



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Dante Bruno Avanso Rosan

**Alterações Genômicas e Transtornos Neuropsiquiátricos em
Familiares de Autistas**

São José do Rio Preto - SP
2019

Dante Bruno Avanso Rosan

**Alterações Genômicas e Transtornos Neuropsiquiátricos em
Famíliares de Autistas**

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

Financiadora: Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

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

R788a

Rosan, Dante Bruno Avanso

Alterações genômicas e transtornos neuropsiquiátricos em familiares de autistas / Dante Bruno Avanso Rosan. -- São José do Rio Preto, 2019

90 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Agnes Cristina Fett-Conte

1. Genética humana. 2. Neuropsiquiatria. 3. Biologia molecular. 4. Mutação (Biologia). 5. Transtorno do espectro autista. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dante Bruno Avanso Rosan

**Alterações Genômicas e Transtornos Neuropsiquiátricos em
Famíliares de Autistas**

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

Financiadora: Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte
FAMERP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Ilha Solteira

Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marcos Ricardo Datti Micheletto
UNESP – São José dos Campos

Dr^a. Patricia Pereira do Nascimento
SYNLAB – São Paulo

São José do Rio Preto – SP
25 de fevereiro de 2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/Hospital de Base-FUNFARME) e no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), com bolsa de estudo CAPES pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto - SP.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Marcelo Rosan e
Adriana Fátima Avanso Rosan, por sempre estarem ao
meu lado apoiando os meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por estar presente na minha vida e em minhas escolhas.

*À minha orientadora **Profa. Dra. Agnes Cristina Fett-Conte** pela oportunidade, confiança, paciência e tempo. Por suas orientações e contribuições na formação e desenvolvimento do meu raciocínio científico e da minha vida acadêmica, mas principalmente por me orientar para a vida.*

*À Profa. Dra. **Maria Rita dos Santos e Passos Bueno**, por me receber desde o mestrado em seu laboratório, pela confiança e oportunidade. Aos **colegas da Sala 200**, incríveis pesquisadores, pela paciência, solidariedade e conhecimento compartilhado.*

*Às instituições envolvidas neste estudo, **IBILCE/UNESP, FAMERP e USP**, a todos os profissionais envolvidos, e principalmente aos pacientes e suas famílias por sua colaboração para o desenvolvimento do projeto e na minha formação pessoal.*

*As minhas amigas do Laboratório de Genética da FAMERP, **Dra. Adriana, Dra. Andréia, Brasilina, Carla, Dra. Cristina, Dra. Fernanda, Marina, Paula Abdala e Valéria**, por me acolherem como uma segunda família, pelas conversas e ensinamentos.*

*A toda minha família, em especial meus pais **Marcelo Rosan e Adriana Fátima Avanso Rosan**, por toda a minha criação e educação, por nunca deixarem faltar amor, carinho, apoio e compreensão em minha vida.*

*À minha namorada, **Nayara Alves Chaves**, pelo companheirismo, apoio e amor, tanto na minha vida pessoal como acadêmica, ajudando a superar muitas dificuldades durante este caminho.*

*Ao meu amigo **Guilherme Sabino**, não somente pela amizade, mas também por me abrigar muitas e muitas vezes em suas casas na cidade de São Paulo, como família.*

*Aos meus melhores amigos, **Caio Jhonatan Tenório Amaral e Luiz Guilherme Maia Gonçalves**, pela amizade, conselhos e compreensão.*

*Aos meus amigos de gameplay, **João #, Ber, Mascote, Nery e Talmim**, pelos momentos de lazer e descontração.*

*Aos membros da **banca examinadora** por aceitarem o convite para avaliar, contribuir e enriquecer este trabalho.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)**, Código de Financiamento 001.*

“If you feel yourself hitting up against your limit remember for what cause you clench your fists... remember why you started down this path, and let that memory carry you beyond your limit.”
(All Might, My Hero Academia)

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA), ou Autismo, corresponde a um grupo de afecções neuropsiquiátricas complexas, de etiologia heterogênea e desconhecida na maioria dos casos. A prevalência é muito alta na população em geral e os afetados são caracterizados por dificuldade de comunicação e socialização, além de manias e repetições. Familiares de autistas apresentam frequências significativamente maiores de alterações comportamentais vinculadas às características autísticas e este fenótipo mais amplo é conhecido como *Broad Autism Phenotype* (BAP). Há centenas de genes candidatos ao autismo ou regiões genômicas que apresentam alterações, que estão descritas não apenas em casuísticas de autistas, mas também de indivíduos com outros transtornos do comportamento, o que evidencia uma sobreposição etiológica entre tais afecções. Além disso, em uma mesma família, uma alteração genética pode estar presente em parentes assintomáticos, naqueles com BAP e naqueles com outros transtornos neuropsiquiátricos. Os estudos em familiares se limitam frequentemente à investigação de pais e irmãos. Este projeto objetivou investigar a presença de alterações genéticas previamente detectadas em autistas, em seus pais, irmãos e em outros familiares com transtornos neuropsiquiátricos, além da presença do BAP e de outros transtornos neuropsiquiátricos nas genealogias dos autistas. A presença e os aspectos relacionados ao BAP em pais de autistas também foram estudados e comparados com um grupo composto de pais de indivíduos com deficiência intelectual idiopática, sem autismo, e com um grupo de pais de indivíduos sem queixas de transtornos neurocomportamentais. As alterações moleculares previamente detectadas em indivíduos com TEA foram investigadas em seus familiares com a utilização de diferentes metodologias já implantadas nos laboratórios participantes deste estudo. O BAP foi investigado com a utilização do BAPQ (*Broad Autism Phenotype Questionnaire*), por meio de entrevistas previamente agendadas. 18 (36%) familiares de autistas apresentaram a mesma alteração genética encontrada no caso índice, sendo que oito (50%) deles também tinham BAP positivo. BAP foi observado nos três grupos de pais investigados, com frequência significativamente maior nos pais de autistas, que também apresentaram maiores escores para personalidade rígida do que os pais dos outros grupos. Nossos achados estão de acordo com os da literatura e acrescentam que algumas alterações genômicas podem predispor não apenas ao autismo como à esquizofrenia, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) e BAP, além do fato de que BAP também é observado em pais de indivíduos com deficiência intelectual. É importante avaliar a presença de BAP em pais de autistas e de outros indivíduos

com afecções do neurodesenvolvimento, como a deficiência intelectual, pois os resultados podem direcionar a orientação de riscos e o Aconselhamento Genético das famílias.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro do Autismo, transtornos mentais, mutações, CNVs.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD), or Autism, is a group of complex neuropsychiatric disorders, with heterogeneous and unknown etiology in most cases. The prevalence is high in the population and those affected are characterized by impairments in communication and socialization, as well as restricted stereotypes. Relatives of individuals with autism have significantly higher frequencies of behavioral alterations related to autistic characteristics and this is known as Broad Autism Phenotype (BAP). There are hundreds of autism candidate genes or genomic regions that present variations, which are described not only in autistic cases, but also in individuals with other behavioral disorders, which shows an etiological overlap between these conditions. In addition, in a single family, a genetic alteration may be present in asymptomatic relatives, in those with BAP and in those with other neuropsychiatric disorders. Studies in relatives are often limited to the investigation of parents and siblings. This project aimed to investigate the presence of genetic alterations previously detected in autistic individuals, in their parents, siblings and other relatives with neuropsychiatric disorders, besides the presence of BAP and other neuropsychiatric disorders in the autistic genealogy. The presence of BAP parents of autistic children and the aspects related to this phenotype were also studied and compared to a group of parents of individuals with idiopathic intellectual disability without autism and with a group of parents of individuals without complaints of neurobehavioral disorders. The molecular alterations previously detected in individuals with ASD were investigated in their relatives with the use of different methodologies already implanted in the laboratories participating in this study. The BAP was investigated using the BAPQ (Broad Autism Phenotype Questionnaire), through interviews previously scheduled. 18 (36%) relatives presented the same genetic alteration that had been found in the non-autistic relative, with eight of them (50%) also having BAP positive. BAP was observed in the three groups of parents investigated, with a significantly higher frequency in the parents of autistic individuals, who also presented higher scores for rigid personality than the parents of the other groups. Our findings are in agreement with the literature, and add that some genomic alterations may predispose not only to autism but also to schizophrenia, Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and BAP, which is also seen in parents of individuals with intellectual disability. It is important to evaluate the presence of BAP in parents of autistic individuals and other individuals with neurodevelopmental conditions, such as intellectual disability, because the results can guide the risk orientation and the Genetic Counseling of families.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, Broad Autism Phenotype, variations, CNVs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aumento da prevalência do Transtorno do Espectro Autista na população americana entre os anos 2004 – 2018.....	17
Figura 2. O intrigante quebra-cabeças da etiologia do Transtorno do Espectro Autista.....	18
Figura 3. Genes relacionados com TEA.....	19
Figura 4. Prejuízos na conectividade neural e nas funções sinápticas no cérebro de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista.....	20
Figura 5. Herdabilidade e coherdabilidade de SNPs entre indivíduos com Transtorno do Espectro Autista e outras afecções neuropsiquiátricas	22
Figura 6. Fluxograma de execução do estudo quanto à avaliação dos familiares de autistas.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCGH	<i>Microarray- based Comparative Genomic Hybridization;</i>
ADI-R	<i>Autism Diagnostic Interview-Revised;</i>
BAP	<i>Broad Autism Phenotype;</i>
BAPQ	<i>Broad Autism Phenotype Questionnaire;</i>
BP	Transtorno Bipolar;
CARS	<i>Childhood-Autism Rating Scale;</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos;
CNVs	Variações no número de cópias;
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition;</i>
DI	Deficiência Intelectual;
DP	Distúrbios psiquiátricos;
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;
GLM	<i>General Linear Models;</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification;</i>
MDD	Transtorno Depressivo Maior;
OMS	Organização Mundial de Saúde;
PCR	Reação em cadeia da polimerase;
SCZ	Esquizofrenia;
SFARI	<i>The Simons Foundation Autism Research Initiative;</i>
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único;
SNVs	Variações de nucleotídeo único;
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade;
TEA	Transtorno do espectro autista.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Casuística.....	26
3.2. Métodos	29
3.2.1 Extração de DNA de leucócitos.....	29
3.2.2 Amplificação das regiões selecionadas	29
3.2.3 Sequenciamento automático	29
3.2.4 Análise dos resultados moleculares	30
3.2.5 Aplicação do BAPQ	30
3.2.6 Antecedentes familiares psiquiátricos	30
3.2.7 Análise estatística	30
3.2.8 Considerações éticas.....	30
4. RESULTADOS	33
4.1 Capítulo 1	34
4.2 Capítulo 2	63
5. CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS	83
7 ANEXO	88
4.1 Anexo A: BAPQ.....	88

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA), também denominado “autismo”, palavra derivada do grego que significa “si próprio”, é uma alteração do neurodesenvolvimento caracterizada por déficits persistentes na comunicação e na interação social, acompanhados por comportamentos estereotipados e interesses restritos (Zhang *et al.*, 2019).

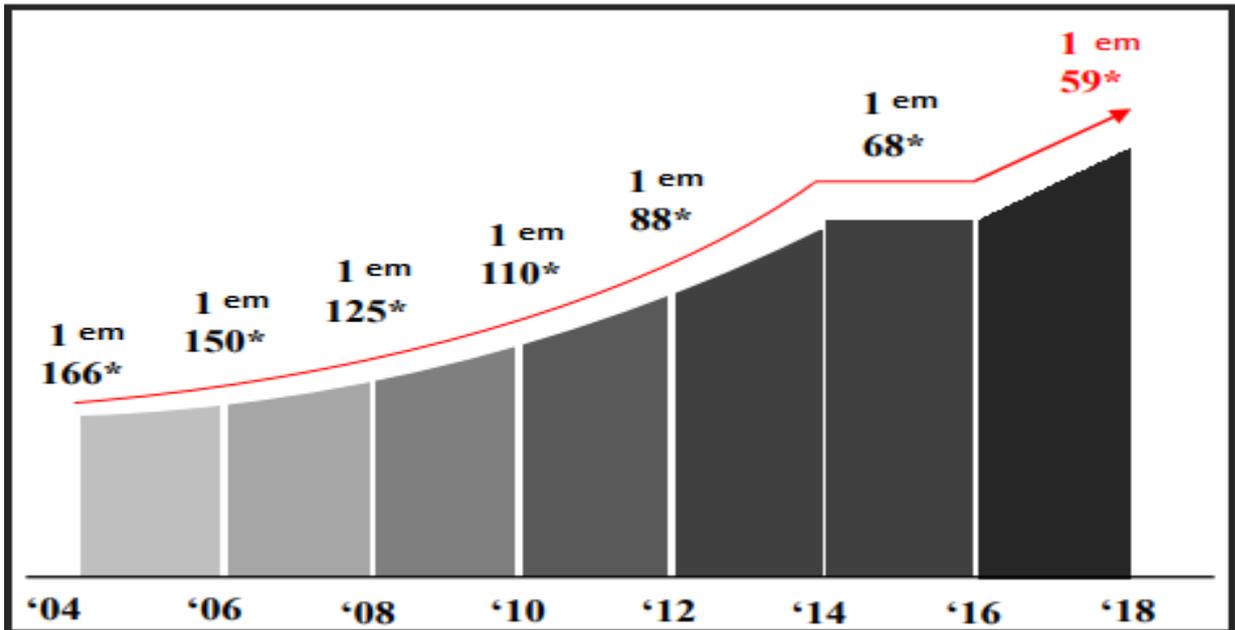
As características comportamentais dos indivíduos com TEA são bastante variáveis de indivíduo para indivíduo, podendo ser observadas antes dos três anos de idade, independente de etnia ou grupo socioeconômico (Baio *et al.*, 2018). Tais variações comportamentais justificam a definição de espectro, proposta na 5ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM 5, APA 2013).

Apesar da prevalência do autismo não ser conhecida na maioria dos países subdesenvolvidos, inclusive no Brasil, a incidência no mundo todo é bastante alta, o que o faz ser considerado um problema de saúde pública. É necessário considerar não apenas as consequências psicológicas nos familiares, mas também o impacto financeiro para estas famílias e para governo. Nos Estados Unidos, o custo estimado de um paciente com autismo durante a vida é de 2,4 milhões de dólares (aproximadamente 9,5 milhões de reais) e o gasto anual do governo americano com tratamento é de \$268 bilhões de dólares (aproximadamente um trilhão de reais) (Lombardo, 2019).

O risco para TEA está aumentando. De acordo com o último relatório do The Autism and Developmental Disabilities Monitoring (2014), do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), a prevalência é de 16,8 por 1.000 (1:59), um aumento de cerca de 150% quando comparado com seis por 1.000 (1:166) do relatório de 2004 (Figura 1), sendo os homens quatro vezes mais afetados do que as mulheres (Baio *et al.*, 2018).

A etiologia do autismo é extremamente complexa e relacionada com diversas interações genéticas, epigenéticas e fatores ambientais (Figura 2). Tais fatores podem ser determinados ou presumidos em aproximadamente 10-25% dos casos, dependendo da seleção dos pacientes e das estratégias laboratoriais utilizadas. Fato é que grande parte da etiologia do autismo continua desconhecida e ainda sem um forte marcador biológico associado (Brito *et al.*, 2018).

Figura 1. Aumento da prevalência do Transtorno do Espectro Autista na população americana entre os anos 2004 – 2018.



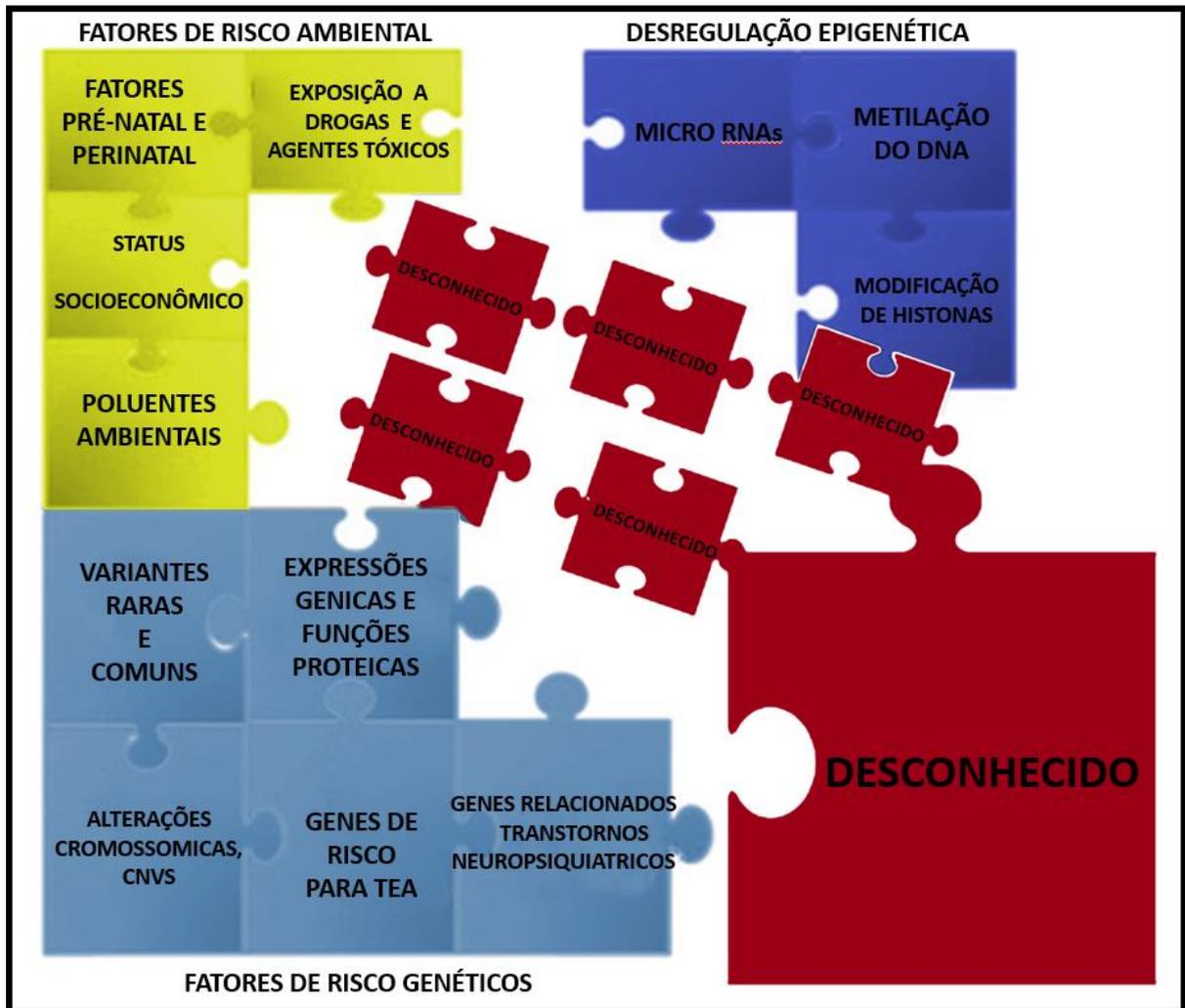
Fonte: Elaborado pelo próprio autor. (Dados adaptados de Baio et al., 2018).

O diagnóstico de TEA é definido por critérios clínicos e geralmente é realizado por equipes multidisciplinares. O grande desafio é a etiologia complexa e heterogênea, assim como a falta de um marcador biológico específico. Os diagnósticos são mais aceitos e confiáveis quando baseados em múltiplas fontes de informação, como a observação clínica, os relatos dos pais ou cuidadores e, quando possível, o autorrelato dos afetados (DSM 5, APA 2013).

Existem dois termos utilizados na classificação do TEA, o “autismo sintomático” e o “autismo não sintomático”. O primeiro se refere ao comportamento autístico associado com características dismórficas ou síndromes genéticas, como a síndrome do X frágil. Já o segundo, também conhecido como autismo idiopático, refere-se aos casos sem relação com alguma síndrome, causa genética ou ambiental conhecida (Zhang *et al.*, 2019).

Há muitas diferenças entre os indivíduos quanto à capacidade de interação social e de comunicação de acordo com os fatores culturais e sociais, mas estas estão sempre prejudicadas em relação ao contexto em que vivem. E tais fatores também podem influenciar a idade da identificação ou do diagnóstico (DSM 5, APA 2013).

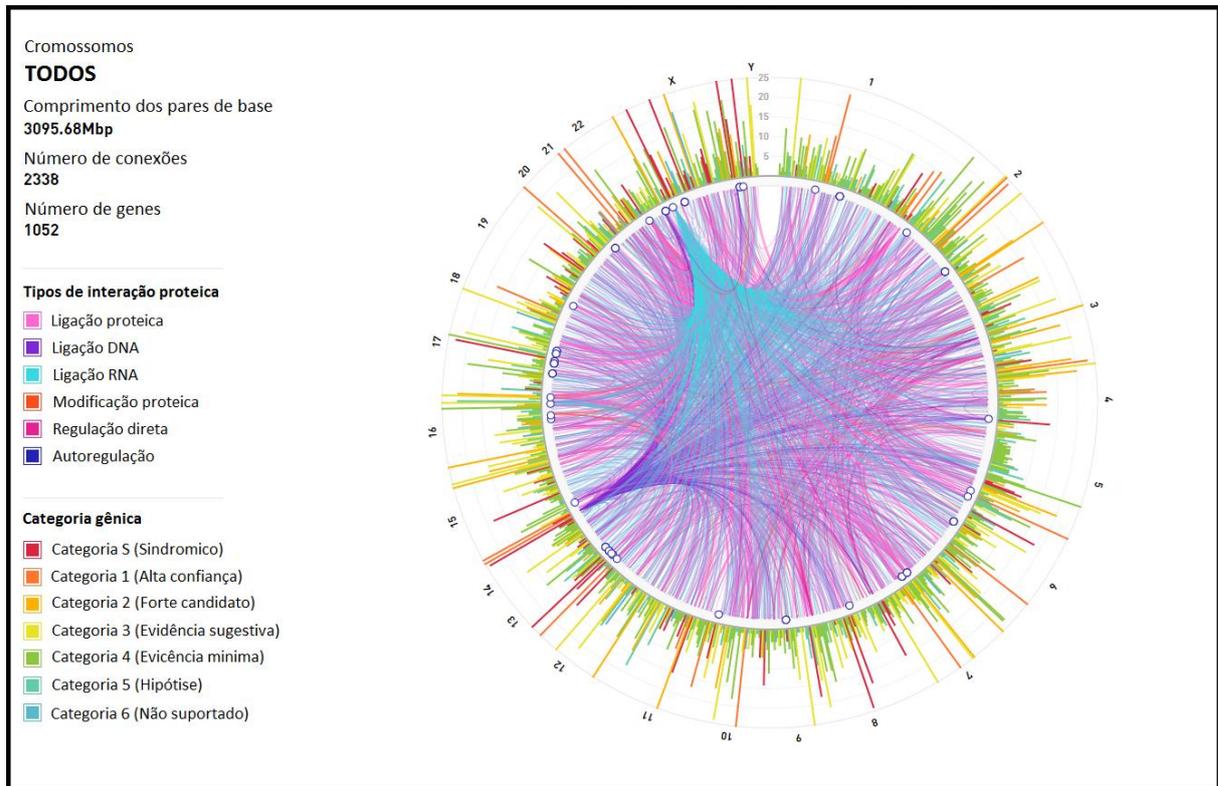
Figura 2. O intrigante quebra-cabeças da etiologia do Transtorno do Espectro Autista.



Fonte: (Adaptado de Ivanov *et al.*, 2015).

Com o constante desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento, um número progressivamente maior de genes vem sendo associados com o TEA. O site da *The Simons Foundation Autism Research Initiative* (SFARI) lista mais de mil genes relacionados com autismo (Figura 3). Sessenta destes genes são apontados como fortes candidatos e podem ser encontrados em todos os cromossomos humanos (Fein e Helt, 2017). Mesmo com uma grande quantidade de genes relatados, é importante ressaltar que a maioria ainda não foi totalmente compreendida e muitos ainda restam para serem mapeados (Brito *et al.*, 2018).

Figura 3. Genes relacionados com TEA, seus tipos de ligações e categorias gênicas.

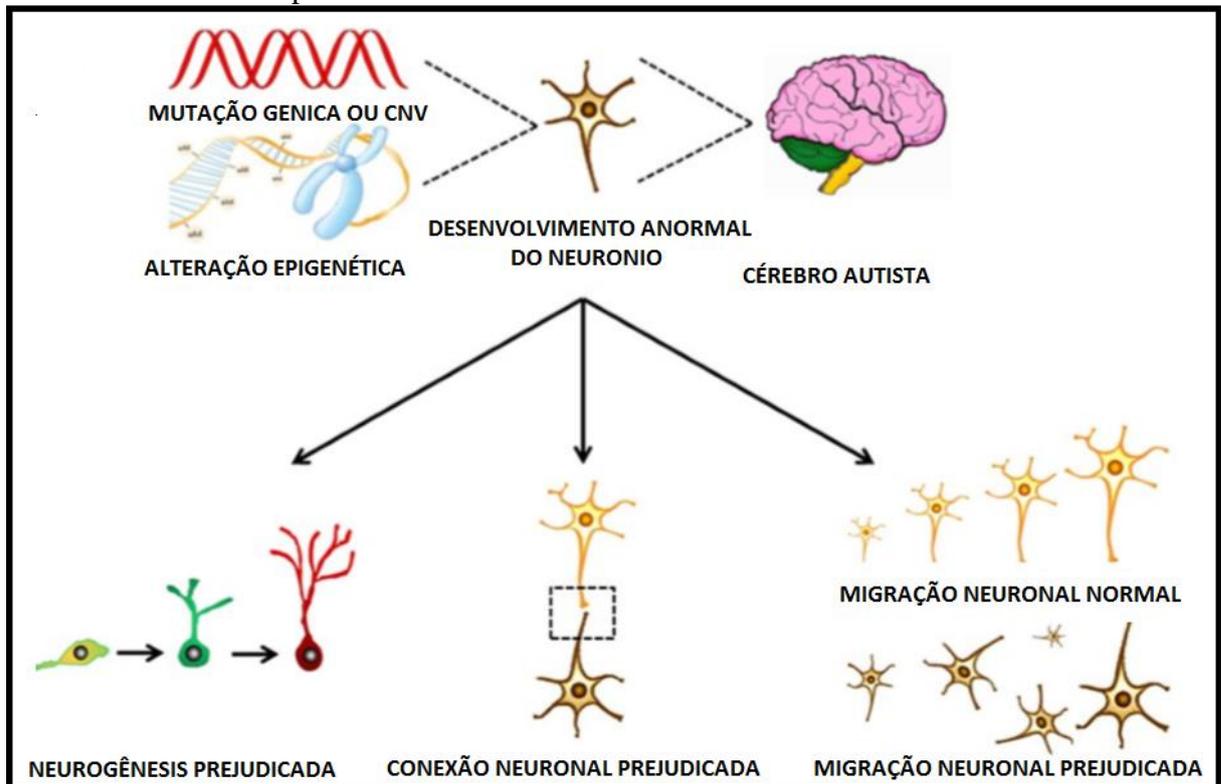


Fonte: Imagem adaptada do site www.gene.sfari.org/database/ring-browser (Acesso em 20 de janeiro de 2019).

Apesar desta grande diversidade de genes envolvidos com TEA, muitos atuam principalmente em vias relacionadas à funções neuronais, como neurogênese e plasticidade sináptica, conectividades neuronais e migração, o que corrobora com o fato de que o comportamento autístico refere-se a um grupo de condições/alterações neuropsiquiátricas (Zhang *et al.*, 2019).

Muitos estudos mostram que os prejuízos na conectividade neural e nas funções sinápticas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do autismo, como pode ser observado na Figura 4 (Zhang *et al.*, 2019). Os genes da família *SHANK*, relacionados com a neuroliginas-neurexinas, que codificam proteínas cruciais para a formação, maturação e estabilização de sinapses, são excelentes exemplos desta relação. Alterações no gene *SHANK3*, o mais estudado da família, são relacionadas com aproximadamente 1% de todos os casos de autismo, um número muito alto quando considerados os mais de 1.000 envolvidos com o transtorno (Balaan *et al.*, 2019).

Figura 4. Prejuízos na conectividade neural e nas funções sinápticas no cérebro de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista.



Fonte: (Adaptado de Zhang *et al.*, 2019).

Estima-se que os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) sejam responsáveis por 20-60% das alterações observadas no autismo, embora o efeito individual das mesmas em diferentes contextos genômicos seja relativo (Eissa *et al.*, 2018). Além de SNPs, também muitas variações no número de cópias (CNVs) e variações de nucleotídeo único (SNVs) foram descritas em associação causal com o fenótipo autístico. Mas os avanços na psiquiatria genômica têm demonstrado mecanismos de sobreposição entre autismo e outros transtornos do neurodesenvolvimento, atribuídos a múltiplos genes envolvidos na plasticidade sináptica, na capacidade de aprendizado, na formação da memória e no desenvolvimento do sistema neurológico como um todo (Fein e Helt, 2017). Assim, muitas alterações moleculares observadas em TEA também estão descritas em outros transtornos neuropsiquiátricos, como Esquizofrenia (SCZ), Transtorno Bipolar (BP), Transtorno Depressivo Maior (MDD) e Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (Brainstorm Consortium, 2018).

Desrupções genéticas nos processos sinápticos tem impactos generalizados sobre as funções cerebrais e prejudicam, inclusive, o processamento de informações nas redes neuronais, afetando o equilíbrio excitatório/inibitório e a plasticidade sináptica (Gilbert e Man, 2017).

TEA é influenciado por muitas variações genéticas e certas combinações podem

modificar e alterar os efeitos patogênicos de mutações hereditárias, *de novo* ou somáticas (Ayhan e Konopka 2019). Tais variações genéticas podem ser transmitidas entre as gerações, com uma herdabilidade moderada, assim como os demais transtornos psiquiátricos (Docherty et al., 2016). Na Figura 5 é possível visualizar sobreposições genéticas e fenotípicas que já foram sugeridas para alguns transtornos neuropsiquiátricos, embora a extensão e a verdadeira relação entre tais transtornos permaneçam incertas.

Assim como TEA, a deficiência intelectual (DI) é tão ou mais complexa, também considerada uma afecção multifatorial na maioria dos casos, e com múltiplos fatores genéticos e ambientais envolvidos na etiopatogenia (Mulas e Rojas, 2018). Estima-se que 30% dos autistas são deficientes intelectuais e muitos fatores causais são compartilhados por estas afecções, embora muito pouco deste contexto esteja esclarecido (Fusar-Poli *et al.*, 2017).

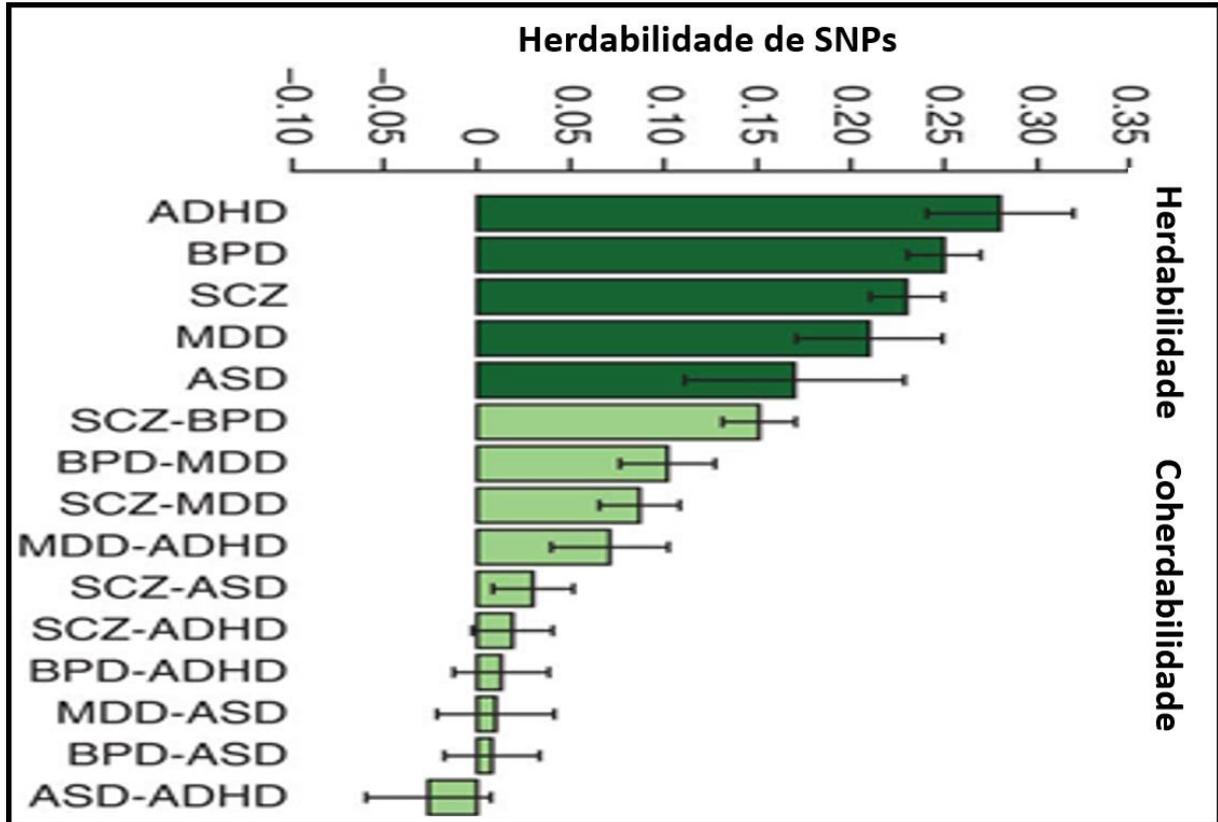
A sobreposição das características fenotípicas e o risco genético compartilhado entre o TEA e os outros transtornos torna ainda mais difícil identificar os genes específicos do autismo contra aqueles que causam características comuns com as demais afecções. Neste contexto, a hipótese de *hits* múltiplos tem muitos defensores. Ela preconiza que o fenótipo comportamental autístico irá depender da somatória e interação das variantes genéticas, das ativações e supressões epigenéticas, *imprinting* e de fatores ambientais pré e pós-natais (Fein e Helt, 2017).

Além disso, no contexto complexo do TEA, é importante ressaltar um aspecto que desperta grande interesse científico. Pais e familiares de indivíduos com autismo são mais propensos a manifestarem características comportamentais semelhantes, porém mais brandas, às dos afetados, assim como uma variedade de outras condições neuropsiquiátricas (Hirokawaa *et al.*, 2019). São descritas alterações de personalidade e linguagem, como prejuízos na interação social, linguagem pragmática e personalidade rígida, que são ainda mais frequentes nos parentes de primeiro grau de autistas (Pisula e Ziegart-Sadowska, 2015).

O conjunto das características de personalidade e de linguagem que refletem uma expressão fenotípica mais branda do autismo é conhecido como "*Broad Autism Phenotype*" (BAP) ou fenótipo amplo do autismo (Hirokawaa *et al.*, 2019). Leo Kanner (1943), o primeiro pesquisador a relatar crianças com autismo, descreveu os pais destas crianças como "pessoas de mentalidade séria, perfeccionistas e com um intenso interesse em ideias abstratas".

Pais com BAP possuem riscos aumentados de terem crianças com autismo e outras afecções do neurodesenvolvimento, inclusive DI, o que tem sido considerado nos estudos de heterogeneidade alélica e eventos aditivos múltiplos (Rubenstein *et al.*, 2018; Woodbury-Smith *et al.*, 2018).

Figura 5. Herdabilidade e coherdabilidade de SNPs entre indivíduos com Transtorno do Espectro Autista e outras afecções neuropsiquiátricas.



ADHD = Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade; BPD = Transtorno Bipolar; SCZ = Esquizofrenia; MDD = Transtorno Depressivo Maior, ASD = Transtorno do Espectro Autista.

Fonte: Adaptado de Cross Disorder Group of the Psychiatric mics Consortium, 2013.

Neste contexto, a hipótese científica testada neste trabalho é de que na casuística brasileira, alterações genéticas detectadas em indivíduos com autismo podem ser mais frequentes em seus familiares que apresentam BAP ou outras doenças neuropsiquiátricas, que BAP é muito frequente em familiares de autistas a que a frequência do fenótipo BAP é maior nos pais de autistas comparados aos pais de indivíduos com DI idiopática e aos pais de indivíduos sem queixas de transtornos do neurodesenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a presença de características autísticas, de outras afecções neurocomportamentais e de alterações genômicas em pais, irmãos e outros parentes de indivíduos com TEA, não dismórficos, que apresentam alterações genômicas relacionadas com a etiologia da doença.

2.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a presença de alterações genômicas previamente encontradas em indivíduos com TEA em seus pais e irmãos, independente da presença de alterações neuropsiquiátricas;
- 2- Avaliar a presença de transtornos neuropsiquiátricos nas genealogias dos autistas;
- 3- Investigar a presença da alteração genômica herdada do probando nos demais familiares com diagnóstico de alterações neuropsiquiátricas, entre as quais, de Transtorno Bipolar, Esquizofrenia, Transtorno Depressivo e Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH);
- 4- Investigar a presença do ‘*Broad Autism Phenotype*’ (BAP), em pais e irmãos de autistas;
- 5- Comparar os achados do BAPQ de pais de autistas com os de pais de indivíduos com deficiência intelectual idiopática e de pais de indivíduos sem queixas;
- 6- Identificar fatores etiológicos comuns entre TEA e outras afecções psiquiátricas em afetados da mesma família.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

A casuística foi composta por 50 familiares, sendo 13 pais, 23 mães, 12 irmãos e duas avós, de idades variadas, de 23 famílias de indivíduos com diagnóstico conclusivo de TEA, não dismórficos, que apresentaram alterações genômicas relacionadas (ou possivelmente relacionadas) com a etiologia da doença (envolvendo genes do neurodesenvolvimento).

Para chegar ao número amostral, foram triadas cerca de 400 famílias cujas informações moleculares constavam nos bancos de dados dos pesquisadores participantes. O critério inicial para a seleção dos familiares foi a presença de alteração molecular no caso índice detectada pelas técnicas de *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA), *Microarray-based Comparative Genomic Hybridization* (aCGH), sequenciamento de exoma ou por sequenciamento direto, realizadas em estudos anteriores do mesmo grupo de pesquisa.

O diagnóstico de autismo seguiu os critérios contidos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-5) e foi realizado por psiquiatras e por outros especialistas em autismo, membros de equipes interdisciplinares. Sempre que possível, uma entrevista com base no *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) e *Childhood-Autism Rating Scale* (CARS) foi aplicada.

Todos os autistas foram avaliados por geneticistas clínicos para excluir possíveis associações com síndromes e fatores etiológicos ambientais. Eles também tiveram resultados negativos para anormalidades cromossômicas e Síndrome do Cromossomo X Frágil. Assim, parentes dos indivíduos com TEA, dismórficos, com síndromes reconhecidas, cromossomopatias ou expostos a fatores ambientais causais foram excluídos deste estudo.

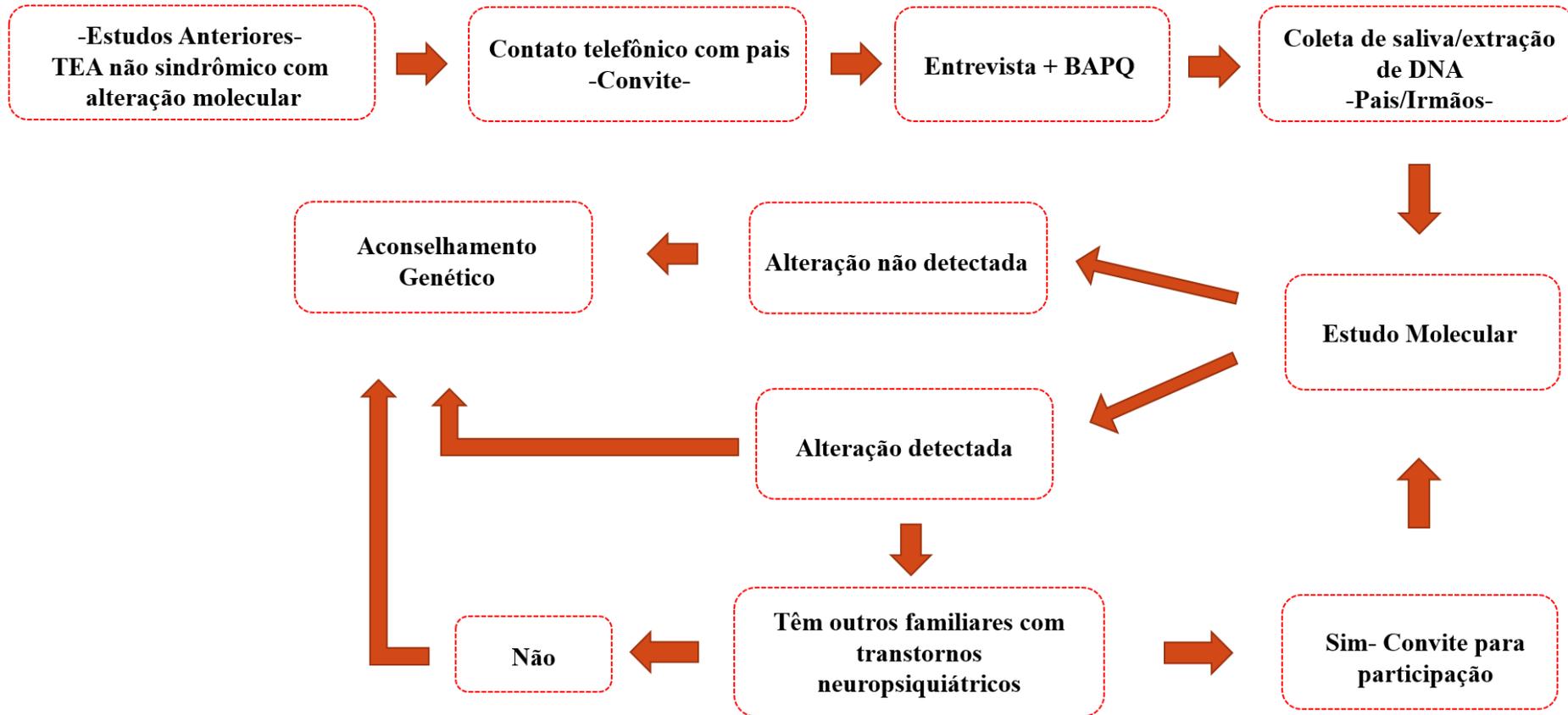
Os 50 familiares participantes foram inicialmente contatados por telefone ou pessoalmente, esclarecidos sobre o projeto e convidados a participar de uma entrevista, com posterior coleta de saliva para obtenção de DNA, em data previamente agendada. As entrevistas e coletas foram realizados nas dependências das instituições participantes ou na residência do familiar.

Além da investigação da alteração genômica detectada no probando, 48 familiares foram avaliados quanto à presença do BAP com a utilização de questionário específico *Broad Autismo Questionnaire* (BAPQ). Não foi possível aplicar o BAP em duas avós. O BAP também foi investigado em dois outros grupos. Um deles foi composto por 50 indivíduos (25 casais), sendo 25 pais e 25 mães de crianças saudáveis, sem alterações neuropsiquiátricas e sem história de distúrbios neuropsiquiátricos na genealogia, de escolas regulares do município. O outro

grupo foi composto por 46 familiares, sendo 20 pais e 26 mães, dos quais 20 casais e seis mães, de crianças com diagnóstico de Deficiência Intelectual idiopática, segundo critérios do DSM-5, atendidas nos ambulatórios de Genética e de Neurologia Infantil do Hospital de Base (FAMERP/FUNFARME).

O fluxograma relacionado à participação dos familiares de autistas está apresentado na Figura 6.

Figura 6. Fluxograma de execução do estudo quanto à avaliação dos familiares de autistas.



3.2. Métodos

3.2.1 Extração de DNA

As alterações moleculares foram investigadas nos familiares indicados a partir de amostras de DNA de saliva, coletadas com a utilização do kit Oragene-DNA, de acordo com protocolo do fabricante. A estimativa da concentração foi realizada pela leitura em espectrofotômetro *NanoDrop ND 2000*.

3.2.2 Amplificação das regiões selecionadas

A amplificação das regiões selecionadas foram realizadas segundo a técnica de Saiki *et al.* (1998), com algumas modificações.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi processada em termociclador SelectCycler (98 tubos), com especificações de acordo com a necessidade de cada caso. Em todos os experimentos um dos tubos não recebeu DNA para controle de contaminação.

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (100 Volts por 30 minutos), juntamente com um marcador de 100pb (Ladder Gibco DNA 100pb), que permite observar se houve amplificação e se o tamanho do segmento obtido coincidirá com o esperado.

3.2.3 Sequenciamento automático

As amostras amplificadas foram submetidas ao sequenciamento automático em sequenciador ABI Prism 377 (*Applied Biosystems Inc*), no Setor de Serviços de Genômica do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (IB-USP/SP), sob coordenação da Profa. Dra. Maria Rita S. Passos Bueno.

As amostras foram submetidas a uma reação de amplificação com 2,0 µL de *Big Dye Terminator* e 3,2 pmol de *primer*. A reação compreende de uma primeira etapa de dois segundos a 96°C para desnaturação da cadeia de DNA, 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos para anelamento em temperatura de 50°C e 4 minutos a 60°C, para extensão das cadeias. Para cada amostra, foi realizada uma reação com o *primer sense (right)* e uma reação com o *anti-sense (left)*. Foram então colocadas em tubos de 1,5 ml e precipitadas com 80µL de isopropanol a 75% em cada tubo, vortexadas por 10 segundos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Depois foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C e todo o isopropanol foi retirado, ficando no tubo apenas o “*pellet*”, que foi lavado com 1,0 ml de etanol 70% e, em seguida, centrifugado novamente a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, os tubos foram

abertos, colocados em repouso por 30 minutos a 37°C e acondicionados a -20°C protegidos da luz.

Depois de precipitadas, as amostras receberam 2,0 µL de *loading buffer* (formamida e blue dextran) e foram incubadas por dois minutos a 95°C, para desnaturação. Após esse procedimento foram mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel de poliacrilamida 2% do sequenciador.

3.2.4 Análise dos resultados moleculares

Os resultados foram analisados pelo software *Sequencher 5.4.6.* e comparados com bancos de dados do genoma humano (*NCBI, 1000 Genomes e NHLBI/ESP databases*).

3.2.5 Aplicação do BAPQ

A investigação da presença da expressão fenotípica ampla do autismo, o BAP, foi realizada com a utilização do BAPQ (*Broad Autism Phenotype Questionnaire*; Hurley *et al.*, 2007), um instrumento “*self and informant-report*” constituído por 36 itens, modificado com novos escores de corte segundo Sasson *et al.*, 2013), para reduzir falsos positivos. O questionário foi traduzido para o Português (Anexo I) de acordo com o processo de tradução e adaptação de instrumentos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018). O BAPQ foi apresentado aos familiares como “Questionário de Personalidade e Preferências”, a fim de reduzir o viés associado às crenças sobre o autismo (Shi *et al.*, 2015). A análise consiste em uma avaliação de características de interação social, de linguagem pragmática e de personalidade rígida. O BAPQ serve para uma classificação diagnóstica e não para conclusão de diagnóstico clínico (Sasson *et al.*, 2013).

3.2.6 Antecedentes familiares psiquiátricos

A investigação de antecedentes familiares psiquiátricos foi realizada durante as entrevistas. Foram considerados como distúrbios psiquiátricos (DP) aqueles que constam nos critérios do CID 10 e do DSM-5, que haviam sido confirmados e/ou acompanhados por psiquiatra. Foram incluídos indivíduos com Esquizofrenia, Depressão Maior, TDAH e Alcoolismo.

3.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software Statistica 9.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), enquanto que os gráficos foram feitos no *software GraphPad Prisma*

versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada usando *Normal Probability Plots of Residuals* e a homocedasticidade pelo teste de Levene. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste *General Linear Models* (GLM) seguido pelo *post hoc de Tukey*, a abordagem do GLM possibilita a análise de modelos com combinações de variáveis categóricas e contínuas, com múltiplos fatores preditivos. Assim, estabelecemos os grupos (G1, G2 e G3) como preditores e os valores obtidos pelos questionários como variáveis dependentes (Quinn *et al.*, 2002). Para avaliar a comparação entre as frequências de BAP+ e BAP- e os grupos de estudo, utilizou-se o teste de qui-quadrado e, posteriormente, o teste exato de Fisher. O nível de significância assumido foi $p \leq 0,05$.

3.2.8 Considerações éticas

O projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa (PNº:1.445.225/2016 e CAAEº: 52315316.3.0000.5415) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Os termos de consentimento e de assentimento (Resolução 466/2012) foram assinados por todos os participantes ou seu responsável. Não houve qualquer tipo de gratificação pela participação no mesmo.

Nos casos em que o DNA foi analisado, o mesmo foi obtido de amostras de saliva, obtida por kit Oragene-DNA, que não envolve riscos. Em caso de indivíduos considerados vulneráveis, a coleta da saliva foi auxiliada pelos pesquisadores e sempre na presença dos pais ou responsáveis. Não houve nenhum caso de desconforto exacerbado durante a coleta e nenhum indivíduo foi excluído do estudo por este motivo.

Ao chegarem ao laboratório, as amostras receberam um código de identificação para privacidade da identidade, de conhecimento apenas dos pesquisadores.

Os resultados foram entregues aos participantes pela orientadora ou pelo doutorando.

As informações obtidas foram tratadas como confidenciais e a identidade de todos os indivíduos será preservada em publicações científicas originadas a partir deste estudo.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos foram compilados e discutidos na forma dois artigos científicos, aqui apresentados como capítulos.

O artigo intitulado “GENETIC AND NEUROPSYCHIATRIC ALTERATIONS IN RELATIVES OF BRAZILIAN AUTISTIC INDIVIDUALS”, apresentado no Capítulo 1, está relacionado aos objetivos específicos 1, 2, 3, 4 e 6.

Os resultados vinculados aos objetivos específicos 4 e 5 estão apresentados no Capítulo 2, também na forma de um artigo científico, que foi intitulado “*BROAD AUTISM PHENOTYPE* NO BRASIL: PREVALÊNCIA EM GENITORES DE AUTISTAS E DE DEFICIENTES INTELECTUAIS IDIOPÁTICOS”.

4.1 Capítulo 1

O artigo científico apresentado foi submetido para publicação na revista *Autism Research*.
(Impact Factor: 3.768)

Dear Editor:

Please find attached our manuscript entitled “**GENETIC AND NEUROPSYCHIATRIC ALTERATIONS IN RELATIVES OF BRAZILIAN AUTISTIC INDIVIDUALS**”. We would like it to be considered for publication as research article at Autism Research.

All authors read the manuscript and approved its submission and take full responsibility of this version. I certify that all the named co-authors of this paper actively participated in its perception and preparation. I warrant that the Article is our own original work, has not been published and will not be submitted to any other journal while under consideration by Autism Research, and that the article in no way infringes the rights of others, and that I am, as the owner of copyright, entitled to make this assignment. Our study was approved by the ethic committee and the patient's parents has sign the consent form.

The authors declare that there are no conflicts of interest, either real or perceived. There are no sponsors involved in the study design, the collection, analysis, or interpretation of the data, the writing of the report, or the decision to submit the manuscript for publication.

Sincerely, Dante Bruno Avanso Rosan.

GENETIC AND NEUROPSYCHIATRIC ALTERATIONS IN RELATIVES OF BRAZILIAN AUTISTIC INDIVIDUALS

Dante Bruno Avanso Rosan¹, Ana Luiza Bossolani Martins², Suzana Ezquina³, Maria Rita de Passos e Bueno⁴, Agnes Cristina Fett-Conte⁵

Affiliations:

1. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP; São José do Rio Preto, SP, Brazil.
2. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS Campus Paranaíba; Paranaíba, MS, Brazil.
3. University of Cambridge; Cambridge, United Kingdom.
4. Universidade de São Paulo – USP/SP; São Paulo, SP, Brazil.
5. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Corresponding Author

***Dante Bruno Avanso Rosan**

Institutional address: Rua Cristovão Colombo, 2265, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/ UNESP, Zip Code 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; Phone: 55 17 997575756, **Email:** danterosan@gmail.com

Conflict of Interest statement:

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments:

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to thank all the participants in this study and their families.

Lay Summary

Autism spectrum disorder is a condition characterized by challenges with social skills, repetitive behaviors, speech and nonverbal communication that can be caused by genetic alterations, especially involving neurodevelopment genes. In some cases, these alterations can be inherited from parents who may present similar characteristics to autism, known as Broad Autism Phenotype (BAP). In this paper we described some genetic variations and BAP in parents of children with autism in a Brazilian population.

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD), or Autism, is a group of complex neuropsychiatric disorders, with heterogeneous etiology and unknown in most cases. The prevalence is high in the population and those affected are characterized by impairments in communication and socialization, as well as restricted stereotypes. Relatives of individuals with autism have significantly higher frequencies of behavioral alterations related to autistic characteristics and this is known as "Broad Autism Phenotype" (BAP). There are hundreds of autism candidate genes or genomic regions that present variations, which are described not only in autistic cases, but also in individuals with other behavioral disorders, which shows an etiological overlap between these conditions. In addition, in a single family, a genetic alteration may be present in asymptomatic relatives, in those with BAP and in those with other neuropsychiatric disorders. Studies in relatives are often limited to the investigation of parents and siblings. This study aimed to investigate the presence of genetic alterations previously detected in autistic individuals in their parents, siblings and other relatives with neuropsychiatric disorders, besides the presence of BAP and other neuropsychiatric disorders in the autistic genealogy. The molecular alterations previously detected in individuals with ASD were investigated in their relatives with the use of different methodologies already implanted in the laboratories participating in this study. The BAP was investigated using the BAPQ (Broad Autism Phenotype Questionnaire), through interviews previously scheduled. 18 (36%) relatives presented the same genetic alteration that had been found in the autistic relative, with eight of them (50%) also having BAP positive. Our findings are in agreement with the literature, reinforcing the importance of investigating BAP in families at risk for ASD.

Keywords: Autism, Broad Autism Phenotype, variations.

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) or “autism” is a neuropsychiatric disorder characterized by impairment of social interaction, with restricted stereotypes and repetitive interests and different degrees of severity (DSM 5, APA 2013). The ASD can be observed in all racial, ethnic and socioeconomic groups, before the age of three and with a wide variety of clinical manifestations (Ivanov *et al.*, 2015). The diagnosis is defined by clinical diagnostic criteria and poses as a challenge due to the complex and heterogeneous etiology and the lack of biologic diagnostic markers (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013; Baio *et al.*, 2018). Features of ASD might even overlap with other psychiatric disorders (DSM 5, APA 2013).

Although the incidence of ASD is not known in the majority of undeveloped countries, it is high in entire world, considering as a public health problem. Moreover, is necessary to considered not only the psychological consequences, but also the financial impact to the families and government. In USA, the estimated cost is near \$2 million per affected child (Benger *et al.*, 2018). The risk for ASD is rising. According to last report of The Autism and Developmental Disabilities Monitoring, the prevalence is 16.8 per 1,000 (one in 59), almost a 150% increase when compared to the 6 per 1,000 (one in 166) of the 2004 report (Baio *et al.*, 2018), with males being affected 4.5 times more frequently than females (Liu *et al.*, 2016).

The etiology of ASD is related from a complex interaction between genetic, epigenetic and environmental factors that can be determined or presumed in approximately 10-25% of cases depending on the selection of patients and the choice of laboratorial strategies (Ivanov *et al.*, 2015), but the etiology in the majority of cases is unknown.

Several genes are strongly linked to the etiology of most cases of ASD, mostly genes are expressed in the brain, acting with a probable additive effect, resulting in the behavioral phenotype (Lowther *et al.*, 2015). It is estimated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) are responsible for 20-60% of the risk of variations in autism, though the individual effect of one SNP in different genomic contexts is relative (Eissa *et al.*, 2018). Addition to SNPs, copy number variations (CNVs) and single nucleotide

variations (SNVs) have been described as involved in the autism phenotype and other neuropsychiatric disorders such as Schizophrenia (SCZ), bipolar disorder (BP), major depressive disorder (MDD) and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) (Brainstorm Consortium 2018).

Advances in psychiatric genomics have shown mechanisms underlying the overlap between autism and these neurodevelopmental disorders, due to those multiple genes involved in neurodevelopment, synaptic plasticity, learning and memory insight (Doherty & Owen, 2014). The genetic disruption of the synaptic processes have widespread impacts on brain function and harms the information processing in the brain networks, affecting excitatory/inhibitory balance and the synaptic plasticity (Gilbert & Man, 2017).

ASD is influenced by thousands of common genetic variants transmitted between generations, like most psychiatric disorders, they are at least moderately heritable (Robinson *et al.*, 2014; Docherty *et al.*, 2016). The phenotypic and genetic overlap has also been suggested for those disorders but the way and extent of these relationships remains unclear (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013).

Parents and relatives of children with ASD are more likely to manifest autistic characteristics as well as a variety of other neuropsychiatric conditions (Robinson *et al.*, 2014). These broad features are likely to be more present in first-degree relatives of individuals with ASD than in other groups (Pisula & Ziegart-Sadowska, 2015). Those set of personality and language features that reflect the phenotypic expression of autism, in non-autistic relatives of autistic individuals are known as “Broad Autism Phenotype” (BAP) and was first noted by Kanner (1943), who described the parents of autistic children as “serious minded, perfectionist individuals, with an intense interest in abstract ideas”. BAP in parents increase the risk for children with autism (Rubenstein *et al.*, 2018). It is a subject that has been considered in inter/intrafamilial locus and allelic heterogeneity studies (Woodbury-Smith *et al.*, 2018)

This study presents the results of a genetic investigation to evaluate whether mutations previously found in Brazilian children with autism are present in their relatives with or without Broad Autism Phenotype to evaluated this association and provide support for further investigations.

Methods

Subjects

This pilot study was approved by the Ethics Research Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto (PNº:1.445.225/2016 and CAAEº: 52315316.3.0000.5415). Written informed consent was obtained from all patients and control group subjects or their legal guardians.

We studied 50 relatives, 13 fathers, 23 mothers, 12 siblings and two grandmother, of 23 not dysmorphic autistic patients, 19 males and four females, that presented genomic alterations involving genes related (or possibly related) with autism etiology (involving neurodevelopmental genes), previously detected by the same researchers group. The patients had conclusive diagnosis of ASD made by psychiatrists, members of interdisciplinary teams according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5), the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) and Childhood-Autism Rating Scale (CARS). They were recruited from special education schools, which provide interventions for children with autism.

All patients were evaluated by clinical geneticists to exclude possible associated syndromes and environmental etiological factors. They also had negative results for chromosomal abnormalities and Fragile X Syndrome. Their molecular alterations were detected by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA), Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH), exoma sequencing or by directed sequencing, made in previous studies of the same research group.

The parents were invited to participate by personal contact during the genetic counseling session or by phone. The contact with six fathers was not possible.

Genomic DNA of saliva samples of parents was extracted at a concentration of at least 50 ng/μL using the Oragene-DNA kit and investigated for the same alteration that had been found in the patient of each family.

Broad Autism Phenotype Questionnaire

The relatives with and without the same genetic alteration of the patient, were investigated for the presence of Broad Autism Phenotype using the self-report BAPQ (Broad Autism Phenotype Questionnaire; Hurley *et al*, 2007, Supporting Information),

modified with new cutoff scores that expand the utility of the BAPQ and to reduce false positives (Sasson *et al.*, 2013). It is a reliable screening tool for detecting BAP in adults, which assesses particular personality and language characteristics along three dimensions: Aloof personality, Rigid personality, and Pragmatic language. The BAPQ was presented to the relatives as “The Personality and Preferences Questionnaire” in order to reduce bias associated with beliefs about autism (Shi *et al.*, 2015).

This questionnaire was translated to Portuguese by the authors, according to the process of translation and adaptation of instruments by the World Health Organization (WHO, 2018).

All participants were given three instructions to keep in mind while filling out the questionnaire: (1) to reference interactions they had with most people rather than special relationships such as those with immediate family members; (2) to think about the way they behaved the majority of their adult life rather than during selected time periods or transitory phases; and (3) to guess if they were unsure how to answer (thus insuring completion of all 36 items) (Hurley *et al.*, 2007).

Family History of Neuropsychiatric Disorders

In the investigation of the presence of neuropsychiatric disorders in other relatives beside the patient (autistic patient), was made by directed question, in an interview. We considered only those that appear in the criteria of International Classification of Diseases 10 (ICD 10) and DSM-5, as Schizophrenia, Bipolar Disorder, Depressive Disorders, Attention Deficit Disorder and Hyperactivity Disorder (ADHD) and Alcoholism, since they were confirmed by psychiatrist and/or neurologist reports.

Results

Of 50 studied relatives of 23 autistic individuals with genomic alterations involving neurodevelopmental genes, 19 males and four females (4.75:1), 18 (36%) presented the same alteration that had been found in the proband of the same family (05 fathers, 07 mothers, 04 sisters and 02 grandmothers) and 32 (64%) not presented the same alteration of the autistic relative. Twelve molecular alterations were inherited (46.15%),

six from fathers and six from mothers. The Table 1 presents the alterations found in the patients and the relatives with presence or absence of the same alteration.

Forty eight relatives were submitted to BAPQ. The exception was the schizophrenic grandmother. Twenty-two (45.8%) of the 48 relatives showed high scores in at least one of the three subscales of the BAPQ, fifteen (31.2%) meeting the cutoff criteria of diagnostic classification for BAP, presenting alterations in two or three subscales (Table 1). Among the 16 relatives with the same genetic variation and that were investigated to BAP, eight (50%) presented BAP and two (12.5%) presented only one characteristic of this behavior phenotype. However, six (37.5%) had the same molecular alteration but without BAP. Beside this, among the 32 without the alteration of the autistic relative, seven (22.9%) had BAP and five (15.6%) presented only one of the characteristics of the broad phenotype.

The patient 1 and in his father presented a not previously described SNV in exon 21 of *SHANK3* gene, at the position chr22:50722009 C/G (22q13.33). The father showed high scores on all three subscales of BAPQ: aloof personality, rigid personality, and pragmatic language, but he did not have the SNV. The mother and the patient's brother did not present this variation or BAP.

The mother of patient 2 presented the same variation that her son in exon 13 of *SHANK2* gene, at the position chr11:70798504 C/T (11q13.4), but she did not show a Broad Autism Phenotype.

The patient 3 presented a SNP in exon 7 of *GABRB3* gene, at the position chr15:26580299 A/G. The polymorphism was inherited from the mother, with aloof and rigid personality, compatible with BAP. The SNP was also present in his sister, without BAP. An uncle from paternal genealogy was referred with alcoholism, which could not to be studied.

A synonymous variation in *NRXN1* gene characterized as NM_001135659 (NRXN1):c.3702G>C present in the patient 4 was also found her mother without BAP. Her father presented high score for rigid personality.

Sequence analysis of the parents of the patient 5 revealed that the synonymous SNV at exon 11 of *SHANK2* gene, at the position chr11:70820660 C/T (11q13.4), was inherited from the mother with BAP in the aloof personality and pragmatic language subscales. The father did not present this variation or BAP.

A SNV in the *SHANK2* gene was observed in the patient 6 (chr11:70820660 C/T -11q13.4), inherited from the father who also meet the criteria for rigid personality in BAPQ. They reported that the patient's maternal grandmother had major depressive disorder.

The patient 7 presented one SNV in the exon 21 of the *SHANK3* gene, at the position chr22:50722049 C/G (22q13.33). The patient's sister presented the same SNV and BAP. She also had Attention Deficit-Hyperactivity Disorder (ADHD). His mother presented BAP, with aloof personality, rigid personality, and pragmatic language without the SNV. Then, presumably, the alteration was inherited from his not studied father.

An 110,8Kb microdeletion in exon 19 of *NRXN1* gene detected in patient 8 was not inherited from his parents. They did not show a Broad Autism Phenotype.

We found a not previously described missense variation at chr22:51113618 A/G (22q13.33) in the exon 2 of *SHANK3* gene of the patient 9. It was not found in his father with BAPQ subscales for aloof and rigid personality, nether in his mother without BAP.

The SNV detected in the *SHANK3* gene observed in the patient 10 (chr22:50721646 C/T - 22q13.33) was *de novo*. Both parents presented a BAP subscales for aloof personality and pragmatic language.

The patient 11 presented a not previously described SNV in the exon 21 of the *SHANK3* gene, at the position chr22:50721985 C/T (22q13.33). It was not found in his mother that did not meet the criteria for BAP. We could not contact the father, with major depressive disorder and alcoholism.

A SNV in the *SHANK2* gene was observed in the patient 12 (chr11:70820660 C/T -11q13.4), but not in his mother. She did not meet the criteria for BAP, but presented an aloof personality. We could not contact the father

The patients 13 and 14 presented the same variation (chr11:70820660 C/T - 11q13) in exon 11 of *SHANK2* gene. They mothers did not show this variation or BAP. We could not contact the fathers.

Two CNVs, one duplication in the position chr15:32,024,192-32,509,926 (15q13.3) and one deletion at chr15:22,410,242-23,222,284 (15q11.2) were observed in patient 15. These alterations were present in both parents, who are cousins, but the duplication was inherited from his father and the deletion was from mother. The maternal and paternal grandmothers also had both CNVs and the maternal one had diagnosis of Schizophrenia. The two patient's sisters did not present the CNVs. The father meets the

criteria for the three subscale of BAPQ. The sisters did not had behavioral or neurological issues and the BAPQ was negative. The grandmothers were unavailable for testing.

The patient 16 presented two duplications, the first was at chr16:29,696,973-30,191,907 (16p11.2) and it was inherited from her father. The other, at chr4:186,934,286-187,137,146 (16p11.2) was inherited from her mother. The patient also inherited a deletion at chr11:48,380,903-48,968,027 (11p11.2) from his father. Both parents presented characteristics for BAP; the father had rigid personality and the mother had rigid personality and pragmatic language (BAP). The patient's sisters don't have the duplications, deletion or BAP. They reported one patient's maternal uncle with major depression.

The patient 17 presented duplication at chr16:29,517,699-30,191,895 (16q11.2). It was not inherited from the mother, who has BAP. The father could not be contacted. The patient's sister meets the BAPQ criteria for rigid personality.

A *de novo* duplication at chr16:29,613,495-30,190,030 (16p11.2) was observed in patient 18. The parents and the sister of patient did not show the same alteration. The father has a rigid personality according to BAPQ. The sister meets the criteria for the three subscales of BAPQ.

The duplication at chr16:29,402,301-30,226,931 (16p11.2) in patient 19 was inherited from the mother and it was also present in both patient's sisters, one of them twin of him. The father and the twin sister don't have BAP, but the other sister and the mother meet the criteria for BAP related to subscales of rigid personality and pragmatic language.

A *de novo* deletion of 1.02 mb was found in the patient 20 (chr22:50,282,986-51,304,566 - 22q13.3). The mother did not have BAP and the father disagree to make BAPQ.

The patient 21 presented duplication at chr15:31,956,036-32,511,581 (15q13.3) inherited from the father. Both parents don't meet the criteria for BAP.

A missense SNV in the *SHANK2* gene was observed in the patient 22 (chr11:70490374 G/A - 11q13.4) but not in his mother with aloof personality and pragmatic language in BAPQ. The patient's sister also meets the criteria for aloof personality in the questionnaire. This missense variation was also found in patient 23, but not in his mother, without BAP. We could not contact the patient's fathers.

Discussion

In addition to ASD being considered a paradigm of neurobehavioral disorders, the etiology is a current scientific challenge to clinical care and research given its extreme complexity, different neurodevelopmental presentations and genetic and non-genetic causes (Arnett *et al.*, 2018). The results of our study also give an idea of how heterogeneous this puzzle is.

Heritability of ASD is around 50% and genetic alterations are considered as a key factor in the etiology (Sandin *et al.*, 2014; Huguet *et al.*, 2016). Rare variations dominate the allelic spectrum in autism, but common variations also have an impact on this disorder, as they seem to play a substantial role in additive genetic effects for risks for the individual as these alterations can be highly heritable (Chaste *et al.*, 2017). In addition, the same genetic changes, segregating in the same family, may originate in very different behavioral phenotypes, such as in ASD and schizophrenia. In these disorders neuronal connectivity, the formation and maintenance of synapses, and synaptic plasticity are affected (Fernandes *et al.*, 2018; Lilja & Ivaska, 2018). Rare, often *de novo*, copy number and single nucleotide variants are both implicated, with many ASD-implicated genes showing pleiotropy and variable penetrance (Woodbury-Smith & Scherer, 2018). The case 15 that we studied can be an example of this phenotype variation. Although several parents had the same genomic alterations in 15q, the proband is autistic, his father had BAP, his mother had no behavioral alterations and one of his grandparents was schizophrenic. This region is known to be associated with a wide range of neuropsychiatric disorders like autism, intellectual disability, epilepsy and schizophrenia, due to genes related to neuronal functions, especially acting in synapses (Madelyn *et al.*, 2017).

For the other hand, not always the logic is observed, as for example, in the case 16. The patient has autism and three CNVs affecting loci related to neural functions. The mother has one of them and BAP, and the father has two of them and only rigid personality. We expected that the father was more severely affected, considering the additive effect of different events. (Yip *et al.*, 2018)

In this context, we selected autistic patients from previous studies of the same group of researchers who presented alterations in neurodevelopmental genes, potentially involved in the phenotype. We were interested in heritability of the mutations and possible other effects, such as BAP or another neuropsychiatric disorders, in those who

presented or did not present the genetic alteration of the patient. This approach is rare in the literature and there are no Brazilian studies on this subject.

The sample size and difficulties in involving both parents (divorce, conflicts, death and so on) limited our study to 50 relatives of 23 not dysmorphic autistic patients that presented genomic alterations in genes that are candidates for autism. The heritability was 46%, similar to the percentages reported in the literature about autism (Lee *et al.*, 2018), and in general population (Speed *et al.*, 2017).

Among the alterations that were found in patients and tested in relatives, some of them were missense mutations. These kind of variations are known to change one amino acid in a protein, which may affect the protein function. However, these are the most difficult class of variants to predict a biological function adequately. By altering the protein structure, somehow they contribute to the etiology of the disease (Geisheker *et al.*, 2017).

Some genetic mutations that we detected are classified as synonymous variation. Some studies have demonstrated functional consequences of synonymous mutations, due to decreases in transcription, translation and altered protein folding (Li *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018). Synonymous codon alterations may not always be neutral. Association studies show that synonymous substitutions may affect protein-folding (Bhardwaj *et al.*, 2014). Also should be noted that these synonymous variants have downstream signaling consequences and may contribute to the risk of disease as much as other mutations (Takata *et al.*, 2016).

Due to high heritability of ASD, studies have linked rare inherited variation as well as common polygenic and *de novo* variations to ASD risk. These variations are also observed among others psychiatric disorders in cross-disorder meta-analysis, due to their moderately to highly heritable. Many exome sequencing studies often overlooked these alterations due to the focus on *de novo* variants (Al-Mubarak *et al.*, 2018). Those findings, like the ones we presented at the position 22:55116383 in exon 21 of the *SHANK3*, where the patient's sister was diagnosed with Attention Deficit-Hyperactivity Disorder and milder autistic phenotypes presented the same SNV as her brother, can reinforce the multiple variants-hit hypothesis, where more than one gene are responsible for the phenotype (Ferri *et al.*, 2018).

To understand the heritability and the genetic etiology of autism, researchers have also turned their attention to the milder expression of autistic traits that can often be found

in parents and siblings of individuals with ASD. These traits of pragmatic language, aloof and rigid personality that reflect characteristics of the phenotypic expression of the genetic liability of autism, referred as the Broad Autism Phenotype (BAP) (Hurley *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2015). Beside this may be considered that also cultural differences between countries might affect the rate of BAP, as proposed by Shi *et al.* (2015).

We applied the Broad Autism Phenotype Questionnaire-BAPQ in 48 Brazilian autistic relatives; 45.8% showed high scores in at least one of the three subscales of the BAPQ and 31.2% (04 fathers, 08 mothers and 03 sisters) had BAP. Different studies estimated that 20% to 50% of parents of children with ASD has at least one of autistic characteristics (Sasson *et al.*, 2013) and it was described that about 35% of them has BAP detected by BAPQ (Gregory *et al.*, 2016) These results are consistent with our findings.

In addition, correlation studies between BAP and heritability are helpful to clarify which traits aggregate in family members and can be useful for restricting phenotypic heterogeneity to detect vulnerability genes for autism more accurately (Shi *et al.*, 2015). In our study 50% of 16 parents with alterations had BAP, demonstrating that this correlation can be useful for restricting phenotypic heterogeneity to detect vulnerability for autism more accurately (Colvert *et al.*, 2015). On the other hand, we found 37.5% of 16 family members with the same genomic alteration who did not present autistic phenotype or autistic characteristics, besides of 37.5% of 32 family members who had some autistic characteristics, but did not present the same patient's mutation. It is known that patients with the same genetic defect can have different clinical presentations and some individuals who carry known disease-causing variants can appear unaffected, which suggests that phenotypic expression in individuals with monogenic disorders is affected by the same variants as in the general population (Niemi *et al.*, 2018). There is also emerging evidence that cumulative effect of common variants can modify the penetrance of rare variants in complex phenotypes, as occurred in schizophrenia (Tansey *et al.*, 2016). Our data corroborated others previously described and demonstrated that not always is possible a correlation of genetic alteration to risk of autism and they do not rule out the presence of additional genomic/environmental changes that could not be detected. The genomic change can be responsible by part of the behavioral phenotype, but the risk results from the sum of other events, still unclear. These events show the complexity of the autistic behavioral phenotype.

As for the presence of other psychiatric disorders (not BAP) in the genealogies, only five affected relatives were found. The reported disorders were Alcoholism, Major Depression, Schizophrenia and ADHD. One of them (paternal uncle) with Alcoholism was not studied because the alteration had been inherited from the mother. A maternal grandmother with major depression was also not investigated because the patient's variation was inherited from the father. It was not possible to contact one uncle with Major Depression. Another maternal grandmother with diagnosis of Schizophrenia had the same duplication on chromosome 16. Finally, a sister with the same alteration found in the patient had ADHD. In this case, can be suggested a common genetic base. The low incident of family members with other psychiatric disorders in our study rather than the BAP may be related to our sample size.

There is a significant overlap of genetic alterations in autism and others neuropsychiatric disorders, but is difficult to make a specific hypothesis without the specific biological pathways and protein complexes that are involved (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013;).

The absence of classical Mendelian segregation in the genetic background of autism, Broad Autism Phenotypes and the overlap with others neuropsychiatric disorders reinforces the models that propose a involvement of many genes with additive effect (multiple-hit hypothesis), and further investigations are necessary to clarify these findings.

Conclusion

Despite our limitations, this study contributes to our understanding of the genomic changes in ASD and with the variability of the phenotype. This was the first study to correlate genetic findings and the application of the BAPQ in a Brazilian population. Our findings are in accordance with those in the literature, reinforcing the importance to investigate BAP in families in risk to ASD.

Author's contributions

DBAR conceptualized and designed the study, participated in data collection, carried out molecular genetic studies, data analysis and statistical analysis, drafted the initial manuscript, reviewed the manuscript and approved the final manuscript as submitted. ALBM participated in data collection, carried out molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. SE analyzed the data and approved the final manuscript as submitted. MRPB participated by supporting the implementation of part of molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. ACFC conceptualized and designed the study, supervised all the data, participated in the investigation, reviewed the diagnoses, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

List of abbreviations

aCGH	Microarray - based Comparative Genomic Hybridization;
ADHD	Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder;
ADI-R	Autism Diagnostic Interview-Revised
ASD	Autism spectrum disorder;
BAP	Broad Autism Phenotype;
BAPQ	Broad Autism Phenotype Questionnaire;
BP	Bipolar Disorder;
CARS	Childhood-Autism Rating Scale;
CNVs	Copy number variations;
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth
Edition;	
ICD 10	International Classification of Diseases 10;
MDD	Major Depressive Disorder;
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification;
SCZ	Schizophrenia;
SNPs	Single nucleotide polymorphisms;
SNVs	Single nucleotide variations;
WHO	World Health Organization.

References

Al-Mubarak, B., Mohamed A., Aisha O., Hesham A., Mohammed A., Michael N., et al. (2017) Whole exome sequencing reveals inherited and de novo variants in autism spectrum disorder: a trio study from Saudi families. *Scientific Reports*, 7, 5679.

Arnett. A. B., Sandy T., & Raphael A. (2018) The state of research on the genetics of autism spectrum disorder: methodological, clinical and conceptual progress. *Current Opinion in Psychology*. 7, 1-5.

Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), Rutter M., Le Couteur A., & Lord C. Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition (ADOS-2) Manual (Part I): Modules 1–4. Torrance, CA: Western Psychological Services; 2012.

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Washington, DC: APA.

Baio, J., Lisa W., Deborah L. C., Matthew J. M., Julie D., & Zachary W. (2018) Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summary*. 67. 1-23.

Benger, M., Kinali M., & Mazarakis, N. D. (2018) Autism spectrum disorder: prospects for treatment using gene therapy. *Molecular Autism*. 9, 39.

Bhardwaj A. (2016) Investigating the role of site-specific synonymous variation in disease association studies. *Mitochondrion*. 16, 83-88.

Brainstorm Consortium. (2018). Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science*. 360, eaap8757.

Chaste, P., Roeder, K., & Devlin, B. (2017). The Yin and Yang of Autism Genetics: How Rare De Novo and Common Variations Affect Liability. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 18, 167-187.

Childhood-Autism Rating Scale (CARS), Schopler, E., Reichler, R. J., & Renner, B. R. The childhood autism rating scale (CARS): For diagnostic screening and classification of autism. New York: Irvington. (1986).

Colvert, E., Beata T., Fiona M., PhD, Catherine S., Sarah R. C., & Emma W. (2015). Heritability of autism spectrum disorder in a uk population-based twin sample. *JAMA Psychiatry*. 72, 415–423.

Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2013) Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nature Genetics*. 45, 984-994.

Docherty, A., Arden, A. M., & Ayman H. F. (2016) Cross-Disorder Psychiatric Genomics. *Current Behavioral Neuroscience Reports*. 3, 256–263.

Doherty J. L., & Owen M.J. (2014). Genomic insights into the overlap between psychiatric disorders: implications for research and clinical practice. *Genome Medicine*. 28, 6.

Eissa N., Al-Houqani, M., Sadeq, A., Ojha, S., Sasse, A., & Sadek , B. (2018). Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Neuroscience*. eCollection.

Fernandes, A., Dor, E., Maurin, T., Laure, G., Menard, M. L., Drozd, M. et al., (2018). exploration and characterisation of the phenotypic and genetic profiles of patients with early onset schizophrenia associated with autism spectrum disorder and their first-degree relatives: a french multicentre case series study protocol (GenAuDiss). *BMJ Open*. e023330.

Ferri, S. L., Abel, T., & Brodtkin, E. (2018) Sex differences in autism spectrum disorder: a review. *Current Psychiatry Reports*. 20, 9.

Geisheker, M. R., Heymann, G., Wang, T., Coe, B. P., Turner, T. N., & Stessman, H. A. F. (2017) Hotspots of missense mutation identify neurodevelopmental disorder genes and functional domains. *Nature Neuroscience*, 20, 1043-1051.

Gilbert, J., & Man, H. (2017). Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. eCollection 2017.

Huguet, G., Benabou, M., & Bourgeron, T., (2016). The genetics of autism spectrum disorders. a time for metabolism and hormones. eCollection.

Hurley, R. S., Losh, M., Parlier, M., Reznick, J. S., & Piven, J. (2007). The Broad Autism Phenotype Questionnaire. *The journal of autism and developmental disorders*. 9, 1679-90.

Ivanov, H. Y., Stoyanova, V. K., Popov, N. T., & Vachev, T. (2015). Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *Folia Med*. 57, 18-28.

Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective content. *Nervous Child*, 2, 217–250.

Kim, H. R., Duc, N. M., & Chung, K. Y. (2018) Comprehensive Analysis of Non-Synonymous Natural Variants of G Protein-Coupled Receptors. *Biomolecules & therapeutics*. 26,101-108.

Lee, J. J., Wedow, R., Okbay, A., Kong, E., Maghziyan, O., & Zacher, M. (2018) Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals. *Nature Genetics*. 50, 1112-1121.

Li, X., Chen, Y., Qi, H., Liu, L., & Shuai, J. (2016). Synonymous mutations in oncogenesis and apoptosis versus survival unveiled by network modeling. *Oncotarget*. 7, 23.

- Lilja, J., & Ivaska, J. (2018). Integrin activity in neuronal connectivity. *Journal of Cell Science*. 15, 131.
- Liu, Y., Li, J., Zheng, Q., Zaroff, C. M., Hall, B. J., Li, X., & Hao, Y. (2016) Knowledge, attitudes, and perceptions of autism spectrum disorder in a stratified sampling of preschool teachers in China. *BMC Psychiatry*. 16, 142.
- Lowther, C., Costain, G., Stavropoulos, D. J., Melvin, R., Silversides, C. K., & Andrade, D. M. (2015). Delineating the 15q13.3 microdeletion phenotype: a case series and comprehensive review of the literature. *Genetics in Medicine*. 17, 149-157.
- Niemi, M. E. K., Martin, H. C., Rice, D. L., Gallone, N., Gordon, S., Kelemen, M., McAloney, K., et al. (2018) Common genetic variants contribute to risk of rare severe neurodevelopmental disorders. *Nature*. 562, 268-271.
- Pisula, E., & Ziegart-Sadowska. (2015). Broader Autism Phenotype in Siblings of Children with ASD—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 13217–13258.
- Robinson, E. B., Samocha, K. E., Kosmicki, J. A., McGrath, L., Neale, B. M., & Perlis, R. H. (2014) Autism spectrum disorder severity reflects the average contribution of de novo and familial influences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111, 15161-15165.
- Rubenstein, E., Wiggins, L., Schieve, L. A., Bradley, C., DiGuseppi, C., & Moody, E. (2018). Associations between parental broader autism phenotype and child autism spectrum disorder phenotype in the Study to Explore Early Development. *Autism*. [Epub ahead of print]
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *Jama*. 311, 770–1777.

- Sasson, N. J., Lam, K. S., Childress, D., Parlier, M., Daniels, J. L., & Piven, J. (2013) The Broad Autism Phenotype Questionnaire: prevalence and diagnostic classification. *Autism Research*. 134-143
- Shi, L. J., Jian, Ou., Jing, G., Su, W., Yuan, Z., & Fu, Zhu. (2015) Broad Autism Phenotype features of Chinese parents with autistic children and their associations with severity of social impairment in probands. *BMC Psychiatry*. 15, 168.
- Speed, D. (2017). Re-evaluation of SNP heritability in complex human traits. *Nature Genetics*. 49, 986–992.
- Tansey, K. E., Ress, E., Linden, E. D., Ripke, S., Chambert, K. D., Moran, J. L. et al. (2016) Common alleles contribute to schizophrenia in CNV carriers. *Molecular Psychiatry*. 8, 1153.
- Takata. A., Ionita-Laza. I., Gogos. J. A., Xu, B., & Karayiorgou, M. (2016) De Novo Synonymous mutations in regulatory elements contribute to the genetic etiology of autism and schizophrenia. *Neuron*. 89, 940-947.
- WHO - World Health Organization (2018). Process of translation and adaptation of instruments. Retrieved August 09, 2018, from http://www.who.int/substance_abuse/research_tools/translation/en/
- Woodbury-Smith, M., & Schereret, S. W. (2018). Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 60, 445-451

Table 1: Gene, position and type of the mutation found in the patients, the presence or absence of the same alteration in relatives with or without Broad Autism Phenotype (BAP) (Continue).

Patient	Gene	Mutation Position	Mutation Type	Studied relative	Presence of the same genetic alteration	BAP present
1	<i>SHANK3</i>	chr22:50722009 C/G	Synonymous	Father	Yes	Yes
				Mother	No	No
				Brother	No	No
2	<i>SHANK2</i>	chr11:70798504 C/T	Synonymous	Mother	Yes	No
3	<i>GABRB3</i>	chr15:26580299 A/G	-	Father	No	No
				Mother	Yes	Yes
				Sister	Yes	No
				Sister	No	No
4	<i>NRXN1</i>	NM_001135659(NRXN1):c.3702G>C	Synonymous	Father	No	No
				Mother	Yes	No
5	<i>SHANK2</i>	chr11:70820660 C/T	Synonymous	Father	No	No
				Mother	Yes	Yes
6	<i>SHANK2</i>	chr11:70820660 C/T	Synonymous	Father	Yes	No
				Mother	No	No
7	<i>SHANK3</i>	chr22:50722049 C/G	Missense	Mother	No	Yes
				Sister	Yes	Yes
8	<i>NRXN1</i>	microdeletion of 110,8Kb on exon 19	Microdeletion	Father	No	No
				Mother	No	No
9	<i>SHANK3</i>	chr22:51113618 A/G	Missense	Father	No	Yes
				Mother	No	No
10	<i>SHANK3</i>	chr22:50721646 C/T	Synonymous	Father	No	Yes
				Mother	No	Yes
11	<i>SHANK3</i>	chr22:50721985 C/T	Synonymous	Mother	No	No
12	<i>SHANK2</i>	chr11:70820660 C/T	Synonymous	Mother	No	No
13	<i>SHANK2</i>	chr11:70820660 C/T	Synonymous	Mother	No	No
14	<i>SHANK2</i>	chr11:70820660 C/T	Synonymous	Mother	No	No

Table 1: Gene, position and type of the mutation found in the patients, the presence or absence of the same alteration in relatives with or without Broad Autism Phenotype (BAP) (Continuation).

Patient	Gene	Mutation Position	Mutation Type	Studied relative	Presence of the same genetic alteration	BAP present
15	<i>CHRNA7</i>	chr15:32,024,192-32,509,926	Duplication	Father	Yes	Yes
				Mother	Yes	No
				Sister	No	No
				Sister	No	No
				Grandmother	Yes	-
	<i>CHRNA7</i>	chr15:22,410,242-23,222,284	Deletion	Father	Yes	-
				Mother	Yes	-
				Sister	No	-
				Sister	No	-
				Grandmother	Yes	-
16	-	chr16:29,696,973-30,191,907	Duplication	Father	Yes	No
				Mother	No	Yes
				Sister	No	No
	-	chr4:186,934,286-187,137,146	Duplication	Father	No	-
				Mother	Yes	-
				Sister	No	-
	-	chr11:48,380,903-48,968,027	Deletion	Father	Yes	-
				Mother	No	-
				Sister	No	-
17	-	chr15:29,517,699-30,191,895	Duplication	Mother	No	Yes
				Sister	No	No
18	-	chr16:29,613,495-30,190,030	Duplication	Father	No	No
				Mother	No	No
				Sister	No	Yes

Table 1: Gene, position and type of the mutation found in the patients, the presence or absence of the same alteration in relatives with or without Broad Autism Phenotype (BAP) (Conclusion).

Patient	Gene	Mutation Position	Mutation Type	Studied relative	Presence of the same genetic alteration	BAP present
19	-	chr16:29,402,301-30,226,931	Duplication	Father	No	No
				Mother	Yes	Yes
				Sister	Yes	No
				Sister	Yes	Yes
20	-	chr22:50,282,986-51,304,566	Deletion	Mother	No	No
21	-	chr15:31,956,036-32,511,581	Duplication	Father	Yes	No
				Mother	No	No
22	<i>SHANK2</i>	chr11:70490374 G/A	Missense	Mother	No	Yes
				Sister	No	No
23	<i>SHANK2</i>	chr11: 70798514 G/A	Missense	Mother	No	No

Supporting Information

Broad Autism Phenotype Questionnaire

Instructions: You are about to fill out a series of statements related to personality and lifestyle. For each question, circle that answer that best describes how often that statement applies to you. Many of these questions ask about your interactions with other people. Please think about the way you are with most people, rather than special relationships you may have with spouses or significant others, children, siblings, and parents. Everyone changes over time, which can make it hard to fill out questions about personality. Think about the way you have been the majority of your adult life, rather than the way you were as a teenager, or times you may have felt different than normal. You must answer each question, and give only one answer per question. If you are confused, please give it your best guess.

1—Very rarely	2—Rarely	3—Occasionally
4—Somewhat often	5—Often	6—Very often

Questions:

1. I like being around other people	1 2 3 4 5 6
2. I find it hard to get my words out smoothly	1 2 3 4 5 6
3. I am comfortable with unexpected changes in plans	1 2 3 4 5 6
4. It's hard for me to avoid getting sidetracked in conversation	1 2 3 4 5 6
5. I would rather talk to people to get information than to socialize	1 2 3 4 5 6
6. People have to talk me into trying something new	1 2 3 4 5 6
7. I am "in-tune" with the other person during conversation***	1 2 3 4 5 6
8. I have to warm myself up to the idea of visiting an unfamiliar place	1 2 3 4 5 6
9. I enjoy being in social situations	1 2 3 4 5 6
10. My voice has a flat or monotone sound to it	1 2 3 4 5 6
11. I feel disconnected or "out of sync" in conversations with others***	1 2 3 4 5 6
12. People find it easy to approach me***	1 2 3 4 5 6
13. I feel a strong need for sameness from day to day	1 2 3 4 5 6
14. People ask me to repeat things I've said because they don't understand	1 2 3 4 5 6
15. I am flexible about how things should be done	1 2 3 4 5 6
16. I look forward to situations where I can meet new people	1 2 3 4 5 6
17. I have been told that I talk too much about certain topics	1 2 3 4 5 6
18. When I make conversation it is just to be polite***	1 2 3 4 5 6
19. I look forward to trying new things	1 2 3 4 5 6
20. I speak too loudly or softly	1 2 3 4 5 6
21. I can tell when someone is not interested in what I am saying***	1 2 3 4 5 6
22. I have a hard time dealing with changes in my routine	1 2 3 4 5 6
23. I am good at making small talk***	1 2 3 4 5 6
24. I act very set in my ways	1 2 3 4 5 6
25. I feel like I am really connecting with other people	1 2 3 4 5 6
26. People get frustrated by my unwillingness to bend	1 2 3 4 5 6
27. Conversation bores me***	1 2 3 4 5 6
28. I am warm and friendly in my interactions with others***	1 2 3 4 5 6
29. I leave long pauses in conversation	1 2 3 4 5 6
30. I alter my daily routine by trying something different	1 2 3 4 5 6
31. I prefer to be alone rather than with others	1 2 3 4 5 6
32. I lose track of my original point when talking to people	1 2 3 4 5 6
33. I like to closely follow a routine while working	1 2 3 4 5 6
34. I can tell when it is time to change topics in conversation ***	1 2 3 4 5 6
35. I keep doing things the way I know, even if another way might be better	1 2 3 4 5 6
36. I enjoy chatting with people ***	1 2 3 4 5 6

***Casual interaction with acquaintances, rather than special relationships such as with close friends and family members.

4.2 Capítulo 2

O artigo científico apresentado será submetido para publicação na revista *Autism Research*.

(Impact Factor: 3.768)

Artigo original

***Broad Autism Phenotype* no Brasil: Prevalência em Genitores de Autistas e de Deficientes Intelectuais Idiopáticos**

Dante Bruno Avanso Rosan¹, Ana Luiza Bossolani Martins², Regina Albuquerque³, Simone Secco da Rocha³, Maria Rita de Passos e Bueno⁴, Agnes Cristina Fett-Conte³

Afiliações:

1. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP; São José do Rio Preto, SP, Brazil.
2. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS Campus Paranaíba; Paranaíba, MS, Brazil.
3. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; São José do Rio Preto, SP, Brazil.
4. Universidade de São Paulo – USP/SP; São Paulo, SP, Brazil.

Autor correspondente

***Dante Bruno Avanso Rosan**

Institutional address: Rua Cristovão Colombo, 2265, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/ UNESP, Zip Code 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; Phone: 55 17 997575756, **Email:** danterosan@gmail.com

Resumo

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), ou Autismo, corresponde a um grupo de afecções neuropsiquiátricas complexas, de etiologia heterogênea e desconhecida na maioria dos casos. A prevalência é muito alta na população em geral e os afetados são caracterizados por dificuldade de comunicação e socialização, além de manias e repetições. Familiares de autistas apresentam frequências significativamente maiores de alterações comportamentais vinculadas às características autísticas e este fenótipo mais amplo é conhecido como “*Broad Autism Phenotype*” (BAP). Há centenas de genes candidatos ao autismo ou regiões genômicas que apresentam alterações, que estão descritas não apenas em casuísticas de autistas, mas também de indivíduos com outros transtornos do comportamento, o que evidencia uma sobreposição etiológica entre tais afecções. A presença das características relacionadas ao BAP em pais de autistas foram estudados e comparados com um grupo composto de pais de indivíduos com Deficiência Intelectual idiopática sem autismo, e com um grupo de pais de indivíduos sem queixas de transtornos neurocomportamentais. O BAP foi investigado com a utilização do BAPQ (*Broad Autism Phenotype Questionnaire*), e foi observado nos três grupos de pais, com frequência significativamente maior nos pais de autistas, que também apresentaram maiores escores para personalidade rígida. Nossos achados estão de acordo com os da literatura e contribui para a compreensão do fenótipo amplo do autismo em casuística brasileira.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro do Autismo, DI, BAP.

Introdução

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) ou autismo é uma doença do neurodesenvolvimento, caracterizada por déficits persistentes na comunicação e na interação social, acompanhados por comportamentos estereotipados e interesses restritos (Zhang *et al.*, 2019). As características comportamentais são tão variáveis de indivíduo para indivíduo que justificam a definição de espectro e são observadas antes dos três anos de idade, independente de etnia ou grupo socioeconômico (Baio *et al.*, 2018; DSM 5, APA 2013).

A prevalência não é conhecida na maioria dos países subdesenvolvidos, inclusive no Brasil, mas é sabidamente alta no mundo todo, o que o faz o autismo ser considerado um problema de saúde pública, com impactos psicológicos e financeiros para famílias e governos. Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo estimado de um indivíduo com autismo durante toda a vida é estimado em cerca de 2,4 milhões de dólares (aproximadamente 9,5 milhões de reais) e o gasto anual estimado do governo com tratamentos chega a \$268 bilhões de dólares (aproximadamente um trilhão de reais) (Lombardo *et al.*, 2019).

Além disso, o risco para TEA vem aumentando. De acordo com o último relatório do *The Autism and Developmental Disabilities Monitoring* (2014), do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), a prevalência é de 16,8 por 1.000 (1:59), um aumento de cerca de 150% quando comparado com seis por 1.000 (1:166) do relatório de 2004, sendo os homens quatro vezes mais afetados do que as mulheres (Baio *et al.*, 2018).

Um dos grandes desafios da ciência é o diagnóstico etiológico. As causas são extremamente complexas e relacionadas com diversas interações genéticas, epigenéticas e fatores ambientais. Tais fatores podem ser determinados ou presumidos em apenas 10-25% dos casos, dependendo do tipo de triagem e investigação laboratorial dos afetados (Brito *et al.*, 2018). O diagnóstico clínico, embora também difícil, segue critérios padronizados e geralmente é realizado por equipes multidisciplinares. Em função dos diagnósticos diferenciais, é recomendado que seja baseado em múltiplas fontes, como a observação clínica, relatos de pais e cuidadores e, quando possível, no autorrelato dos afetados. Há muitas diferenças entre os indivíduos quanto à capacidade de interação social e de comunicação de acordo com os fatores culturais e sociais, mas estas estão sempre prejudicadas em relação ao contexto em que vivem. E tais fatores também podem

influenciar a idade da identificação ou do diagnóstico (DSM 5, APA 2013).

“Autismo síndrômico” se refere ao comportamento autístico associado com características dismórficas ou síndromes genéticas, como a síndrome do X frágil, enquanto e o “autismo não síndrômico”, também conhecido como autismo idiopático, refere-se aos casos sem relação com alguma síndrome, causa genética ou ambiental conhecida (Zhang *et al.*, 2019).

Apesar da grande diversidade de genes envolvidos com TEA, muitos atuam principalmente em vias relacionadas a funções neuronais, como neurogênese e plasticidade sináptica, conectividades neuronais e migração. Tais variações genéticas podem ser transmitidas entre as gerações, com uma herdabilidade moderada, assim como os demais transtornos psiquiátricos (Docherty *et al.*, 2016). Certas combinações de diferentes variantes genéticas podem modificar e alterar os efeitos patogênicos de mutações hereditárias, *de novo* ou somáticas, fazendo com que indivíduos com a mesma mutação num gene candidato tenha efeitos diferentes entre os portadores, inclusive da mesma genealogia (Ayhan e Konopka 2019).

Já a deficiência intelectual (DI) é definida pela presença de deficiências funcionais, tanto intelectuais quanto adaptativas, nos domínios conceitual, social e prático, e tem a prevalência estimada na população geral de 1/100 (DSM 5, APA 2013; Fusar-Poli *et al.*, 2017). Assim como TEA, é tão ou mais complexa e também considerada multifatorial na maioria dos casos, com múltiplos e complexos fatores genéticos e ambientais envolvidos na etiopatogenia, podendo ocorrer isoladamente ou associada a síndromes (Mulas e Rojas, 2018). Estima-se que 30% dos autistas são deficientes intelectuais e muitos fatores causais são compartilhados por estas afecções, embora pouco deste contexto esteja esclarecido (Fusar-Poli *et al.*, 2017).

A sobreposição das características fenotípicas e o risco genético compartilhado entre o TEA e os outros transtornos torna ainda mais difícil identificar genes específicos do autismo e aqueles que causam características em comuns com as demais afecções. Neste contexto, a hipótese de *hits* múltiplos tem muitos defensores. Ela preconiza que o fenótipo comportamental autístico irá depender da somatória e interação das variantes genéticas, das ativações e supressões epigenéticas, *imprinting* e de fatores ambientais pré e pós-natais (Fein e Helt, 2017).

Além disso, pais e familiares de indivíduos com TEA são mais propensos a manifestarem características comportamentais semelhantes, porém mais brandas do que as dos afetados, assim como uma variedade de outras condições neuropsiquiátricas

(Hirokawaa 2019). Nos parentes de primeiro grau de autistas são descritas frequências elevadas de alterações de personalidade, prejuízos na interação social, linguagem pragmática e personalidade rígida, entre outros (Pisula e Ziegart-Sadowska, 2015). O conjunto de tais características que refletem uma expressão fenotípica mais branda do autismo é conhecido como *Broad Autism Phenotype* (BAP) (Hirokawaa *et al.*, 2019). Pais com BAP possuem riscos aumentados de terem crianças com autismo e outras afecções do neurodesenvolvimento, inclusive DI, o que tem sido considerado nos estudos de heterogeneidade alélica e de eventos aditivos múltiplos (Rubenstein *et al.*, 2018; Woodbury-Smith *et al.*, 2018).

Este estudo apresenta os resultados da investigação da presença do BAP e de suas subcategorias (prejuízos na interação social, linguagem pragmática e personalidade rígida) em uma casuística brasileira de pais de autistas, pais de indivíduos com DI e pais de indivíduos sem alterações neuropsiquiátricas.

Material e Métodos

Casuística

O projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa (PNº:1.445.225/2016 e CAAEº: 52315316.3.0000.5415) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Os termos de consentimento (Resolução 466/2012) foram assinados por todos os participantes.

A casuística foi composta por 132 indivíduos divididos em três grupos: 1) pais de indivíduos não dismórficos com TEA - G1; 2) pais de indivíduos não dismórficos com DI idiopática – G2 e 3) pais de indivíduos saudáveis, sem queixas de alterações de comportamento em até três gerações – G3. Os filhos dos membros dos grupos G1 e G2 foram atendidos nos ambulatórios de Genética e de Neurologia Infantil do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP (FAMERP/FUNFARME).

O grupo G1 foi composto por 36 familiares, sendo 13 pais e 23 mães (13 casais e 10 mães) em idades variadas, de 23 famílias de indivíduos com diagnóstico conclusivo de TEA. O diagnóstico de autismo seguiu os critérios contidos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª Edição (DSM-5) e *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) ou *Childhood-Autism Rating Scale* (CARS), e foi realizado por psiquiatras e por outros especialistas em autismo, membros de equipes interdisciplinares. Todos os autistas haviam sido avaliados por geneticistas clínicos para excluir síndromes

e fatores etiológicos ambientais. Todos tiveram resultados negativos para anormalidades cromossômicas e Síndrome do Cromossomo X Frágil. Assim, os pais dos indivíduos com TEA dismórficos, com síndromes reconhecidas, cromossomopatias ou expostos a fatores ambientais potencialmente causais foram excluídos deste estudo.

O grupo de pais de indivíduos com DI (G2), foi composto por 46 familiares, sendo 20 pais e 26 mães (20 casais e seis mães), de crianças com diagnóstico de DI idiopática, segundo critérios do DSM-5, não dismórficas. Os critérios de exclusão foram os mesmos do grupo G1.

O G3 foi composto de 50 genitores de indivíduos saudáveis, sem alterações neuropsiquiátricas ou história de distúrbios neuropsiquiátricos na genealogia, que foram recrutados de escolas regulares do município, sendo 25 pais e 25 mães (25 casais),

Os participantes foram inicialmente contatados por telefone ou pessoalmente, esclarecidos sobre o projeto e convidados a participar de uma entrevista, em data previamente agendada nas dependências das instituições participantes ou na residência do familiar.

Aplicação do BAPQ

A investigação da presença do BAP foi realizada com a utilização do BAPQ (*Broad Autism Phenotype Questionnaire* - Hurley *et al*, 2007), um questionário “*self and informant-report*” constituído por 36 itens, com novos scores de corte segundo Sasson e colaboradores (2013) para reduzir falsos positivos. O questionário foi traduzido para o Português de acordo com o processo de tradução e adaptação de instrumentos preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018).

A análise consiste em uma avaliação de três características comportamentais, apresentadas no BAPQ como subescalas (cada uma com 12 perguntas): interação social, linguagem pragmática e personalidade rígida. Indivíduo com escore elevado em determinada subescala é interpretado como tendo a característica correspondente à mesma. Os valores também variam por sexo do indivíduo avaliado, conforme instruções do teste.

O BAPQ é utilizado para triagem e possível classificação diagnóstica, mas não para conclusão de diagnóstico clínico ou etiológico (Sasson *et al.*, 2013). Estes dependem da avaliação multiprofissional e da utilização de outras estratégias de análise.

A fim de reduzir o viés associado às crenças sobre o autismo, o BAPQ foi apresentado aos familiares como “Questionário de Personalidade e Preferências” (Shi *et al.*, 2015).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software Statistica 9.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), enquanto que os gráficos foram feitos no software GraphPad Prisma versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada usando o *Normal Probability Plots of Residuals* e a homocedasticidade pelo teste de Levene, assumindo nível de significância de 0,05.

A comparação entre a frequência da presença e a ausência do BAP nos grupos de estudo foi analisada pelo teste de qui-quadrado, seguido do teste exato de Fisher *software Statistica 9.0*. Para comparação entre os grupos, foram adotados os *General Linear Models (GLM)* com *post hoc de Tukey*, o GLM possibilita a análise de modelos com combinações de variáveis categóricas e contínuas, com múltiplos fatores preditivos. Assim, os grupos G1, G2 e G3 foram considerados como preditores e os valores obtidos pelos questionários como variáveis dependentes (Quinn *et al.*, 2002).

Resultados

Ocorrência das características do BAP pelo BAPQ

Os dados referentes à ocorrência das características investigadas pelo BAPQ são apresentadas na Tabela 1.

Dos 36 pais de indivíduos com TEA estudados, 17 (47,2%) apresentaram escores elevados em pelo menos uma das três subescalas do BAPQ (09 mulheres e 08 homens) e 19 pais (52,8%) não apresentaram alterações (14 mulheres e 05 homens). 12 (33,3%) atingiram o limiar para o critério de classificação diagnóstica para o BAP, pois apresentaram alteração em duas ou três subescalas (08 mulheres e 04 homens).

Entre os 46 pais de indivíduos com DI, 15 (32,6%) atingiram a classificação de uma ou mais alterações no questionário para BAP e 31 (67,4%) não demonstraram alterações (17 mulheres e 14 homens). Nove (19,56%) apresentaram critérios de classificação diagnóstica para características do BAP (06 mulheres e 03 homens).

Dos 50 pais de indivíduos saudáveis, sem alterações neuropsiquiátricas, 12 (24%) deram respostas compatíveis com pelo menos uma das alterações comportamentais do

BAPQ (06 mulheres e 06 homens) e 38 (76%) não apresentaram alterações comportamentais significativas (19 mulheres e 19 homens). Seis (12%) atingiram escores para critérios de classificação diagnóstica para características do BAP (03 mulheres e 03 homens).

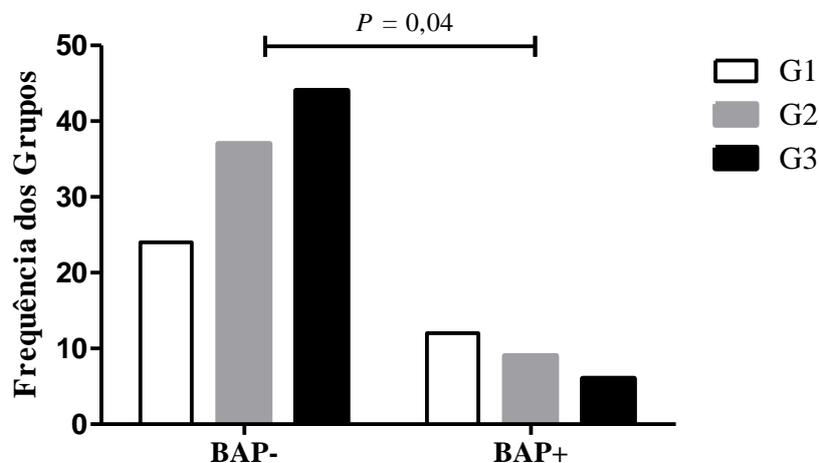
Tabela 1. Número de pais dos três grupos que atingiram ou não os escores correspondentes às três subescalas das características do BAP.

Características do BAP	G1		G2		G3	
	Mãe	Pai	Mãe	Pai	Mãe	Pai
0	14 (38,9%)	05 (13,9%)	17 (36,9%)	14 (30,4%)	19 (38%)	19 (38%)
1	01 (2,8%)	04 (11,1%)	03 (6,5%)	03 (6,5%)	03 (6%)	03 (6%)
2	07 (19,4%)	02 (5,5%)	05 (10,9%)	02 (4,3%)	03 (6%)	02 (4%)
3	01 (2,8%)	02 (5,5%)	01 (2,2%)	01 (2,2%)	00 (0%)	01 (2%)

G1 = pais de indivíduos com transtorno do espectro autista; G2 = pais de indivíduos com deficiência intelectual; G3 = pais de indivíduos sem alteração.

A análise de comparação das frequências de BAP (pelo menos duas características) nos três grupos (G1, G2 e G3) foi realizada considerando-se a presença (BAP+) ou a ausência (BAP-) em conjunto. A Figura 1 apresenta as frequências em cada grupo. (Tabela 2).

Figura 1. Frequências dos indivíduos com BAP (BAP+) e sem BAP (BAP-) nos grupos amostrais avaliados.



G1 = Pais de indivíduos com transtorno do espectro autista; G2 = Pais de indivíduos com deficiência intelectual; G3 = Pais de indivíduos sem alteração.

Os resultados pelo teste qui-quadrado indicaram uma diferença significativa entre a ausência e a presença de BAP nos grupos avaliados ($p= 0,04$). Em decorrência disso, foi realizado o teste exato de Fisher na comparação entre os grupos. Foi evidenciada uma diferença estatística somente entre os grupos G1 e G3 ($p=0,016$), enquanto que a comparação entre os grupos G1 e G2 ($p= 0,107$) e entre G2 e G3 ($p=0,230$) não evidenciaram diferença estatística.

Tabela 2: Frequência de indivíduos com BAP (BAP+) e sem BAP (BAP-) nos grupos estudados.

Grupos	BAP+		BAP-		Total	
	N	%	N	%	N	%
G1	12	33,3	24	66,6	36	27,3
G2	9	19,6	37	80,4	46	34,8
G3	6	12	44	88	50	37,9
Total	27	20,45	105	79,55	132	100

G1 = pais de indivíduos com transtorno do espectro autista; G2 = pais de indivíduos com deficiência intelectual; G3 = pais de indivíduos sem alteração.

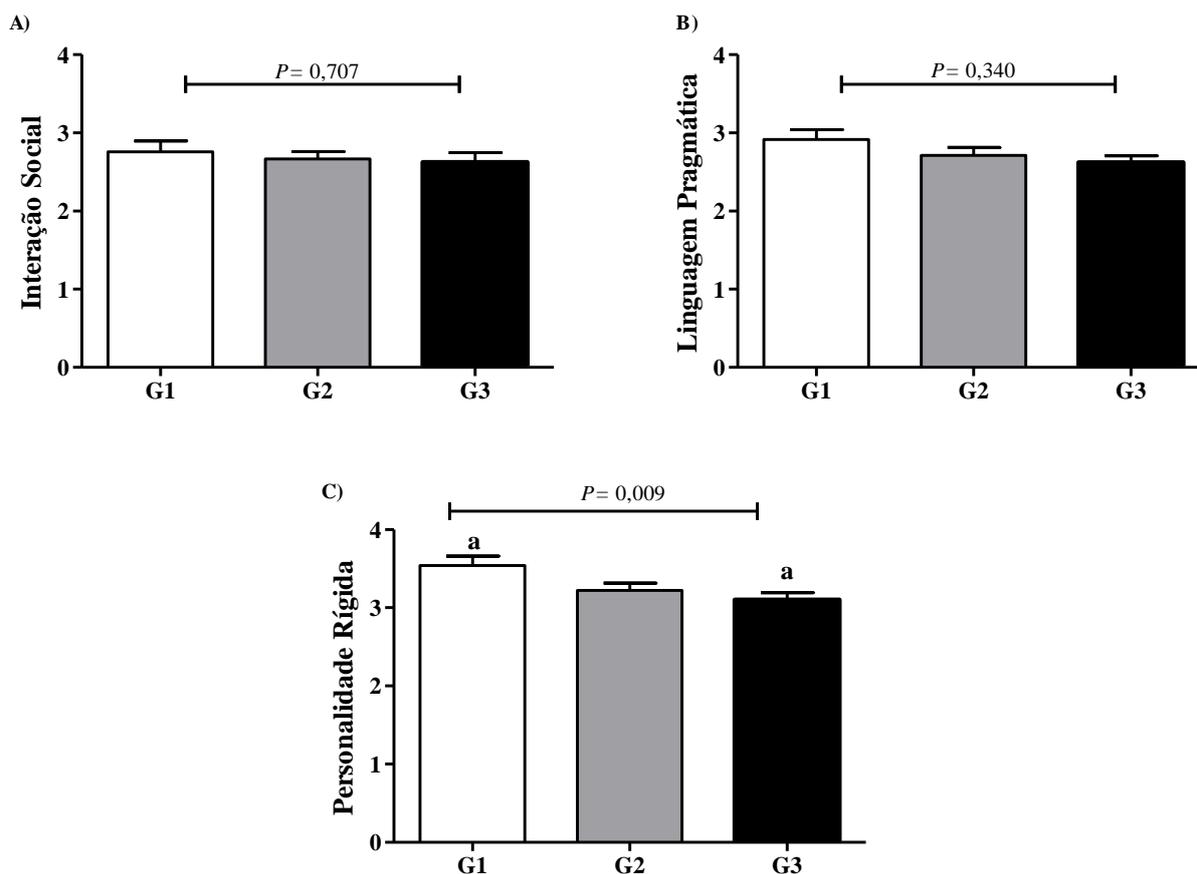
Comparação das médias das respostas do BAPQ

As médias das respostas das três subescalas do BAPQ dos indivíduos dos três grupos amostrais, estão apresentadas na Tabela 3. As médias dos escores obtidos em cada uma das três subescalas do BAPQ de cada grupo foram comparadas pelo teste GLM. De acordo com os resultados encontrados, a personalidade rígida foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,014$). O teste *post-hoc de Tukey* evidenciou a diferença significativa entre os grupos G1 e G3 ($p=0,009$), sendo o G1 mais frequente. As demais comparações não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 2).

Tabela 3. Médias das respostas do BAPQ por grupo, por característica.

<i>Pais</i>	Interação social (M)	Linguagem Pragmática (M)	Personalidade rígida (M)
G1 (n=36)	2,79	2,91	3,55
G2 (n=20)	2,66	2,71	3,22
G3 (n=25)	2,6	2,62	3,1

M = média; G1 = pais de indivíduos com transtorno do espectro autista; G2 = pais de indivíduos com deficiência intelectual; G3 = pais de indivíduos sem alteração.

Figura 2. Comparação entre as médias obtidas das três subescalas do BAPQ nos grupos de estudo.

Teste realizado: *General Linear Models* (GLM) seguido de *post hoc de Tukey*.

Discussão

Desde a primeira descrição do autismo há referências sobre características autísticas nos genitores (Kanner 1943; Rubenstein et. al., 2018). Para verificar a presença das características de personalidade e linguagem que refletem esta expressão fenotípica ampla em pais, Hurley e colaboradores (2007) desenvolveram o *Broad Autism Phenotype Questionnaire*, que vem sendo amplamente utilizado em diferentes populações. Entretanto, a maior parte dos estudos investigou pais de autistas (Sharma e Bhusha 2018), algumas vezes comparados a pais de indivíduos sem queixas de alterações neurocomportamentais (Shi et al., 2015). Não foram encontrados estudos que envolvem pais de indivíduos com TEA, DI e sem queixas. Inclusive, até onde pode ser averiguado, no Brasil há apenas uma descrição de estudo que utilizou o BAPQ, e apenas em 20 genitores de autistas (Endres et al., 2015).

Dificuldades de interação social, linguagem pragmática e personalidade rígida são características avaliadas no BAPQ que ocorrem na população em geral (Rubenstein et al., 2018), obviamente também na Brasileira. Nossos resultados confirmam esta afirmação, até pelo fato de que pais dos três grupos avaliados apresentaram as características investigadas, muitos com BAP.

Dos pais de autistas, 47,2% apresentaram pelo menos uma das características, cuja literatura refere frequência entre 20 e 50% (Sasson et al., 2013). Também, BAP foi observado em 33,3% destes pais, uma frequência semelhante à de 35% encontrada em uma casuística Inglesa que foi avaliada pelo BAPQ (Gregory et al., 2016).

A DI, por sua vez, também é um transtorno neuropsiquiátrico, com sobreposição de aspectos fenotípicos, etiológicos, inclusive genéticos, com TEA. Por exemplo, indivíduos com DI podem apresentar déficits em algumas funções, como comunicação e participação social, que são avaliadas pelo BAPQ. Também, é relatada uma frequência aumentada de genitores com dificuldades cognitivas entre os de filhos com DI (Osborn et al., 2019). Diante destas considerações e do fato das características autísticas também estarem presentes na população em geral, os resultados dos pais de indivíduos com DI aqui estudados eram esperados. Entre eles, 32,6% apresentaram pelo menos uma das características comportamentais estudadas pelo BAPQ e 19,56% apresentaram BAP, números menores, porém não significativamente diferentes dos observados no grupo G1. Entretanto, não foram encontrados outros trabalhos de investigação de BAPQ em pais de indivíduos com DI, o que impede a comparação com dados de outras populações.

Dos pais brasileiros de indivíduos saudáveis que compuseram o grupo aqui estudado 24% apresentaram pelo menos uma característica entre as três avaliadas pelo BAP, também semelhante à frequência de 20% relatada para pais americanos de indivíduos sem queixas de comportamento (Sasson *et al.*, 2013).

A comparação entre os grupos quanto à presença do BAP revelou diferença significativa apenas entre pais de autistas e pais de indivíduos sem queixas, evidenciando que os pais de autistas brasileiros também apresentam mais características da doença quando comparados com pais de indivíduos sem queixas, conforme esperado (Shi *et al.*, 2015). Embora não significativa, pode ser sugerido que a frequência de BAP em pais de indivíduos com DI é elevada.

BAP presente, detectado pelo questionário aqui utilizado não significa presença ou ausência de TEA no genitor investigado, porque, conforme já referido, não é um instrumento de diagnóstico de autismo (Piven e Sasson 2014). Assim, os resultados aqui obtidos não podem ser extrapolados para presença ou ausência da doença entre genitores de autistas brasileiros.

Para a classificação diagnóstica de BAP é preciso obter resultados alterados em duas ou três das subescalas do BAPQ, sendo que três reflete um fenótipo mais acentuado. Este não diferiu significativamente entre os grupos, mas este resultado pode ter sido influenciado pelo pequeno número de indivíduos avaliados em cada grupo. É importante ressaltar que a maioria das casuísticas já descritas onde foi aplicado BAPQ em genitores de autistas é composta de 20 a 100 indivíduos (Endres *et al.*, 2015; Sharman e Bhusha 2018). Uma exceção é a casuística descrita por Sasson e colaboradores (2013), composta por 2.000 indivíduos. Por outro lado, os critérios de inclusão aqui adotados não foram citados nos demais estudos.

O escore médio para personalidade rígida dos pais de indivíduos com autismo também foi estatisticamente superior (3,54) quando comparado com o dos pais de indivíduos normais (3,10). Entre os genitores de autistas brasileiros estudados por Endreas e colaboradores (2015) o escore médio foi de 3,5, o que demonstra pouco interesse em mudanças ou dificuldades de adequação às mesmas. Mesmo considerando-se implicações culturais que se aplicam ao BAP, a população brasileira estudada mostra semelhança com a população americana de pais de autistas estudados por Sasson e colaboradores (2013), onde o escore médio obtido foi de 3,11.

É importante estudar a presença do BAP em parentes de indivíduos com TEA, uma porção significativa da etiologia do autismo pode ser atribuída a fatores hereditários

e genéticos. Avaliações clínicas podem ser melhores na avaliação de características do BAP, no entanto, as mesmas em grandes estudos pode consumir muito tempo e recursos, para estes casos, uma triagem através de instrumentos como o BAPQ são recomendadas (Rubersteein *et al.*, 2018).

Conclusão

O *Broad Autism Phenotype* é mais frequente em pais de indivíduos com autismo do que em pais de indivíduos sem alterações neuropsiquiátricas da população brasileira estudada. A presença de personalidade rígida também é mais frequente quando comparados estes dois grupos. Características autísticas também são observadas em genitores de indivíduos com deficiência intelectual. É importante avaliar a presença de BAP em pais de autistas e de outros indivíduos com afecções do neurodesenvolvimento, como a deficiência intelectual. Os resultados podem direcionar a orientação de riscos e o Aconselhamento Genético das famílias.

Lista de abreviaturas:

ADI-R: Autism Diagnostic Interview-Revised

BAP: Broad Autism Phenotype;

BAP ⁺: Presença de BAP

BAP ⁻: Ausência de BAP

BAPQ: Broad Autism Phenotype Questionnaire

CARS: Childhood-Autism Rating Scale;

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos

DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition;

DI: Deficiência Intelectual;

FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;

G1: Pais de indivíduos com transtorno do espectro autista;

G2: Pais de indivíduos com deficiência intelectual

G3: Pais de indivíduos saudáveis, sem queixas de alterações de comportamento em até três gerações;

GLM: General Linear Models;

OMS: Organização Mundial de Saúde;

TEA: Transtorno do espectro autista.

Referências

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Washington, DC: APA.

Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), Rutter M., Le Couteur A., & Lord C. *Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition (ADOS-2) Manual (Part I): Modules 1–4*. Torrance, CA: Western Psychological Services; 2012.

Ayhan, F., & Konopka, G. (2019) Regulatory genes and pathways disrupted in autism spectrum disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. [Epub ahead of print]

Baio, J., Lisa W., Deborah L. C., Matthew J. M., Julie D., & Zachary W. (2018) Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summary*. 67. 1-23.

Brito, A., Russo, F. B., Muotri, A. R., & Beltrão-Braga, P. C. (2018) Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells. *Cell Tissue Res*. 371. 163-160.

Childhood-Autism Rating Scale (CARS), Schopler, E., Reichler, R. J., & Renner, B. R. *The childhood autism rating scale (CARS): For diagnostic screening and classification of autism*. New York: Irvington. (1986).

Docherty, A., Arden, A. M., & Ayman H. F. (2016) Cross-Disorder Psychiatric Genomics. *Current Behavioral Neuroscience Reports*. 3, 256–263.

Endres, R. G., Lampert, S. S., Schuch, J. B., Roman, T., & Bosa, C. A. (2015) The Broader Autism Phenotype in parents of children with Autism Spectrum Disorder – ASD. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*. 31. 295-292.

Fein, D., & Helt, M. (2017) Facilitating Autism Research. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 23. 903-915.

Fusar-Poli, L., Brondino, N., Orsi, P., Provenzani, U., Micheli, A., Nemi, S. U. et al. (2017) Long-term outcome of a cohort of adults with autism and intellectual disability: A pilot prospective study. *Research in Developmental Disabilities*. 60. 223-231.

Gregory, L. W., Budgett, J., & Charlton, R. A. (2016) Aging and Autism Spectrum Disorder: Evidence From the Broad Autism Phenotype. *Autism Research*. 12. 1294-1303.

Hirokawaa, K., Kimura, T., Ikehara, S., Honjob, K., Sato, T., Ueda, K., et al. (2019) Associations between broader autism phenotype (BAP) and maternal attachment are moderated by maternal postpartum depression when infants are one month old: A prospective study of the Japan environment & children's study. *Journal of Affective Disorders*. 243. 485-493.

Hurley, R. S., Losh, M., Parlier, M., Reznick, J. S., & Piven, J. (2007). The Broad Autism Phenotype Questionnaire. *The journal of autism and developmental disorders*. 9, 1679-90.

Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective content. *Nervous Child*, 2, 217–250.

Lombardo, V. M., Lai, M. C., & Baron-Cohen, S. (2019) Big data approaches to decomposing heterogeneity across the autism spectrum. *Molecular Psychiatry*. [Epub ahead of print]

Osborn, R., Lynette, R., & Kneebone, I. (2019) Barriers to accessing mental health treatment for parents of children with intellectual disabilities: a preliminary study. 29. 1-7.

Piven, J., Sasson, N. J. (2014) On the Misapplication of the Broad Autism Phenotype Questionnaire in a Study of Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 44. 2077-2078.

Quinn GP, K.M. (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. New York: Cambridge University Press.

Rubenstein, E., Wiggins, L., Schieve, L. A., Bradley, C., DiGiuseppi, C., & Moody, E. (2018). Associations between parental broader autism phenotype and child autism spectrum disorder phenotype in the Study to Explore Early Development. *Autism*. [Epub ahead of print]

Sasson, N. J., Lam, K. S., Childress, D., Parlier, M., Daniels, J. L., & Piven, J. (2013) The Broad Autism Phenotype Questionnaire: prevalence and diagnostic classification. *Autism Research*. 134-143.

Sharma, U., & Bursha, B. (2018) The hindi adaptation and standardization of BAPQ: A brief tool for assessing Broad Autism Phenotype. *Asian Journal of Psychiatry*. 38. 16-19.

Shi, L. J., Ou, J., Gong, J., Wang, S., Zhou, Y., Zhu, F., et al. (2015) Broad autism phenotype features of Chinese parents with autistic children and their associations with severity of social impairment in probands. *BMC Psychiatry*. 15.

WHO - World Health Organization (2018). Process of translation and adaptation of instruments. Retrieved August 09, 2018, from http://www.who.int/substance_abuse/research_tools/translation/en/

Woodbury-Smith, M., & Schereret, S. W. (2018). Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 60, 445-451.

Zhang, X. C., Shu, L. Q., Zhao, X. Z., & Li, X. K. (2019) Autism spectrum disorders: autistic phenotypes and complicated mechanisms. *World Journal of Pediatrics*. [Epub ahead of print]

5.CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1. Alterações genômicas previamente encontradas em indivíduos com TEA podem ser observadas em seus pais e em outros familiares, independente da presença e do tipo de alterações neuropsiquiátricas que estes indivíduos possam apresentar.
2. Algumas alterações genômicas parecem predispor ao autismo e a outras afecções psiquiátricas dentro da mesma família.
3. A presença do *Broad Autism Phenotype* (BAP) em genealogias de autistas parece depender de vários fatores etiológicos, não só de variações genômicas isoladas.
4. *Broad Autism Phenotype* (BAP) é mais frequente em pais de indivíduos com autismo do que em pais de indivíduos sem alterações neuropsiquiátricas da população brasileira estudada.
5. A presença de personalidade rígida é mais frequente em genitores de autistas do que em genitores de indivíduos sem alterações neuropsiquiátricas.
6. Características autísticas também são observadas em genitores de indivíduos com deficiência intelectual.
7. É importante avaliar a presença de BAP em pais de autistas e de outros indivíduos com afecções do neurodesenvolvimento, como a deficiência intelectual, pois os resultados podem direcionar a orientação de riscos e o Aconselhamento Genético das famílias.

6 REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Washington, DC: APA.

Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), Rutter M., Le Couteur A., & Lord C. *Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition (ADOS-2) Manual (Part I): Modules 1–4*. Torrance, CA: Western Psychological Services; 2012.

Ayhan, F., & Konopka, G. (2019) Regulatory genes and pathways disrupted in autism spectrum disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. [Epub ahead of print].

Baio, J., Lisa W., Deborah L. C., Matthew J. M., Julie D., & Zachary W. (2018) Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summary*. 67. 1-23.

Balaan, C., Corley, M. J., Eulalio, T., Leite-ahyo, K., Pang, A. P. S., Fang, R., et al. (2019) *Behavioural Brain Research*. [Epub ahead of print].

Brito, A., Russo, F. B., Muotri, A. R., & Beltrão-Braga, P. C. (2018) Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells. *Cell Tissue Res*. 371. 163-160.

Childhood-Autism Rating Scale (CARS), Schopler, E., Reichler, R. J., & Renner, B. R. *The childhood autism rating scale (CARS): For diagnostic screening and classification of autism*. New York: Irvington. (1986).

Docherty, A., Arden, A. M., & Ayman H. F. (2016) Cross-Disorder Psychiatric Genomics. *Current Behavioral Neuroscience Reports*. 3, 256–263.

Eissa N., Al-Houqani, M., Sadeq, A., Ojha, S., Sasse, A., & Sadek, B. (2018). Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Neuroscience*. eCollection..

Fein, D., & Helt, M. (2017) Facilitating Autism Research. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 23. 903-915.

Fusar-Poli, L., Brondino, N., Orsi, P., Provenzani, U., Micheli, A., Nemi, S. U. et al. (2017) Long-term outcome of a cohort of adults with autism and intellectual disability: A pilot prospective study. *Research in Developmental Disabilities*. 60. 223-231.

Gilbert, J., & Man, H. (2017). Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. eCollection 2017.

Hirokawaa, K., Kimura, T., Ikehara, S., Honjob, K., Sato, T., Ueda, K., et al. (2019) Associations between broader autism phenotype (BAP) and maternal attachment

are moderated by maternal postpartum depression when infants are one month old: A prospective study of the Japan environment & children's study. *Journal of Affective Disorders*. 243. 485-493.

Hurley, R. S., Losh, M., Parlier, M., Reznick, J. S., & Piven, J. (2007). The Broad Autism Phenotype Questionnaire. *The journal of autism and developmental disorders*. 9, 1679-90.

Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective content. *Nervous Child*, 2, 217–250.

Lombardo, V. M., Lai, M. C., & Baron-Cohen, S. (2019) Big data approaches to decomposing heterogeneity across the autism spectrum. *Molecular Psychiatry*. [Epub ahead of print].

Mulas, F., & Rojas, M. (2018). Intellectual developmental disability overlapping with autism spectrum disorder and attention deficit-hyperactivity disorder. *Medicina (B Aires)*. 78. 263-268.

Pisula, E., & Ziegart-Sadowska. (2015). Broader Autism Phenotype in Siblings of Children with ASD—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 13217–13258.

Quinn GP, K.M. (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. New York: Cambridge University Press.

Rubenstein, E., Wiggins, L., Schieve, L. A., Bradley, C., DiGuseppi, C., & Moody, E. (2018). Associations between parental broader autism phenotype and child autism spectrum disorder phenotype in the Study to Explore Early Development. *Autism*. [Epub ahead of print].

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239. 487-491.

Sasson, N. J., Lam, K. S., Childress, D., Parlier, M., Daniels, J. L., & Piven, J. (2013) The Broad Autism Phenotype Questionnaire: prevalence and diagnostic classification. *Autism Research*. 134-143.

SFARI. Disponível em: <<https://www.gene.sfari.org/database/ring-browser>> Acesso em 20 de janeiro de 2019.

Shi, L. J., Ou, J., Gong, J., Wang, S., Zhou, Y., Zhu, F., et al. (2015) Broad autism phenotype features of Chinese parents with autistic children and their associations with severity of social impairment in probands. *BMC Psychiatry*. 15.

WHO - World Health Organization (2018). Process of translation and adaptation of instruments. Retrieved August 09, 2018, from http://www.who.int/substance_abuse/research_tools/translation/en/.

Woodbury-Smith, M., & Schereret, S. W. (2018). Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 60, 445-451.

Zhang, X. C., Shu, L. Q., Zhao, X. Z., & Li, X. K. (2019) Autism spectrum disorders: autistic phenotypes and complicated mechanisms. *World Journal of Pediatrics*. [Epub ahead of print].

7.1 Anexo A: BAPQ

Nome:

Data:

Você está prestes a preencher uma série de declarações relacionadas à sua personalidade e estilo de vida. Para cada declaração, circule a resposta que melhor descreve a frequência que a mesma se aplica a você. Muitas destas questões são sobre as suas interações com outras pessoas. Por favor, pense na maneira como você interage com a maioria das pessoas, ao invés de interações com familiares, como filhos, irmãos e pais. Todas as pessoas mudam ao longo do tempo, o que pode tornar difícil para preencher algumas declarações sobre sua personalidade. Pense sobre como você tem sido durante a maioria da sua vida adulta, em vez da maneira como você era na adolescência. Você deve responder todas as declarações com apenas uma resposta. Se você está confuso, por favor, marque a que você acredita ser a melhor resposta.

RESPOSTAS:

1— Muito raramente
4— Frequentemente

2— Raramente
5— Muito Frequente

3— Ocasionalmente
6— Quase Sempre

Declarações:

Respostas:

- | | |
|---|-------------|
| 1. Eu gosto de estar perto de outras pessoas | 1 2 3 4 5 6 |
| 2. Acho difícil falar de um jeito que me entendam | 1 2 3 4 5 6 |
| 3. Eu me sinto confortável com mudanças inesperadas de planos | 1 2 3 4 5 6 |
| 4. É difícil evitar mudança de assunto em uma conversa | 1 2 3 4 5 6 |
| 5. Eu prefiro falar com as pessoas para obter informações do que para me socializar | 1 2 3 4 5 6 |
| 6. As pessoas têm de me convencer a tentar algo novo | 1 2 3 4 5 6 |
| 7. Eu estou ‘em sintonia’ com a outra pessoa durante uma conversa *** | 1 2 3 4 5 6 |
| 8. Eu tenho que me preparar para a ideia de visitar um lugar desconhecido | 1 2 3 4 5 6 |
| 9. Gosto de estar em situações sociais | 1 2 3 4 5 6 |
| 10. Minha voz tem um som monótono e sem variações | 1 2 3 4 5 6 |
| 11. Eu me sinto desconectado ou “fora de sincronia” nas conversas com outros *** | 1 2 3 4 5 6 |

12. As pessoas acham fácil se aproximar de mim *** 1 2 3 4 5 6
13. Eu sinto uma forte necessidade de rotina no meu dia-dia 1 2 3 4 5 6
14. As pessoas pedem para eu repetir o que eu disse, porque eles não me entendem 1 2 3 4 5 6
15. Sou flexível sobre como as coisas devem ser feitas 1 2 3 4 5 6
16. Fico ansioso em situações onde eu posso conhecer pessoas novas 1 2 3 4 5 6
17. Foi-me dito que eu falo demais sobre certos assuntos 1 2 3 4 5 6
18. Quando eu converso é apenas para ser educado *** 1 2 3 4 5 6
19. Fico ansioso para tentar coisas novas 1 2 3 4 5 6
20. Eu falo muito alto ou muito baixo 1 2 3 4 5 6
21. Sei quando alguém não está interessado no que eu estou dizendo *** 1 2 3 4 5 6
22. Eu tenho dificuldade em lidar com as mudanças na minha rotina 1 2 3 4 5 6
23. Eu sou bom em estabelecer uma conversa fiada *** 1 2 3 4 5 6
24. Sou muito inflexível no meu jeito (focado) 1 2 3 4 5 6
25. Eu sinto que realmente me conecto com outras pessoas 1 2 3 4 5 6
26. As pessoas ficam frustradas por minha falta de vontade de ser flexível 1 2 3 4 5 6
27. Conversar me aborrece *** 1 2 3 4 5 6
28. Eu sou caloroso e amigável nas minhas interações com os outros *** 1 2 3 4 5 6
29. Faço pausas longas em minhas conversas 1 2 3 4 5 6
30. Eu altero a minha rotina diária para tentar algo diferente 1 2 3 4 5 6
31. Eu prefiro estar sozinho do que com os outros 1 2 3 4 5 6
32. Eu perco a noção do meu ponto original (foco) quando falo com as pessoas 1 2 3 4 5 6
33. Eu gosto de seguir uma rotina fixa quando trabalho 1 2 3 4 5 6
34. Sei quando é hora de mudar de assunto numa conversa *** 1 2 3 4 5 6
35. Eu continuo fazendo as coisas do meu jeito, mesmo que de outra forma fique melhor 1 2 3 4 5 6

36. Gosto de conversar (bater papo) com as pessoas ***

1 2 3 4 5 6

*** Em interações ocasionais com conhecidos, não em relacionamentos especiais, como com amigos próximos e membros da família.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica da presente Tese, em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 12/03/2019

Assinatura do autor