental. Dentre suas características mais importantes, destacam-se os padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades, a fala ausente ou pouco desenvolvida, com vocabulário restrito e normalmente utilizado de forma inadequada, as brincadeiras e os gestos estereotipados, com movimentos constantes e repetitivos de mãos e do corpo, assim como a fixação por objetos giratórios e por partes de objetos, em vez do todo. Em situações de mudanças de rotina, mesmo aquelas mais simples, esses indivíduos geralmente respondem com acessos de fúria (Le Couteur, 1993; APA, 1994).

Fisicamente, os indivíduos com autismo não apresentam um quadro característico, podendo ser observadas algumas anomalias discretas. Rodier *et al.* (1997), comparando crianças normais, autistas e crianças portadoras de outras anomalias do desenvolvimento com suas irmandades, verificaram que o grupo de autistas apresentava alguns sinais discretos, como rotação posterior do ouvido externo, pés pequenos, mãos de tamanho aumentado, redução da distância interpupilar, sem contudo haver redução da distância intercantal ou da circunferência craniana.

Quanto ao tratamento do autismo, ele é apenas paliativo e sintomático. Atualmente, ainda não há uma intervenção farmacológica que amenize todos os seus aspectos. Geralmente consegue-se melhoria dos sintomas, como a agressão, a ansiedade e o comportamento obsessivo-compulsivo, mas pouco ou nenhum efeito sobre o relacionamento social ou a comunicação (Smalley, 1997).

O autismo foi inicialmente descrito pelo psiquiatra Léo Kanner, em 1943. Nesse ano, ele utilizou o termo "autista" para descrever onze casos clínicos de crianças com distúrbios do contato afetivo. A palavra autismo provém do grego *autos*, que significa "em si mesmo". Embora o termo autismo tenha se tornado mais popular após a utilização por Kanner em sua publicação científica, ele foi introduzido em 1911 pelo psiquiatra Eugen Bleuler, para referir-se aos quadros de esquizofrenia em que havia limitações das relações do indivíduo com o mundo exterior (Berquez, 1991).

Na época da publicação de Kanner, o autismo foi considerado uma característica psicodinâmica, desenvolvida em resposta a estímulos ambientais, principalmente o familiar. Kanner expressava essa abordagem claramente psicodinâmica do autismo ao relatar seu interesse pelo estudo da personalidade, da atitude e do comportamento dos pais de autistas, com a finalidade de compreender a disfunção da criança. Havia concordância entre os pesquisadores quanto a sua origem ambiental, destacando-se entre esses fatores o nível cultural elevado das famílias de autistas e a ocorrência de mães frias, repressoras e pouco carinhosas, o que levaria à incapacidade da criança em desenvolver níveis adequados de relacionamento social. Posteriormente, em 1968, o próprio Kanner reconheceu que o autismo era decorrente de defeito inato e que a abordagem psicodinâmica era insuficiente para explicar todas as suas características. Essa conclusão reforçou as suposições de causas orgânicas e genéticas na etiologia dessa afecção (Berquez, 1991).

Várias condições médicas estão associadas ao autismo e podem ter um papel significativo na sua manifestação. Dentre os fatores pré e peri-natais avaliados, Nelson (1991) destacou a ocorrência de infecções durante a gestação,

como rubéola e toxoplasmose, complicações durante a gravidez e o parto, toxemia, uso de medicamentos, prematuridade e baixo peso ao nascimento.

A rubéola congênita consiste numa das patologias descritas como causa freqüente de autismo e condições autísticas. Durante a infecção por rubéola, no período gestacional, ocorre a transferência placentária de imunoglobulinas maternas para o embrião ou feto. Há suspeitas de que os anticorpos para a rubéola alcancem o sistema nervoso central, causando danos, especialmente em áreas envolvidas com o desenvolvimento cognitivo da criança (Gillberg, 1992a; Gupta *et al.*, 1996).

O autismo também está comumente associado com condições patológicas do sistema nervoso e sensorial (Fombonne *et al.*, 1997). Alterações do sistema sensorial podem levar ao desenvolvimento inadequado do indivíduo, com prejuízo severo da linguagem e do relacionamento. Em alguns casos de crianças com sintomas similares ao autismo, posteriormente diagnosticou-se a ocorrência de surdez, sendo essa considerada a causa da alteração comportamental apresentada pelo indivíduo (Voeller, 1996).

As anomalias neurológicas são um achado freqüente em autismo, havendo associação com retardo mental em aproximadamente 75% dos casos, convulsões em 15% a 35% e eletroencefalograma anormal em 20% a 50% dos casos (Smalley, 1997). Em um estudo com 40 crianças autistas, De Long & Nohria (1994) encontraram 50% com alterações neurológicas, como malformações cerebrais, epilepsia pós-encefalite e epilepsia sem origem neurológica determinada.

As regiões do sistema nervoso central encontradas como alteradas em autistas são principalmente o cerebelo e os lobos temporal e parietal (Courchesne *et al.*, 1988, 1993, 1994; Murakami *et al.*, 1989; Gillberg, 1992a;

Voeller, 1996; Smalley, 1997). O lobo temporal contém uma variedade de neurônios especializados na recepção e compreensão da identidade facial e de expressões, de gestos e de ações afetivas. A compreensão desses sentimentos tem papel fundamental no comportamento social e seus significados são memorizados no hipocampo. Uma vez que a interação social se desenvolve com o aprendizado, consistindo na recepção dos estímulos sócio-emocionais, na sua compreensão e memorização, presume-se que as anomalias nas áreas cerebrais envolvidas nesses processos podem predispor o indivíduo ao autismo (Voeller, 1996).

Alguns indivíduos portadores de esclerose tuberosa, uma síndrome autossômica dominante caracterizada por tumores benignos (hamartomas) e malformações (hamartias) em diferentes órgãos, mais notavelmente sistema nervoso central, pele, retina, rins e coração, apresentam autismo ou sinais autísticos (Smalley *et al.*, 1992). Nesses indivíduos, a porção do cérebro mais afetada por hamartomas é o lobo temporal. Anormalidades dos lobos parietais também foram descritas em autismo, por Courchesne *et al.* (1993), que encontraram redução no tamanho dessa estrutura. Os lóbulos VI e VII do verme cerebelar também apresentaram alterações em indivíduos autistas, sendo relatados aumento (hiperplasia) e diminuição (hipoplasia) de seu tamanho (Courchesne *et al.*, 1988, 1994; Murakami *et al.*, 1989).

Apesar da forte contribuição de fatores orgânicos na etiologia do autismo, já está bem estabelecida a sua associação com fatores genéticos. Essa associação foi determinada principalmente a partir de alguns estudos que observaram a agregação familiar do autismo, mostrando ser ele mais comum na irmandade de crianças afetadas (Ritvo *et al.*, 1989; Jorde *et al.*, 1991). Também foram descritas agregação familiar de outras doenças psiquiátricas nos membros

de famílias com crianças autistas, principalmente em parentes em primeiro grau, assim como associação do autismo com algumas doenças de etiologia genética conhecida (Folstein & Piven, 1991; Lombroso *et al.*, 1994).

A reincidência de autismo em uma irmandade é cerca de 50 a 100 vezes mais alta do que o risco na população em geral, sendo que nas famílias com vários membros afetados tal risco ultrapassa 200 vezes (Hallmayer *et al.*, 1994). Os estudos de gêmeos mono e dizigóticos têm demonstrado taxas de concordância para o autismo que variam de 36% a cerca de 100% em gêmeos monozigóticos e de 0% a 24% em gêmeos dizigóticos, com taxa média de 64% de concordância em gêmeos monozigóticos e 9% em dizigóticos (Spiker *et al.*, 1994, Smalley, 1997). O risco de recorrência observado em irmandades após o nascimento de um afetado varia de 4,5% (Jorde *et al.*, 1991) a 8,6% (Ritvo *et al.*, 1989).

Os estudos de agregação familiar mostraram também que, entre os parentes em primeiro grau de um indivíduo autista, são comumente encontrados distúrbios afetivos. Aproximadamente 15% dos indivíduos das irmandades de autistas apresentam dificuldades cognitivas (Lombroso *et al.*, 1994). Sinais autísticos discretos, como distúrbios de humor, atraso do desenvolvimento da fala, ansiedade e interação social abaixo da média, também podem estar presentes em suas irmandades (Smalley, 1997)

As condições genéticas conhecidas em associação com o autismo são responsáveis por cerca de 34% dos casos. O autismo recorrente ou familiar é observado em 7% dos pacientes, enquanto o idiopático perfaz 59% dos casos (Gillberg, 1992a). Dentre as condições de origem genética associadas com o autismo e mais freqüentemente documentadas na literatura, estão as alterações cromossômicas, envolvendo os cromossomos sexuais (XO, XXY e XYY), as trissomias do 21 e do 22 e a presença de cromossomos marcadores. Entre as

doenças gênicas, destacam-se principalmente a síndrome do cromossomo X frágil, a esclerose tuberosa, as síndromes de Goldenhar, Noonan, Moebius, Williams e Cornélia de Lange, a fenilcetonúria, a neurofibromatose e a hipomelanose de Ito. As patologias não-genéticas que podem levar ao autismo incluem o hipotireoidismo congênito, a rubéola e a toxoplasmose congênita, a encefalite herpética e a infecção pré-natal por citomegalovírus (Grandino, 1990; Comings & Comings, 1991; Sverd, 1991; Gillberg, 1992a; Bay *et al.*, 1993; Ghaziuddin *et al.*, 1994).

Os diversos estudos mostram, portanto, uma grande heterogeneidade genética na etiologia do autismo. Provavelmente, essa heterogeneidade se deve à contribuição de vários genes que, de formas diferentes e específicas, levam à expressão dessa patologia. Smalley (1991) e Jorde *et al.* (1991) propuseram modelos poligênicos e multifatoriais, respectivamente, para explicar a etiologia do autismo. Hallmayer *et al.* (1996a) avaliaram a transmissão familiar dessa condição e encontraram tanto evidências de ligação com o cromossomo X como de padrão de transmissão autossômico. Assim, os dados disponíveis até o momento, indicam que o autismo realmente não segue padrões clássicos de herança mendeliana.

Os demais distúrbios comportamentais classificados na categoria de transtornos invasivos do desenvolvimento assemelham-se ao autismo quanto a alguns aspectos, como a procura por isolamento e aversão a relações interpessoais. Porém, devido a algumas particularidades, são classificados diferencialmente, constituindo as síndromes de Rett e de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e o transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação (APA, 1994).

A síndrome de Rett difere do autismo quanto à taxa sexual e ao desvio nas relações sociais. Esse distúrbio tem sido diagnosticado apenas no sexo

feminino, enquanto o autismo acomete mais freqüentemente o sexo masculino. Há ainda na síndrome de Rett um padrão característico e progressivo de desaceleração do crescimento craniano, perda de habilidades manuais voluntárias adquiridas anteriormente e aparecimento de marcha pouco coordenada ou movimentos do tronco. Particularmente durante os anos pré-escolares, as meninas com síndrome de Rett podem exibir dificuldades na interação social similares àquelas observadas no autismo, mas que tendem a ser temporárias. Além disso, com a progressão da doença, os movimentos tornam-se parecidos com os realizados por muitos autistas (CID 10, 1993; APA, 1994; Edelson, 1995).

A síndrome de Asperger, por sua vez, assemelha-se de tal modo ao autismo que é considerado por muitos autores como um subtipo do mesmo (Saliba & Griffiths, 1990; Gillberg, 1992b). Esse transtorno diferencia-se do autismo pela ausência de atraso no desenvolvimento da linguagem, e pelo fato dos afetados apresentarem uma memória prodigiosa (APA, 1994).

O transtorno desintegrativo da infância é diagnosticado nos indivíduos em que o desenvolvimento foi normal até os dois anos de idade e, a partir de então, iniciou-se um processo de perda das habilidades comportamentais e intelectuais adquiridas, resultando em comportamento autístico. O diagnóstico de transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação (PDD-NOS - Pervasive Developmental Disorder, Not Otherwise Specified) é aplicado aos casos em que ocorre prejuízo severo no desenvolvimento da interação social recíproca ou da capacidade de comunicação verbal ou não-verbal, mas não são satisfeitos os critérios para os outros transtornos invasivos do desenvolvimento. Também nessa classificação inclui-se o autismo atípico, caracterizado por indivíduos que apresentam todas as características do autismo, porém observadas apenas após a idade de três anos (APA, 1994).

I.2. Alterações Cromossômicas nos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento

As descrições de anomalias cromossômicas em autismo e em outros distúrbios neuropsiquiátricos mostram uma grande variabilidade de achados, como alterações numéricas e estruturais envolvendo vários cromossomos, além de rearranjos complexos.

As primeiras alterações citogenéticas relatadas em indivíduos autistas indicaram anomalia do cromossomo 22 (Turner & Jennings, 1961), trissomia do 21 (Wakabayashi, 1979) e anomalias cromossômicas estruturais como inversão/duplicação de 3p e 16q, 5p+ e +7p- (Mariner *et al.*, 1986).

Fryns & Kleczkowska (1992) cariotiparam dois pacientes com comportamento autístico e verificaram mosaicismos para um cromossomo em anel muito pequeno, derivado do cromossomo 18, com pontos de quebras em 18p11.2 e 18q21. O envolvimento da banda 18p11 foi posteriormente observado em uma criança com autismo e retardo mental, que apresentava o cariótipo 46,XX,del(18p11.3)/46,XX,i(18q), resultando em monossomia de 18p e trissomia de 18q (Ghaziuddin *et al.*, 1993). Da mesma forma, a deleção da banda 18q21 também foi descrita em outros casos de indivíduos com autismo e retardo mental (Wilson & Al Saadi, 1989; Seshadri *et al.*, 1992).

Rearranjos cromossômicos complexos, que freqüentemente estão associados com retardo mental e malformações congênitas múltiplas, têm sido observados em autismo. Lopreiatjo & Wulfsberg (1992) descreveram um rearranjo envolvendo os cromossomos 1, 7 e 21 em um caso de autismo e Kleczkowska *et al.* (1993) encontraram um rearranjo complexo envolvendo os cromossomos 1, 2 e 13 em uma criança com retardo mental moderado, fenótipo dismórfico e

diferentes tipos de técnicas de bandamento e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) identificaram tais marcadores como iso(15)(pter→q13,q13→pter), incluindo portanto a região crítica das síndromes de Prader-Willi e de Angelman, ou seja, a região cromossômica 15q11-q13. Esses autores propuseram a existência de uma síndrome de retardo mental moderado a severo, comportamento autístico e alguns sinais clínicos discretos associados com duplicações de 15q. Relatos semelhantes foram descritos, com variações cromossômicas estruturais diversas, mas sempre resultando em trissomia ou tetrassomia da região 15q11-q13 (Schinzel, 1990; Shibuya *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1994; Bunday *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Crolla *et al.*, 1995; Hotopf & Bolton, 1995; Flejter *et al.*, 1996; Martinsson *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997a; Schroer *et al.*, 1998). Esses marcadores, quando investigados, apresentavam origem materna (Flejter *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997a; Schroer *et al.*, 1998), enquanto que os de origem paterna não estavam associados com fenótipo alterado (Schroer *et al.*, 1998), sugerindo a ocorrência de *imprinting* genômico na manifestação de sintomatologia autística com origem gênica relacionada ao cromossomo 15.

Apesar do número significativo de investigações citogenéticas em autismo, poucos estudos têm sido realizados nos outros transtornos invasivos do desenvolvimento. A respeito disto, Weidmer-Mikhail *et al.* (1998) ressaltaram a importância de avaliações genéticas nos demais distúrbios de comportamento e relataram os resultados de suas investigações em 92 indivíduos portadores desses transtornos. Nessa amostra, três indivíduos apresentaram alterações citogenéticas. Dentre elas, detectou-se um caso de tetrassomia do cromossomo 15, presente em um indivíduo autista, um caso com deleção de 8q e outro com XYY, sendo essas alterações observadas em indivíduos com transtorno invasivo

do desenvolvimento sem outra especificação. Segundo os autores, é possível que as alterações citogenéticas sejam mais comuns nos demais transtornos invasivos do desenvolvimento do que em autismo.

Outros achados citogenéticos em pacientes com distúrbios comportamentais foram descritos por Lewis *et al.* (1995). Dos 345 pacientes avaliados, 11 apresentaram alterações cromossômicas, sendo que apenas dois eram autistas. O achado mais comum foi o sítio frágil em Xq27.3, presente em quatro casos, um dos quais era autista. O outro paciente autista apresentava o cariótipo 45,X. Nos demais pacientes, com outros transtornos do comportamento, também foram encontradas alterações envolvendo os cromossomos sexuais, como XXY e i(Xq) e alterações dos autossomos, por exemplo, +21 e del(9)(p23).

O número crescente de estudos citogenéticos em autismo e em outros transtornos invasivos do desenvolvimento tem revelado a ocorrência de alterações afetando diferentes cromossomos, que podem indicar regiões cromossômicas com genes candidatos com papel relevante em sua etiologia. Por exemplo, nas duplicações do cromossomo 15 em autismo, está incluída a região crítica das síndromes de Prader-Willi e Angelman (15q11-q13), duas síndromes fenotipicamente distintas decorrentes de deleções dessa região e *imprinting* genômico. Essa região contém além de outros genes, as subunidades alfa 5, beta 3 e gama 3 dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro de mamíferos (Wagstaff *et al.*, 1991; Glatt *et al.*, 1992; Greger *et al.*, 1995). Atualmente, ainda não está esclarecido se um excesso de receptor GABA influencia o desenvolvimento do cérebro, mas é concebível que alterações nesses receptores possam levar ao desenvolvimento de epilepsia e problemas comportamentais, como aqueles presentes no autismo (Wagstaff *et al.*, 1991).



I.3. Associação entre Autismo e Síndrome do Cromossomo X Frágil

A condição gênica mais freqüentemente associada ao autismo é a síndrome do cromossomo X frágil ou síndrome de Martin-Bell. Essa síndrome afeta aproximadamente 1 em cada 2000 homens e 1 em cada 2500 mulheres, consistindo na principal causa gênica de retardo mental hereditário (Sherman, 1996). Os portadores apresentam alguns sinais clínicos característicos, como face alongada, orelhas grandes e em abano e macrorquidismo, associados com retardo mental em algum grau e hiperatividade (Hagerman, 1996). Apesar de ser uma síndrome gênica, apresenta um marcador citogenético, expresso como um sítio frágil na parte distal do braço longo, na região Xq27.3, denominado FRAXA. Essa alteração raramente é visualizada em preparações cromossômicas usuais, mas é induzida por condições especiais de cultivo, que envolvem utilização de meio de cultura deficiente em folato e timidina, ou inibidores da enzima timidilato sintetase, como a fluordesoxiuridina e a trimetoprima (Glover, 1981).

A freqüência da síndrome do cromossomo X frágil em populações de autistas do sexo masculino é bastante variável (Tabela 1). Em alguns estudos não foi observada associação entre o fra(X) e o autismo (Venter *et al.*, 1984; White, 1984; Goldfine *et al.*, 1985; Pueschel *et al.*, 1985; Jayakar *et al.*, 1986; Reiss *et al.*, 1986). Porém, vários autores encontraram associação entre essas afecções (Chudley, 1984; Mikkelsen, 1984; Turner, 1984; Watson *et al.*, 1984; Blomquist *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1996; McGillivray *et al.*, 1986; Wahlstrom *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 1986; Gillberg *et al.*, 1987; Matsuishi *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1988; Mavrou *et al.*, 1988; Ho & Kolousek, 1989; Payton *et al.*, 1989; Cantú *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1991; Tranebjaerg & Kure, 1991; Malmgren *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993).



Tabela 1. Frequência da síndrome do cromossomo X frágil entre portadores de autismo do sexo masculino. Adaptado de Fisch (1992) e Sherman (1996).

Estudo	Tamanho da amostra	Número de fra(X) positivos	Frequência (%)
Chudley, 1984	16	1	6,3
Mikkelsen, 1984	20	1	5,0
Turner, 1984	70	1	1,4
Venter <i>et al.</i> , 1984	40	0	0,0
Watson <i>et al.</i> , 1984	76	4	5,3
White, 1984	6	0	0,0
Blomquist <i>et al.</i> , 1985	81	11	13,6
Goldfine <i>et al.</i> , 1985	34	0	0,0
Pueschel <i>et al.</i> , 1985	18	0	0,0
Brown <i>et al.</i> , 1996	183	24	13,1
Jayakar <i>et al.</i> , 1986	15	0	0,0
McGillivray <i>et al.</i> , 1986	31	3	9,7
Reiss <i>et al.</i> , 1986	11	0	0,0
Wahlstrom <i>et al.</i> , 1986	101	16	15,8
Wright <i>et al.</i> , 1986	31	1	3,2
Gillberg <i>et al.</i> , 1987	20	4	20,0
Matsuishi <i>et al.</i> , 1987	38	1	2,6
Crowe <i>et al.</i> , 1988	20	2	10
Mavrou <i>et al.</i> , 1988	30	2	6,7
Ho & Kolousek, 1989	41	1	2,4
Payton <i>et al.</i> , 1989	85	2	2,4
Cantú <i>et al.</i> , 1991	41	1	2,4
Cohen <i>et al.</i> , 1991	344	24	7,0
Tranebjaerg & Kure, 1991	20	2	10,0
Malmgren <i>et al.</i> , 1992	21	6	28,6
Li <i>et al.</i> , 1993	84	7	8,3
Total	1477	114	7,7

Os trabalhos que avaliaram um número elevado de indivíduos (acima de 75) encontraram valores de associação entre 2,4% (Payton *et al.*, 1989) e 15,8% (Wahlstrom *et al.*, 1986). Conforme Sherman (1996), quando vários estudos são considerados, a frequência média de indivíduos autistas com fra(X) é cerca de 7,7%, sugerindo portanto uma contribuição significativa da síndrome do cromossomo X frágil na etiologia do autismo.

Cohen *et al.* (1991) e Fisch (1992) estimaram que a ocorrência casual da síndrome do cromossomo X frágil e do autismo em um mesmo indivíduo, segundo cálculos teóricos, seria de $2,96 \times 10^{-7}$, ou seja, 3 portadores de ambos os distúrbios entre 10 milhões de indivíduos na população geral. Tal valor foi obtido pelo cálculo da probabilidade conjunta dessas síndromes, ou seja, a frequência populacional da síndrome do cromossomo X frágil multiplicada pela frequência do autismo. Na prática, tem-se observado um número superior de indivíduos portando ambos distúrbios, o que sugere que a co-ocorrência dessas afecções não se deve ao acaso. Esses autores postularam que o autismo, nos indivíduos com a síndrome do cromossomo X frágil, é uma condição secundária, cuja origem parece estar relacionada ao retardo mental presente nessa síndrome.

A síndrome do cromossomo X frágil têm um padrão de transmissão complexo, com características incomuns, como a existência de homens obrigatoriamente portadores porém não afetados, uma alta taxa de portadoras afetadas (um terço), diferenças na expressividade de acordo com a origem da mutação (por exemplo, o risco de retardo mental em uma mulher portadora é muito maior quando a mutação é herdada de sua mãe do que de seu pai transmissor mentalmente normal) e apresenta o fenômeno de antecipação genética, que consiste, nessa síndrome, no aparecimento de maior número de indivíduos afetados nas gerações mais recentes dos heredogramas. Tais

particularidades compõem o que era referido comumente como o paradoxo de Sherman (Howard-Peebles & Friedman, 1985).

O gene responsável pela síndrome do cromossomo X frágil (*FMR-1*, Fragile X Mental Retardation 1) mapeado na região Xq27.3, foi caracterizado molecularmente em 1991 por três grupos independentes e quase ao mesmo tempo (Oberlé *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991). Em consequência, atualmente sabe-se que a síndrome do X frágil é resultante de um mecanismo incomum de mutação, conhecido como mutação dinâmica. Nos indivíduos normais, o número de trinucleotídeos CGG presentes no gene *FMR-1* varia de seis a 50 cópias, *in tandem*, sendo considerada uma região polimórfica na população. Em alguns indivíduos, essas unidades de repetição estão repetidas de 50 a 200 vezes e essa condição é conhecida como pré-mutação. Ao ser passada à prole, principalmente através da meiose feminina, a pré-mutação pode sofrer amplificação e ser convertida em mutação completa (muitas centenas ou até milhares de cópias), que leva a expressão citogenética e clínica da síndrome do X frágil (Rousseau *et al.*, 1991).

A repetição de trinucleotídeos CGG está localizada na porção 5' não traduzida do primeiro exon do gene *FMR-1*. Quando o número de cópias do trinucleotídeo CGG ultrapassa 200, os níveis de RNA mensageiro do *FMR-1* estão diminuídos ou ausentes. Essa mudança na expressão do gene está correlacionada com a metilação das citosinas no dinucleotídeo 5'-CpG-3' na terminação 5' do gene (Hagerman, 1996).

Embora ausência da proteína *fmr-1* pareça ser a causa da síndrome, a patogênese da doença e a função da proteína normal ainda não estão totalmente esclarecidas. Sabe-se que esse gene é expresso ativamente e de modo generalizado no início do desenvolvimento embrionário em camundongos,

mas com expressão mais restrita nos adultos, concentrando-se principalmente no cérebro e túbulos seminíferos. Em humanos, sua expressão também ocorre de forma semelhante. No cérebro fetal humano, a expressão da proteína fmr-1 está presente em áreas envolvidas no processo de aprendizagem, como o núcleo basal magnocelular e neurônios piramidais do hipocampo (Abitbol *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1993). Essa proteína tem função de ligação a RNAs, apresentando dois domínios KH (domínios de homologia com proteínas tipo K), como outras proteínas com essa mesma função que já foram seqüenciadas, por exemplo, a hnRNP (ribonucleoproteína nuclear heterogênea). Ela tem sido encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma celular, reforçando a suposição de que exerça papel de transportadora de RNAs (Siomi *et al.*, 1994, Eberhart *et al.*, 1996; Oostra & Hoogeveen, 1997). A proteína fmr-1 também possui seqüências RGG (domínios ricos em glicina), o que enfatiza a proposição de ligação a polirribossomos, como uma partícula ribonucleoprotéica (Brown *et al.*, 1998).

Provavelmente, a síndrome do cromossomo X frágil é decorrente da perda de capacidade da proteína fmr-1 ligar-se a RNAs, pois o fenótipo também surge em decorrência da mutação de sentido errôneo (*missense*) Ile304Asn, no segundo domínio KH, que modifica o seu centro ativo (Reyniers *et al.*, 1996). Nos túbulos seminíferos, a expressão do gene parece estar relacionada com a proliferação das espermatogônias, o que poderia explicar o baixo número de espermatozóides maduros nos indivíduos afetados com fra(X) e, também, a raridade da transmissão da mutação completa de pai portador da pré-mutação para suas filhas (Reyniers *et al.*, 1993).

A detecção de portadores da síndrome do cromossomo X frágil, devido à elucidação dos mecanismos responsáveis pela sua manifestação, pode ser atualmente realizada também por técnicas moleculares. Esses testes são

importantes para confirmação do diagnóstico clínico, detecção de portadoras heterozigotas e para diagnóstico pré-natal. O tamanho da repetição de trinucleotídeos pode ser determinado por *Southern blotting* ou pela reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction).

A análise por *Southern blotting* envolve a digestão do DNA genômico por duas enzimas de restrição, a *EcoRI* e a *EagI*, seguida de hibridação com a sonda StB12.3, sendo capaz de definir não apenas a presença da expansão de trinucleotídeos, mas também investigar o estado de metilação do sítio de restrição correspondente a *EagI*, que não corta seqüências de DNA metilado (Rousseau *et al.*, 1995). Essa técnica possui o inconveniente de depender de grandes quantidades de DNA, uso de sondas radioativas e consumo maior de tempo, sendo a técnica de PCR uma alternativa para triagem populacional (Haddad *et al.*, 1996).

A metodologia que utiliza a técnica de PCR para avaliação do número de repetições de trinucleotídeos tem sido aperfeiçoada constantemente, para obter-se sucesso na amplificação dessas seqüências de DNA tão longas e ricas em CG. Haddad *et al.* (1996) descreveram um protocolo no qual a determinação de homens com a mutação completa ocorre exatamente pela falta de produto de amplificação, que é apenas detectado em homens portadores da pré-mutação e em indivíduos normais. Esse método não é sensível para a detecção de mulheres portadoras da pré-mutação e da mutação completa do gene *FMR-1*, em virtude da amplificação preferencial do seu alelo normal.

I.4. Marcadores Genéticos em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento

A investigação de marcadores genéticos também é outro aspecto que tem merecido atenção e alguns trabalhos têm trazido interessantes propostas de estudo, com resultados promissores na detecção de novos genes candidatos de susceptibilidade aos transtornos invasivos do desenvolvimento.

Algumas dessas investigações têm relatado a associação de genes e haplótipos HLA do complexo principal da histocompatibilidade (MHC) e autismo (Daniels *et al.*, 1995; Warren *et al.*, 1996a, b). Os locos HLA caracterizam-se como regiões hipervariáveis, herdadas como haplótipos, nos quais raramente ocorrem rearranjos. Daniels *et al.* (1995) descreveram uma frequência aumentada do haplótipo B44-SC30-DR4 em autismo, enquanto Warren *et al.* (1996a, b) relataram uma forte associação envolvendo alelos da terceira região hipervariável do haplótipo DR beta 1. Outros genes do MHC também podem ter papel importante no autismo e em outras alterações neurológicas infantis, como a dislexia e o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. Nessas duas condições, foi observada deleção homozigota do gene C4B, que ocasiona a falta de produção da proteína correspondente, com função de defesa do organismo contra vírus e bactérias (Warren *et al.*, 1996b).

A associação de polimorfismos de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) do oncogene *H-RAS* (C-Harvey-ras) e autismo já foram descritas por alguns autores (Hérault *et al.*, 1993, 1994, 1995; Comings *et al.*, 1996), sugerindo que defeitos nesse gene e possivelmente em outros componentes de proteínas mensageiras do tipo G podem ter um papel importante em algumas doenças neuropsiquiátricas. Hérault *et al.* (1993, 1994, 1995), através de análise de *Southern blotting* e PCR, obtiveram associação positiva entre autismo e dois marcadores *HRAS*. Os produtos desse oncogene, mapeado em 11p15.5, estão envolvidos na proliferação e diferenciação de células nervosas. A proteína ras

exerce atividade GTPase, estando relacionada com a atividade do fator de crescimento neuronal. Esse fator de crescimento tem função essencial na sobrevivência e manutenção dos neurônios simpáticos e sensoriais durante o desenvolvimento do sistema nervoso dos vertebrados. Portanto, presume-se que alterações nessa proteína possam afetar o funcionamento do sistema nervoso e conseqüentemente levar à manifestação de sinais autísticos.

Outros genes que têm despertado o interesse dos pesquisadores são os relacionados com produção, transporte e recepção da serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5HT). A serotonina é um neurotransmissor do sistema nervoso central e periférico. Após ser liberado nas sinapses cerebrais, ele pode ligar-se a receptores específicos ou ser recapturado ao neurônio pré-sináptico pelos seus transportadores. Investigações quanto aos genes responsáveis pelas diversas etapas da transmissão neuronal mediadas pela serotonina, em autismo e em outros transtornos neuropsiquiátricos, estão sendo realizadas, com achados relevantes para o esclarecimento da etiologia desses transtornos. Não foram encontradas evidências de ligação entre os genes da serotonina (5HT) ou um de seus receptores (5HT2A) em autismo (Hérault *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997b; Klauck *et al.*, 1997). Em estudos de polimorfismos de VNTR (Variable Number of Tandem Repeated DNA sequences), porém, houve associação entre uma variante do gene promotor do transportador da serotonina (5HTT) com autismo (Cook *et al.*, 1997b), e do alelo tipo 1 desse transportador com o transtorno obsessivo-compulsivo (McDougle *et al.*, 1998).

Poucos estudos de ligação de microssatélites em autismo foram realizados. As investigações inicialmente foram realizadas para marcadores no cromossomo X, devido a prevalência de homens entre as populações de autistas. Hallmayer *et al.* (1996b) e Petit *et al.* (1996) encontram marcadores com fraca associação, sendo estes localizados entre o DXS453 e o DXS1001, delimitando a região do cromossomo X compreendida entre as bandas Xq12 e Xq24

(Hallmayer *et al.*, 1996b) e a região próxima ao DXS287, mapeado em Xq23 (Petit *et al.*, 1996).

Em uma triagem mais ampla do genoma dos autistas recentemente realizada (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998) foram encontrados alguns marcadores de microssatélites com alta frequência de ligação ao autismo, localizados em seis cromossomos (4, 7, 10, 16, 19 e 22), especialmente aqueles mapeados em 7q, entre os marcadores D7S530 e D7S684, ou seja, entre as regiões 7q31 e 7q32.

Os estudos citogenéticos e moleculares em autismo, apesar de terem expandido nos últimos anos, ainda são restritos e pouco conclusivos, deixando evidente a importância da avaliação genética nesse grupo de indivíduos. Os resultados obtidos na presente pesquisa poderão contribuir no entendimento da etiologia e da patogênese dessa doença, assim como ter implicações diretas no aconselhamento genético das famílias.

II. OBJETIVOS

Em função do papel relevante dos fatores genéticos nos transtornos invasivos do desenvolvimento, de sua complexidade e heterogeneidade etiológica e do conhecimento restrito quanto aos mecanismos biológicos envolvidos em sua manifestação, o presente trabalho teve por objetivos:

- a) investigar a presença de anomalias cromossômicas constitucionais e do sítio frágil em Xq27.3 em indivíduos portadores desses distúrbios, através de técnicas de citogenética convencional e molecular;
- b) investigar a frequência da mutação dinâmica do gene *FMR-1* nos indivíduos do sexo masculino, através da técnica de PCR;
- c) sugerir, nos casos possíveis, a participação de regiões cromossômicas e de genes específicos na etiologia dos transtornos invasivos do desenvolvimento.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Em conformidade com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto para o desenvolvimento deste trabalho foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa, do IBILCE/UNESP- São José do Rio Preto-SP, tendo sido aprovado em reunião de 18 de fevereiro de 1998.

III.1. Casuística

A casuística foi constituída por trinta indivíduos da Escola Municipal do Autista, de São José do Rio Preto-SP, diagnosticados por sua equipe clínica multidisciplinar como portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento, segundo critérios do DSM-IV (APA, 1994) (Tabela 2). Desse grupo, 18 indivíduos eram do sexo masculino, com idades que variaram de cinco a 25 anos, com média e desvio padrão de $12,28 \pm 5,85$ anos, e 12 do sexo feminino, cujas idades variaram de sete a 30 anos, com média e desvio padrão de $16,91 \pm 7,44$ anos. Na Tabela 3 está apresentada a distribuição desses indivíduos segundo o diagnóstico clínico e o sexo.

A maior parte dos indivíduos apresentavam autismo (19 casos) e os demais apresentavam outros transtornos invasivos do desenvolvimento, sendo oito casos de transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação (PDD-NOS), um caso de síndrome de Rett e dois casos de síndrome de Asperger. Entre os indivíduos com PDD-NOS foi comum a ocorrência de outras condições neuropsiquiátricas, além dos sinais autísticos, de associação já estabelecida com os transtornos invasivos do desenvolvimento, como o retardo mental e a epilepsia (Tabela 4).

Tabela 2. Caracterização dos indivíduos estudados, quanto ao sexo, idade e diagnóstico clínico, segundo critérios do DSM-IV (APA, 1994).

Código	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico clínico
1394	F	21	Autismo
1395	M	6	Autismo
1397	M	20	Autismo
1408	M	10	Autismo
1409	M	6	Autismo
1410	M	12	Autismo
1431	M	7	Autismo
1432	F	19	Autismo
1448	M	10	Autismo
1450	M	10	Autismo
1459	M	5	Autismo
1460	F	20	Autismo
1462	M	14	Autismo
1464	F	11	Autismo
1824	M	12	Autismo
1830	M	22	Autismo
1903	F	18	Autismo
1968	M	18	Autismo
1974	F	9	Autismo
1428	F	30	PDD-NOS
1449	F	7	PDD-NOS
1398	F	29	PDD-NOS
1407	M	7	PDD-NOS
1426	F	9	PDD-NOS
1463	M	25	PDD-NOS
1461	M	12	PDD-NOS
1430	F	10	PDD-NOS
1829	F	20	Síndrome de Rett
1391	M	18	Síndrome de Asperger
1429	M	7	Síndrome de Asperger

M= masculino; F= feminino

PDD-NOS= transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação

Tabela 3. Distribuição dos indivíduos segundo o diagnóstico clínico e o sexo.

Diagnóstico clínico	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
Autismo	13	6	19
PDD-NOS	3	5	8
Síndrome de Rett	0	1	1
Síndrome de Asperger	2	0	2
Total	18	12	30

PDD-NOS= transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação

Tabela 4. Caracterização dos indivíduos estudados com PDD-NOS, segundo as condições neuropsiquiátricas associadas.

Código	Alteração neuropsiquiátrica
1428	NC
1449	Epilepsia
1398	Deficiência mental
1407	Deficiência mental
1426	Deficiência mental e epilepsia
1463	Deficiência mental e epilepsia
1461	ADNPM com quadro psicótico
1430	Quadro psicótico

PDD-NOS= transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação

ADNPM= atraso no desenvolvimento neuropsicomotor

NC= nada a constar

III.2. Métodos

III.2.1. Estudo citogenético

III.2.1.1. Citogenética convencional

Foram realizadas culturas de linfócitos, obtidos a partir da punção de sangue venoso periférico em seringa heparinizada com *Liquémine* (Roche). As culturas foram desenvolvidas segundo técnica padrão utilizada pelo Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia, UNESP de São José do Rio Preto-SP (Varella-Garcia & Tajara, 1991), com modificações. Para tanto foram utilizados o meio de cultura TC 199 (Cultilab) suplementado com 5% e 15% de soro fetal bovino e o meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 20% de soro fetal bovino. Em ambos os meios, foram acrescentados penicilina (100 U/mL) e quemisetina (100 U/mL) e para o estímulo mitogênico foi utilizada a fito-hemaglutinina (PHA-Gibco).

A expressão do sítio frágil Xq27.3 foi investigada em dois sistemas de indução, utilizando-se a fluordesoxiuridina (FudR) e a trimetoprima (TMP). Para cada sistema foram feitas três réplicas com um total de 15 mL de meio, 1,5 mL de plasma e 0,6 mL de PHA, que após homogeneizado foi distribuído igualmente em três frascos de cultura. No sistema com FudR foi utilizado o meio TC 199 com 15% de soro fetal bovino ao qual foi acrescentado 10 $\mu\text{L/mL}$ de FudR, resultando na concentração final de 2×10^{-7} M, e no sistema com TMP foi utilizado o meio TC 199 com 5% de soro fetal bovino, acrescentado de 20 $\mu\text{L/mL}$ de TMP, numa concentração final de 26 $\mu\text{g/mL}$. Ambas as drogas foram introduzidas 24 horas antes da colheita e os frascos foram cobertos com papel alumínio.

Também foram semeadas três réplicas com o meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino nas mesmas quantidades já descritas. Essas culturas foram utilizadas para a análise do cariótipo ou para análise com técnicas complementares.

Todas as culturas foram mantidas a 37°C por cerca de 72 horas e, uma hora antes da colheita, procedeu-se a interrupção da divisão celular, com a adição de 0,1 ml de solução de colquicina Houdé 4×10^{-5} M, em cada réplica. Após o bloqueio celular, o material foi centrifugado, o sedimento hipotonizado com KCl 0,075 M por 10 minutos a 37°C e fixado em metanol:ácido acético (3:1). A suspensão celular foi gotejada em lâminas úmidas e geladas.

As lâminas foram submetidas à técnica de bandamento GTG, descrita por De Grouchy & Turleau (1982), com modificações. Tal procedimento consistiu de banhos de dois minutos cada em álcool metílico 50%, água desionizada gelada e tampão Sorensen pH 7,8. O material foi submetido à digestão enzimática por cerca de cinco segundos em solução de tripsina (Difco 1:250) 0,03% diluída em 1xPBS. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução de 1xPBS, e após dois minutos, coradas com solução tamponada de Giemsa 2% por quatro minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

Para elucidação de um rearranjo cromossômico, em um dos casos estudados, foi realizada a investigação das regiões de heterocromatina constitutiva e dos organizadores nucleolares. Para tanto, foram empregadas as técnicas de bandamento CBG com hidróxido de bário, segundo Sumner (1972), e de bandamento Ag-NOR, conforme Howell & Black (1980).

A técnica de banda CBG consistiu basicamente num tratamento prévio da lâmina em HCl 0,2 N por 15 minutos e, após, com hidróxido de bário $[Ba(OH)_2]$ aquecido a $37^\circ C$ e recém filtrado, por um período variável de sete a 10 minutos. Após alguns banhos em água desionizada, as lâminas foram incubadas em 2xSSC à temperatura ambiente por 10 minutos e a $60^\circ C$ por uma hora. Em seguida, foram lavadas em água desionizada gelada e mergulhadas em banhos de álcoois 70% e 95%. As lâminas foram então coradas com solução tamponada de Giemsa 2% por 20 minutos, lavadas em água corrente e secas ao ar.

A técnica de bandamento Ag-NOR consistiu na adição de algumas gotas de solução coloidal reveladora e solução aquosa de nitrato de prata 50% sobre as lâminas, mantidas à temperatura entre $55^\circ C$ a $60^\circ C$ em câmara úmida, por cerca de sete minutos. Após tal processo, as lâminas foram lavadas em água corrente e coradas com solução tamponada de Giemsa 2%.

De cada caso, foram analisadas pelo menos 50 metáfases em bandamento GTG em um ou ambos sistemas de indução de sítios frágeis, sendo os cromossomos identificados segundo as normas da ISCN (1995). As metáfases foram analisadas em microscópio da marca Carl Zeiss, modelo Jenaval, em objetiva de 100x, ocular de 10x e optovar de 1,25x (aumento final de 1250x). As metáfases com alterações foram fotografadas para documentação em microscópio da marca Carl Zeiss, modelo Standard WL, com equipamento fotográfico MC 63, em filme Ilford 100 ASA. Os negativos foram revelados em solução KodaK D-72 e copiados em papel Kodabrome F3.



III.2.1.2. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Quando necessário para elucidação de alguma alteração detectada pelas técnicas citogenéticas convencionais, foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo a técnica de Knoll *et al.*, (1993), com modificações. Para tanto, as áreas ideais para hibridação, ou seja, contendo maior densidade de metáfases com bom espalhamento cromossômico, foram assinaladas com um lápis diamante, na face inferior de lâminas envelhecidas previamente por cerca de dez dias à temperatura ambiente.

Inicialmente, processou-se o pré-tratamento das lâminas, que consistiu de desidratação em etanol 70%, 85% e 100% por dois minutos cada, à temperatura ambiente, seguido de secagem ao ar. Logo após, as mesmas foram banhadas em ácido acético 70%, durante um minuto e meio, lavadas em três banhos de 1xPBS por cinco minutos em cada banho e novamente submetidas à desidratação. Depois de secas, as lâminas foram submetidas à digestão com solução de RNase (100µg/mL) durante 45 minutos, em câmara úmida a 37°C.

Posteriormente, o material foi lavado em três banhos de 2xSSC, por cinco minutos cada, desidratado e então submetido à digestão enzimática em solução de pepsina 0,008% a 37°C, durante cinco minutos. Imediatamente, iniciou-se a fixação em formaldeído 4% a 37°C durante cinco minutos, lavagem em 1xPBS à temperatura ambiente por cinco minutos e novamente a desidratação.

A desnaturação do material foi realizada em solução de formamida 70%, pH 7,0 a 75°C, durante dois minutos, seguida de desidratação a -20°C.

Para a hibridação, foram utilizadas sondas fluorescentes com marcação direta, específicas para regiões do cromossomo 15, ou seja, a sonda alfa-centromérica D15Z1, marcada com Spectrum Green (cedida pela Profa. Dra. Marileila Varela Garcia, Cancer Center, University of Colorado Health Sciences



Center, USA) e as sondas de sequência única D15S10 e SNRPN (Vysis), incluindo o controle PML, todas marcadas com Spectrum Orange. Os marcadores D15S10 e SNRPN estão mapeados em 15q11-q13 e o controle PML na região 15q22.

As sondas foram preparadas segundo o protocolo do fabricante. Inicialmente, foram diluídas na solução de Hybrisol 65% que acompanha tais sondas, desnaturadas a 70°C por cinco minutos e imediatamente aplicadas na área de hibridação desejada. Para a hibridação, foram colocados 10µL da solução de sonda sobre as lâminas, cobertas com lamínulas de vidro, sendo imediatamente vedadas com selante e incubadas em câmara umedecida com água a 37°C, por um período de 48 horas.

Após o período de incubação, o selante foi retirado e as lâminas foram mergulhadas em 2xSSC para remoção das lamínulas. Em seguida, foram lavadas para retirar o excesso de sonda, em três banhos consecutivos de formamida 50% a 37°C, por cinco minutos cada e em três banhos de 2xSSC a 37°C, também por cinco minutos cada, com agitação periódica. Posteriormente, foram lavadas em solução de NP40 0,5% a 37°C durante seis minutos. Após um banho rápido em 2xSSC à temperatura ambiente, as lâminas foram desidratadas e secas ao ar. Finalmente, receberam 12 µL do contracolorante DAPI e, então, foram cobertas com lamínula de vidro.

A análise foi realizada em microscópio Carl Zeiss Axioskop com lâmpada HBO 50W, equipado com filtro para DAPI, FITC, rodamina e filtro triplo, tendo sido analisadas 30 metáfases para cada sonda. Para documentação, os sinais foram capturados em câmera CCD (NU200, Photometrics, Tucson, AZ) e pseudocoloridos através do programa *Oncor-image*, etapa essa gentilmente realizada pela Profa. Dra. Marileila Varela Garcia, Cancer Center, University of Colorado Health Sciences Center, USA.

III.2.2. Estudo molecular

III.2.2.1. Extração de DNA de leucócitos

O DNA genômico de cada indivíduo foi obtido a partir de leucócitos de sangue venoso periférico, segundo a técnica descrita por Pena *et al.* (1991), com modificações. O volume de 5 mL de sangue venoso periférico foi coletado em tubo *vacutainer* com EDTA, transferido para tubo de polipropileno, completado com solução de lise (sacarose 0,32M, TRIS-HCl pH 7,4 10mM, $MgCl_2$ 5 mM, Triton X-100 1%) até o volume de 12 mL, homogeneizado e centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento com leucócitos ressuspensionado em 4,5 mL de solução 2 (NaCl 0,075M, EDTA 0,02M), ao qual foram adicionados 250 μ L de SDS 10% e 25 μ L de proteinase K (20 mg/mL). Após incubação durante a noite a 37°C, foram adicionados 5 mL de fenol pH 7,8, homogeneizado por inversão e centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno, homogeneizado com 5 mL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 e centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos. Esse procedimento de eliminação de resíduos de fenol foi repetido uma vez.

Em sequência, em outro tubo de polipropileno acondicionado no gelo, foram colocados 500 μ L de KCl 2M e sobre esse, adicionado o sobrenadante do tubo submetido à centrifugação. O volume foi completado com etanol gelado até 14 mL e o tubo invertido várias vezes até visualização do DNA, precipitado em forma de fios brancos enovelados. O DNA foi coletado com um capilar de vidro encurvado e lavado duas vezes com etanol 70% gelado. Após secagem ao ar, o DNA foi ressuspensionado em 250 μ L de tampão TE (TRIS-HCl pH 7,4 10 mM, EDTA 1 mM), e permaneceu em banho-maria a 65°C por 30 minutos, sendo em seguida armazenado a -20°C. A estimativa da concentração do DNA foi realizada através de leitura em espectrofotômetro (GeneQuant, Pharmacia).

III.2.2.2. Investigação de polimorfismo no gene *FMR-1*

A investigação do polimorfismo de repetições de trinucleotídeos CGG, presente no gene *FMR-1* responsável pela síndrome do cromossomo X frágil, foi realizada segundo técnica descrita por 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). Para tanto, foi utilizada a técnica *hot-start*, em volume final de 25 μ L de reação para cada indivíduo, em microtubos de polipropileno de 0,5 mL. Inicialmente, preparou-se uma solução de 21 μ L contendo todos os reagentes, exceto as amostras de DNA genômico e a Taq DNA polimerase. As concentrações finais dos reagentes na solução de 25 μ L foram: KCl 50 mM, TRIS-HCl 10 mM, Triton X-100 0,1%, $MgCl_2$ 2,0 mM, dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, 200 μ M de cada dATP, dCTP, dTTP, 50 μ M de dGTP, 150 μ M de 7-deaza-dGTP, 0,08 μ M do *primer* Eag-L (30 pb), 0,3 μ M do *primer* Eag-U (27 pb) e 0,2 μ M do *primer* f (30 pb). Tais *primers* foram descritos por Haddad *et al.* (1996), sendo os *primers* Eag-U e Eag-L desenhados por esses autores, e o *primer* f desenhado por Fu *et al.* (1991):

Eag-U = 5' cgacctgtcaccgcccttcagccttcc 3' (sense)

f = 5' agccccgcacttccaccaccagctcctcca 3' (antisense)

Eag-L = 5' cgctgcgggtgtaaactgaaaccacgtc 3' (antisense)

Em seguida, à solução de reação foram adicionados 2 μ L de DNA genômico em concentração de 50 ng/ μ L e uma gota de óleo mineral. Para cada grupo de indivíduos investigados, foi utilizado um controle positivo (amostra de portador da mutação completa do gene *FMR-1*), um controle negativo (não-portador da mutação) e um controle sem DNA (para verificar a ocorrência de contaminação das reações). Posteriormente, os tubos foram levados ao

termociclador (MJ Research) e submetidos ao programa XFRA, que consistiu em um primeiro ciclo a 98°C durante 10 minutos, segundo ciclo a 72°C por 12 minutos e os ciclos seguintes consistindo nas etapas de desnaturação a 94°C por um minuto e meio, hibridação dos *primers* a 65°C por um minuto, e extensão da cadeia a 72°C por dois minutos, repetidas 35 vezes, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Durante o segundo ciclo desse programa, após três a cinco minutos, foram adicionados em cada tubo 2 µL de Taq DNA polimerase, diluída a 0,8 µM em KCl 50 mM, TRIS- HCl 10 mM e Triton X-100 0,1%. Após o término da amplificação, as amostras foram estocadas a 4°C.

O resultado da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 6%. De cada amostra foram homogeneizados 5 µL de produto amplificado com igual volume da solução: TEB 2x, azul de bromofenol 0,1%, xileno-cianol 0,1%, Ficoll 400 0,10%. Logo após, o homogeneizado foi aplicado no gel de poliacrilamida e submetido a eletroforese em tampão TEB 0,5x, sob voltagem constante de 100 V. Após o xileno cianol ter migrado aproximadamente 7 cm do topo do gel, a eletroforese foi interrompida e o gel corado segundo o método descrito por Santos *et al.* (1993), que consistiu em etapas sequenciais de fixação (135 mL de água, 15 mL de etanol, 1,15 mL de ácido acético), coloração com solução de nitrato de prata 2% (0,3g de nitrato de prata, 150 mL de água), revelação (4,5g de hidróxido de sódio, 450 µL de formaldeído, 150 mL de água) e novamente fixação. O gel foi fotografado em sistema de câmera digital Ricoh e posteriormente analisado. Os indivíduos portadores da síndrome do cromossomo X frágil foram identificados pela ausência da banda polimórfica, de cerca de 550 pb, revelando a presença da mutação completa. A exclusão de falso-positivo foi definida pela presença do controle interno (banda de 223pb).



Na Figura 1, está representado o segmento do gene compreendido entre as posições 13381 e 14100, mostrando as posições de hibridação dos *primers*, a região de polimorfismo das repetições CGG e o sítio de restrição da enzima *EagI*. Os *primers* Eag-U e f flanqueiam a região de polimorfismo das repetições CGG, produzindo um fragmento de amplificação de tamanho entre 488 a 632 pb 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 223 pb 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 eficiência da reação de PCR para cada caso.

13381 gggataaccg gatgcatttg atttccacg cactgagtg cacctctgca gaaatgggcg
13441 ttctggccct cgcgaggcag tgCGACCTGT CACCGCCCTT CAGCCTTCCc gccctccacc
primer Eag-U→
13501 aagcccgcgc acgcccggcc cgcgcgtctg tttttcgacc cggcacc~~cgc~~ gcccgttccc
EagI
13561 agcagcgcgc atgcgcgcgc tcccaggcca cttgaagaga gagggggggg ccgaggggct
13621 gagcccgcgg ggggagggaa cagcgttgat cacgtGACGT GGTTCAGTG TTTACACCG
← primer Eag-L
13681 CAGCGggccg ggggttcggc ctcagtcagg cgctcagctc cgtttcgggt tcaactccgg
13741 tggagggccg cctctgagcg ggcggcgggc cgacggcgag cgcggggcgc ggcggtgacg
13801 gaggcgccgc tgccaggggg cgtgcggcag cg~~cg~~ggcgcg ~~gc~~ggcgcgcg ~~cg~~ggcgcgcg
13861 ~~gg~~agggcgcg ~~gc~~ggcgcgcg ~~cg~~ggcgcgcg ~~gg~~ctgggcct cgagcgccc cagcccacct
13921 ctcgggggcg ggctcccggc gctagcaggg ctgaagagaa gaTGGAGGAG CTGGTGGTGG
← f
13981 AAGTGCGGGG CTccaatggc gctttctaca aggtacttgg ctctagggca ggccccatct
14041 tcgcccttcc ttccctccct tttttctttg gtgtcggcgg gaggcaggcc cggggccctc

Figura 1. Representação do local de anelamento dos *primers* (Eag-U, Eag-L e f), da região polimórfica (CGG)₁₀AGG(CGG)₉, e do sítio de restrição da enzima *EagI* (C/GGCCCG), sobre a região do gene *FMR-1* estudada no presente trabalho [GenBank (L29074)].

IV.RESULTADOS

IV.1. Avaliação citogenética

Os resultados da análise citogenética estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Entre os trinta indivíduos avaliados, dois (6,7%) apresentaram o sítio frágil Xq27.3 (casos 1397 e 1461) e outros dois indivíduos apresentaram anomalias cromossômicas constitucionais (casos 1394 e 1449). No caso 1394 foi observado mosaicismo 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36) e no caso 1449 um cromossomo marcador extranumerário derivado do 15. Quando foram considerados apenas os 19 indivíduos com diagnóstico de autismo, a frequência de achados citogenéticos foi 10,5% (casos 1394 e 1397). Entre os outros transtornos invasivos do desenvolvimento, esta frequência foi 18,1% (1449 e 1461). Assim, a frequência total de alterações na amostra estudada, considerando-se o fra(X)(q27.3) e as anomalias cromossômicas constitucionais, foi 13,3% (4/30).

Os dois indivíduos portadores do sítio frágil em Xq27.3 eram do sexo masculino, os casos 1397 e 1461 (Figura 2). O indivíduo 1397, do grupo de autistas, apresentou três metáfases com esta alteração, entre 64 analisadas (4,7% das células), nas culturas com FudR. No sistema de indução com trimetoprima, porém, a fragilidade não foi observada. No indivíduo 1461, com diagnóstico de quadro psicótico e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, foram encontradas três metáfases com este sítio frágil entre as 50 analisadas, no sistema com FudR. Ambos indivíduos apresentavam os sinais clínicos característicos da síndrome do cromossomo X frágil.

Tabela 5. Resultado da análise citogenética nos indivíduos autistas, realizado com os sistemas de indução de sítios frágeis. TMP= trimetoprima; FudR= fluordesoxiuridina; o traço (-) indica a ausência de alterações.

Código	Sistema de indução de sítios frágeis						Cariótipo
	TMP			FudR			
	Nº de células	Tipo de alteração	Freq. %	Nº de células	Tipo de alteração	Freq. %	
1394	110	inv(7)(p15q36)	2				46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36)
1395	50	-	-				46,XY
1397	50	-	-	64	fra(X)(q27.3)	4,7	46,Y, fra(X)(q27.3)
1408				50	-	-	46,XY
1409				50	-	-	46,XY
1410	50	-	-				46,XY
1431				50	-	-	46,XY
1432				50	-	-	46,XX
1448				50	-	-	46,XY
1450				50	-	-	46,XY
1459				50	-	-	46,XY
1460				50	-	-	46,XX
1462				50	-	-	46,XY
1464				50	fra(1)(q32)	4	46,XX
1824				50	-	-	46,XY
1830	50	-	-	100	-	-	46,XY
1903	50	-	-	50	-	-	46,XX
1968				100	chrb(Xq27-28)	3	46,XY
1974	50	-	-	50	fra(6)(q26)	4	46,XX

Tabela 6. Resultado da análise citogenética nos indivíduos portadores de outros transtornos invasivos do desenvolvimento, que não o autismo, realizado com os sistemas de indução de sítios frágeis. TMP= trimetoprima; FudR= fluordesoxiuridina; o traço (-) indica a ausência de alterações.

Código	Sistema de indução de sítios frágeis						Cariótipo
	TMP			FudR			
	Nº de células	Tipo de alteração	Freq. %	Nº de células	Tipo de alteração	Freq. %	
1391	50	-	-	50	-	-	46,XY
1398	50	-	-	50	-	-	46,XX
1407	50	-	-				46,XY
1426				50	fra(1)(q21)	4	46,XX
					fra(3)(p14)	4	
					fra(X)(q22)	4	
1428	50	-	-				46,XX
1429	50	-	-	50	-	-	46,XY
1430				50	fra(1)(q21)	8	46,XX
1449				50	der(15)	100	47,XX,der(15)
1461				50	fra(X)(q27.3)	6	46,Y, fra(X)(q27.3)
1463	50	-	-				46,XY
1829	50	-	-	50	-	-	46,XX



Figura 2

Ainda entre os indivíduos autistas, o caso 1968, do sexo masculino apresentou quebras em Xq27~q28 em três metáfases (3%) entre 100 metáfases analisadas no sistema com FudR. Este indivíduo, porém, não apresentava sinais da síndrome do cromossomo X frágil.

Os sistemas de indução utilizados para avaliação da presença do fra(X)(q27.3) permitiram também a detecção de alguns sítios frágeis comuns, sendo estes os sítios frágeis 1q21 (casos 1426, 1430), 1q32 (1464), 3p14 (1426), 6q26 (1974) e Xq22 (1426), todos detectados no sistema com FudR.

Além do fra(X)(q27.3), no grupo de indivíduos com diagnóstico de autismo, foi observada no indivíduo 1394, do sexo feminino, a inv(7)(p15q36) em duas metáfases num total de cento e dez células analisadas (Figura 3). Este achado pode sugerir um mosaicismo em frequência muito baixa (inferior a 2% em linfócitos circulantes), pois as metáfases alteradas foram encontradas em lâminas obtidas de frascos de cultivo diferentes. Portanto, foi proposto o cariótipo 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36). A investigação em fibroblastos não foi possível, devido ao fato dos pais da paciente não terem autorizado a biópsia de pele.

Dentre os indivíduos com outros transtornos invasivos do desenvolvimento, foi também detectada alteração cariotípica constitucional no caso 1449. Este indivíduo, do sexo feminino e portadora de traços autísticos associado a crises epiléticas de difícil controle, apresentou um cromossomo marcador adicional em todas as células analisadas. Em bandamento GTG (Figura 4A), este marcador acrocêntrico satelitado apresentou padrão compatível com o cromossomo 15, provavelmente até a região 15q21, sugerindo o cariótipo 47,XX,+der(15).

Figura 3

Figura 3. Cariograma do indivíduo 1394, em bandamento GTG, apresentando a inversão do cromossomo 7 [46,XX,inv7(p15q36)].

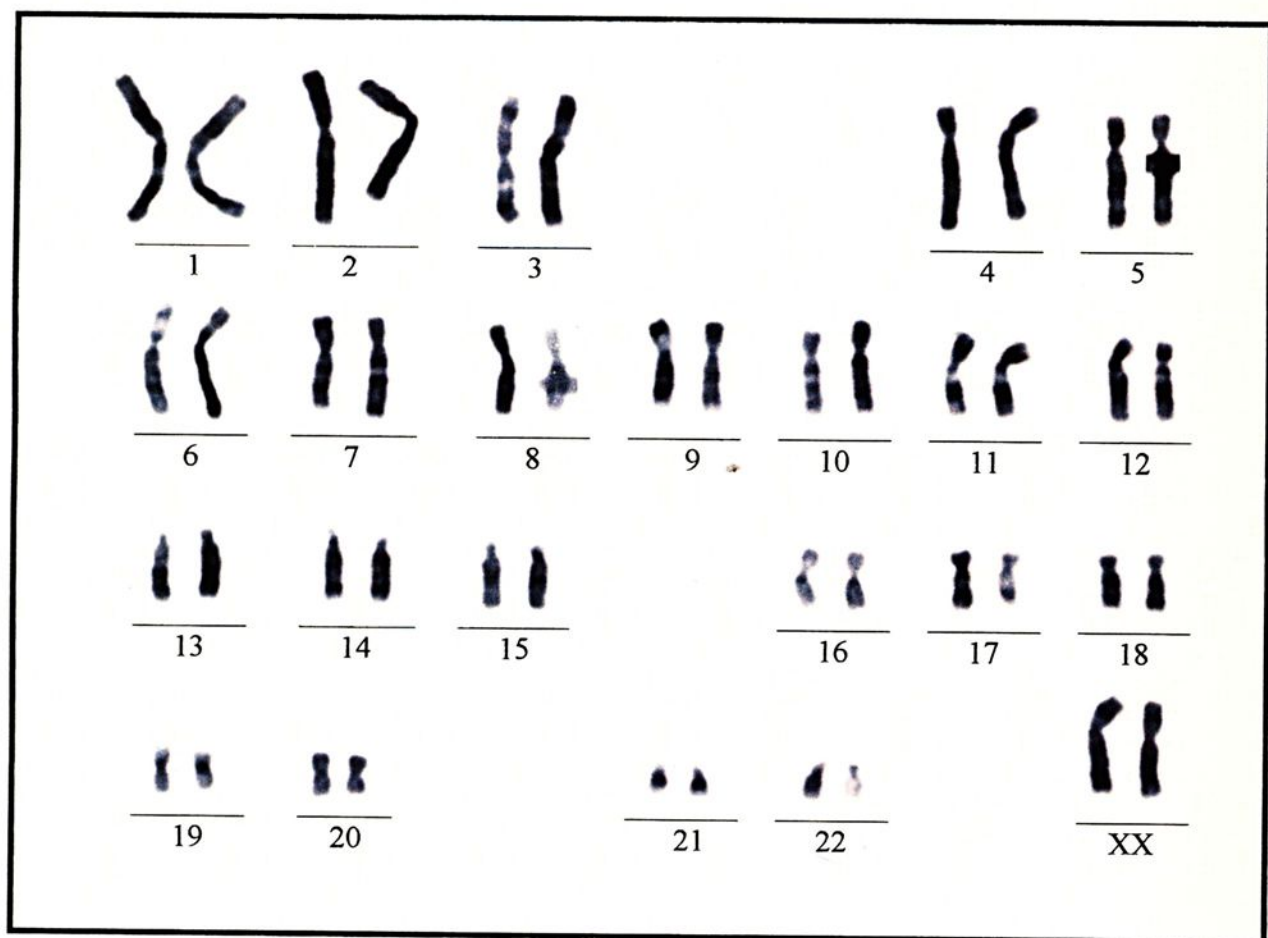
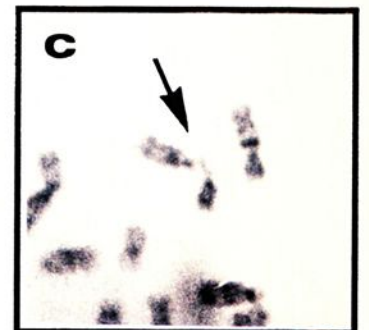
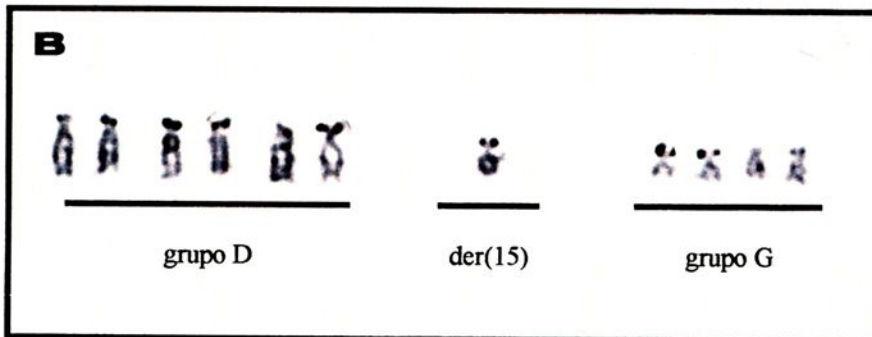
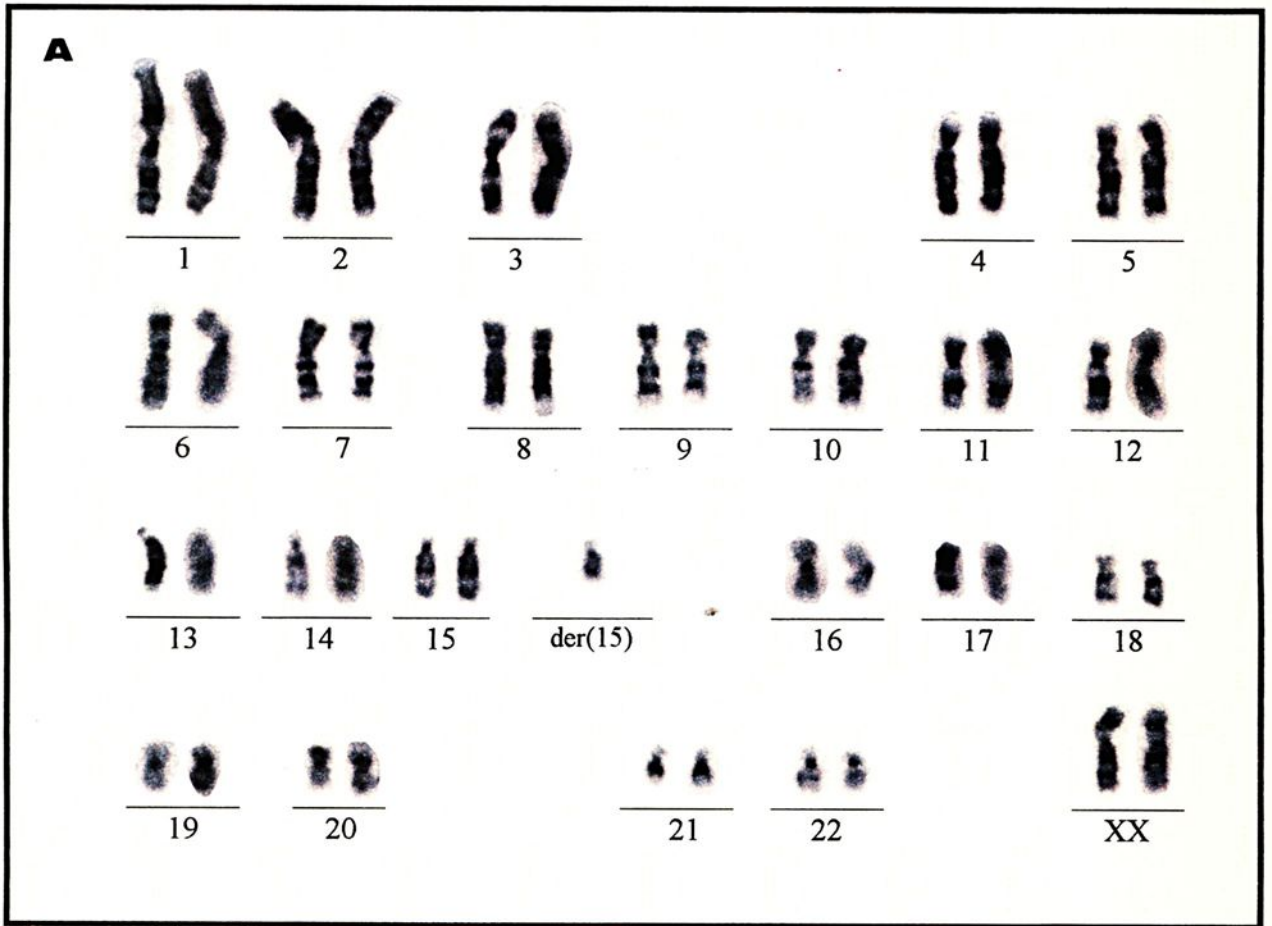


Figura 4

Figura 4. Cariograma do indivíduo 1449, em bandamento GTG, apresentando o cromossomo extranumerário derivado do 15 [47,XX,+der(15)] (A); cariograma parcial em bandamento Ag-NOR mostrando o marcador satelitado (B); e metáfase parcial, em bandamento GTG, indicando pela seta, associação de satélites entre o marcador e o cromossomo 14 (C).

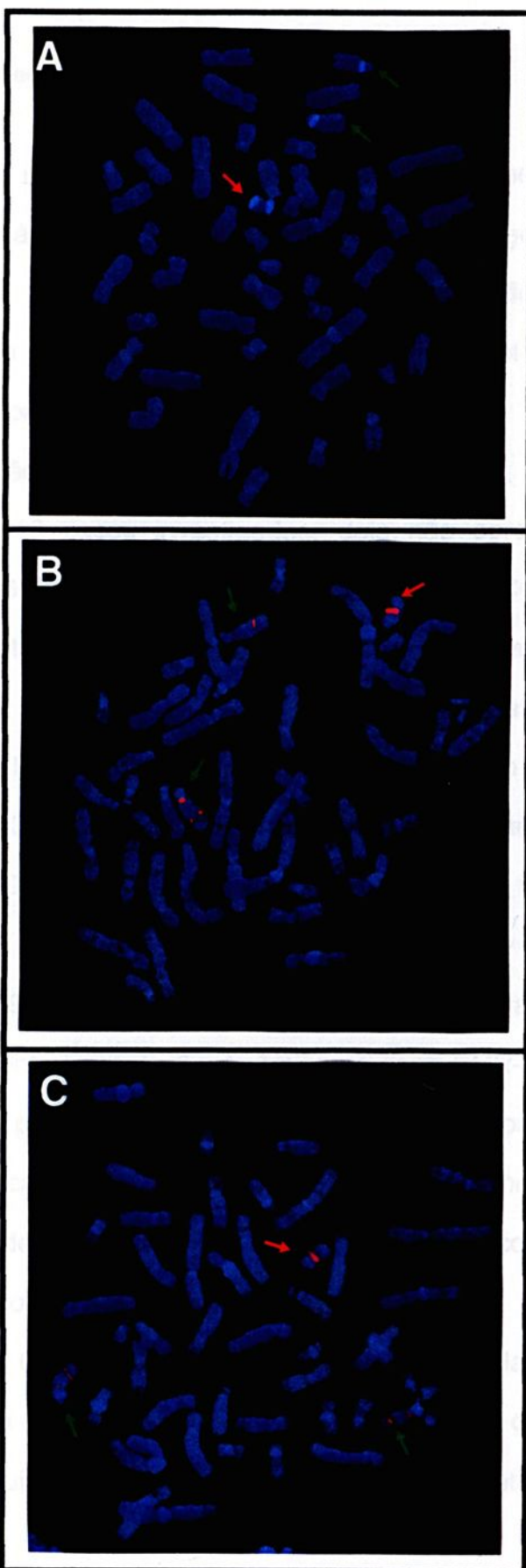


Em bandamento Ag-NOR, o marcador apresentou marcação positiva na região organizadora nucleolar (Figura 4B) e, durante a análise citogenética foi observado em associação de satélites com outros cromossomos acrocêntricos (Figura 4C). O bandamento CBG evidenciou marcação do centrômero e da extremidade distal do braço longo, indicando a presença de heterocromatina constitutiva em ambas as extremidades. A investigação dos pais revelou constituição cromossômica normal.

A análise deste marcador em FISH com a sonda alfa-centromérica do 15 (D15Z1) e as sondas de sequência única dos genes D15S10 e SNRPN, mapeados em 15q11-q13 e do controle PML, mapeado em 15q22, confirmou a origem do marcador como der(15), evidenciando um sinal brilhante no centrômero e também presença de heterocromatina constitutiva na região distal do braço longo (Figura 5A). Os cromossomos 15 normais apresentaram sinais de hibridação correspondentes ao centrômero e dois sinais brilhantes correspondentes, respectivamente, às sondas D15S10 e PML e às sondas SNRPN e PML. No marcador era evidente, além da marcação fluorescente no centrômero e na região 15q distal, as marcações equivalentes às sondas D15S10 (Figura 5B) e SNRPN (Figura 5C), não apresentando sinal de hibridação com o controle PML. O cariótipo foi, então, estabelecido como 47,XX,+mar.ish der(15)(D15Z1+, D15S10+, SNRPN+, PML-).

Figura 5

Figura 5. Métafases hibridadas com a sonda alfa-centromérica D15Z1 (A), marcada com Spectrum Green (sinais verdes) e as sondas de sequência única D15S10 e PML (B) e SNRPN e PML (C), marcadas com Spectrum Orange (sinais vermelhos). Os cromossomos são contracolorados com DAPI. Os cromossomos 15 homólogos normais exibiram os sinais fluorescentes esperados nos três ensaios de FISH. O cromossomo extranumerário derivado do 15 exibiu dois sinais centroméricos e os sinais para as sondas D15S10 e SNRPN, da região 15q11-q13. As setas verdes indicam os cromossomos 15 normais, e a seta vermelha indica o cromossomo marcador.



IV.2. Avaliação molecular

Todos os indivíduos do sexo masculino do presente estudo foram investigados quanto à ocorrência de mutação dinâmica no gene *FMR-1*, através da técnica de PCR. Após amplificação da região polimórfica do gene *FMR-1*, com a utilização dos *primers* Eag-U, Eag-L e f, foi possível a identificação dos indivíduos normais para o número de repetições CGG e a identificação dos portadores da mutação completa deste gene.

Entre os 18 casos investigados, dois não apresentaram a banda polimórfica, de 500-600pb, em consequência da repetição CGG do gene *FMR-1* (FRAXA), sendo, portanto, portadores da mutação responsável pela síndrome do cromossomo X frágil. Estes indivíduos correspondiam aos casos 1397 e 1461, os quais, durante a avaliação citogenética, expressaram o sítio frágil em Xq27.3. A mutação do caso 1397 foi gentilmente confirmada pela técnica de *Southern blotting*, pela Profa. Dra. Angela V. Morgante, do Instituto de Biociências da USP-SP.

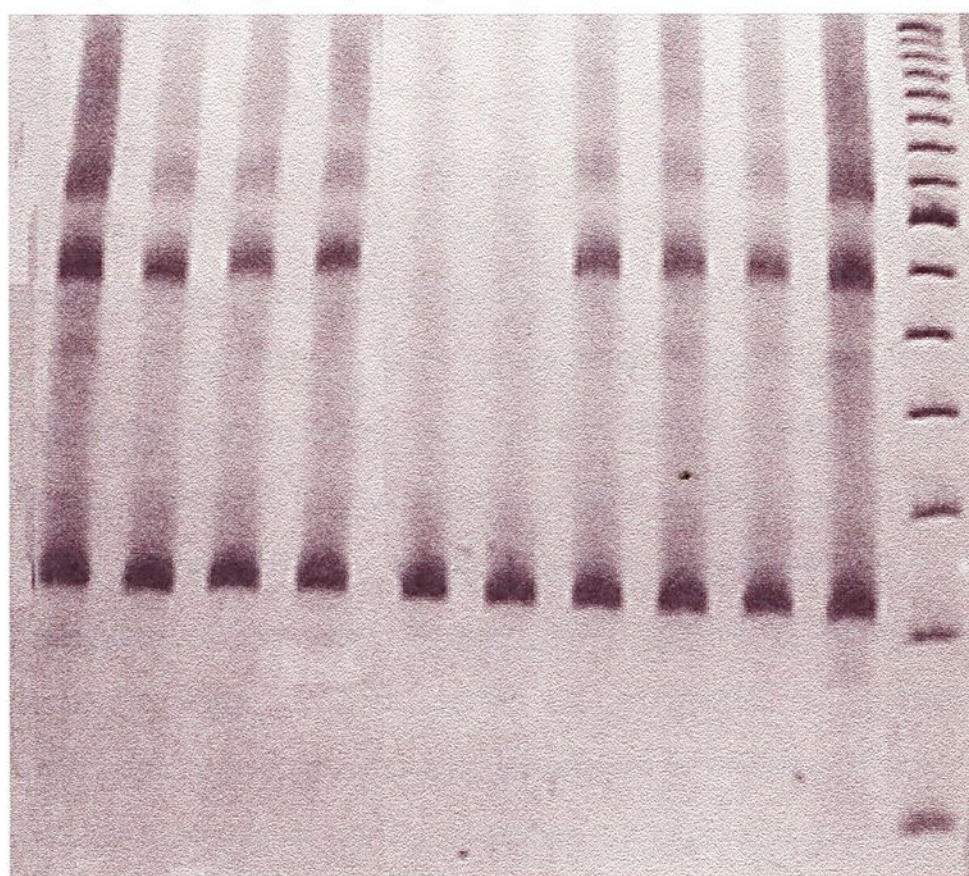
O caso 1968 no qual 3% das metáfases mostraram fragilidade em Xq27-28, não apresentou a mutação dinâmica no gene *FMR-1*. A análise do DNA genômico por PCR, para amplificação no gene *FMR-1*, mostrou padrão normal (fragmento com cerca de 550 pb) e a análise por *Southern blotting* também excluiu a presença de mutação. Assim, este achado foi considerado como um resultado citogenético falso-positivo para o FRAXA.

Na Figura 6 são apresentados os resultados relativos a investigação da mutação no gene *FMR-1*, em gel de poliacrilamida 6%, de dez indivíduos do sexo masculino, incluindo os portadores da mutação completa (linhas 5 e 6).

Figura 6

Figura 6. Imagem do gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, evidenciando a ausência da banda polimórfica (500-600 pb) nos indivíduos 1397 e 1461, portadores da mutação completa do gene *FMR-1* (linhas 5 e 6) e a presença de tal banda nos indivíduos sem a mutação, casos 1395, 1408, 1409, 1410, 1431, 1448, 1450 e 1459, correspondendo respectivamente às linhas 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10. A linha 11 indica o marcador de peso molecular de 100 pb.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



500pb

200pb

V. DISCUSSÃO

O termo transtorno invasivo do desenvolvimento é aplicado aos transtornos qualitativos da comunicação e interação social, com manifestação precoce, geralmente nos primeiros cinco anos de vida. O diagnóstico é baseado em critérios comportamentais e em prejuízos observados nas áreas de linguagem, aprendizado e habilidades motoras (CID 10, 1993; APA, 1994). Os 30 indivíduos estudados no presente estudo, após avaliação multidisciplinar, realizada por profissionais especializados, foram diagnosticados como portadores de distúrbios pertencentes a essa categoria de transtornos.

Dezenove indivíduos apresentaram o diagnóstico de autismo. Neste grupo, treze eram do sexo masculino e seis do sexo feminino, resultando em uma taxa sexual de 2,17:1. Esta taxa foi inferior à relatada por outros estudos, que referem valores entre três a quatro homens autistas para cada mulher afetada (Tranebjaerg & Kure, 1991; Smalley, 1997). Apesar da diferença encontrada em relação a esses autores, pôde ser observada no presente estudo a predominância do sexo masculino em relação ao feminino. Ainda não existe uma explicação conclusiva para a existência de maior número de autistas do sexo masculino, mas algumas hipóteses já foram levantadas. Uma das possibilidades consideradas refere-se à importância de genes localizados no cromossomo X, que atuariam como desencadeadores do autismo ou, pelo menos, teriam papel importante em sua susceptibilidade (Tranebjaerg & Kure, 1991). Essa hipótese é reforçada pelo fato do autismo ser uma condição freqüentemente encontrada em indivíduos com síndrome do cromossomo X frágil, com aproximadamente 7% dos autistas sendo portadores dessa síndrome. Como os homens têm somente um cromossomo X, eles são mais vulneráveis aos efeitos deletérios de genes

desse cromossomo, sendo então mais significativamente afetados pelo fra(X) do que o sexo feminino. As deficiências físicas e cognitivas nas mulheres heterozigotas são geralmente menos severas do que aquelas dos homens e, dessa forma, podem não ser reconhecidas entre os membros de famílias afetadas pela síndrome do cromossomo X frágil (Hagerman *et al.*, 1992).

Em estudo comparativo entre os sexos, avaliando autistas de mesma idade e nível de inteligência, McLennam *et al.* (1993) relataram menor grau de comprometimento social nas garotas autistas, sobretudo naquelas de idade precoce. Porém, a situação invertia-se quando comparados grupos de adolescentes e adultos, onde as mulheres eram mais severamente afetadas. Uma possível explicação para esses achados é a necessidade maior da comunicação verbal no sexo feminino para a integração social, enquanto no sexo masculino predominam as habilidades viso-espaciais, empregadas, por exemplo, na integração social através dos esportes de grupo. Sendo a fala uma habilidade com prejuízo acentuado no autismo, pode-se supor que a inabilidade de comunicação seja mais comprometedora no estabelecimento de relações sociais para as mulheres do que para os homens.

Outra hipótese sobre a maior ocorrência de homens afetados pelo autismo foi sugerida por Gillberg (1992a). Segundo ele, o modelo diagnóstico do autismo foi delineado segundo observações feitas em indivíduos do sexo masculino. A mesma condição autista, em mulheres, é possivelmente menos típica, com diferenças resultantes da própria identidade feminina. Assim, muitas vezes, o diagnóstico de autismo é erroneamente descartado pelo pesquisador, que acaba por incluir essas mulheres em outra categoria diagnóstica com sinais autísticos.

O grupo dos indivíduos com outros transtornos invasivos do desenvolvimento, apesar de pequeno em número, mostrou no presente estudo taxa sexual de 0,83 homem afetado para cada mulher, o que reforçou a sugestão que o critério diagnóstico aplicado para o autismo seja um fator de desvio da taxa sexual em direção ao sexo masculino. Nos demais transtornos invasivos do desenvolvimento, embora também sejam de difícil diagnóstico, há menor rigor quanto aos sintomas autísticos que devem estar presentes, para que seja reconhecida tal categoria de transtorno. Por sua vez, para o diagnóstico de autismo, há obrigatoriedade de presença de alguns sinais clínicos, sujeitos à subjetividade do observador.

Após 1994 começaram a ser utilizados os critérios do CID 10 e do DSM-IV para estabelecimento do diagnóstico, que trouxeram uma nova abordagem sobre o autismo e os transtornos invasivos do desenvolvimento. Fombonne *et al.* (1997) realizaram extensa investigação epidemiológica desses transtornos em crianças francesas. Utilizando os critérios do CID 10, os autores encontraram 174 autistas entre 325.347 crianças, nascidas entre os anos de 1976 e 1985. Nesse grupo, 112 eram do sexo masculino e 62 do sexo feminino, ou seja, taxa sexual de 1,8:1. Assim, torna-se provável que taxas sexuais tão extremas quanto 4:1 sejam artefatos da triagem diagnóstica. Contudo, parece realmente existir um desvio em direção ao sexo masculino, por volta de 2:1 com a utilização dos critérios atuais de diagnóstico.

No presente trabalho, entre os indivíduos com outros transtornos invasivos do desenvolvimento, dois deles, de sexo masculino, tinham síndrome de Asperger. A síndrome de Rett foi diagnosticada em um indivíduo do sexo feminino. Essas duas síndromes recebem diagnóstico diferencial do autismo, apresentando algumas peculiaridades. Na síndrome de Asperger, é notável a



ausência de atraso significativo do desenvolvimento da linguagem e na síndrome de Rett é marcante a sua ocorrência exclusiva em mulheres, com a presença de movimentos característicos de torção das mãos (APA, 1994). Apesar dessas síndromes compartilharem muitos sinais clínicos com o autismo, sendo consideradas por Gillberg (1992b) como subgrupos dessa afecção, os critérios diagnósticos do CID 10 (1993) e do DSM-IV (APA, 1994) são rigorosos em sua classificação independente, porém dentro dos transtornos invasivos do desenvolvimento.

Oito indivíduos receberam o diagnóstico de transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação (PDD-NOS). Nestes indivíduos, foram encontradas algumas das alterações neuropsiquiátricas de conhecida associação ao autismo (Gillberg, 1992a; Fombonne *et al.*, 1997; Smalley, 1997). Devido ao fato dos critérios diagnósticos das doenças neuropsiquiátricas serem complexos, muitas vezes há dificuldade de enquadramento do indivíduo afetado em um grupo específico, sendo adequado um diagnóstico múltiplo em tais casos (Gillberg, 1992a). A deficiência mental e a epilepsia foram as condições mais comumente observadas, afetando de forma isolada ou em co-ocorrência em cinco destes indivíduos.

A variabilidade de afecções diagnosticadas em associação com o autismo mostra a existência de heterogeneidade em sua etiologia, sendo ele um distúrbio que acompanha diversas alterações, genéticas ou não. Esse mesmo argumento é válido para os outros transtornos invasivos do desenvolvimento.

A contribuição de fatores genéticos na etiologia de doenças mentais e do desenvolvimento comportamental é fortemente evidenciada por estudos epidemiológicos envolvendo gêmeos, segregação familiar e análise de ligação (Lombroso *et al.*, 1994). Algumas dessas doenças têm um componente genético

elucidado, enquanto outras ainda estão sob investigação. No presente trabalho, a avaliação citogenética revelou a presença da síndrome do cromossomo X frágil e de alterações cromossômicas constitucionais em quatro pacientes (13,3%). Dois indivíduos apresentaram o fra(X)(q27.3) e foram confirmados molecularmente como FRAXA. Foram encontrados um caso de mosaicismo 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36) e um caso de cromossomo marcador extranumerário derivado do cromossomo 15. Em outro paciente foram visualizadas em 3% de suas metáfases quebras cromossômicas em Xq27~28, excluído como FRAXA por testes moleculares. Durante a investigação citogenética, alguns sítios frágeis comuns sensíveis ao folato foram identificados, porém, o exato significado desses polimorfismos em populações com comprometimento psiquiátrico ainda são pouco conclusivos. Esses achados são semelhantes às descrições realizadas por outros autores, como por exemplo, os relatados por Cantú *et al.* (1990). Esses autores encontraram entre 67 indivíduos, com autismo ou sinais autísticos, quatro deles apresentando anomalias cromossômicas, dos quais um tinha fra(X), dois apresentavam deleção do braço curto do cromossomo 5 (síndrome Cri-du-Chat) e em outro detectou-se um cromossomo marcador com invdup(15q13).

O sítio frágil (X)(q27.3) foi observado em dois entre 18 indivíduos do sexo masculino, investigados citogeneticamente e confirmados molecularmente. Ambos os pacientes apresentavam sinais clínicos da síndrome do cromossomo X frágil. Um deles, caso 1397, foi diagnosticado como autista e o outro, o caso 1461, apresentava PDD-NOS, com quadro psicótico e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

A síndrome do cromossomo X frágil é uma condição observada freqüentemente entre os indivíduos com transtornos invasivos do desenvolvimento, particularmente o autismo (Brown *et al.*, 1986). Tal observação

levou muitos investigadores ao estudo específico do fra(X) em populações de autistas, assim como triagem de autistas entre os indivíduos com o diagnóstico da síndrome do cromossomo X frágil.

Vários outros pesquisadores encontraram a presença de portadores da síndrome do cromossomo X frágil em populações de autistas do sexo masculino (Chudley, 1984; Mikkelsen, 1984; Turner, 1984; Watson *et al.*, 1984; Blomquist *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1996; McGillivray *et al.*, 1986; Wahlstrom *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 1986; Gillberg *et al.*, 1987; Matsuishi *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1988; Mavrou *et al.*, 1988; Ho & Kolousek, 1989; Payton *et al.*, 1989; Cantú *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1991; Tranebjaerg & Kure, 1991; Malmgren *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993), bem como do sexo feminino (Cohen *et al.*, 1989; Hagerman *et al.*, 1992; McLennan *et al.*, 1993) (Tabela 1). Também há descrições de autismo entre os indivíduos diagnosticados com fra(X) (Levitas *et al.*, 1983; Malmgren *et al.*, 1992). Porém, alguns autores não encontraram associação entre essas afecções (Goldfine *et al.*, 1985; Pueschel *et al.*, 1985; Jayakar *et al.*, 1986; Reiss *et al.*, 1986). Possivelmente, as discrepâncias de valores observados entre o diferentes estudos se devem ao tamanho da mostra, aos critérios de diagnóstico adotados pelos autores e a metodologia de triagem do FRAXA nessas populações. Muitos dos sinais autísticos estão sujeitos ao julgamento subjetivo do observador, de tal modo que variações diagnósticas podem ocorrer entre diferentes investigações.

A frequência relatada de associação entre o autismo e o fra(X) varia entre os diferentes estudos, com valores de até 28,6% (Malmgren *et al.*, 1992). Em média, os valores observados de associação ficam entre 5,4% a 7%, segundo as revisões de Fisch (1992) e Hagerman (1996).



Recentes estudos de ligação de microssatélites do cromossomo X em autismo não confirmaram a região Xq27-28 como um loco de efeito principal para essa afecção (Hallmayer *et al.*, 1996b; Petit *et al.*, 1996). Porém, esses mesmos estudos não excluíram a participação do cromossomo X em autismo, indicando segmentos com fraca associação. Assim, genes de pequeno efeito podem estar localizados entre os marcadores DXS453 e DXS1001 (Hallmayer *et al.*, 1996b), ou próximos ao DXS287 (Petit *et al.*, 1996), ou seja, compreendidos entre as regiões Xq12-q24.

Pouco sabe-se sobre o exato mecanismo da associação entre o autismo e a síndrome do fra(X), porém há sugestões que o autismo, quando associado com a síndrome do cromossomo X frágil, seja secundário ao retardo mental (Cohen *et al.*, 1991; Fisch, 1992). Dentre indivíduos com esses transtornos foram descritas similaridades entre anomalias neuroanatômicas envolvendo os lobos VI e VII do verme cerebelar e o hipocampo (Mazzoco *et al.*, 1997). Tais alterações possivelmente surjam devido à expressão alterada da proteína *fmr-1*, expressa ativamente no cérebro fetal humano (Abitbol *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1993).

Apesar de não ter sido encontrada associação entre o sítio frágil Xq27.3 e o autismo por técnicas de microssatélites, Petit *et al.* (1996) ressaltaram que no grupo por eles avaliado havia a presença de uma menina autista que apresentou o FRAXA, confirmado molecularmente, mas que não apresentava sinais clínicos da síndrome do cromossomo X frágil. Essa observação reforça a sugestão da importância do gene *FMR-1* na susceptibilidade ao autismo e a outros distúrbios de relacionamento e interação social. Todavia, o desenvolvimento do autismo dependeria ainda de outros genes de susceptibilidade, o que explicaria a existência de fra(X) sem autismo. Assim,

para a manifestação do autismo seria necessário a presença do FRAXA em genoma apropriado. Outra hipótese levantada por esses autores seria um papel regulatório do gene *FMR-1* sobre outros genes, os quais teriam papel principal na etiologia do autismo. Portanto, variantes específicas desses genes, na presença da mutação completa do *FMR-1*, sofreriam expressão alterada, levando ao fenótipo autístico. Tais sugestões dependem de conhecimentos mais detalhados dos demais genes de susceptibilidade ao autismo que estão sendo identificados e das possíveis interações de regulação gênica entre eles ou de seus produtos em cadeias bioquímicas relacionadas ao sistema nervoso central.

Um gene próximo ao loco do FRAXA que pode estar relacionado com comportamento autístico e outras disfunções neurofisiológicas é o *GABRA3*. Esse gene codifica a subunidade alfa 3 do ácido gama-aminobutírico (GABA). A importância desse neurotransmissor inibitório nas alterações neurológicas encontradas nas síndromes de Prader-Willi e de Angelman é discutida por Wagstaff *et al.* (1991). Assim, uma possibilidade a ser considerada é a ocorrência de metilação do *GABRA3* com consequente inativação, em decorrência da metilação do gene *FMR-1*. Tal processo pode ser a causa do quadro clínico autístico em alguns dos indivíduos com a síndrome do cromossomo X frágil. Ainda nesse contexto também esteja a explicação para a existência de casos da síndrome do cromossomo X frágil em que os indivíduos apresentam fenótipo muito semelhante ao da síndrome de Prader-Willi, embora Fischer (1992) tenha sugerido que essa ocorrência é devida a homologia entre os genes *SNRPN* da síndrome de Prader-Willi e *FMR-1* da síndrome de Martin-Bell.

A frequência da síndrome do cromossomo X frágil entre os homens autistas observada no presente estudo foi 1/13, ou seja, 7,7%. Esta frequência foi bem próxima aos valores médios relatados pela literatura. Considerando todos

os indivíduos do sexo masculino deste estudo, que incluem mais três portadores de PDD-NOS e dois portadores da síndrome de Asperger, foram encontrados dois casos com o FRAXA, elevando a frequência da síndrome do cromossomo X frágil para 2/18, ou seja, 11,1% dos portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento do sexo masculino.

Independente dos mecanismos genéticos que levam ao autismo, é notável a alta frequência de indivíduos autistas portadores do FRAXA, justificando sua triagem nesse distúrbio, possibilitando uma sugestão etiológica do autismo em casos específicos, e direcionando o aconselhamento genético.

Um outro indivíduo autista do grupo ora avaliado apresentou quebras cromossômicas em Xq terminal (Xq27~q28), o caso 1968. Esta alteração foi visualizada em 3% das células analisadas, porém, este indivíduo não apresentava quadro clínico compatível com a síndrome do cromossomo X frágil. O resultado da investigação molecular foi negativo para o FRAXA.

A ocorrência de indivíduos que apresentam fragilidade em Xq27~q28 e que não são acometidos pela síndrome de Martin-Bell já foram anteriormente descritos (Rousseau *et al.*, 1991; Oberlé *et al.*, 1991; Vianna-Morgante *et al.*, 1994; Weidmer-Mikhail *et al.*, 1998). Além do FRAXA, dois outros sítios frágeis sensíveis ao folato foram identificados na região Xq27-q28, os sítios frágeis FRAXE e FRAXF. A clonagem desses sítios frágeis demonstrou que eles também apresentam polimorfismos instáveis de repetições de trinucleotídeos CGG, sujeitos à amplificação e metilação nos indivíduos citogeneticamente positivos para tais fragilidades (Holden *et al.*, 1996). Esses sítios frágeis são, portanto, molecularmente semelhantes ao FRAXA, sendo porém muito mais raros. O FRAXE está relacionado com deficiência mental moderada, mas não

acarreta sinais físicos típicos da síndrome de Martin-Bell. O FRAXF não foi ainda consistentemente associado com alterações clínicas (Hirst *et al.*, 1993).

Os dados moleculares obtidos por PCR, na presente investigação, comprovaram a mutação no gene *FMR-1* nos indivíduos detectados pela análise citogenética, os casos 1397 e 1461. Também por esta metodologia, como mencionado, foi identificado um caso citogenético falso-positivo para o FRAXA (caso 1968) e foram confirmados os diagnósticos de fra(X) negativo nos demais indivíduos de sexo masculino. As famílias dos indivíduos portadores da síndrome do cromossomo X frágil também foram investigadas molecularmente. A análise de *Southern blotting* diagnosticou a presença de pré-mutação na mãe do indivíduo 1397 e confirmou a ausência da mutação em seu irmão gêmeo dizigótico, clinicamente normal. A mãe e a irmã do indivíduo 1461 ainda não foram testadas por *Southern blotting*. Contudo, os dois irmãos deste indivíduo foram testados por PCR, um deles também institucionalizado devido ao retardo mental e o outro portador de distúrbio comportamental, tendo sido identificados como portadores do FRAXA. Dessa forma, podemos verificar que a análise molecular por PCR é um método alternativo rápido e seguro para triagem do FRAXA, em grupos de indivíduos do sexo masculino com autismo e/ou deficiência mental.

Apesar do protocolo de PCR aplicado no presente estudo não ser adequado para a investigação dos indivíduos do sexo feminino e não ser eficiente na detecção de homens mosáicos para o FRAXA, ele é vantajoso em relação à metodologia citogenética, devido à sua rapidez e confiabilidade, como ressaltado pelos idealizadores do protocolo aqui utilizado (Haddad *et al.*, 1996). Triagens populacionais em homens autistas podem ser realizadas por essa

técnica com baixo custo, sendo encaminhados para o teste de *Southern blotting* apenas as famílias dos indivíduos com resultado positivo.

Outros sítios frágeis, além do Xq27.3, também foram descritos em indivíduos autistas. Gillberg & Walstrom (1985) relataram os sítios frágeis fra(X)(p22), fra(16)(q23) e fra(6)(q26) entre os autistas por eles avaliados citogeneticamente. Jayakar *et al.* (1986), avaliando 20 crianças autistas, encontraram duas delas manifestando o sítio frágil em 2q13. Li *et al.* (1993) destacaram entre os sítios frágeis encontrados por eles o fra(3)(p14) e o fra(6)(q27). Outras populações com alterações neuropsiquiátricas também exibem certos sítios frágeis em frequência mais alta do que a da população geral. Em pacientes esquizofrênicos, Garofalo *et al.* (1993) encontraram frequência mais elevada do fra(9)(p21) e Simonin & Gericke (1996), estudando pacientes com síndrome de Tourette, encontraram grande número de sítios frágeis comuns, como os fra(1)(p21), fra(1)(q44), fra(7)(q32) e fra(14)(q24), com frequência em média de duas vezes mais elevada entre esses indivíduos do que entre os controles, entretanto, sem ressaltar nenhum ponto de quebra de especial interesse nessa síndrome.

Embora o exato significado dos sítios frágeis ainda seja desconhecido, é sugerido que eles possam ter papel na expressão de algumas condições patológicas. A composição de bases de alguns sítios frágeis resulta da expansão de trinucleotídeos CGG, encontrada em outros sítios frágeis do X, como o FRAXE e o FRAXF, e nos autossomos 11 (FRA11B) e 16 (FRA16A) (Wang *et al.* 1996). Esse tipo de expansão causa metilação do DNA na região em que ela se encontra, impedindo a sua transcrição (Rousseau *et al.*, 1991) e alterando a estrutura local da cromatina (Wang *et al.*, 1996). Essas características são

apontadas como a causa da visualização citogenética dos sítios frágeis de repetição de trinucleotídeos.

Apesar da repetição de trinucleotídeos estar presente em alguns sítios frágeis, nem todos eles possuem essa mesma estrutura de seqüência de bases. Por exemplo, a análise molecular do fra(3)(p14.2), não revelou tal tipo de conformação (Rassol *et al.*, 1996). A perda de heterozigotidade da região 3p14.2 está associada com o aumento de susceptibilidade ao desenvolvimento de algumas neoplasias, como o carcinoma renal hereditário. Também foi encontrada deleção homozigota dessa região de fragilidade cromossômica em linhagens celulares de carcinoma colorretal, de cérvix, de mama e de pulmão (Boldog *et al.*, 1997).

A existência de uma síndrome neurológica especificamente associada com um sítio frágil, ou seja, a síndrome do retardo mental ligado ao cromossomo X frágil, o fato de que vários sítios frágeis têm em sua estrutura seqüências de bases semelhantes (repetições *in tandem* de di- ou trinucleotídeos) e que mutações que levam à amplificação de seqüências repetitivas de DNA, as mutações dinâmicas, estão envolvidas em doenças neurodegenerativas, justificam a necessidade da investigação de sítios frágeis em autismo e nos transtornos invasivos do desenvolvimento.

Na presente investigação, ocorreram alguns sítios frágeis, nas regiões 1q21, 1q32, 3p14, 6q26 e Xq22. Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre estes sítios frágeis identificados e os transtornos invasivos do desenvolvimento, pois tratam-se de sítio frágeis comuns, presentes na população geral e sem descrição de associação com alterações clínicas. Porém, neste tipo de avaliação, a detecção de outros sítios frágeis além do Xq27.3 serve como controle interno da eficiência dos sistemas de indução empregados (Weidmer-

Mikhail *et al.*, 1998). O sistema com a fluordesoxiuridina é aparentemente mais eficaz na indução de sítios frágeis, comparado à trimetoprima, tanto na indução do FRAXA quanto na indução dos sítios frágeis comuns, de acordo como os dados obtidos neste trabalho, apresentados nas Tabelas 5 e 6.

O indivíduo 1394, com diagnóstico de autismo, apresentou em 2% de suas células a inv(7)(p15q36) e o cariótipo da paciente foi sugerido como mosaicismo 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36). Ao exame clínico, esta paciente apresentava implantação baixa dos cabelos na nuca, fendas palpebrais oblíquas para cima, nariz bulboso, prognatismo, lábios grossos, hálux valgo, cifose e lordose. Alterações no cromossomo 7 foram encontradas em outros estudos com autistas. Mariner *et al.* (1986) descreveram um paciente autista que apresentava um cromossomo 7 extranumerário com deleção de seu braço curto. Lopreiatto & Wulfsberg (1992) observaram em um paciente autista, um rearranjo entre os cromossomos 1, 7 e 21, envolvendo as regiões 7q11.33 e 7q36.1.

As regiões cromossômicas envolvidas no rearranjo observado no cromossomo 7, no presente estudo, contêm importantes genes do desenvolvimento (homeogenes), com marcante atuação na formação do sistema nervoso central. Em 7q36 está mapeado o homeogene *EN-2*, relacionado ao desenvolvimento cerebelar. O *EN-2* humano é homólogo ao homeogene de *Drosophila*, cujos homólogos em camundongo, os genes *En-1* e *En-2*, são expressos no cerebelo de fetos e de adultos dessa espécie, com papel na diferenciação morfológica neuronal (Petit *et al.*, 1995). Em camundongos, os mutantes para esses homeogenes apresentam fenótipos diferentes, sendo que o mutante *En-1* morre logo após o nascimento, com grandes anomalias cerebrais, enquanto o mutante *En-2* sobrevive, apresentado defeitos no cerebelo (Hanks *et al.*, 1995). Petit *et al.* (1995), estudando um grupo de 100 crianças autistas,

comparadas com 100 crianças normais, encontraram associação de um tipo específico de polimorfismo do homeogene *EN-2*, denominado de alelo tipo 2 da sonda MP4, com o autismo. O envolvimento do homeogene *EN-2* em anormalidades do cerebelo e o possível papel dessa estrutura do sistema nervoso central no autismo (Courchesne *et al.*, 1988, 1993, 1994; Murakami *et al.*, 1989) fazem desse gene um importante candidato na etiologia das alterações neurológicas associadas ao autismo e a outros transtornos invasivos do desenvolvimento. Para a confirmação dessa sugestão, porém, são necessários estudos sobre as variantes alélicas desse homeogene em diferentes populações psiquiátricas.

Outros importantes genes do desenvolvimento, os homeogenes *HOXA*, estão mapeados no cromossomo 7, em 7p15. Nessa região, eles formam um *cluster* gênico, com as variantes *HOXA-1* a *HOXA-11*. O estudo desses homeogenes em vertebrados demonstraram sua atividade na formação e fechamento do tubo neural (Prince & Lumsden, 1994; Rodier *et al.*, 1996; Clagett-Dame & Plum, 1997; Min *et al.*, 1998). Suas seqüências regulatórias podem estar localizadas a grandes distâncias, sendo identificados como reguladores diretos da expressão desses genes os receptores do ácido retinóico e os próprios genes *HOX*.

A possibilidade dos genes *HOXA* humanos estarem envolvidos nos transtornos invasivos do desenvolvimento provém da observação de pacientes vítimas da talidomida que apresentavam autismo (Rodier *et al.*, 1996). Embora o autismo não seja uma condição encontrada com frequência entre as vítimas desse fármaco, essa condição apareceu em aproximadamente 30% dos casos em que a exposição à talidomida ocorreu entre o 20º e 24º dia de gestação, sendo ausente a sintomatologia autística nos pacientes cuja exposição fora em

outro período. Segundo Rodier *et al.* (1996), as alterações neurológicas ocasionadas pela talidomida, em virtude de exposição nesse período gestacional, mimetizam as anomalias observadas em animais-modelos com deleção do gene *Hoxa-1*.

Recentemente, foi publicado um amplo estudo que avaliou o genoma de 99 famílias inglesas, através de marcadores de microssatélites, em que haviam um ou mais membros autistas, totalizando 201 indivíduos. Foram utilizados 354 marcadores, distantes cerca de 10cM entre si (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998). Nesse estudo, foram observados locos com alta frequência de ligação ao autismo, localizados em seis cromossomos (4, 7, 10, 16, 19 e 22), especialmente aqueles mapeados em 7q, entre os marcadores D7S530 e D7S684, ou seja, entre as regiões 7q31 e 7q32. Portanto, é sugestiva a participação de genes do cromossomo 7 no autismo, através de alterações do padrão normal do desenvolvimento neurológico.

Outro achado citogenético importante foi a detecção de um cromossomo marcador extranumerário, observado em todas as células analisadas do indivíduo 1449, de sexo feminino. A paciente, com diagnóstico de PDD-NOS, apresentava traços autísticos, deficiência mental, hipertelorismo ocular, hipertricose generalizada, narinas antevertidas, implantação baixa dos cabelos na nuca, crises convulsivas frequentes e severas, com padrão encefalográfico semelhante ao encontrado na síndrome de Lennox-Gastaut. Ao exame físico apresentava apenas narinas antevertidas e uma mancha café-com-leite lombar.

O padrão em bandamento GTG do cromossomo marcador era compatível com a região cromossômica 15q, do centrômero até aproximadamente a banda 15q21. Este marcador satelitado apresentou impregnação pela prata na

região organizadora nucleolar, reforçando a sugestão de tratar-se de um marcador acrocêntrico e presença de heterocromatina constitutiva em sua porção centromérica e q terminal, visível com bandamento CBG e FISH.

Estima-se que cromossomos marcadores ocorrem em cerca de 0,05% dos nativos e, que desses, 40% são invdup(15) (Leana-Cox *et al.*, 1994). A ocorrência de cromossomos extranumerários envolvendo trissomia ou tetrassomia da região 15q11-q13 em quadro autístico, retardo mental e epilepsia foram relatadas em vários estudos (Schinzel, 1990; Gillberg *et al.*, 1991; Shibuya *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1994; Bunday *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Crolla *et al.*, 1995; Hotopf & Bolton, 1995; Flejter *et al.*, 1996; Martinsson *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997a; Schroer *et al.*, 1998), sugerindo uma forte participação de genes dessa região cromossômica nessa afecção, bem como correlação direta entre o número de cópias adicionais dessa região e a extensão da região duplicada com a severidade do quadro clínico. Frequentemente, os pacientes trissômicos apresentam um fenótipo menos grave em relação aos tetrassômicos para a região 15q11-q13 (Robinson *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Leana-Cox *et al.*, 1994; Flejter *et al.*, 1996). Segundo Gillberg *et al.* (1991), a síndrome do cromossomo 15 extranumerário tem como características principais retardo mental moderado a severo, hipotonia muscular, epilepsia, cifoescoliose e autismo ou quadro autístico.

O segmento 15q11-q13 é a região cromossômica envolvida nas síndromes de Prader-Willi e de Angelman, duas afecções cujos afetados têm comprometimento do desenvolvimento mental. Além disso, essa região está sujeita ao *imprinting* genômico. O *imprinting* tanto pode ser materno quanto paterno, sendo o estado de metilação determinado durante a gametogênese. Na síndrome de Angelman, a deleção em 15q11-q13 ocorre no cromossomo de

origem materna e, em Prader-Willi, a mesma deleção ocorre no cromossomo de origem paterna. Logo, os genes com papel importante no fenótipo de Prader-Willi têm expressão paterna, enquanto os de Angelman têm expressão materna (Schroer *et al.*, 1998). Nos indivíduos normais, somente um dos alelos dessa região, o paterno ou o materno, pode ser transcrito e portanto, ter expressão gênica.

Para determinação detalhada do marcador, foi realizada a investigação por FISH, que confirmou ser um derivado do cromossomo 15, com segmento de heterocromatina constitutiva em ambas as extremidades, presença dos marcadores D15S10 e SNRPN (região 15q11-q13) e ausência do marcador PML (15q22). Assim, o cariótipo desse indivíduo foi estabelecido como 47,XX,+mar.ish der15(D15Z1+,D15S10+,SNRPN+,PML-), apresentando, então, trissomia da região 15q11-q13.

A revisão dos relatos de cromossomos marcadores derivados do 15 possibilitou a identificação de grupos principais de rearranjos (Cheng *et al.*, 1994; Crolla *et al.*, 1995). Os tipos mais comuns são bi-satelitados, com inversão e duplicação da região 15q11-q13, levando à tetrassomia dessa região. No caso identificado no presente estudo, foi verificada a presença de material centromérico na parte distal deste cromossomo, porém sem duplicação da região 15q11-q13 e com satélite apenas no braço curto do marcador. Este marcador não tem descrição idêntica na literatura, porém, é bastante similar a outros marcadores de trissomia parcial do cromossomo 15 já relatados (Cheng *et al.*, 1994; Crolla *et al.*, 1995; Schroer *et al.*, 1998).

Embora existam fortes sugestões de que alterações envolvendo a região 15q11-q13 predisponham aos sinais autísticos, ainda está pouco esclarecida a participação dos genes localizados nesse segmento cromossômico.

Nessa região e suas adjacências são encontrados vários genes com expressão no sistema nervoso central, nas sinapses e que são subunidades de proteínas receptoras de neurotransmissores ou de canais de íons (Wagstaff *et al.*, 1991; Matsuura *et al.*, 1997). Em todos os casos descritos até o momento em que havia co-ocorrência de comportamento autístico e presença de cromossomo derivado do 15, esse era de origem materna, levando a sugestão que somente os genes de expressão materna desse segmento do cromossomo 15 contribuem para a manifestação de quadro autístico (Cook *et al.*, 1997a). Nessa região cromossômica, encontram-se mapeados os genes da ubiquitina-ligase E3A (*UBE3A*) (Matsuura *et al.*, 1997), os genes que codificam as subunidades GABRA5, GABRB3 e GABRG3 do receptor GABA (Wagstaff *et al.*, 1991; Glatt *et al.*, 1992; Greger *et al.*, 1995), da subunidade alpha-7 do receptor colinérgico neuronal nicotínico (*CHRNA7*) (Doucette-Stamm *et al.*, 1993) e, possivelmente, um gene envolvido na manifestação da hipomelanose de Ito (*ITO*) (Pellegrino *et al.*, 1995).

O gene *UBE3A* é o principal candidato na etiologia da síndrome de Angelman, fazendo dela o primeiro exemplo de uma doença genética de alteração dos padrões bioquímicos proteolíticos dependentes da ubiquitina (Matsuura *et al.*, 1997). Esse gene tem expressão bialélica em fibroblastos, linfoblastos, rins e outros tecidos, com *imprinting* restrito ao cérebro (Vu & Hoffman, 1997; Rougeulle *et al.*, 1997). Os principais sinais da síndrome de Angelman estão relacionados com a perda da expressão materna desse gene no hipocampo e cerebelo (Albrecht *et al.*, 1997). Fung *et al.* (1998) relataram a presença de retardo mental, alterações de linguagem e ataxia em um caso de deleção de 14 pares de bases em uma região não-transcrita do gene *UBE3A*. Tais observações permitiram a sugestão de papel do gene *UBE3A* em

transtornos do comportamento, como os apresentados pelos portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento. O cerebelo é uma região descrita como sujeita a alterações em autistas (Courchesne *et al.*, 1988, 1993, 1994; Murakami *et al.*, 1989) e o hipocampo tem ação no comportamento social, sendo a região cerebral com função nos processos de memorização (Voeller, 1996). Dessa forma, é possível que a presença de cromossomo marcador extranumérico derivado do cromossomo 15 materno propicie no cérebro expressão aumentada da *UBE3A*, cuja ação nas áreas do hipocampo e do cerebelo pode de alguma forma alterar seu funcionamento normal, levando aos distúrbios autísticos.

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro de mamíferos. Nas síndromes de Prader-Willi e Angelman, o gene da subunidade beta3 (*GABRB3*) está deletado, sugerindo o envolvimento do GABA nessas síndromes (Wagstaff *et al.*, 1991). Em ratos, o gene *GABRB3* têm expressão no córtex cerebral, no cerebelo, no hipocampo, nos núcleos caudado e talâmico paraventriculares, assim, defeitos na sua função podem produzir convulsões e distúrbios de movimento, como aqueles do fenótipo Angelman. Da mesma forma que o *UBE3A*, esse gene tem expressão em áreas do sistema nervoso central com possível associação aos transtornos invasivos do desenvolvimento, ou seja, o cerebelo e o hipocampo. Cook *et al.* (1998), em estudos de ligação de nove locos na região 15q11-q13 em indivíduos com quadro autístico, encontraram desequilíbrio de ligação apenas em relação ao alelo 155CA-2 do gene *GABRB3*, indicando portanto, esse gene como um candidato de predisposição a distúrbios autísticos. Os genes das outras duas subunidades do receptor GABA mapeadas nessa região, o *GABRA5* e o *GABRG3*, também foram observados como deletados nas síndromes de Prader-Willi e de Angelman,

sugerindo efeito sinérgico dessas subunidades na manifestação fenotípica dessas síndromes (Glatt *et al.*, 1992; Greger *et al.*, 1995).

Quanto ao gene *CHRNA7*, Chini *et al.* (1994) sugeriram que ele pode ter papel nas crises convulsivas em pacientes com duplicação do cromossomo 15 e Freedman *et al.* (1997) mostraram ligação entre um polimorfismo de dinucleotídeos em 15q11-q14, o sítio do gene *CHRNA7*, e esquizofrenia. Adler *et al.* (1998) também demonstraram existir desequilíbrio de ligação entre essa região e a esquizofrenia, enquanto Emslie *et al.* (1997) sugeriram ser esse gene o principal agente na epilepsia juvenil mioclônica. Os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) são membros de uma superfamília de canais de íons, que mediam a transmissão de sinais rápidos nas sinapses. Esses receptores são formados por subunidades, das quais a subunidade α -7 é a mais importante, com marcante atividade na permeabilidade desses canais aos íons cálcio (Doucette-Stamm *et al.*, 1993). Em pacientes esquizofrênicos, as alterações psico-fisiológicas estão relacionadas com resposta alterada aos estímulos sensoriais. Por exemplo, em indivíduos normais sujeitos seguidamente a um mesmo estímulo sonoro, a resposta ao segundo estímulo é menos intensa, enquanto nos indivíduos esquizofrênicos a resposta inibitória está diminuída (Freedman *et al.*, 1997). Os estudos em animais-modelo permitiram a identificação do padrão de alteração semelhante quanto à inibição aos estímulos sonoros, em função de decréscimo da expressão do *CHRNA7* (Freedman *et al.*, 1997). Seu papel regulador da permeabilidade de canais de íons e sua participação ativa na transmissão neuronal rápida em resposta a estímulos sensoriais reforçam seu envolvimento em crises epiléticas.

A região 15q11-q13 também é sugerida como loco gênico da hipomelanose de Ito, um tipo específico de incontinência pigmentar com

anormalidades do sistema nervoso central e que está associada ao autismo (Castroviejo *et al.*, 1998). Em indivíduos com autismo e hipomelanose de Ito foram encontrados espasmos (8%), convulsões (49%) e, em alguns casos, foi encontrada hipoplasia cerebelar. A região gênica 9q33-qter também é sugerida como contendo um loco da hipomelanose de Ito (Happle, 1987), sendo então sugerido que essa patologia pode ser uma condição que resulta da perda de genes de pigmentação específicos, em diferentes locos gênicos (Pellegrino *et al.*, 1995; Happle, 1998). Uma vez que a perda desses genes podem levar a anormalidades neurológicas, é aceitável os mesmos, quando presentes em excesso, possam de alguma forma alterar a estrutura do sistema nervoso central, com prejuízo de áreas do desenvolvimento, provocando o autismo.

Assim, os achados do presente estudo demonstraram que as alterações citogenéticas e moleculares nos transtornos invasivos do desenvolvimento não estão restritas ao subgrupo de autismo, mas que estão também presentes nas outras alterações dessa categoria diagnóstica, em frequência similar ou mesmo mais alta do que no autismo. Os achados demonstraram também que um mesmo tipo de anomalia pode estar associada a fenótipos diferentes, por exemplo, a síndrome do cromossomo X frágil ocorreu entre casos de autismo e de PDD-NOS. Dentro de uma mesma categoria diagnóstica também puderam ser identificadas diferentes alterações. Estas observações reforçam a sugestão de que o autismo consiste num conjunto de características cuja origem etiológica é diversa e que está associado a diferentes alterações patológicas.

Portanto, os achados observados nesta investigação e outros da literatura reforçam a necessidade de investigação citogenética e da síndrome do cromossomo X frágil em pacientes com transtornos invasivos do

desenvolvimento, com o objetivo de obter indicação de regiões cromossômicas específicas que possam conter genes candidatos relacionados com a expressão desse grave distúrbio. A análise molecular detalhada de regiões dos cromossomos 7, 15 e X, com marcadores moleculares conhecidos, é uma possibilidade de investigação bastante interessante, em vista da associação mais evidente entre alterações estruturais e gênicas desses cromossomos e o espectro autístico. Nas regiões cromossômicas alteradas identificadas neste trabalho estão mapeados genes com participação evidente na transmissão dos estímulos sensoriais e genes do desenvolvimento relacionados com a formação do sistema nervoso central. Os conhecimentos gerados pela análise genética podem fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na gênese dessas doenças e auxiliar no estabelecimento de terapias futuras.

VI. CONCLUSÕES

- a) Os resultados obtidos através deste trabalho reforçam a participação significativa de fatores genéticos na etiologia do autismo e de outros transtornos invasivos do desenvolvimento, demonstrada pela frequência de 13,3% (4/30) de alterações genéticas nessas afecções;
- b) No grupo avaliado foram detectados dois indivíduos com a síndrome do cromossomo X frágil (FRAXA), um indivíduo com um cromossomo extranumerário der(15) e um caso de mosaicismo 46,XX/46,XX,inv(7p15q36), justificando, portanto, a triagem citogenética e molecular nos casos de transtornos invasivos do desenvolvimento de etiologia desconhecida;
- c) As regiões cromossômicas envolvidas nas alterações observadas, ou seja, 7p15, 7q36, 15q11-q13 e Xq27.3, alocam genes com participação no desenvolvimento do sistema nervoso central e na transmissão neuronal. Portanto, tais genes caracterizam-se como candidatos relacionados com a expressão dos transtornos invasivos do desenvolvimento. A análise molecular dessas regiões torna-se uma perspectiva para estudos futuros, podendo gerar conhecimentos importantes sobre os mecanismos etiológicos destes transtornos e auxiliar no estabelecimento de terapias.



VII. RESUMO

Os transtornos invasivos do desenvolvimento (PDDs) constituem um grupo de condições neurobiológicas caracterizadas por atraso e desvio do desenvolvimento social, de comunicação e cognitivo, com manifestação precoce, geralmente nos primeiros anos de vida. Essa classe de distúrbios inclui o autismo, as síndromes de Asperger e de Rett, o transtorno desintegrativo da infância e o transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação (PDD-NOS).

Devido a existência de evidências de fatores genéticos na etiologia desses transtornos, o presente trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência de alterações citogenéticas e moleculares em pacientes com PDDs. Foram avaliados pacientes da Escola Municipal do Autista, de São José do Rio Preto-SP, diagnosticados por um grupo multidisciplinar de profissionais, segundo os critérios do DSM-IV. Este grupo foi composto por 30 indivíduos, dos quais 19 pacientes tinham diagnóstico de autismo, oito apresentavam PDD-NOS, dois eram portadores da síndrome de Asperger e um da síndrome de Rett.

Todos os pacientes foram investigados quanto à presença de anomalias cromossômicas. Foram utilizadas técnicas citogenéticas, incluindo a pesquisa do cromossomo X frágil e de outros sítios frágeis, a partir de cultivo celular em meio deficiente em folato e com adição de seus antagonistas, como a trimetoprima e a fluordesoxiuridina (FudR). Os pacientes do sexo masculino também foram avaliados por teste molecular, para detecção de mutação dinâmica no gene *FMR-1* (FRAXA) pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Dois pacientes apresentaram a síndrome do cromossomo X frágil. Outros dois indivíduos apresentaram anomalias cromossômicas constitucionais, sendo um caso de mosaicismo 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36) e o outro de cromossomo marcador extranumerário der(15). Um dos indivíduos com a síndrome do cromossomo X frágil e a paciente com inv(7) eram autistas,

enquanto os demais indivíduos tinham diagnóstico de PDD-NOS. Em outro paciente autista foram observadas quebras cromossômicas em Xq27~q28 em 3% das células analisadas, porém, foi excluído como FRAXA por testes moleculares. Foram observados também alguns sítios frágeis comuns, nas bandas 1q21, 1q32, 3p14, 6q26 e Xq22.

A inv(7)(p15q36) foi encontrada em uma paciente autista, em apenas 2% das células analisadas. As regiões cromossômicas envolvidas neste rearranjo contêm importantes genes do desenvolvimento (homeogenes), relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso central, os homeogenes *EN-2* e *HOXA*.

A paciente com o cromossomo extranumerário derivado do 15 apresentava distúrbios autísticos associados com retardo mental, epilepsia, e transtornos comportamentais. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) identificou o der(15) com uma cópia da região 15q11-q13. A partir das preparações citogenéticas, hibridadas com as sondas D15Z1 (região centromérica), D15S10 e SNRPN (região 15q11-q13) e PML (região 15q22), propôs-se o cariótipo 47,XX,+mar.ish der(15)(D15Z1+,D15S10+,SNRPN+,PML-). Na região 15q11-q13 estão mapeados alguns genes, incluindo os genes *ITO*, *UBE3A*, *CHRNA7* e os genes para três subunidades do receptor do neurotransmissor GABA, *GABRB3*, *GABRA5* e *GABRG3*, todos relacionados ao sistema nervoso central.

Nossos achados reforçam a necessidade de avaliação genética em indivíduos com transtornos invasivos do desenvolvimento. As análises citogenéticas e moleculares sugerem a participação de genes candidatos localizados nas regiões 7p15, 7q36, 15q11-q13 e Xq27.3, relacionados com a expressão do autismo e de outros PDD. Estes achados, portanto, enfatizam a necessidade de análises moleculares detalhadas dessas regiões, numa tentativa de esclarecer a etiologia desses distúrbios e contribuir para o estabelecimento de terapias futuras.

VIII. SUMMARY

The Pervasive Developmental Disorders (PDDs) constitute a group of neurobiological conditions characterized by specific delays and deviation in social, communicative, and cognitive development, and the onset of these conditions occurs in the first years of life. This class of disorders includes autism, Asperger's disorder, Rett's disorder, childhood disintegrative disorders and pervasive developmental disorder, not otherwise specified (PDD-NOS).

Because genetic factors have been implicated in etiology of these disorders, the purpose of this work was to investigate the occurrence of genetic abnormalities in patients with PDDs. The patients of the School of the Autist, São José do Rio Preto-SP, diagnosed by a multidisciplinary professional staff in accordance with criteria of CID 10 and DSM-IV, were evaluated. This group was composed by 30 individuals, of which 19 patients were autists, eight had PDD-NOS, two had Asperger's disorder, and one had Rett's disorder.

All patients were evaluated for chromosome abnormalities. It was performed cytogenetic techniques, using cultures with folate deficient medium and folate antagonists such as trimethoprim and fluorodeoxyuridine (FudR), which allow expression of fragile X chromosome (FRAXA) and other fragile sites. The male patients were also evaluated by means of a molecular test for FRAXA using polymerase chain reaction (PCR).

Two patients showed fragile X syndrome. Two other individuals showed constitutional chromosomal abnormalities: one case of mosaicism 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36) and one case of a supernumerary chromosome der(15). One of the individuals with fragile X syndrome and the patient that showed inv(7) were autists. The other patients had PDD-NOS. Another autist

patient showed chromosome breaks at Xq27-q28 in 3% of the cells, but FRAXA was excluded by DNA analysis. Some common fragile sites were observed during cytogenetic analysis, in bands 1q21, 1q32, 3p14, 6q26 and Xq22.

The inv(7)(p15q36) was observed in only 2% of the analyzed cells of an autistic patient. Chromosome regions involved in this rearrangement contain important developmental genes (homeogenes) related to the development of the central nervous system, such as homeogenes *EN-2* and *HOXA*.

The patient with extranumerary chromosome der(15) showed autistic disorder associated with mental retardation, epilepsy and behavioral disorder, like other cases reported with similar cytogenetic anomaly. The fluorescence in situ hybridization (FISH) technique identified the der(15) with a copy of the 15q11-q13 region. The preparations hybridized with probes for D15Z1 (centromeric region), D15S10 and SNRPN (15q11-q13 region) and PML (15q22 region), allowing to propose the karyotype 47,XX,+mar.ish der(15)(D15Z1+,D15S10+,SNRPN+,PML-). In the region 15q11-q13 some genes were mapped, including the *ITO*, *UBE3A*, *CHRNA7* and the genes for three GABA receptor subunits, *GABRB3*, *GABRA5* and *GABRG3*, all related to the nervous system.

Our findings reinforce the need of genetic evaluation in PDDs. The results of cytogenetic and molecular analysis suggest the participation of candidate genes localized in the regions 7p15, 7q36, 15q11-q13 and Xq27.3 related to susceptibility for autism and other PDDs. These findings also support the detailed molecular analysis of these regions as a strategy to clarify the etiology of these disorders and to contribute to the establishment of therapies.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABITBOL, M.; MENINI, C.; DELEZOIDE, A.L.; RHYNES, 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.**, v. 4: p. 147-152, 1993.
- ADLER, L.E.; OLINCY, A.; WALDO, M.; HARRIS, J.G.; GRIFFITH, J.; STEVENS, K.; FLACH, K.; NAGAMOTO, H.; BICKFORD, P.; LEONARD, S.; FREEDMAN, R. Schizophrenia, sensory gating and nicotinic receptor. **Schizophr. Bull.**, v. 24: p. 189-202, 1998.
- ALBRECHT, U.; SUTCLIFFE, J.; CATTANACH, B.; BEECHEY, C.; ARMSTRONG, D.; EICJHELE, G.; BEAUDET, A. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. **Nature. Genet.**, v. 17: p. 75-78, 1997.
- APA (American Psychiatric Association): Diagnostic and Statistical Manual of Mental Retardation, 4th. Ed. Washington, DC: American Psychiatric Press. 1994.
- BAKER, P.; PIVEN, J.; SCHWARTZ, S.; PATIL, S. Duplication of chromosome 15q11-13 in two individuals with autistic disorder. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 24: p. 529-535, 1994.
- BAY, C.; MAUK, J.; RADCLIFFE, J.; KAPLAN, P. Mild Brachmann-de Lange syndrome. Delineation of the clinical phenotype, and characteristic behaviors in a six-year-old boy. **Am. J. Med. Genet.**, v. 47: p. 965-968, 1993.
- BERQUEZ, G. O autismo infantil e Kanner. In: Mazet, P.; Lebovici, S. (org). Autismo e psicoses da criança, p. 20-30. Artes Médicas, Porto Alegre, 1991.
- BLACKMAN, J.A.; SELZER, S.C.; PATIL, S.; VAN DYKE, D.C. Autistic disorder associated with an iso-dicentric Y chromosome. **Dev. Med. Child. Neurol.**, v. 33: p. 153-166, 1991.

- BLOMQUIST, H.K.; BOHMAN, M.; EDVINSSON, S.O., *et al.* Frequency of the fragile X syndrome in infantile autism: a Swedish multicenter study. **Clin. Genet.**, v. 26: p. 113-117, 1985.
- BOLDOG, F.; GEMMILL, R.M.; WEST, J.; ROBINSON, M.; ROBINSON, L.; LI, E.; ROCHE, J.; TODD, S.; WAGGONER, B.; LUDSTROM, R.; JACOBSON, J.; MULLOKANDOV, M.R.; KLINGER, H.; DRABKIN, H.A. Chromosome 3p14 homozygous deletions and sequence analysis of FRA3B. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6: p. 193-203, 1997.
- BROWN, W.T.; JENKINS, E.C.; COHEN, J.L. *et al.* Fragile X and autism: a multicenter study. **Am. J. Med. Genet.**, v. 23: p. 341-352, 1986.
- BROWN, V.; SMALL, K.; LAKKIS, L.; FENG, Y.; GUNTER, C.; WILKINSON, K.D.; WARREN, S.T. Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. **J. Biol. Chem.**, v. 273: p. 1521-1527, 1998.
- BUNDEY, S.; HARDY, C.; VICKERS, S.; KILPATRICK, M.W.; CORBETT, J.A. Duplication of the 15q11-13 region in a patient with autism, epilepsy and ataxia. **Dev. Med. Child Neurol.**, v. 36: p. 736-742, 1994.
- CANTÚ, E.S.; STONE, J.W.; WING, A.A.; LANGE, H.R.; WILLIAMS, C.A. Cytogenetic survey for autistic fragile X carriers in a mental retardation center. **Am. J. Ment. Retard.**, v. 94: p. 442-447, 1990.
- CASTROVIAJO, P.; ROCHE, C.; BERMEJO, M. A.; MARTIN, L.V.; TENDERO, A.; ESQUIROZ, J. L.; PASCUAL, S.J.P. Hypomelanosis of Ito: a study of 76 infantile cases. **Brain Dev.**, v. 20: p. 36-43, 1998.
- CHENG, S.; SPINNER, N.B.; ZACHAI, E.H.; KNOLL, J.H.M. Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosome 15 from 11 patients. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 55: p. 753-759, 1994.
- CHINI, B.; RAIMOND, E.; ELGOYHEN, A.B.; MORALLI, D.; BALZARETTI, M.; HEINEMANN, S. Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha-7-nicotinic receptor subunit gene (*CHRNA7*). **Genomics**, v. 19: p. 379-381, 1994.

- CHUDLEY, A.E. Report on behavioral phenotype. In: Opitz, J.; Sutherland, G. (eds): Conference report: international workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. **Am. J. Med. Genet.**, v. 17: p. 5-94, 1984.
- 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, 1993.
- CLAGETT-DAME, M.; PLUM, L.A. Retinoid-regulated gene expression in neural development. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 7: p. 299-342, 1997.
- COHEN, I.L.; BROWN, W.T.; JENKINS, E.C.; KRAWCZUN, M.S.; FRENCH, J.H.; RAGUTHU, S.; WOLF-SCHEIN, E.G.; SUDHALTER, V.; FISCH, G.; WIENIEWSKI, K. Fragile X syndrome in female with autism. **Am. J. Med. Genet.**, v. 34: p. 302-303, 1989.
- COHEN, J.L.; SUDHALTER, V.; PFADT, A.; JENKINS, E.E.; BROWN, T.W.; VETZE, P.M. Why are the autism and the fragile X syndrome associated? Conceptual and methodological issues. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 48: p. 195-202, 1991.
- COMINGS, D.E.; COMINGS, B.G. Clinical and genetics relationships between autism-pervasive developmental disorder and Tourette syndrome: a study of 19 cases. **Am. J. Med. Genet.**, v. 39: p. 180-191, 1991.
- COMINGS, D.E.; WU, S.; CHIU, C.; MUHLEMAN, D.; SVERD, J. Studies of the c-Harvey-Ras gene in psychiatric disorders. **Psychiatry Res.**, v. 63: p. 25-32, 1996.
- COOK, E.H.Jr; LINDGREEN, V.; LEVENTHAL, B.L.; COURCHESNE, R.; LINCOLN, A.; SHULMAN, C.; LORD, C.; COURCHESNE, E. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 60: p. 928-934, 1997a.
- COOK, E.J.Jr, COURCHESNE, R.; LORD, C.; COX, N.J.; YAN, S.; LINCOLN, A. HAAS, R.; COURCHESNE, E.; LEVENTHAL, B.L. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorders. **Mol. Psychiatry**, v. 2: p. 247-250, 1997b.

- COOK, E.H.Jr; COURCHESNE, R.Y.; COX, N.J.; LORD, C.; GONEN, D.; GUTER, S.J.; LINCOLN, A.; NIX, K.; HAAS, R.; LEVENTHAL, B.L.; COURCHESNE, E. Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder with 15q11-13 markers. **Am. J. Med. Genet.**, v. 62: p. 1077-1083, 1998.
- COURCHESNE, E.; YEUNG-COURCHESNE, R.; PRESS, G.A.; HESSELINK, J.R.; JENNIGAN, T.L. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. **N. Engl. J. Med.**, v. 318: p. 1349-1354, 1988.
- COURCHESNE, E.; PRESS, G.A.; YEUNG-COURCHESNE, R. Parietal lobe abnormalities detected with MR in patients with infantile autism. **Am. J. Roentgenol.**, v. 160: p. 387-393, 1993.
- COURCHESNE, E.; SAITOH, O.; YEUNG-COURCHESNE, R.; PRESS, G.A.; LINCOLN, A.J.; HASS, R.H.; SCHREIBMAN, L. Abnormality of cerebellar vermal lobules VI and VII in patients with infantile autism: identification of hypoplastic and hyperplastic groups with MR imaging. **Am. J. Roentgenol.**, v. 162: p. 123-130, 1994.
- CROLLA, J.A.; HARVEY, J.F.; SITCH, F.L.; DENNIS, N.R. Supernumerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. **Hum. Genet.**, v. 95: p. 161-170, 1995.
- CROWE, R.R.; TSAI, L.Y. MURRAY, J.C.; PATIL, S.R.; QUINN, J. A study of autism using X chromosome DNA probes. **Biol. Psychiatry**, v. 24: p. 473-479, 1988.
- DANIELS, W.W.; WARREN, R.P.; ODELL, J.D.; MACIULIS, A.; BURGER, R.A.; WARREN, W.L.; TORRES, A.R. Increased frequency of the extended or ancestral haplotype B44-SC30-DR4 in autism. **Neuropsychobiology**, v. 32: p. 120-123, 1995.
- De GROUCHY, J.; TURLEAU, C. **Atlas des Maladies Chromosomiques**. Expansion Scientifique Française, Paris. 1982.
- De LONG, R.; NOHRIA, C. Psychiatric family history and neurological diseases in autistic spectrum disorders. **Dev. Med. Child Neurol.**, v. 36: p. 441-448, 1994.

- DOUCETTE-STAMM, L.; MONTEGGIA, L.M.; DONNELLY-ROBERTS, D.; WANG, M.T.; LEE, J.; TIAN, J.; GIORDANO, T. Cloning and sequence of the human alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor. **Drug Dev. Res.**, v. 30: p. 252-256, 1993.
- EBERHART, D.; MALTER, H.E.; FENG, Y.; WARREN, S.T. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. **Hum. Mol. Genet.**, v. 5: p. 1083-1091, 1996.
- EDELSON, S.M. Visión global del autism. <http://www.autism.org/>, 1995.
- EMSLIE, F.; WILLIAMSON, M.P.; REES, M.; KERR, M.; KJEDESEN, M.J.; PANG, K.A. SUNDQVIST, A.; FRIIS, M.L.; CHADWICK, D.; RICHENS, A.; CURTIS, D.; WHITEHOUSE, W.P.; GARDINER, R.M. Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. **Medizinische Genetik**, v. 9: p. 15, 1997.
- FAHSOLD, R.; ROTT, H.D.; CLAUSSEN, U.; SCHMALENBERGER, B. Tuberous sclerosis in a child with *de novo* translocation t(3;12)(p26.3;q23.3). **Clin. Genet.**, v. 40: p. 326-328, 1991.
- FISCH, G.S. Is autism associated with the fragile X syndrome? **Am. J. Med. Genet.**, v. 43: p. 47-55, 1992.
- FISCHER, K.M. Genes for Prader Willi syndrome/Angelman syndrome and fragile X syndrome are homologous, with genetic imprinting and unstable trinucleotide repeats causing mental retardation, autism and aggression. **Med. Hypotheses**, v. 47: p. 289-298, 1996.
- FLEJTER, W.L.; BENNET-BAKER, P.E.; GHAZIUDDIN, M.; McDONALD, M.; SHELDON, S.; GORSKI, J.L. Cytogenetic and molecular analysis of a inv dup(15) chromosomes observed in two patients with autistic disorders and mental retardation. **Am. J. Med. Genet.**, v. 61: p.182-187, 1996.
- FOLSTEIN, S.E.; PIVEN, J. Etiology of autism: genetic influences. **Pediatrics**, v. 87: p. 767-771, 1991.

- FOMBONNE, E.; MAZAUBRUM, C.; CANS, C.; GRANDJEAN, H. Autism and associated medical disorders in a french epidemiological survey. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v. 36: p. 1561-1569, 1997.
- FREEDMAN, M.C.; COON, H.; MYLES-WORSLEY, M.; ORR-URTREGER, A.; DAVIS, A.; POLYMEROPOULOS, M.; HOLIK, J.; HOPKINS, J.; HOFF, M.; ROSENTHAL, J.; WALDO, M.C; *et al.* Linkage of neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 94: p. 587-592, 1997.
- FRYNS, J.P.; KLECZKOWSKA, A. Autism and ring chromosome 18 mosaicism. **Clin. Genet.**, v. 42: p. 51, 1992.
- FU, Y.H.; KUHL, D.P.A.; PIZZUTI, A.; PIERETTI, M.; SUTCLIFFE, J.S.; RICHARDS, S.; VERKERK, A.J.M.H.; HOLDEN, J.J.A.; FENNLICK, R.G.Jr.; WARREN, S.T.; OOSTRA, B.A.; NELSON, D.L.; CASKEY, C.T. Variation of the CGG repeat at the fragile X results in genetic instability : resolution of the Sherman paradox. **Cell**, v. 67: p. 1047-1058, 1991.
- FUNG, D.C.Y.; YU, B.; CHEONG, K.F.; SMITH, A.; TRENT, R.J. *UBE3A* "mutations" in two unrelated and phenotypically different Angelman syndrome patients. **Hum. Genet.**, v. 102: p. 487-492, 1998.
- GAROFALO, G.; RAGUSA, R.M.; ARGIOLOS, A.; SCAVUZZO, C.; SPINA, E.; BARLETTA, C. Evidence of chromosomal fragile sites in schizophrenic patients. **Ann Génét**, v. 36: p. 132-135, 1993.
- GHAZIUDDIN, M.; SHELDON, S.; TSAI, L.Y.; ALESSI, N. Abnormalities of chromosome 18 in a girl with mental retardation and autistic disorder. **J. Intellect. Disabilit. Res.**, v. 37: p. 313-317, 1993.
- GHAZIUDDIN, M.; BOLYARD, B.; ALESSI, N. Autistic disorder in Noonan syndrome. **J. Intellect. Disabilit. Res.**, v. 38: p. 62-72, 1994.
- GILLBERG, C. L. Autism and autistic-like conditions: subclasses among disorders of empathy. **J. Child Psychol. Psychiatry**, v. 33: p. 813-842, 1992a.

- GILLBERG, C. Subgroups in autism: are there behavioural phenotypes typical of underlying medical conditions? **J. Intellect. Disabilit. Res.**, v. 36: p. 201-214, 1992b.
- GILLBERG, C.; WINNEGARD, J.; WAHLSTROM, J. The sex chromosomes: a key to autism? An XYY case of infantile autism. **Appl. Res. Ment. Retard.**, v. 5: p. 353, 360, 1984.
- GILLBERG, C.; STEFFENBURG, S.; JAKOBSSON, G. Neurobiological findings in 20 relatively gifted children with Kanner-type autism or Asperger syndrome. **Dev. Med. Child. Neurol.**, v. 29: p. 641-649, 1987.
- GILLBERG, C.; STEFFENBURG, S.; WAHLSTROM, J.; GILLBERG, I.C.; SJOSTEDT, A.; MARTINSSON, T.; LIEDGREN, S.; EEG-OLOFSSON, O. Autism associated with marker chromosome. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v. 30: p. 489-494, 1991.
- GLATT, K.A.; SINNET, D.; LALANDE, M. Dinucleotide repeat polymorphism at the GABA_A receptor alpha-5 (*GABRA5*) locus at chromosome 15q11-q13. **Hum. Mol. Genet.**, v. 1: p. 348, 1992.
- GLOVER, T.W. FudR induction of the X chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 33: p. 234, 1981.
- GOLDFINE, P.E.; McPHERSON, P.M.; HEATH, G.A.; HARDESTY, V.A.; BEAUREGARD, L.J.; GORDON, B. Association of fragile X syndrome with autism. **Am. J. Psychiatry**, v. 142: p. 108-110, 1985.
- GRANDINO, A. Autismo infantil e genética. **Temas**, v. 38: p. 50-60, 1990.
- GREGER, V.; KNOLL, J.H.M.; WOOLF, E.; GLATT, K.; TYNDALE, R.F.; DeLOREY, T.M.; OLSEN, R.W.; TOBIN, A.J.; SIKELA, J.M.; NAKATSU, Y.; BRILLIANT, M.H.; WHITING, P.S.; LALANDE, M. The gamma-aminobutyric acid receptor gamma-3 subunit gene (*GABRG3*) is tightly linked to the alpha-5 subunit gene (*GABRA5*) on the chromosome 15q11-q13 and is transcribed in the same orientation. **Genomics**, v. 26: p. 258-264, 1995.

- GUPTA, S.; AGGARWAL, S.; HEADS, C. Dysregulated immune system in children with autism: beneficial effects of intravenous immune globulin on autistic characteristics. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 26: 1996.
- HADDAD, L.A.; MINGRONI-NETTO, R.C.; VIANNA-MORGANTE, A.M.; PENA, S.D.J. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among retarded males. **Hum. Genet.**, v. 97: p. 808-812, 1996.
- HAGERMAN, R.J. Physical and behavioral phenotype. In: Hagerman, R.J.; Silverman, A.C. (eds.). **Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1996, p. 3-87.
- HAGERMAN, R.J.; JACKSON, C.; AMIRI, K.; SILVERMAN, A.C.; O'CONNOR, R.; SOBESKY, W. Girls with fragile X syndrome : physical and neurocognitive status and outcome. **Pediatrics**, v. 89: p. 395-400, 1992.
- HALLMAYER, J.; PINTADO, E.; LOTSPEICH, L.; SPIKER, D.; McMAHON, W.; PETERSEN, P.B.; NICHOLAS, P.; PINGREE, C.; KRAEMER, H.C.; WONG, D.L.; RITVO, E.; LIN, A.; HEBERT, J.; CAVALLI-SFORZA, L.L.; CIARANELLO, R.D. Molecular analysis and test of linkage between the *FMR-1* gene and infantile autism in multiplex families. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 55: p. 951-959, 1994.
- HALLMAYER, J.; SPIKER, D.; LOTSPEICH, L.; McMAHON, W.; PETERSEN, P.B.; NICHOLAS, P.; PINGREE, C.; CIARANELLO, R.D. Male-to-male transmission in extended pedigrees with multiple cases of autism. **Am. J. Med. Genet.**, v. 67: p. 13-18, 1996a.
- HALLMAYER, J.; HEBERT, J.M.; SPIKER, D.; LOTSPEICH, L.; McMAHON, W.M.; PETERSEN, B.; NICHOLAS, P.; PINGREE, C.; LIN, A.A.; CAVALLI-SFORZA, L.L.; RISCH, N.; CIARANELLO, R.D. Autism and the X chromosome. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 53: p. 985-989, 1996b.
- HANKS, M.; WURST, W.; ANSON-CATWRIGHT, L.; AUERBACH, A.B.; JOYNER, A.L. Rescue of the *En-1* mutant phenotype replacement of *En-1* with *En-2*. **Science**, v. 269: p. 679-682, 1995.

- HAPPLE, R. Tentative assignment of hypomelanosis of Ito to 9q33-qter. **Hum. Genet.**, v. 75: p. 98-99, 1987.
- HAPPLE, R. Incontinentia pigmenti versus hypomelanosis of Ito: the whys and wherefores of a confusing issue. **Am. J. Med. Genet.**, v. 79: p. 64-65, 1998.
- HÉRAULT, J.; PERROT, A.; BARTHÉLÉMY, C.; BÜCHLER, M.; CHERPY, C.; LEBOYER, M.; SAUVAGE, D.; LELORD, G.; MALLET, J.; MÜH, J.P. Possible association of c-Harvey-ras-1 (HRAS) marker with autism. **Psychiatry Res.** v. 46: p. 261-267, 1993.
- HÉRAULT, J.; MARTINEAU, J.; PETIT, E.; PERROT, A.; SAUVAGE, D.; BARTHÉLÉMY, C. Genetic markers in autism: association study on short arm of chromosome 11. **J. Autism Dev. Disord.**; v. 24: p. 233-234, 1994.
- HÉRAULT, J.; PETIT, E.; MARTINEAU, J.; PERROT, A.; LENOIR, P.; CHERPY, C.; BARTHÉLÉMY, C.; SAUVAGE, D.; MALLET, J.; MÜH, J.P. Autism and genetics: clinical approach and association study with two markers of *HRAS* gene. **Am. J. Med. Genet.**, v. 60: p. 276-281, 1995.
- HÉRAULT, J.; PETIT, E.; MARTINEAU, J.; CHERPI, C.; PERROT, A.; BARTHÉLÉMY, C.; LELORD, G.; MÜH, J.P. Serotonin and autism: biochemical and molecular biology features. **Psychiatry Res.**, v. 65: p. 33-43, 1996.
- HINDS, H.L.; ASHLEY, C.T.; SUTCLIFFE, J.S.; NELSON, D.L.; WARREN, S.T.; HOUSMAN, D.E.; SCHALLING, M. Tissue specific expression of *FMR-1* provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. **Nature Genet.**, v. 3: p. 36-43, 1993.
- HIRST, M.C.; BARNICOAT, A.; FLYNN, G.; WANG, Q.; DAKER, M.; BUCKLE, V.J.; DAVIES, K.E.; BOBROW, M. The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27-q28 distal to both FRAXA and FRAXE. **Hum. Mol. Genet.**, v. 2: p. 197-200, 1993.
- HO, H.H.; KALOUSEK, D.K. Brief report: fragile X syndrome in autistic boys. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 23: p. 343-347, 1989.

- HOLDEN, J.J.A.; WING, M.; CHALIFOUX, M.; JULIEN-INALSINGH, C.; SCHUTZ, C.; ROBINSON, P.; SZATMARI, P.; WHITE, B.N. Lack of expansion of triplet repeats in the *FMR-1*, *FRAXE*, and *FRAXF* loci in male multiplex families with autism and pervasive developmental disorders. **Am. J. Med. Genet.**, v. 64: p. 399-403, 1996.
- HOTOPF, M.; BOLTON, P. A case of autism associated with partial tetrassomy 15. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 25: p. 41-49, 1995.
- HOWARD-PEEBLES, P.N.; FRIEDMAN, J.M. Unaffected carrier males in families with fragile-X syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 37: p. 956, 1985.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. A rapid technique for producing silver-stained NORs and trypsin-Giemsa bands on human chromosomes. **Hum. Genet.**, v. 43: p. 53-56, 1980.
- INTERNATIONAL MOLECULAR GENETIC STUDY OF AUTISM CONSORTIUM. **Hum. Mol. Genet.**, v. 7: p. 571-578, 1998.
- ISCN (1995): **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Mitelmam, F. (ed); S. Karger, Basel, 1995.
- JAYAKAR, P.; CHUDLEY, A.E.; RAY, M.; EVANS, J.A.; PERLOV, J.; WAND, R. Fra(2)(q13) and inv(9)(p11q12) in autism: causal relationship? **Am. J. Med. Genet.**, v. 23: p. 381-392, 1986.
- JORDE, L.B.; HASSTEDT, S.J.; RITVO, E.R.; MASON-BROTHERS, A.; FREEMAN, B. J.; PINGREE, C.; McMAHON, W.M.; PETERSEN, B.; JENSON, W.R.; MO, A. Complex segregation analysis of autism. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 49: p. 932-938, 1991.
- KLAUCK, S.M.; POUSTKA, F.; BENNER, A.; LESCH, K.P.; POUSTKA, A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? **Hum. Mol. Genet.**, v. 6: p. 2233-2238, 1997.
- KLECZKOWSKA, A.; FRYNS, J.P.; DECOCK, P.; VANDER-BERGHE, H. Complex chromosomal rearrangement (CCR), moderate mental retardation and discrete dysmorphic syndrome. **Genet. Couns.**, v. 4: p. 321-324, 1993.

- KNOLL, J.H.; SINNETT, D.; WAGSTAFF, J. GLATT, K.; WILCOX, A.S.; WHITING, P.M.; WINGROVE, P.; *et al.* FISH ordering of reference markers and of the gene for the $\alpha 5$ subunit of the γ -aminobutyric acid receptor (GABRA5) within the Angelman and Prader-Willi syndrome chromosomal regions. **Hum. Mol. Genet.**, v. 2: p. 183-189, 1993.
- Le COUTEUR, A. Changing perspectives in autism. **Br. J. Hosp. Med.**, v. 50: p. 159-161, 1993.
- LEANA-COX, J.; JENKINS, L.; PALMER, C.G.; PLATTNER, R.; SHEPPARD, L.; FLEJTER, W.L.; ZACKOWSKI, J.; TSIEN, F.; SCHWARTZ, S. Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes, using probes specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome region: clinical implications. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 54: p. 748-756, 1994.
- LEVITAS, A.; HAGERMAN, R.J.; BRADEN, M.; RIMLAND, B.; McBOGG, P.; MATHEUS, I. Autism and the fragile X syndrome. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 4: p. 151-158, 1983.
- LEWIS, K.E.; LUBETSKY, M.J.; WENGER, S.L.; STEELE, M.W. Chromosomal abnormalities in a psychiatric population. **Am. J. Med. Genet.**, v. 60: p. 53-54, 1995.
- LI, S.Y.; CHEN, Y.C.J.; LAI, T.J.; HSU, C.Y.; WANG, Y.C. Molecular and cytogenetic analysis of autism in Taiwan. **Hum. Genet.**, v. 92: p. 441-445, 1993.
- LOMBROSO, P.J.; PAULS, D.L.; LECKMAN, J.F. Genetic mechanisms in childhood psychiatric disorders. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v. 33: p. 921-938, 1994.
- LOPREIATJO, J.O.; WULFSBERG, E.A. A complex chromosome rearrangement in a boy with autism. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 13: p. 281-283, 1992.
- MALMGREN, H.; GUSTAVSON, K.H.; WALSTRÖM, J.; ARPI-HENRIKSON, I.; BENSCH, J.; PETTERSON, U.; DAHL. Infantile autism-fragile X: molecular findings support genetic heterogeneity. **Am. J. Med. Genet.**, v. 44: p. 830-833. 1992.

- MARINER, R.; JACKSON, A.W.; LEVITAS, A.; HAGERMAN, R.J.; BRADEN, M.; McBOGG, P.M.; SMITH, A.C.M.; BERRY, R. Autism, mental retardation and chromosomal abnormalities. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 16: p. 425-440, 1986.
- MARTINSSON, T.; JOHANNESSON, T.; VUJIC, M.; SJOSTEDT, A.; STEFFENBURG, S.; GILLBERG, C.; WAHLSTROM, J. Maternal origin of invdup(15) chromosomes in infantile autism. **Eur. Child Adoles. Psychiatry**, v. 5: p. 185-192, 1996.
- MATSUISHI, T.; SHIOTSUKI, Y.; NIIKAWA, N.; KATAFUCHI, Y.; OTAKI, E.; ANDO, H.; YAMASHITA, Y.; HIRIKAWA, M.; URABE, F.; KURIYA, N.; YAMASHITA, F. Fragile X syndrome in japanese patients with infantile autism. **Pediatr. Neurol**, v. 3: p. 284-287, 1987.
- MATSUURA, T.; SUTCLIFFE, J.S.; FANG, P.; GALJAARD, R.J.; JIANG, Y.; BENTON, C.S.; ROMMENS, J.M.; BEAUDET, A.L. *De novo* truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. **Nature Genet.**, v. 15: p. 74-77, 1997.
- MAVROU, A.; SYRROU, M.; TSENGHI, C.; AGELAKIS, M.; YOUROUKOS, S.; METAXOTOU, C. Martin-Bell syndrome in Greece, with report of another 47,XXY fragile X patient. **Am. J. Med. Genet.**, v. 31: p. 735-739, 1988.
- MAZZOCO, M.M.M.; WENDY, R.K.; BAUMGARDNER, T.L.; FREUND, L.S.; REISS, A.L. Autistic behaviors among girls with fragile X syndrome. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 27: p. 415-435, 1997.
- McDOUGLE, C.J.; EPPERSON, C.N.; PRICE, L.H.; GELERNTER, J. Evidence for linkage disequilibrium between serotonin transporter protein gene (*SLC6A4*) and obsessive compulsive disorder. **Mol. Psychiatry**, v. 3: p. 270-273, 1998.
- McGILLIVRAY, B.C.; HERBST, D.S.; DILL, F.J.; SANDERCOCK, H.J.; TISCHLER, B. Infantile autism: an occasional manifestation of fragile (X) mental retardation. **Am. J. Med. Genet.**, v. 23: p. 353-358, 1986.

- McLENNAM, J.D.; LORD, C.; SCHOPLER, E. Sex differences in higher functioning people with autism. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 23: p. 217-227, 1993.
- MIKKELSEN, M. Report on behavioral phenotype. In: Opitz, J.; Sutherland, G. (eds): Conference report: international workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. **Am. J. Med. Genet.**, v. 17: p. 5-94, 1984.
- MIN, W.; WOO, H.J.; LEE, C.S.; LEE, K.K.; YOON, W.K.; PARK, H.W.; KIM, M.H. 307-bp fragment in HOXA7 upstream sequence is sufficient for anterior boundary formation. **DNA Cell Biol.**, v. 17: p. 293-299, 1998.
- MURAKAMI, J.W.; COURCHESNE, E.; PRESS, G.A.; TEUNG-COURCHESNE, R.; HESSELIN, J.R. Reduced cerebellar hemisphere size and its relationship to vermal hypoplasia in autism. **Arch. Neurol.**, v. 46: p. 689-694, 1989.
- MURAYAMA, K.; GREENWOOD, R.S.; RAO, K.W.; AYLSWORTH, A.S. Neurological aspects of del(1q) syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 40: p. 488-492, 1991.
- NELSON, K.B. Prenatal and perinatal factors in the etiology of autism. **Pediatrics**, v. 87: p. 761-766, 1991.
- OBERLÉ, I.; ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; KRETZ, C.; DEVRY, D.; HANAUER, A. BOUE, J.; BERTHEAS, M.F.; MANDEL, J.L. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. **Science**, v. 252: p. 1097-1102, 1991.
- OOSTRA, B.A.; HOOGEVEEN, A.T. Animal model for fragile X syndrome. **Ann. Med.**, v. 29: p. 563-567, 1997.
- PAYTON, J.B.; STEELE, M.W.; WENGER, S.L.; MINSHEW, N.J. The fragile X marker and autism in perspective. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v. 28: p. 417-421, 1989.
- PELLEGRINO, J.E.; SCHNUR, R.E.; KLINE, R.; ZACKAU, E.H.; SPINNER, N.B. Mosaic loss of 15q11-q13 in a patient with hypomelanosis of Ito: is there a role for the P gene? **Hum. Genet.**, v. 96: p. 485-489, 1995.

- PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M.; GONTIJO, N.F.; MEDEIROS, A.M.; RIBEIRO, J.C.C. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. 12: p. 146-152, 1991.
- PETIT, E.; HÉRAULT, J.; MARTINEAU, J.; PERROT, A.; BARTHÉLÉMY, C.; HAMEURY, L.; SAUVAGE, D.; LELORD, G.; MÜH, J.P. Association study with two markers of a human homeogene in infantile autism. **J. Med. Genet.**, v. 32: p. 269-274, 1995.
- PETIT, E.; HERÁULT, J.; RAYNOUD, M.; CHERPI, C.; PERROT, A.; BARTHÉLEMY, C.; LELORD, G.; MÜH, J.C. X chromosome and infantile autism. **Biol. Psychiatry**, v. 40: P. 457-464, 1996.
- PRINCE, V.; LUMSDEN, A. *Hoxa-2* expression in normal and transposed rhombomeres: indepent regulation in the neural like and neural crest. **Development**, v. 120 p. 911-923, 1994.
- PUESCHEL, S.M.; HERMAN, R. GRODEN, G. Brief report: screening children with autism for fragile-X syndrome and phenylketonuria. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 15: p. 335-338, 1985.
- RASSOL, F.V.; Le BLEAU, M.M.; SHEN, M.L.; NEILLY, M.E.; ESPINOSA, R. 3rd; ONG, S.T.; BOLDOG, F.; DRABKIN, H.; McCARROL, R.; McKEITHAN, T.W. Direct cloning of the DNA sequences from the common fragile site region at chromosome band 3p14.2. **Genomics**, v. 35: p. 109-117, 1996.
- REISS, A.L.; FEINSTEIN, C.; TOOMEY, K.E.; GOLDSMITH, B.; ROSENBAUN, K.; CARUSO, M.A. Psychiatric disability associated with the fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 23: p. 393-402, 1986.
- REYNIERS, E.; VITZ, L.; De BOULLE, K.; VAN ROY, B.; VAN VELZEN, D.; DE GRAAFF, E.; VERKERK, A.J.M.H.; JORENS, H.Z.J.; DARBY, J.K.; OOSTRA, B.; WILLEMS, P.J. The full mutation in the *FMR-1* gene of male fragile X patients is absent in this sperm. **Nature Genet.**, v. 4: p. 143-146, 1993.
- REYNIERS, E.; WOLFF, G.; TARIVERDIAN, G.; De BOULLE, K.; STORM, K.; KOOY, R.F.; WILLEMS, P.J. Severe mental retardation and

- machroorchidism without mutation in the *FMR1* gene. **Am. J. Med. Genet.**, v. **64**: p. 408-412, 1996.
- RITVO, E.R.; JORDE, L.B.; MASSOM-BROTHERS, A. The UCLA University of Utah epidemiologic survey of autism: recurrence risk estimates and genetic counseling. **Am. J. Psychiatry**, v. **146**: 1032-1036, 1989.
- ROBINSON, W.P.; WAGSTAFF, J.; BERNASCONI, F.; BACCICHETTI, C.; ARTIFONI, L.; FRANZONI, E.; SUSLAK, L.; SHIH, L.T.; AVIV, H.; SCHINZEL, A.A. Uniparental disomy explains the occurrence of the Angelman or Prader-Willi syndrome in patients with additional small inv dup(15) chromosome. **J. Med. Genet.**, v. **30**: p. 756-760, 1993.
- RODIER, P.M.; INGRAM, J.L.; TISDALE, B.; NELSON, S.; ROMANO, J.; Embryological origin of autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **J. Comp. Neurol.**, v. **370**: p. 247-261, 1996.
- RODIER, P.M.; BRYSON, S.E.; WELCH, J.P. Minor malformation and physical measurements in autism: data from Nova Scotia. **Teratology**, v. **55**: p. 319-325, 1997.
- ROUGEULLE, C.; GLATT, H.; LALANDE, M. The Angelman syndrome candidate gene, *UBE3A/E6-AP*, is imprinted in brain. **Nat. Genet.**, v. **17**: p. 14-15, 1997.
- ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; BIANCALA, V.; BLUMENFELD, S.; KRETZ, C.; BOUÉ, J.; TOMMERUP, N.; VAN DER HAGEN, C.; DeLOZIER-BLANCHET, C.; CROQUETTE, M.F.; GILGENKRANTZ, S.; JALBERT, P.; VOELCKEL, M.A.; OBERLÉ, I.; MANDEL, J.L. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. **N. Engl. J. Med.**, v. **325**: p. 1673-1681, 1991.
- SALIBA, J.R.; GRIFFITHS, M. Autism of the Asperger type associated with an autosomal fragile site. **J. Autism Dev. Disord.**, v. **20**: p. 569-575, 1990.
- SANTOS, F.R.; PENA, S.D.J.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of an Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Hum. Genet.**, v. **90**: p. 655-656, 1993.

- SCHINZEL, A. Autistic disorder and additional inv dup (15) (pterq13) chromosome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 35: p. 447, 1990.
- SCHROER, R.J.; PHELAN, M.C.; MICHAELIS, R.C.; CRAWFORD, E.C.; SKINNER, S.A.; CUCCARO, M.; SIMENSEN, R.J.; BISHOP, J.; SKINNER, C.; FENDER, D.; STEVENSON, R.C. Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. **Am. J. Med. Genet.**, v. 76: p. 327-336, 1998.
- SESHADRI, K.; WALLERSTEIN, R.; BURACK, G. 18q- chromosomal abnormality in a phenotypically normal 2½-years-old male with autism. **Dev. Med. Child. Neurol.**, v. 34: p. 999-1009, 1992.
- SHERMAN, S. Epidemiology. In: Hagerman, R.J.; Silverman, A.C. (eds.). **Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1996, p. 3-87.
- SHIBUYA, Y.; TONOKI, H.; KAJII, N.; NIIKAWA, N. Identification of a marker chromosome as inv dup(15) by molecular analysis. **Clin. Genet.**, v. 40: p. 233-236, 1991.
- SIMONIC, I.; GERICKE, G.S. The enigma of common fragile sites. **Hum. Genet.**, v. 97: p. 524-531, 1996.
- SIOMI, H.; CHOI, M.; SIOMI, M.C.; NUSSBAUM, R.L.; DREYFUSS, G. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of *FMR-1* that causes fragile X syndrome. **Cell**, v. 77: p. 33-39, 1994.
- SMALLEY, S.L. Genetic influences in autism. **Psychiatr. Clin. North Am.**, v. 14: p. 125-129, 1991.
- SMALLEY, S.L. Genetic influences in childhood onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 60: p. 1276-1282, 1997.
- SMALLEY, S.L.; TANGUAY, P.E.; SMITH, M.; GUTIERREZ, G. Autism and tuberous sclerosis. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 22: p. 339-355, 1992.

- SPIKER, D.; LOTSPEICH, L.; KRAEMER, H.C.; HALLMAYER, J.; McMAHON, W.; PETERSEN, P.B.; NICHOLAS, P.; PINGREE, C.; WIESE-SLATER, S.; CHIOTTI, C.; WONG, D.L.; DIMICELLI, S.; RITVO, E.; CAVALLI-SFORZA, L.L.; CIARANELLO, R.D. Genetics of autism: characteristics of affected and unaffected children from 37 multiplex families. **Am. J. Med. Genet.**, v. 54: p. 27-35, 1994.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v. 75: p. 305-306, 1972.
- SVERD, J. Tourette syndrome and autistic disorder: a significant relationship. **Am. J. Med. Genet.**, v. 39: p. 173-179, 1991.
- TRANEBJAERG, L.; KURE, D. Prevalence of fra(X) and other specific diagnoses in autistic individuals in a Danish country **Am. J. Med. Genet.**, v. 38: p. 212-214, 1991.
- TURNER, B. Report on behavioral phenotype. In: Opitz, J.; Sutherland, G. (eds): Conference report: international workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. **Am. J. Med. Genet.**, v. 17: p. 5-94, 1984.
- TURNER, B. JENNINGS, A.N. Trissomy for chromosome 22. **Lancet**, v. I: p. 49-50, 1961.
- VARELLA-GARCIA, M.; TAJARA, E.H. Métodos para análise de cromossomos humanos: manual de protocolos. IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, 1991.
- VENTER, P.A.; OP'THOF, J.; COETZEE, D.J.; VAN DER WALT, C.; RETIEF, A.E. No marker (X) syndrome in autistic children. **Hum. Genet.**, v. 67: p. 107, 1984.
- VERKERK, A.J.M.H.; PIERETTI, M.; SUTCLIFF, J.S., *et al.* Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, v. 65: p. 905-914, 1991.
- VIANNA-MORGANTE, A.M.; MINGRONI-NETTO, R.C.; BARBOSA, A.C.C.; ROSENBERG, C. FRAXF e duplicação do cromossomo 8 em paciente com

- retardo mental e malformações congênitas múltiplas. **Rev. Bras. Genet.**, v. **17 (suppl)**: p. 89, A. 60, resumo, 1994.
- VOELLER, K.K.S. Developmental neurobiological aspects of autism. **J. Autism Dev. Disord.**, v. **26**: p. 189-193, 1996.
- VU, T.H.; HOFFMAN, A.R. Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. **Nature Genet.**, v. **17**: p. 12-13, 1997.
- WAGSTAFF, J.; KNOLL, J.H.M.; FLEMING, J. *et al.* Localization of the gene encoding the GABA-A receptor $\beta 3$ subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. **Am. J. Hum. Genet.**, v. **49**: p. 330-337, 1991.
- WAHLSTROM, J.; GILLBERG, C.; GUSTAVSON, K.H.; HOLMGREN, G. Infantile autism and the fragile X: a Swedish multicenter study. **Am. J. Med. Genet.**, v. **23**: p. 403-408, 1986.
- WAKABAYASHI, S. A case of infantile autism associated with Down syndrome. **J. Autism Dev. Disord.**, v. **9**: p. 31-36, 1979.
- WANG, Y.A.; GELLIBOLIAN, R.; SHIMIZU, M.; WELLS, R.D.; GRIFFITH, J.; Long triplet repeat blocks exclude nucleosomes: a possible mechanism for the nature of fragile sites in chromosomes. **J. Mol. Biol.**, v. **263**: p. 511-516, 1996.
- WARREN, R.P.; ODELL, J.D.; WARREN, W.L.; BURGER, R.A.; MACIULIS, A.; DANIELS, W.W.; TORRES, A.R. Strong association of the third hypervariable region of HLA-DR beta 1 with autism. **J. Neuroimmunol.**, v. **67**: p. 97-102, 1996a.
- WARREN, R.P.; SINGH, V.K.; AVERRET, R.E.; ODELL, J.D.; MACIULIS, A.; BURGER, R.A.; DANIELS, W.W.; WARREN, W.L. Immunogenetic studies in autism and related disorders. **Mol. Chem. Neuropathol**, v. **28**: p. 77-81, 1996b.
- WATSON, M.S.; LECKMAN, J.F.; ANNEX, B.; BREG, W.R.; BOLES, D.; VOLKMAR, R.R.; COHEN, D.J. Fragile X in a survey of 75 autistic males. **New Engl. J. Med.**, v. **310**: p. 1462, 1984.

- WEIDMER-MIKHAIL, E.; SHELDON, S.; GHAZIUDDIN, M. Chromosomes in autism and related pervasive developmental disorders: a cytogenetic study. **J. Intellect. Disabil. Res.**, v. 42: p. 8-12, 1998.
- WHITE, S. Report on behavioral phenotype. In: Opitz, J.; Sutherland, G. (eds): Conference report: international workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. **Am. J. Med. Genet.**, v. 17: p. 5-94, 1984.
- WILSON, G.N.; AL SAADI, A.A. Obesity and abnormal behavior associated with interstitial deletion of chromosome 18. **J. Med. Genet.**, v. 26: p. 62-63, 1989.
- WRIGHT, H.H.; YOUNG, S.R.; EDWARDS, J.G.; ABRAMSON, R.K.; DUNCAN, J. Fragile X syndrome in a population of autistic children. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v. 25: p. 641-644, 1987.
- YU, S.; PRITCHARD, M.; KREMER, E.J.; LYNCH, M. *et al.* Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. **Science**, v. 252: p. 1179, 1181, 1991.

ANEXO I

Critérios diagnósticos do DSM-IV (APA, 1994) para os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento

Critérios Diagnósticos para 299.00 Transtorno Autista

- A. Um total de seis (ou mais) itens de (1), (2) e (3), com pelo menos dois de (1), um de (2) e um de (3):
- (1) prejuízo qualitativo na interação social, manifestado por pelo menos dois dos seguintes aspectos:
 - (a) prejuízo acentuado no uso de múltiplos comportamentos não-verbais, tais como contato visual direto, expressão facial, posturas corporais e gestos para regular a interação social.
 - (b) fracasso em desenvolver relacionamentos com seus pares apropriados ao nível de desenvolvimento.
 - (c) falta de tentativa espontânea de compartilhar prazer, interesses ou realizações com outras pessoas (por exemplo, não mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse).
 - (d) falta de reciprocidade social ou emocional.
 - (2) prejuízos qualitativos na comunicação, manifestados por pelo menos um dos seguintes aspectos:
 - (a) atraso ou ausência total de desenvolvimento da linguagem falada (não acompanhada por uma tentativa de compensar através de modo alternativos de comunicação, tais como gestos ou mímica).
 - (b) em indivíduos com fala adequada, acentuado prejuízo na capacidade de iniciar ou manter uma conversação.
 - (c) uso estereotipado e repetitivo da linguagem ou linguagem idiossincrática.
 - (d) falta de jogos ou brincadeiras de imitação social variados e espontâneos apropriados ao nível de desenvolvimento.
 - (3) padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes aspectos:
 - (a) preocupação insistente com um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse, anormais em intensidade ou foco.
 - (b) adesão aparentemente inflexível a rotinas ou rituais específicos e não-funcionais.
 - (c) maneirismos motores estereotipados e repetitivos (por ex., agitar ou torcer mãos ou dedos, ou movimentos complexos de todo o corpo).
 - (d) preocupação persistente com partes de objetos.
- B. Atrasos ou funcionamento anormal em pelo menos uma das seguintes áreas, com início antes dos 3 anos de idade: (1) interação social, (2) linguagem para fins de comunicação social, ou (3) jogos imaginativos ou simbólicos.
- C. A perturbação não é melhor explicada por Transtorno de Rett ou Transtorno Desintegrativo da Infância.

Critérios diagnósticos para 299.80 Transtorno de Asperger

- A. Prejuízo qualitativo na interação social, manifestado por pelo menos dois dos seguintes quesitos:
- (1) prejuízo acentuado no uso de múltiplos comportamentos não-verbais tais como contato visual direto, expressão facial, posturas corporais, gestos para regular a interação social.
 - (2) fracasso para desenvolver relacionamentos apropriados ao nível de desenvolvimento com seus pares.
 - (3) ausência de tentativa espontânea de compartilhar prazer, interesses ou realizações com outras pessoas (por ex., deixar de mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse a outras pessoas).
 - (4) falta de reciprocidade social ou emocional.
- B. Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamento, interesse e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes quesitos:
- (1) insistente preocupação com um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesses, anormal em intensidade ou foco.
 - (2) adesão aparentemente inflexível a rotinas e rituais específicos e não-funcionais.
 - (3) maneirismos motores estereotipados e repetitivos (por exemplo., dar pancadinhas ou torcer as mãos ou os dedos, ou movimentos complexos de todo o corpo).
 - (4) insistente preocupação com partes de objetos.
- C. A perturbação causa prejuízo clinicamente significativo nas áreas sociais ocupacional ou outras áreas importantes de funcionamento.
- D. Não existe um atraso geral clinicamente significativo na linguagem (por exemplo, palavras isoladas são usadas aos dois anos, frases comunicativas são usadas aos três anos).
- E. Não existe um atraso geral clinicamente significativo no desenvolvimento cognitivo ou no desenvolvimento de habilidades de auto-ajuda apropriadas à idade ou do comportamento adaptativo (outro que não a interação social) e curiosidade acerca do ambiente na infância.
- F. Não são satisfeitos os critérios para um outro Transtorno Invasivo do Desenvolvimento ou Esquizofrenia.



Critérios Diagnósticos para 299.80 Transtorno de Rett**A. Todos os quesitos abaixo:**

- (1) desenvolvimento pré-natal e perinatal aparentemente normal.
- (2) desenvolvimento psicomotor aparentemente normal durante os primeiros cinco meses após o nascimento.
- (3) circunferência craniana normal ao nascer.

B. Início de todas as seguintes características após o período de desenvolvimento normal:

- (1) desaceleração do crescimento craniano entre os cinco e os 48 meses de idade.
- (2) perda de habilidades manuais voluntárias anteriormente adquiridas entre os cinco e trinta meses de idade, com o desenvolvimento subsequente de movimentos estereotipados das mãos (por exemplo, gestos de torcer ou lavar as mãos).
- (3) perda do envolvimento social ocorre precocemente no curso do transtorno (embora em geral a interação social se desenvolva posteriormente).
- (4) aparecimento de marcha ou movimentos do tronco fracamente coordenados.
- (5) desenvolvimento das linguagens expressiva ou receptiva severamente prejudicado, com severo retardo psicomotor.



Critérios diagnósticos para 299.10 Transtorno Desintegrativo da Infância

- A. Desenvolvimento aparentemente normal, pelo menos durante os dois primeiros anos após o nascimento, manifestado pela presença de comunicação verbal e não-verbal, relacionamentos sociais, jogos e comportamento adaptativo apropriados à idade.
- B. Perda clinicamente significativa de habilidade já adquiridas (antes dos 10 anos) em pelo menos duas das seguintes áreas:
 - (1) linguagem expressiva ou receptiva.
 - (2) habilidades sociais ou comportamento adaptativo.
 - (3) controle intestinal ou vesical.
 - (4) jogos.
 - (5) habilidades motoras.
- C. Anormalidades do funcionamento em pelo menos duas das seguintes áreas:
 - (1) prejuízo qualitativo na interação social (por ex., prejuízo nos comportamentos não-verbais, fracasso para desenvolver relacionamentos com seus pares, falta de reciprocidade social ou emocional).
 - (2) prejuízos qualitativos na comunicação (por ex., atraso ou ausência de linguagem falada, incapacidade para iniciar ou manter uma conversação, uso estereotipado e repetitivo da linguagem, falta de jogos variados de faz-de-conta).
- D. A perturbação não é melhor explicada por um outro Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Específico ou por Esquizofrenia.

