ANITA JOVELINA BRITO DE JESUS

**Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro
do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente**

São Paulo

2020

ANITA JOVELINA BRITO DE JESUS

**Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro
do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão
Braga

São Paulo

2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Ficha catalográfica

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3927
FMVZ

Jesus, Anita Jovelina Brito de
Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro do Autismo em
participantes do Projeto a Fada do Dente / Anita Jovelina Brito de Jesus. – 2020.
150 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. TEA. 2. Autismo. 3. Risco genético. 4. Risco ambiental. 5. Projeto a Fada do Dente. I.
Título.

Parecer da Comissão de Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 18 de abril de 2019
CEUAX N [4452260219](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Equipe envolvida: Anita Jovelina Brito De Jesus - [executor](#) (usp); Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga (orientador)

Título do projeto: "Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 17/04/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente

Pesquisador: Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 61093416.0.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.945.213

Apresentação do Projeto:

Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar componentes de risco para o TEA, considerando a influência dos fatores genéticos e ambientais, através de um questionário online. Além disso, avaliar se o questionário pode ser uma forma funcional e prática para a coleta de dados, e se pode se transformar numa ferramenta para levantar dados para estudos do TEA na população brasileira.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As informações serão coletadas das fichas de anamnese de cada criança, as quais já foram entregues pelos pais de cada indivíduo que participa do Projeto a Fada do Dente, e pelas pessoas que responderem ao questionário online. Não haverá coleta de material biológico para esta pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse projeto já foi apreciado e aprovado pelo CEP/SH/ICB.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Esse projeto já foi apreciado e aprovado pelo CEP/SH/ICB.

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: JESUS, Anita Jovelina Brito de

Título: Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 10 / 03 / 2020

Banca Examinadora

Prof. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Instituição: Universidade de São Paulo - USP Julgamento: _____

Prof. Dr. Paulo Breno Noronha Liberalesso

Instituição: Hospital Pequeno Príncipe Julgamento: _____

Prof. Dr. Rodrigo Arantes Reis

Instituição: Universidade Federal do Paraná Julgamento: _____

Prof. Dra. Angela Aguirres Fachel

Instituição: Weill Cornell Medicine – NY, USA Julgamento: _____

Prof. Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira Durigon

Instituição: Universidade de São Paulo - USP Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu filho, Nicolas Brito Sales, que tem sido a força que necessito para trilhar os caminhos do autismo.

AGRADECIMENTOS

A todos da FMVZ (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) de São Paulo pela oportunidade de realização deste curso de pós-graduação.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

Ao Dr. Alysson Muotri, por ter me apontado o caminho e acreditado no meu potencial.

À Dra. Fabiele Russo, à Cecília Benazzato, à Lissa Castanha e Ariane Freitas, que me ensinaram muito durante este processo. Seus ensinamentos de vida e escolar sempre serão lembrados com carinho.

Ao João Leonardo Mendonça e ao Raphael Cruz, que me receberam no laboratório com muito carinho e me ajudaram muito no início.

À Dra. Helena Brentani e seus orientandos, Mirian Revers e Felipe Franco, por terem me auxiliado tanto quando mais precisei.

Ao Professor Dr. Eduardo Massad por seus ensinamentos e disponibilidade em nos auxiliar.

À Dra. Graciela Pignatari, por ser uma das responsáveis e co-criadora do Projeto A Fada do Dente.

Ao meu marido e melhor amigo, Alexsander Sales, e aos meus filhos, Guilherme e Nicolas, que me apoiaram desde o início e me ajudaram muito durante o processo. Sem eles, teria sido muito mais difícil.

À minha mãe e meu pai, Irene e Arnaldo, que acreditam em mim e me apoiam sempre.

A todas as famílias que responderam à nossa anamnese *on-line*. Sem vocês, este trabalho não teria o mesmo valor.

E em especial à minha orientadora, Prof. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, que aceitou o desafio de me orientar e soube fazê-lo com maestria, muito carinho e dedicação. Você tem sido essencial em minha caminhada e jamais me esquecerei de seus ensinamentos.

A Deus, que me colocou desafios e que me deu entendimento para tentar ajudar ao meu filho e a outras famílias.

“Tudo só é 100% possível, se você tentar 100% .”
Anita Brito

RESUMO

BRITO, A. **Avaliação de componentes de risco para o Transtorno do Espectro do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente.** [Assessment of risk components for Autism Spectrum Disorder in participants of the Tooth Fairy Project]. 2020. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) são quadros complexos do neurodesenvolvimento, cujos sintomas incluem déficits na interação e comunicação social associados a comportamentos restritos e repetitivos. Sabe-se que as causas do TEA são multifatoriais, envolvendo genética e ambiente. Neste trabalho, nosso objetivo foi levantar dados sobre fatores de herança genética e ambientais em indivíduos brasileiros com TEA, a partir de uma anamnese *on-line* que captou dados de famílias de todo o território nacional. A ocorrência de fatores de herança genética foi testada com base no histórico familiar. Já para os fatores ambientais, foram consideradas exposição a fatores de risco durante a gestação. O grupo investigado contou com 2141 pessoas com TEA e 408 indivíduos para o grupo controle. Os respondentes foram captados em palestras dadas em todo o território nacional, e pelas redes sociais do “Projeto a Fada do Dente”. Nossas análises revelaram que é possível separar componentes de vulnerabilidade genética e exposição ambiental na população estudada, entretanto, não é possível separar grupos de pacientes que correspondam a um ou a outro componente, mas sim um *continuum* com diferentes composições dos componentes genéticos e ambientais. Além disso, alguns fatores ambientais considerados como de associação para o TEA, como parto cesárea, fumo e idade dos pais não se mostraram relevantes nesta população estudada.

Palavras chave: TEA. Autismo. Risco genético. Risco ambiental. Projeto a Fada do Dente.

ABSTRACT

BRITO, A. Assessment of risk components for Autism Spectrum Disorder in participants of the Tooth Fairy Project. [Avaliação de componentes de risco para Transtorno do Espectro do Autismo em participantes do Projeto a Fada do Dente]. 2020. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Autism spectrum disorders (ASD) are complex neurodevelopmental disorders that include deficits in interaction and social communication associated with restricted and repetitive behaviors. It is known that the causes of ASD are multifactorial, involving genetics and the environment. Our objective here was to collect data on genetic inheritance and environmental factors in Brazilian individuals with ASD, based on an online anamnesis designed to capture data from families across the country. The occurrence of genetic inheritance was tested based on family history. As for environmental factors, we have considered exposure to risk factors during pregnancy. There were 2141 people with ASD in the investigated group, and 408 individuals in the control group. Respondents were captured in lectures given throughout Brazil, and by the social networks of “Projeto a Fada do Dente”. Our analyzes revealed that it is possible to separate components of genetic vulnerability and environmental exposure in the population studied. However, it is not possible to separate groups of patients that correspond to only one or the other component, but rather a continuum with different compositions of the genetic and environmental components. In addition, some environmental factors considered to be associated with ASD, such as cesarean delivery, smoking during gestation and parents' age were not relevant in this population studied.

Keywords: ASD. Autism. Genetic risk. Environmental risk. Tooth Fairy Project.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dados sobre incidência do TEA	19
Figura 2 – Herdabilidade genética no TEA – modelo dos copos	29
Figura 3 – Diferentes manifestações clínicas em decorrência de uma mesma mutação genética – modelo dos copos	30
Figura 4 – Apresentação dos questionários usados para G-TEA, G-TEAL e G-C	39
Figura 5 – Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo – G-TEA	52
Figura 6 - Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo – G-TEAL	52
Figura 7 - Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo – G-C	53
Figura 8 - Gráfico de Barras de alguns dos transtornos psiquiátricos	60
Figura 9 - Cluster de análises feitas a partir de um agrupamento de perguntas sobre HTP e HTN	62
Figura 10 – Dimensões das variáveis relacionadas ao HF	63
Figura 11 – MCA das variáveis relacionadas ao HF	64
Figura 12 – Contribuições das variáveis de transtornos psiquiátricos para Dimensão 1	64
Figura 13 - Contribuições das variáveis de transtornos psiquiátricos e neurológicos para a Dimensão 2	65
Figura 14 – MCA das dimensões de HTP, HTN e HF dos respondentes deste estudo	66
Figura 15 – Análise dos sintomas que denotam Depressão mencionados pelos respondentes deste estudo	67
Figura 16 – Análise dos sintomas de estresse durante a gestação mencionados pelos respondentes deste estudo	69
Figura 17 – Análise dos tipos de agressão sofrida durante a gestação referidas pelos respondentes deste estudo	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Questões correspondentes aos transtornos e doenças psiquiátricas e neurológicas presentes em nosso grupo	44
Tabela 2 - Parâmetros avaliados e número das questões correspondentes	48
Tabela 3 - Dados sobre o sexo dos respondentes deste estudo	53
Tabela 4 - Ano de nascimento dos respondentes deste estudo	55
Tabela 5 - Dados sobre o grau de autismo dos respondentes deste estudo	56
Tabela 6 - Dados sobre o tipo de parto referidos pelos respondentes deste estudo	56
Tabela 7 - Dados sobre o consumo de cigarro durante a gestação referidos pelos respondentes deste estudo	57
Tabela 8 - Problemas gastrointestinais referidos pelos respondentes deste estudo	58
Tabela 9 - Problemas com alimentação referidos pelos respondentes deste estudo	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Escalas usadas para auxiliar no diagnóstico e rastreio de TEA	22
Quadro 2 -	Síndromes metabólicas no TEA e Autismos Sindrômicos	25
Quadro 3 -	Perguntas excluídas para o G-C	37
Quadro 4 -	Dados do questionário	40
Quadro 5 -	E-mail enviado para validação do questionário	42
Quadro 6 -	Perguntas excluídas das análises	50

LISTA DE ABREVIATURAS

APA	do inglês <i>American Psychiatric Association</i>
ASD	do inglês <i>Autism Spectrum Disorder</i>
CDC	Centro de Controle de Doenças, do inglês <i>Centers for Disease Control</i>
CGH	do inglês, <i>comparative genomic hybridization</i>
CID	Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
CMV	Citomegalovírus
CNV	do inglês, <i>Copy Number Variation</i>
DI	Deficiência Intelectual
DISOE	Deficiência Intelectual Sem Outra Especificação
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (do inglês, <i>Diagnostic and Statistical Manual</i>)
FA	Fatores Ambientais
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
FR	Fator(es) de Risco
G-C	Grupo Controle
G-TEA	Grupo TEA
G-TEAL	Grupo TEA Laudados
GWAS	do inglês, <i>Genome-Wide Association Study</i>
HF	Histórico Familiar
HTN	Histórico de Transtornos Neurológicos
HTP	Histórico de Transtornos Psiquiátricos
MCA	Análise de Correspondência Múltipla, do inglês <i>Multiple Correspondence Analyses</i>

NGS	do inglês, <i>Next Generation Sequence</i>
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PROTEA	Programa do Transtorno do Espectro Autista
SA	Síndrome de Asperger
SFARI Gene	do inglês, <i>Simons Foundation Autism Research Initiative Gene Database</i>
SNV	do inglês, <i>Single Nucleotide Variant</i>
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro do Autismo
TG	Transtornos Gastrointestinais
TID-SOE	Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação
TM	Transtornos Motores
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
TORCH	Acrônimo para Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes Simples
TS	Transtorno do Sono

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. Transtorno do Espectro do Autismo	21
2.2. Fatores genéticos relacionados ao TEA	27
2.3. Fatores ambientais relacionados ao TEA	31
2.4. Uso de questionários em pesquisas para o TEA	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Grupo de estudo e recrutamento	36
4.2. Confeção do questionário com foco em fatores genéticos e ambientais	37
4.3. Modo de aplicação do questionário	41
4.4. Critério de exclusão de respondentes e de perguntas	42
4.5. Forma de apresentação e análises estatísticas	43
4.5.1. Histórico Familiar	43
4.5.2. Fatores de Risco	45
4.5.3. Estresse emocional	47
4.5.4. Análises de agrupamentos	48
4.5.5. Análise de MCA	49
4.5.6. Perguntas excluídas da análise	49
5. RESULTADOS	51
5.1. Participantes	51
5.1.1. Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo	52
5.1.2. Sexo dos respondentes deste estudo	53
5.1.3. Idade dos respondentes deste estudo	54
5.1.4. Grau de autismo dos respondentes deste estudo	55
5.1.5. Tipos de parto dos respondentes deste estudo	56
5.1.6. Consumo de cigarros durante a gestação dos respondentes deste estudo	57
5.1.7. Problemas gastrointestinais e distúrbios alimentares	

referidos pelos respondentes deste estudo	58
5.2. Análise de Histórico Familiar e Exposição Ambiental dos respondentes deste estudo	59
5.2.1. Resultados para HF	59
5.2.1.1. Resultado da Análise de agrupamentos de perguntas	62
5.2.1.2. Resultado MCA	63
5.2.2. Resultados para exposição ambiental	66
5.2.2.1. Resultados para exposição a diferentes fatores associados a estresse emocional	66
5.2.2.1.A. Resultados de análises de agrupamentos de perguntas relacionadas à Depressão, Exposição a estressores e Agressão	71
5.2.2.1.B. MCA de perguntas relacionadas à Depressão, Estressores e Agressão	73
5.2.2.2. Resultados para exposição a fatores socioeconômicos e exposição ambiental a químicos e biológicos durante a gestação	75
5.2.2.2.A Gráficos de frequência	75
5.2.2.2.B Agrupamento	76
5.2.2.2.C MCA de problemas gestacionais e fatores socioeconômicos	77
5.2.3. Análise de cluster dos fatores ambientais usando dados ordinais originais das variáveis excluindo exposição a fatores estressores específicos	78
5.2.4. Análise de fatores genéticos e ambientais	80
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	98
ANEXOS	131

1. INTRODUÇÃO

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) são transtornos complexos do neurodesenvolvimento, com manifestações clínicas desde a primeira infância (CLARKE, 2016; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017) nas áreas de sociabilização e comunicação, e apresentação de comportamentos restritos e repetitivos (DE LA TORRE-UBIETA et al., 2016; BAIO et al., 2018). O diagnóstico é clínico, dependente de um profissional experiente, e é baseado nos sinais e sintomas que o indivíduo com TEA apresenta (VORSTMAN, 2017). Além disso, indivíduos com TEA podem apresentar muitas comorbidades, como Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH), Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Esquizofrenia, Epilepsia, Transtornos Motores (TM) (ex: hipotonia, apraxia ou atraso motor), Transtorno do Sono (TS), Problemas Gastrointestinais e Deficiência Intelectual (DI) (BAUMAN, 2010; DE LA TORRE-UBIETA et al., 2016; MUSKENS et al., 2017), o que aumenta a variabilidade fenotípica da apresentação.

Atualmente, 1:59 crianças em idade escolar são diagnosticadas com TEA nos Estados Unidos, de acordo com o último levantamento realizado pelo Centro de Controle de Doenças (CDC), sendo considerado um transtorno do neurodesenvolvimento com alta prevalência (BAIO et al., 2018). Além disso, se observarmos os levantamentos realizados nos últimos cerca de 30 anos, expostos na Figura 1, é possível notar uma curva referindo um aumento exponencial da prevalência dos casos de TEA (CDC, 2014), o que provavelmente está associado a uma maior capacidade diagnóstica ou a um melhor entendimento da população sobre o transtorno, mas sem descartar a influência de fatores causais genéticos e ambientais que possam estar atuando para este aumento (FOMBONNE; QUIRKE; HAGEN, 2009; CAWTHORPE, 2017).

Figura 1. Dados sobre a incidência do TEA

Prevalência e Incidência do TEA

- Prevalência mundial: 1-2% da população mundial
- Suposta prevalência no Brasil: 2-4 milhões de brasileiros

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: A figura 1 mostra a prevalência do TEA desde o ano de 1975 até o ano de 2018, ano em que foi realizado o último levantamento pelo CDC. Considerando estes dados, podemos observar que houve um aumento de cerca de 8.475% dos casos de TEA. Os estudos não são capazes de dizer o motivo do aumento, mas se conjectura que seja devido a uma melhor capacidade de diagnóstico do TEA ou, ainda, um real aumento de casos devido a interações de genética e ambiente. No Brasil, como ainda não temos dados epidemiológicos sobre o TEA, estima-se que haja entre 2 a 4 milhões de brasileiros no TEA.

Em relação à etiopatogenia, estudos recentes afirmam que o TEA é um transtorno multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais que atuam em diferentes combinações (VORSTMAN, 2017). Estudos com grandes coortes reforçam a origem predominantemente genética do TEA (DE RUBEIS et al., 2014; BAI et al., 2019), mas não descartam que fatores ambientais, aos quais mãe e feto podem ser expostos durante a gestação, possam interferir no risco para o TEA. Até o momento, se entende que os fatores ambientais seriam responsáveis por mudanças epigenéticas capazes de causar prejuízos no neurodesenvolvimento ainda durante a gestação, ou bem cedo após o nascimento (SEALEY et al., 2016; MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017).

Influências ambientais têm sido bem estudadas no TEA, mas os achados ainda carecem de estudos mais robustos. Alguns estudos apontam que as vitaminas pré-natais, como o ácido fólico por exemplo, se consumidas pela mãe bem próximo do período da concepção e durante os primeiros meses de gestação, podem ajudar a proteger o feto, diminuindo o risco de se desenvolver TEA (SURÉN et al., 2013; NG et al., 2017; LEVINE et al., 2018; SCHIMDT et al., 2019). No entanto, o consumo de ácido valpróico e de outros medicamentos durante a gestação podem aumentar o

risco para o TEA (KIM, K.C. et al., 2011; NG, et al., 2017; WONG; HOEFFER, 2018).

Já os estudos sobre a contribuição da genética para o TEA são mais robustos e já apontam mais de mil genes envolvidos na etiopatogenia do TEA (CLARKE et al., 2016; NG et al., 2017; *Simons Foundation Autism Research Initiative Gene Database* - SFARI Gene, 2019). Além disso, os estudos na área de genética também mostram que outros casos de TEA, ou outras condições neurológicas e/ou psiquiátricas numa mesma família, aumentam o risco para o TEA (IOSSIFOV et al., 2014; SANDIN et al., 2014; GESCHWIND; STATE, 2015; BAI et al., 2019).

Em nosso laboratório, para que pudéssemos investigar as causas e mecanismos envolvidos no TEA, criamos, em 2009, o “Projeto a Fada do Dente”. Com a criação do Projeto, pudemos coletar dentes-de-leite de crianças com TEA em conjunto com dados clínicos no intuito de investigarmos as possíveis causas do TEA e verificar se existe associação entre os achados biológicos, o Histórico Familiar (HF) e os sinais clínicos/comportamentais. Uma vez identificados, esses achados poderão se tornar alvos terapêuticos, os quais podem atenuar, ou até mesmo reverter, as alterações identificadas, buscando melhorar a qualidade de vida dos indivíduos e, consequentemente, de suas famílias.

Neste trabalho, nós desenvolvemos um questionário que foi aplicado de forma virtual, para avaliar fatores genéticos e ambientais que possam estar relacionados ao TEA na população brasileira. O questionário foi construído especialmente para este projeto de acordo com nossos objetivos e com base em fichas de anamnese aplicadas por médicos para avaliar pessoas com TEA. De maneira geral, este questionário se constitui de um informativo abrangente sobre o histórico clínico e familiar do indivíduo, que foi previamente diagnosticado como dentro do espectro. Importante salientar que em relação aos fatores ambientais considerados relevantes para o TEA, além dos descritos na literatura, atentamos também para fatores relevantes para o nosso país, como epidemias que circularam pelo Brasil nos últimos anos, como o caso do Zika Vírus, por exemplo.

Para a aplicação do questionário, contatamos famílias que enviaram dentes para o “Projeto a Fada do Dente” e outras famílias recrutadas a partir de palestras para pais em todo o território brasileiro. A partir das respostas recebidas, foram feitas análises estatísticas que nos mostraram um panorama do TEA no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

COLOCAR MAIS SOBRE HISTÓRIA DO TEA (PAULO)

2.1. Transtorno do Espectro do Autismo

O termo “autismo” vem do grego “autos” e significa “em/de si mesmo” (KANNER, 1943; ASPERGER, 1991; UDDIN, 2011). Apesar da denominação do autismo ser relativamente nova, relatos de pessoas com comportamentos autísticos são observados na literatura médica desde 1798, quando o psiquiatra Jean Itard descreveu um “garoto selvagem” (VAN DRENTH, 2018). Isso não significa que o autismo tenha surgido nessa época e até a metade do século XX, o autismo era apenas um sintoma de outras psicopatologias, como descrito por Eugene Bleuler, se referindo ao autismo como um dos quatro “As” (Alucinações, Ambivalência, Afeto incongruente e Autismo) presentes em pessoas com Esquizofrenia (MAATZ; HOFF; ANGST, 2015). No início dos anos 1940, tanto Hans Asperger como Leo Kanner estudaram sintomas em crianças que apresentavam comportamentos semelhantes entre si, mas diferentes das pessoas com Esquizofrenia estudadas por Bleuler. Embora os termos Síndrome de Asperger e Autismo sejam atribuídos aos dois pesquisadores, respectivamente, estudos recentes mostram que, possivelmente, outros pesquisadores já vinham estudando o autismo na década de 1930, como é o caso de Ida Frye, que estava estudando crianças introspectivas que pareciam ter um “mundo próprio” (VAN DRENTH, 2018).

Em 1952, A Associação Americana de Psiquiatria (APA, do inglês *American Psychiatric Association*) lançou o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual*) para que fosse possível diagnosticar e definir transtornos mentais. Desde então, o DSM já chegou à sua 5ª edição e o autismo e síndromes associadas ficaram definidos como Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), com critérios padronizados pela APA para ajudar no diagnóstico clínico, sendo esses baseados em déficits persistentes na comunicação e interação social associados a comportamentos restritos e repetitivos, podendo variar de grau, que são denominados 1, 2 e 3 (leve, moderado e severo, respectivamente) (APA, 2013).

O atual sistema de classificação do TEA unificou o que anteriormente era diagnosticado como Transtorno Autístico, Síndrome de Asperger (SA) e Transtorno

Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (TID-SOE) (APA, 2013; GRZADZINSKI; HUERTA; LORD, 2013; DE LA TORRE-UBIETA et al., 2016).

Mesmo com a padronização dos critérios clínicos pela APA, o diagnóstico do TEA representa um desafio, uma vez que sinais e sintomas podem ser interpretados de forma errônea a depender do ambiente e cultura da pessoa investigada. Para uma investigação clínica mais precisa, é sugerido que sejam feitas avaliações, além do ambiente da clínica, em casa e na escola.

Atualmente, já é possível diagnosticar o TEA entre 18 e 24 meses de vida, o que é um fator importante para a intervenção terapêutica comportamental precoce, podendo contribuir para um melhor desenvolvimento e evolução do paciente (BARON-COHEN; ALLEN; GILLBERG, 1992; BRENTANI et al., 2013), e há estudos que mostram que características importantes para o desenvolvimento esperado podem ser notadas até mesmo antes dos seis meses (VOLKMAR; CHAWARSKA, 2008). Entretanto, para adultos o diagnóstico é retrospectivo e, portanto, ainda desafiador, pois o médico que irá diagnosticar deverá contar com lembranças da pessoa com TEA ou de algum responsável (HOWES et al., 2018).

Além do diagnóstico clínico, que segue os critérios descritos no DSM-V (APA, 2013) ou no CID-10 (Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde, 1992), tanto para adultos, quanto para crianças, há alguns instrumentos/escalas de rastreamento e diagnóstico, como vemos no Quadro 1, que têm auxiliado tanto na área clínica quanto na área da pesquisa.

Quadro 1 – Escalas usadas para auxiliar no diagnóstico e rastreio de TEA

Tipo de Instrumento	Nome do Instrumento	Público alvo	Tradução e validação	Referência
Diagnóstico	ADOS (<i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i>)	Crianças acima dos 02 anos	PACIFICO et al., 2012 OBS: Tradução / Adaptação cultural, mas não autorizado a aplicação	LORD et al, 2000
Diagnóstico	ADOS-T (<i>Autism Diagnostic Observation Schedule - Toddler Model</i>)	Crianças abaixo dos 02 anos	Sem validação no Brasil	GUTHRIE et al., 2013
Diagnóstico e Instrumento de pesquisa	ADI-R (do inglês, <i>Autism Diagnostic Interview, Revised</i>)	Idade mental de 18 meses até a idade adulta	BECKER, 2012	LORD; RUTTER; LE COUTEUR, 1994

Rastreamento	M-CHAT (do inglês, <i>Modified Checklist for Autism in Toddlers</i>)	Crianças entre 18 a 24 meses	LOSAPIO; PONDÉ, 2008	ROBINS et al., 2001
Rastreamento	CARS (do inglês, <i>Childhood Autism Rating Scale</i>)	Crianças acima de 02 anos	PEREIRA; RIESGO; WAGNER, 2008	XU; YAO; LIU, 2019
Rastreamento	ASQ (do inglês, <i>Autism Screening Questionnaire</i>)	Para crianças a partir de 04 anos	Sato et al. em 2009	GUEDES; TADA, 2015
Rastreamento	ABC (do inglês, <i>Autism Behavior Checklist</i>)	Assim que se suspeita de TEA	MARTELETO e PEDROMÔNICO, 2005	VOLKMAR et al., 1988
Rastreamento	ATA (Escala de Avaliação de Traços Autísticos)	A partir dos 02 anos	ASSUMPÇÃO et al., 1999	BALLABRIG A; ESCUDÉ; LLABERIA, 1994

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Escalas de rastreio e diagnósticas para o TEA. O diagnóstico final deve ser feito pelo médico, o qual pode lançar mão de instrumentos diagnósticos e, eventualmente, pode contar com opiniões e relatórios de terapeutas como, por exemplo, psicólogos e fonoaudiólogos, caso ache necessário. Estes e outros instrumentos diagnósticos podem ser usados para confirmar suspeitas do TEA, mas somente após consulta clínica e anamnese.

É importante ressaltar que os instrumentos diagnósticos devem ser aplicados por profissionais treinados e que para alguns há uma versão validada em Português. Por fim, apesar dos instrumentos diagnósticos poderem ser usados para confirmar suspeitas do TEA, exames complementares, como ressonância, eletroencefalograma, entre outros, podem também ser requisitados para que se exclua outras patologias, uma vez que não há exames ou biomarcadores que possam ser usados para confirmar ou excluir o diagnóstico de TEA.

Em relação à prevalência, apesar do TEA ser estudado há muitos anos, sua prevalência ainda é desconhecida em muitos países, inclusive no Brasil. Até os anos 1990, cerca de 16 estudos epidemiológicos sobre o TEA haviam sido realizados, cada um usando critérios e métodos específicos, em lugares como Estados Unidos, Inglaterra, Japão entre outros. Os dados apresentaram que 3,3 a 16 indivíduos em cada 10.000 tinham TEA (WING, 1993). Atualmente, segundo o CDC, a incidência do TEA é de 1 para cada 59 nascidos nos Estados Unidos (BAIO et al., 2018), sendo que os meninos são cerca de 4 vezes mais diagnosticados do que as meninas (4:1) (APA, 2013; BAIO, et al. 2018). Porém, uma meta-análise de 2017, mostrou que esse número pode ser mais próximo de 3:1, uma vez que meninas tendem a ser menos diagnosticadas que meninos, pois os sinais do TEA se apresentam de maneira diferente no sexo feminino (LOOMES; HULL; MANDY, 2017). De maneira geral, os

estudos que já foram feitos sugerem que entre 1 e 2% da população mundial tenha TEA (BROEK et al., 2014; BAIO et al., 2018).

Em relação ao tratamento farmacológico, ainda não existem fármacos identificados para se tratar os diferentes tipos de TEA, apenas para as comorbidades associadas, tais como TDAH, Epilepsia, TOC, Depressão, Distúrbio do Sono, entre outros. Contudo, todas essas comorbidades devem ser tratadas, caso necessário, com medicamentos associados a terapias. Embora alguns tratamentos farmacológicos tenham mostrado uma modesta melhora em alguns indivíduos com TEA, os efeitos colaterais devem ser considerados. As intervenções comportamentais, que trabalham aspectos sociais e de comunicação com pais, professores e comunidade em geral, são as mais indicadas para se tratar os sintomas centrais do TEA (HOWES et al., 2018).

A ABA (Análise Aplicada do Comportamento, do inglês *Applied Behavioral Analysis*), bem como outros tratamentos baseados em modelos comportamentais, são as formas de tratamento que são mais aceitas como efetivas (National Research Council, 2001). Este tipo de abordagem é muito fundamentado na análise experimental do comportamento, que é uma ciência que visa entender como o comportamento pode ser alterado pelo ambiente (LOVAAS, 1987; VISMARA; ROGERS, 2010). Por se tratar de um transtorno complexo, a melhor abordagem para o tratamento do TEA é combinar terapias educacionais, fonoaudiológicas e psicossociais com tratamentos farmacológicos, quando necessários, para sintomas específicos (BRENTANI et al., 2013).

Por fim, para discutirmos as causas do TEA e apenas para efeito didático, podemos subdividir o TEA em dois grandes grupos: os autismos sindrômicos e os não-sindrômicos (ou idiopáticos). As formas sindrômicas do autismo são, geralmente, associadas a distúrbios e/ou características fenotípicas e comportamentais. Além disso, podem ser confirmadas através de testes genéticos em função de um gene específico mutado, já que são, em geral, síndromes monogênicas. Já os autismos idiopáticos, que são responsáveis por mais de 75% dos casos de TEA e têm uma herança multifatorial, não têm a causa estabelecida e dependem do diagnóstico clínico (FERNANDEZ; SCHERER, 2017; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017; BRITO et al., 2018; RUSSO et al., 2019).

Quadro 2 – Síndromes Metabólicas no TEA e Autismos Síndrômicos

TEA e Síndromes metabólicas			
<i>Síndrome</i>	<i>Características</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Referências</i>
Síndromes mitocondriais	Autismo, Fadiga, possível atraso nos marcos motores	ST	GRIFFITHS; LEVY, 2017
Distúrbios do metabolismo de Purina	Autismo, Atraso no desenvolvimento, Epilepsia	ST	PAGE; COLEMAN, 2000; JINNAH, SABIBA; VAN DEN BERGHE, 2013; OROZCO et al., 2019
Fenilcetonúria	Autismo, Epilepsia, DI	Dieta diferenciada	BAIELI et al., 2003
Defeitos de síntese de colesterol	Autismo, auto agressividade, DI	Suplementação de colesterol	PORTER, 2002
Distúrbios de ciclo de ureia	Autismo, Epilepsia, DI	Dieta diferenciada	CAMPISTOL et al., 2016
Síndrome de Sanfilippo	Autismo, regressão no desenvolvimento, Transtorno do Sono	ST	WOLFENDEN; WITTKOWSKI, HARE, 2017
Autismos Síndrômicos			
<i>Síndrome</i>	<i>Características e prevalência</i>	<i>Principal Gene relacionado</i>	<i>Referências</i>
Síndrome do X-Frágil	Autismo, características dismórficas (rosto alongado e orelhas grandes e proeminentes), possível ataxia ou tremores, funcionamento cognitivo e executivo alterados 1:4.000 (mais meninos)	FMR1	LUBS, 1969; WEISS, 2009
Síndrome de Rett	Autismo, regressão no desenvolvimento, DI, crescimento anormal do crânio, Epilepsia 1:10.000 (mais meninas)	MECP2	WEISS, 2009;
Síndrome de Heller - TDI	Autismo, regressão na fala, nas habilidades sociais e motoras 1.7:100.000	Sem genes específicos	WEN et al., 2017
Síndrome de Phelan-McDermid	Autismo, hipotonia neonatal, características dismórficas, crescimento normal a acelerado, atraso ou ausência da fala Desconhecido	SHANK3	CAGLAYAN, 2010; COSTALES; KOLEVZON, 2015
Síndrome da Esclerose Tuberosa	Autismo, convulsões, dificuldades comportamentais e intelectuais, envolvimento de	TSC1, TSC2	CAGLAYAN, 2010, VIGNOLI et al., 2015; VORSTMAN et al., 2017

	múltiplos órgãos (rins, coração, pulmão etc.) 1:6.000		
CDKL-5	Autismo, comprometimento motor, deficiência intelectual, déficits visuais, epilepsia Desconhecido	CDKL-5	RICCIARDI et al., 2012; TRAZZI et al., 2018
Síndrome de Prader-Willi	Autismo, deficiência intelectual, deficiência de hormônio do crescimento, hipotonia, hipogonadismo, irritabilidade, hiperfagia 1:15.000	UBE3A – região cromossômica paterna 15q11-q13	DYKENS et al., 2007; ELENA et al., 2012; RUSSO et al., 2019
Síndrome de Angelman	Autismo, ataxia, convulsões, deficiência intelectual, acessos de riso 1:12.000	UBE3A – região cromossômica materna 15q11-q13	LOSSIE et al., 2001; PETERS et al., 2004; TRILLINGSGAARD; ØSTERGAARD, 2004
Síndrome de Timothy	Autismo, problemas cardíacos, sindactilia, deficiência imune, disfunções neurológicas e distúrbios faciais Menos de 20 pessoas em todo o mundo	Cav1.2	BETT et al., 2012, RUSSO et al., 2019

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: ST: Sem tratamento

TDI: Transtorno Desintegrativo da Infância

2.2. Fatores genéticos relacionados ao TEA

A partir dos anos 1990, associações com síndromes genéticas como X-Frágil, estudos de citogenética (COHEN et al., 1991), observações neuroanatômicas e dados de neuroimagem (COURCHESNE et al., 1988) demonstraram um desenvolvimento anormal do cérebro e, a partir destes achados, se estabeleceu uma base neurobiológica para o TEA, derrubando todas as teorias estabelecidas anteriormente que ligavam o TEA somente a transtornos psíquicos (HERTZ-PICCIOTTO; SCHMIDT; KRAKOWIAK, 2017).

Entretanto, é sabido que o TEA pode ser muito semelhante a outros transtornos psiquiátricos, com uma sobreposição comum de sintomas, que pode ser atribuída a

mecanismos moleculares comuns subjacentes. Ou seja, apesar de clinicamente diferentes, encontramos genes relacionados ao TEA, ou variantes genéticas associadas, que estão diretamente ligados com outros transtornos do neurodesenvolvimento, ou com outras doenças, tais como doenças congênitas do coração, transtornos metabólicos, Epilepsia, DI, TOC, Transtorno Bipolar, Esquizofrenia e Depressão (DE RUBEIS et al., 2014; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017; O'CONNEL, 2018). Pesquisas apoiam essa teoria à medida em que vários estudos de associação genômica ampla (GWAS - do inglês *Genome-Wide Association Study*) identificaram os mesmos loci gênicos significativos, independentemente do transtorno, e uma série de estudos de associações GWAS produziram resultados significativos, revelando uma sobreposição de fenótipos (O'CONNEL, 2018).

Estudos genéticos realizados em pacientes com TEA revelam uma grande quantidade de genes envolvidos no transtorno, tendendo a aumentar à medida que mais indivíduos são geneticamente mapeados (CLARKE, 2016). Com o surgimento da NGS (do inglês, *Next Generation Sequence*), o qual inclui sequenciamento completo tanto do exoma quanto do genoma, tem sido possível identificar um número crescente de genes que contribuem para a etiologia do TEA, principalmente os idiopáticos. Em alguns casos, uma única alteração genética pode causar TEA, porém, na maioria dos casos, o TEA pode resultar de uma combinação de variantes genéticas comuns ou raras associadas a fatores ambientais (HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017).

De acordo com dados mais recentes do *Simons Foundation Autism Research Initiative Gene Database* (SFARI Gene), 1089 genes podem estar implicados no TEA (SFARI Gene, 2019). Além disso, estudos recentes mostram que a contribuição genética no TEA é estimada em torno de 80%, sugerindo, mais uma vez, que o risco genético é preponderante, sendo apenas um pouco menor que o risco genético entre gêmeos, que é de cerca de 90% (SANDIN, 2014; BAI et al., 2019). Com os avanços da genética, novos genes relacionados ao TEA estão sendo descritos e, com esse conhecimento genético que está sendo adquirido, associado a características particulares de cada indivíduo, é provável que, futuramente, novas síndromes monogenéticas sejam identificadas.

Além das mutações genéticas, o TEA também está associado à variedade de diferentes regiões genômicas geradas pelas CNVs (do inglês, *Copy Number Variation*) (VORSTMAN, 2017). Um estudo feito com CGH (do inglês, *comparative genomic hybridization*) realizado no DNA genômico de indivíduos com e sem TEA, para se detectar CNVs que não estavam presentes em seus pais, revelou que CNVs raras e *de novo* foram significativamente associadas ao TEA (SEBAT et al., 2007). Com esses avanços, novas áreas nos cromossomos e no genoma têm sido descobertas, inclusive ampliando a identificação de novas CNVs em indivíduos com transtornos do neurodesenvolvimento. No entanto, ainda há inconsistências na interpretação de certas diferenças em algumas CNVs e em algumas SNVs (do inglês, *Single Nucleotide Variant*), que podem resultar de contribuições ambientais ou diferença de gênero, onde as mulheres possivelmente tenham um “fator de proteção” para aberrações genômicas que não é encontrado em homens (VELINOV, 2019).

Um modelo publicado em 2017 usando “modelos de copos”, como se estivessem carregando fatores genéticos de maior ou menor impacto, bem como fatores ambientais, sugeriu como acontece a redução de penetração e a herdabilidade genética em uma família que tenha filhos com TEA. Neste modelo (Figura 2), podemos observar que o pai carrega um fator genético mais fraco, associado a fatores ambientais. Porém, esses fatores não são suficientes para “encher seu copo”, não alcançando o limiar para desenvolver TEA. O mesmo ocorre com a mãe, a qual traz consigo um fator genético mais expressivo associado a um fator genético mais fraco e a um fator ambiental. No entanto, ela também não atinge o limiar para TEA e não apresenta características suficientes para ser diagnosticada. Ao terem filhos, a junção da genética dos pais, associada à genética dos filhos, faz com que dois dos quatro filhos apresentem TEA. Essa herdabilidade se deu devido à combinação de variantes genéticas fortes, fracas, herdadas e *de novo*, bem como a fatores ambientais. Além da herdabilidade, o primeiro e quarto filhos desenvolveram uma mutação *de novo*, chamados na figura de gene “D”, para o primeiro, e gene “E” para o quarto filho (HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017).

Figura 2. Herdabilidade genética no TEA

Fonte: (HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017, adaptado por Brito, A., 2020)

Legenda: Herdabilidade genética em uma família com TEA. O primeiro e quarto filhos atingem o limiar para TEA e desenvolvem o transtorno através de uma combinação genética herdada de pai e mãe, de fatores ambientais e de mutações *de novo*. "A, B, C, D, E" representam fatores de risco genéticos para o TEA.

Há também o fato de que uma mesma mutação genética, mas associada a fatores ambientais e a outros fatores genéticos, possa se manifestar de forma diferente em cada indivíduo. Na Figura 3, do mesmo estudo de 2017, apesar de três pessoas apresentarem a mesma mutação em um mesmo gene, esta se apresenta de forma diferente em cada uma, sendo que a primeira pessoa desenvolve TEA, a segunda, TDA-H, e a terceira, TEA e TOC (HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017).

Figura 3. Diferentes manifestações clínicas decorrentes de uma mesma mutação genética

Fonte: (HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017, adaptado por Brito, A., 2020)

Legenda: Mutação genética no gene *ASTN2* e sua relação causal com três manifestações clínicas diferentes. Apesar da mutação ser no mesmo gene, outras variáveis individuais, tanto genéticas, quanto fatores ambientais, podem contribuir para a variação do fenótipo clínico.

TEA (Transtorno do Espectro do Autismo)

TOC (Transtorno Obsessivo Compulsivo)

TDAH (Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade).

Ademais, a compreensão do complexo papel da modelagem da cromatina, bem como todos os mecanismos que a permeiam, têm sido apontados como fundamentais para se compreender a etiologia do TEA, uma vez que alterações nas proteínas nucleares associadas e/ou alterações no DNA genômico, bem como modificações na cromatina, foram encontrados com muita frequência na investigação de genes únicos associados ao TEA (DE RUBEIS et al., 2014; O'CONNELL et al., 2018). Essa compreensão se faz necessária uma vez que a cromatina pode ser influenciada por uma série de eventos externos já conhecidos na literatura como possíveis

responsáveis por subtipos do TEA, tais como nutrição e metabolismo, funcionamento do sistema imune, toxinas ambientais e variabilidade genética (LASALLE, 2013; O'CONNELL et al., 2018).

De maneira geral, o que é mais aceito atualmente é que o TEA seja poligênico e multifatorial, com estudos que mostram o envolvimento de causas genéticas e de fatores ambientais, levando a manifestações clinicamente diferentes em cada indivíduo, pois a união desse conjunto genética/ambiente pode desempenhar um papel bem variado, com impacto diferente para cada indivíduo (RUDIE et al., 2012; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017).

2.3. Fatores ambientais relacionados ao TEA

Conforme exposto anteriormente, além dos fatores genéticos, fatores ambientais podem influenciar para o desenvolvimento do TEA. Pesquisas visando entender a influência ambiental no complexo processo do neurodesenvolvimento já são feitas há mais de 100 anos e buscam avaliar de que forma esses fatores podem influenciar o risco e severidade do TEA e de outros transtornos (HERTZ-PICCIOTTO; SCHMIDT; KRAKOWIAK, 2017). Essa relação estaria baseada, possivelmente, em mudanças epigenéticas em função do ambiente (SEALEY et al., 2016; MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017). Alterações epigenéticas complexas já foram descritas para doenças neurológicas e em transtornos do neurodesenvolvimento como TEA, Esquizofrenia e Depressão (RUDIE et al., 2012; PINTO et al., 2014; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017). Estudos recentes revelaram que o ambiente intrauterino pode modular o risco para Esquizofrenia, bem como risco para TEA (URSINI et al., 2018).

Uma das grandes barreiras para se estabelecer associações causais entre fatores ambientais e TEA é a falta de consistência, temporalidade e especificidade em alguns estudos. Para tanto, são necessárias pesquisas mais robustas para que se resolvam inconsistências na literatura disponível sobre TEA e fatores ambientais (NG et al., 2017). Além disso, fatores tidos como relacionados ao TEA no passado, como por exemplo a relação da vacina tríplice viral, mercúrio, inibidores de recaptação de serotonina, uso de cigarro durante a gravidez e exposição ao timerosal estão, atualmente, descartados da relação com o TEA (MODABBERNIA; VELTHORST;

REICHENBERG, 2017; NG et al., 2017). No entanto, outros fatores externos, como complicações no parto, idade parental avançada e hipóxia têm sido consideradas de grande risco para desenvolvimento do TEA, ao passo que obesidade e diabetes gestacional, bem como cesariana têm mostrado que são fatores de menor risco, mas ainda de significância relevante (MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017).

Outro fator externo que se mostrou inconclusivo foi o nutricional. Deficiência em ácido fólico ou ômega 3 parecem não fazer diferença para o quadro de TEA. Já a vitamina D parece ser deficiente em pacientes com TEA, mas carece de mais estudos para se estabelecer uma real relação entre os dois e não há evidências científicas de que haja uma relação causal entre TEA e deficiência em vitamina D (HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017; MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017). De maneira contrária ao risco, um estudo em uma coorte de gestantes que ingeriram ácido fólico demonstrou uma possível proteção contra o desenvolvimento do TEA (NG et al., 2017).

Os estudos sobre elementos tóxicos ainda são muito limitados, mas sugerem associação de alguns metais pesados, como mercúrio inorgânico e chumbo e o aumento do risco para o TEA (MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017). Evidências sobre deficiência de minerais, níveis de zinco, ferro, magnésio, cobre, molibdênio, níquel e selênio em pessoas com TEA tiveram resultados conflitantes e estudos relacionando deficiência de cálcio se mostraram inconsistentes. Outras inconsistências aparecem em estudos sobre cobalto, cromo e manganês feitos em crianças com TEA, se mostrando sem significância (NG et al., 2017).

A poluição também foi um fator de risco estudado em camundongos (C57BL6/J) expostos a poluentes (<100 nm de partículas ambientais ultrafinas), onde os animais apresentaram ventriculomegalia, alterações neuroquímicas e ativação de células gliais no cérebro, especialmente os camundongos machos, sugerindo uma resposta inflamatória (ALLEN et al., 2014). Outro trabalho mostrou que gestantes que estavam especialmente no terceiro trimestre de gestação, ou recém-nascidos que residem em áreas com alta concentração de poluentes e expostos a dióxido de nitrogênio e a materiais particulados (menor que 2,5 µm), bem como a óxido nítrico, tiveram maior risco de TEA, pois estes materiais podem desencadear uma neuroinflamação e estresse oxidativo (BECERRA et al., 2013). Entretanto, apesar dos

vários estudos realizados investigando o risco de poluentes para o desenvolvimento do TEA (VOLK et al., 2011; BECERRA et al., 2013; ALLEN et al., 2014), os resultados foram fracamente associados ou inconclusivos (NG et al., 2017).

Estudos clínicos feitos em animais e humanos demonstraram que a neuroinflamação também pode ser explicada pela exposição precoce, durante o neurodesenvolvimento, à presença de conservantes nos alimentos, a substâncias tóxicas ou a estresse, e podem resultar em uma cascata de citotoxicidade no cérebro (DIETERT, R.R.; DIETERT, J.M, 2008; BLAYLOCK; STRUNECKA, 2009), a qual pode estar relacionada à desregulação da neurotransmissão de glutamato. Essa cascata pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, resultando em alterações crônicas que afetam o neurodesenvolvimento (BLAYLOCK; STRUNECKA, 2009).

Ainda em relação à neuroinflamação, estudos *in vitro* do nosso grupo revelaram que astrócitos derivados de células de crianças com TEA idiopático produziam uma grande quantidade de IL-6 capaz de interferir na morfologia e sinaptogênese de neurônios. À medida que a IL-6 era bloqueada, havia um aumento da sinaptogênese. Este estudo confirmou a ligação entre interleucina-6 e TEA e foi o primeiro trabalho a provar que as disfunções gliais poderiam contribuir para a fisiopatologia do autismo idiopático (RUSSO et al., 2018).

2.4. Uso de questionários em pesquisas para o TEA

Ao se iniciar um trabalho de pesquisa, o pesquisador procura responder a uma pergunta, ou perguntas, que possam trazer informações relevantes à sociedade. Para que uma pesquisa seja considerada relevante, as perguntas devem ser cuidadosamente elaboradas para que as respostas possam gerar novos desdobramentos, conhecimento na área estudada ou, ainda, corroborar ou refutar teorias apresentadas anteriormente (NAHAS; GRAZIOSI; LIEBANO, 2014). Assim, é fundamental determinar a natureza da pergunta, quais variáveis devem ser selecionadas e como será realizada as análises. Para tanto precisamos elaborar questionários de forma muito cuidadosa, pois devemos considerar que não é suficiente a simples coleta de respostas, mas saber qual a validade do questionário e

qual a melhor forma de análise dos dados de acordo com a forma que foram coletados (MANZATO; SANTOS, 2012).

A aplicação de questionários em pesquisas científicas vem sendo utilizada há muitos anos, e esta aplicação se deu, durante muito tempo, por meio de coleta de dados em material impresso. Atualmente, pesquisas têm sido feitas também no formato virtual, com os questionários especificamente desenhados, aplicados e as suas respostas recebidas por meio eletrônico.

Para que haja sucesso nessa etapa de recolhimento de dados, sejam esses impressos ou *on-line*, é necessário que os dados coletados durante a pesquisa atendam às necessidades do processo de análise. Embora haja muitos trabalhos feitos a partir de coleta de dados através de questionários, há uma carência de publicações sobre este assunto (MOYSÉS; MOORI, 2007).

Além disso, também é importante ponderar a praticidade e acesso aos respondentes, considerando que a locomoção pode ser dificultosa em alguns casos. Um estudo de 2017, o qual acompanhou pessoas com TEA em momentos diferentes, aplicou o teste A-TAC (do inglês, *The Autism-Tics, ADHD and other Comorbidities inventory*) por telefone quando os pacientes tinham entre 9 e 12 anos. Quando os pacientes estavam com 18 anos, o questionário passou a ser aplicado *on-line* e, segundo os pesquisadores, a troca da maneira de aplicação pode ter alterado alguns resultados (TAYLOR et al., 2017).

Já existem alguns questionários para diagnóstico e rastreio do TEA, inclusive *on-line*, como mencionado no Quadro 1, que são facilmente encontradas na *internet* e que podem ser usados em caso de suspeita de alguns sinais e sintomas do TEA.

Diversos estudos epidemiológicos comparando casos e controles, e também buscando a associação de fatores de exposição com o risco de TEA, já existem na literatura, como apresentado anteriormente. No entanto, vale ressaltar que cada estudo tende a trabalhar com um fator de exposição, e não com vários ao mesmo tempo. Existem também questionários padronizados para fatores específicos, como para “exposição à violência” (HOFF; ROSENBAUM, 1994; THOMPSON et al., 2006) e “desnutrição” (ABRAMSON; SLOME; KOSOVSKY, 1963; HROLFSDOTTIR, 2019), mas não para diferentes fatores, como fizemos em nosso trabalho.

Entendendo que o TEA é um transtorno poligênico e multifatorial, com herdabilidade em torno de 50%, e que um indivíduo não está exposto a apenas um

fator, é fundamental entender o relacionamento entre todas as possíveis variáveis. O interesse do nosso trabalho é avaliar a relação de diferentes exposições em um grupo com TEA.

Neste trabalho, não investigamos a genética dos nossos respondentes com exames laboratoriais, portanto não pudemos fazer análise de mutações e variantes raras que poderiam fornecer o risco genético individual. Entretanto, de maneira indireta, usamos dados de Histórico Familiar (HF) de transtornos psiquiátricos e neurológicos como *proxi* de exposição a fatores genéticos. Nosso questionário não tem a intenção de ser usado como instrumento de rastreamento ou diagnóstico, pois foi elaborado para captar informações relevantes sobre exposição a fatores ambientais e genéticos em pessoas já diagnosticadas.

Após cuidadosa pesquisa, verificamos que este é o primeiro questionário/anamnese *on-line* para pessoas com TEA que investiga fatores ambientais e genéticos envolvidos em famílias do território brasileiro.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo fazer uma análise descritiva do relacionamento dos fatores genéticos e ambientais já associados ao TEA, através de um questionário aplicado em uma amostra representativa da população brasileira.

3.2. Objetivos Específicos

- Fazer análise exploratória das variáveis de história familiar de transtornos psiquiátricos e neurológicos na população estudada, buscando dimensões e redução da dimensionalidade dos dados;
- Fazer análise exploratória das variáveis separadas quanto a exposição ambiental (biológica), vulnerabilidade social, e exposição ao estresse emocional na população estudada, buscando dimensões e redução da dimensionalidade dos dados;

- Verificar o relacionamento de fatores genéticos e ambientais associados ao TEA encontrados na população estudada;
- Comparar alguns fatores ambientais considerados como de associação para o TEA entre o Grupo TEA (G-TEA) e Grupo Controle (G-C).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Grupo de estudo e recrutamento.

Este projeto faz parte do “Projeto a Fada do Dente”, que foi iniciado por nosso grupo em 2009 para receber dentes decíduos de crianças com TEA visando investigar os mecanismos biológicos envolvidos no transtorno através de investigação de contribuições genéticas e epigenéticas (CEP ICB 1001/2009). Importante salientar que, atualmente, o “Projeto a Fada do Dente” tem o status de biorrepositório, contando com várias pesquisas científicas em andamento e, apesar deste trabalho fazer parte do “Projeto a Fada do Dente”, foi submetido ao comitê de ética em pesquisas com humanos e foi aprovado (Parecer CEP 2.945.213).

Neste trabalho, as famílias doadoras foram contatadas por e-mail e convidadas a preencher nosso questionário *on-line*, após a explicação do mesmo. Os demais respondentes foram recrutados por contato direto com famílias de crianças com TEA, convidadas a participar deste trabalho durante a exposição de palestras de divulgação científica relacionadas ao autismo em todo território nacional, como também por meio de redes sociais. Todos os respondentes deste grupo foram previamente diagnosticados por um profissional de saúde e são chamados aqui de Grupo TEA (G-TEA).

Dentro do G-TEA, os respondentes que enviaram laudos foram subcategorizados e referidos como G-TEA Laudados (G-TEAL). Este grupo serviu também como controle positivo para validação da metodologia, já que os questionários foram preenchidos *on-line*.

Além do G-TEA e G-TEAL, nosso projeto contou com um Grupo Controle (G-C), onde os participantes que não têm filhos com TEA responderam a um questionário adaptado. O único pré-requisito para participar do grupo controle é que o respondente, ou filho do respondente, não podia ter sido diagnosticado com TEA.

4.2. Confeção do questionário, com foco em fatores genéticos e ambientais

Com o início do “Projeto a Fada do Dente”, houve o desenvolvimento de uma ficha de anamnese usada para captar dados clínicos/comportamentais dos doadores de dentes-de-leite (ANEXO A). Para o presente trabalho, usamos como base essa ficha de anamnese, dados da literatura e sugestões de médicos e especialistas em TEA do PROTEA (Programa do Transtorno do Espectro Autista), ambulatório da unidade de psiquiatria da infância e adolescência da FMUSP (Faculdade de Medicina da USP) para confeccionarmos um questionário/anamnese que fosse adequado aos objetivos deste projeto (ANEXO B). As perguntas foram formuladas com um vocabulário acessível para a população e com perguntas fechadas para que a tabulação de dados fosse possível. Todas as perguntas deveriam ser respondidas pelos pais ou responsáveis pelas pessoas com TEA ou, ainda, por adultos com TEA.

Já no G-C, pais e/ou responsáveis por crianças e adolescentes sem TEA responderam a um questionário adaptado, com a exclusão de algumas perguntas específicas para pacientes com TEA e diretamente ligadas ao diagnóstico, como vemos no Quadro 3. As perguntas foram excluídas por considerarmos inadequadas e irrelevantes para serem feitas ao G-C.

Quadro 3 - Perguntas excluídas para o G-C

Perguntas excluídas para o G-C	
01	A pessoa com TEA foi diagnosticada por algum profissional da área da saúde?
02	Caso já tenha o laudo com diagnóstico, poderia enviar para nossa equipe? Se sim, enviar para contato@projetoafadadodente.org.br
03	Qual a especialidade de quem diagnosticou a pessoa com TEA?
04	Nome do especialista que diagnosticou. Se não souber, ou se a pessoa com TEA ainda não foi diagnosticada, responda escrevendo "Não sei".
05	Qual o grau de autismo? (Leve: necessita de pouco ou nenhum apoio. Moderado: necessita de apoio em várias áreas. Severo: necessita de muito apoio em várias áreas.). Observação: Pessoas diagnosticadas com Síndrome de Asperger, responder a opção 1. Leve.
06	Com que idade a pessoa com TEA foi diagnosticada por algum médico ou especialista?
07	Com que idade você ficou preocupado com o desenvolvimento da pessoa com TEA pela primeira vez?

08	Qual (ou quais) sintoma(s) a pessoa com TEA apresentou primeiro que chamou sua atenção, ou a atenção de outra pessoa? Marque todas que se apliquem.
09	Atualmente, a pessoa com TEA fala?
10	Com que idade a pessoa com TEA começou a falar?
11	A pessoa com TEA parou de falar em algum momento?
12	A pessoa com TEA voltou a falar?
13	Em relação à fala, a pessoa com TEA tem algum diagnóstico dado por um médico ou fonoaudiólogo?
14	A pessoa com TEA tem diagnóstico de alguma síndrome?
15	A pessoa com TEA foi diagnosticada, ou apresenta, algum problema de coordenação motora?
16	Marque abaixo se a pessoa apresenta sensibilidade nestes casos (hipersensibilidade sensorial). Marque todas as opções que se apliquem.
17	Marque abaixo se a pessoa com TEA apresenta sensibilidade nestes casos (hipossensibilidade sensorial). Marque todas as opções que se apliquem.
18	A pessoa com TEA fez algum teste ou exame genético para complementar o diagnóstico de TEA? Marque todas as respostas que se apliquem.
19	Caso tenha feito algum teste ou exame genético descrito acima para complementar o diagnóstico de TEA, poderia disponibilizar o(s) laudo(s) do(s) exame(s) para a equipe do Projeto a Fada do Dente? Caso afirmativo, enviar para o e-mail contato@projetoafadadodente.org.br
20	A pessoa com TEA fez algum dos exames ou testes abaixo? Marque todas as respostas que se apliquem.
21	Apresentou alguma alteração em alguns dos testes? Se sim, qual exame apresentou alteração e qual foi a alteração? Caso não tenha feito, ou não saiba, responda escrevendo "Não se aplica".
22	Marque todas as opções necessárias para descrever se a pessoa com TEA apresenta malformação ou alteração no formato:
23	Se sim, descreva qual a malformação que a pessoa com TEA apresenta? Se não apresentar nenhuma malformação, responda escrevendo somente "Não".
24	O irmão gêmeo também está no TEA?
25	Há mais algum irmão ou irmã, que não seja gêmeo, que também está no TEA? Se sim, quantos irmãos ou irmãs também estão no TEA?

Fonte: Brito, A. (2020)

Importante ressaltar que, antes do início da aplicação do questionário, foi feita uma explicação detalhada deste trabalho no recrutamento dos respondentes. Além disso, não solicitamos dados referentes à identificação de documentos (CPF, RG, Passaporte etc.). Todos os participantes que aceitaram responder ao questionário foram alertados previamente de que se tratava de uma pesquisa científica, sigilosa e que os dados não tinham relação com diagnóstico ou tratamento, como vemos na Figura 4.

Figura 4. Apresentação dos questionários usados para G-TEA, G-TEAL e G-C

Avaliação de componentes de risco para o TEA	GRUPO CONTROLE
<p>Este questionário tem como objetivo coletar dados de pessoas com TEA e será usado somente para pesquisa científica. A identidade dos participantes/pais/responsáveis será mantida em sigilo e nunca será revelada. Caso necessário, os participantes poderão ser contatados por e-mail ou telefone pelos pesquisadores do Projeto a Fada do Dente para esclarecimento de dúvidas. Responsável pelo Projeto a Fada do Dente:</p> <p>Prof. Dra. Patrícia C. B. Beltrão Braga, Universidade de São Paulo</p> <p>* Required</p> <p>Projeto a Fada do Dente</p> <p>Nome completo da pessoa com TEA, sem abreviações. *</p> <p>Your answer</p> <p>Sexo da pessoa com TEA *</p>	<p>Este questionário tem como objetivo coletar dados de pessoas SEM AUTISMO (TEA) e será usado somente para pesquisa científica. A coleta de dados servirá para comparar com as respostas coletadas previamente em um outro grupo com autismo. A identidade dos participantes/pais/responsáveis será mantida em sigilo e nunca será revelada. Caso necessário, os participantes poderão ser contatados por e-mail ou telefone pelos pesquisadores do Projeto a Fada do Dente para esclarecimento de dúvidas. Responsável pelo Projeto a Fada do Dente:</p> <p>Prof. Dra. Patrícia C. B. Beltrão Braga, Universidade de São Paulo</p> <p>* Required</p> <p>Email address *</p> <p>Cannot pre-fill email address.</p> <p>Projeto a Fada do Dente</p> <p>Nome completo do seu filho ou filha, SEM ABREVIACÕES. *</p>

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda:

1. Avaliação de componentes de risco para o TEA: Este questionário tem como objetivo coletar dados de pessoas com TEA e será usado somente para pesquisa científica. A identidade dos participantes/pais/responsáveis será mantida em sigilo e nunca será revelada. Caso necessário, os participantes poderão ser contatados por e-mail ou telefone pelos pesquisadores do Projeto a Fada do Dente para esclarecimento de dúvidas. Responsável pelo Projeto a Fada do Dente: Prof. Dra. Patrícia C. B. Beltrão Braga, Universidade de São Paulo
2. Grupo Controle: Este questionário tem como objetivo coletar dados de pessoas SEM AUTISMO (TEA) e será usado somente para pesquisa científica. A coleta de dados servirá para comparar com as respostas coletadas previamente em um outro grupo com autismo. A identidade dos participantes/pais/responsáveis será mantida em sigilo e nunca será revelada. Caso necessário, os participantes poderão ser contatados por e-mail ou telefone pelos pesquisadores do Projeto a Fada do Dente para esclarecimento de dúvidas. Responsável pelo Projeto a Fada do Dente: Prof. Dra. Patrícia C. B. Beltrão Braga, Universidade de São Paulo

As perguntas foram feitas no formato de múltipla escolha, com caixas de seleção, lista suspensa, resposta curta e resposta longa, divididas em sessões. O Quadro 4 mostra as sessões do questionário e suas subdivisões.

Quadro 4 - Dados do questionário

Sessão	Objetivo específico	Abordagem
1ª sessão <i>Dados pessoais dos indivíduos com TEA</i>	Captar informações que diferenciem uma pessoa da outra, como informações pessoais. As respostas para essa sessão são informações sobre a pessoa com TEA.	Nome, data e local de nascimento, endereço atual, com quem vive, escolaridade, contato.
2ª sessão <i>Informação sobre os pais</i>	Captar informações relevantes sobre os pais da pessoa com TEA. As informações de caráter pessoal, como contatos de telefone e e-mail, também servem para entrarmos em contato para novos estudos, caso necessário.	Nome completo dos pais, idade, endereço, situação de empregabilidade, contato.
3ª sessão <i>Histórico clínico</i>	Captar informações clínicas e comportamentais da pessoa com TEA. Essa sessão traz um histórico clínico, com informações importantes sobre sintomas e aspectos importantes do diagnóstico, bem como histórico de exames e testes psicológicos e genéticos.	Aparecimento dos primeiros sintomas, exames, grau de autismo, dados sobre comunicação, presença de outras síndromes, questões sensoriais, distúrbios, comorbidades.
4ª sessão <i>Dados gestacionais</i>	Captar informações sobre a gestação da pessoa com TEA/aspetos maternos.	Informações do pré-natal, exposição a produtos tóxicos, vacinação durante a gestação, se fez uso de ácido fólico ou algum medicamento durante a gestação, uso de cigarros, bebidas ou drogas ilícitas, saúde física e mental da mãe durante a gestação, infecções. Ainda: número de gestações, abortamentos, e tipo de parto.
5ª sessão <i>Dados clínicos da pessoa com TEA no parto e pós-parto imediato</i>	Captar informações sobre parto e pós-parto da pessoa com TEA. Nesta sessão, abordamos aspectos de possíveis intercorrências na gestação, parto e pós-parto imediato que possam ser relevantes e previamente relacionadas à risco ambiental para o TEA.	Tipo de parto, tamanho e peso ao nascer, circunferência da cabeça, índice Apgar, se teve anóxia/hipóxia, resultado do teste do pezinho, outras observações da saúde da criança ao nascer. Ainda: amamentação e vacinação.
6ª sessão	Captar informações sobre moradia e dinâmica familiar para se estabelecer	Tipo, tamanho da moradia, número de pessoas que

<i>Histórico Familiar (local de moradia e dinâmica familiar)</i>	aspectos ambientais envolvidos no TEA.	habitam, renda aproximada da família, número de irmãos e ordem de nascimento, irmãos gêmeos.
<i>7ª sessão Dados dos familiares consanguíneos da pessoa com TEA</i>	Captar informações de parentes consanguíneos a fim de se estabelecer questões genéticas e hereditárias. Aqui, procuramos investigar sobre o histórico familiar da pessoa com TEA e questões relacionadas aos riscos genéticos.	Existência de mais alguém na família com TEA, síndromes ou transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas.
<i>8ª sessão Sessão final</i>	Apesar da explicação antes da participação de cada família, esta sessão serve para confirmar o entendimento do respondente sobre a natureza deste projeto como de pesquisa, salientando que nada tem a ver com diagnóstico e/ou tratamento para o TEA.	O TCLE foi transformado em 03 parágrafos para que a pessoa leia com atenção e marque “ciente”.

Fonte: Brito, A. (2020)

4.3. Modo de aplicação do questionário

A plataforma escolhida para a aplicação do questionário foi o Google Docs, uma vez que é uma ferramenta de fácil acesso e permite a criação de coleta de dados de forma prática e rápida.

Após o desenvolvimento do questionário *on-line*, foi feito um teste, chamado aqui de “processo de validação”, visando checar a facilidade de entendimento das perguntas e o tempo dispendido para a participação. Para tanto, o questionário foi enviado através de um link para o e-mail de 10 pessoas, 05 com filhos previamente diagnosticados com TEA e 05 com filhos neurotípicos (controles). Além do link para o questionário, as 10 pessoas receberam outro e-mail contendo 10 questões abertas para que pudessem dar suas impressões e sugestões sobre o questionário (Quadro 5).

Após a correção de eventuais dificuldades para entendimento do questionário, as quais foram pontuadas pelo grupo que respondeu no processo de validação, as famílias que doaram dentes entre 2009 e 2017 para o “Projeto a Fada do Dente” foram contatadas por e-mail e convidadas a participar deste projeto juntamente com as recrutadas presencialmente nas palestras.

Outro ponto a ser salientado é que alguns dos participantes que têm filhos com TEA enviaram laudos e exames pelo e-mail contato@projetoafadadodente.org.br, sendo usados como G-TEAL, uma vez que nenhum dos participantes que preencheu o questionário passou por avaliação diagnóstica pelo “Projeto a Fada do Dente”.

Quadro 5. E-mail enviado para validação do questionário:

Olá,
 Você está recebendo este questionário porque faz parte de um pequeno time seletivo que escolhemos para nos dar um feedback sobre esta ferramenta. LEMBRE-SE de manter sigilo sobre esta pesquisa e não repassar a ninguém sem prévia autorização, pois ainda estamos em fase de validação e correções.
 Lembrando, também, que o link foi enviado para seu e-mail. Por favor, verifique sua caixa de entrada, lixeira, spam ou filtradas para ver se recebeu. Se sim, é só clicar no link roxo escrito **FILL FORM** e começar.

Por favor, ao responder às questões abaixo, use toda sinceridade possível para que possamos melhorar nosso questionário e, conseqüentemente, nosso trabalho.

1. Quanto tempo você levou para responder?
2. Teve interferências/distrações enquanto respondia? Por exemplo, teve que parar por algum motivo ou por que alguém te chamou?
3. Há alguma pergunta (ou perguntas) que você considera pertinente estar(em) aí, mas que não está(ão)?
4. Há alguma pergunta (ou perguntas) que você considera sem relevância?
5. Você teve dificuldade para responder ao questionário?
6. Se teve alguma dificuldade, qual foi?
7. Você considera que falte uma explicação melhor no começo do questionário, ou está bem explicado?
8. Sobre o vocabulário usado no questionário, há palavras que você desconhecia? As explicações para alguns termos estão claras em sua opinião?
9. Poderia dar exemplos de palavras que, sem a explicação, seriam difíceis de entender?
10. Gostaria de acrescentar mais algum ponto que ache relevante?

Muito obrigada por suas respostas e por seu tempo. Você está colaborando muito para continuarmos com os estudos sobre o TEA na população brasileira.

Anita Brito
 Doutorando na USP, São Paulo, para estudos sobre o TEA.
 FMVZ, Departamento de Anatomia dos animais domésticos e silvestres.

Fonte: Brito, A. (2020)

4.4. Critério de exclusão de respondentes e de perguntas

Um dos critérios para exclusão parcial de respostas de alguns participantes foi se o filho com TEA era adotivo, pois não seria possível para o respondente elucidar sobre os dados genéticos/familiares e ambientais durante a gestação. Porém, informações sobre o sexo, local de nascimento, escolaridade da pessoa com TEA e toda informação que não fosse relacionada à genética e ambiente pré-natal foram consideradas para as análises deste projeto.

Outro critério de exclusão parcial considerou respostas com alguma incompatibilidade ou inconsistência, como, por exemplo, quando a mãe não sabia responder algo, ou quando uma resposta se apresentava de forma incongruente com outras.

4.5. Forma de apresentação e análises estatísticas

Foram usadas ferramentas diferentes para análise dos dados aqui apresentados. Para análises simples de verificação de porcentagem em algumas variáveis, as repostas foram quantificadas e transportadas para o programa estatístico *Social Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 2.0. Foram utilizadas análises estatísticas descritivas, onde verificamos a frequência e porcentagem válida dos dados transportados dos três grupos estudados. Para fim de comparação, analisamos variáveis que nos tragam informações pertinentes sobre os grupos e que pudessem ser comparadas com o G-C, como sexo, local de nascimento, ano de nascimento, tipo de parto e se fumou durante a gestação.

A compilação e análise de outras variáveis, para que pudessemos estabelecer uma possível relação entre exposição a fatores genéticos e ambientais, foram conduzidas no software RStudio, versão 3.6.1 - R Core Team, 2019 (R CORE TEAM, 2019), com a instalação dos seguintes pacotes: devtools (WICKHAM; HESTER; CHANG, 2019), Hmisc (HARRELL; CHARLES, 2019), ggplot2 (WICKHAM, 2016), factoExtra (KASSAMBARA; MUNDT, 2017), factoMineR (LE; JOSS; HUSSON, 2008).

As perguntas foram agrupadas criando variáveis de exposição. Para as análises feitas nessa seção, eliminamos os dados dos pacientes adotados. Foram feitas análises de acordo com a literatura relacionados à vulnerabilidade de TEA, sendo 1 para Histórico Familiar (HF), 2 para exposição a Fatores de Risco ambientais, biológicos e socioeconômicos, e 3 para exposição a estresse emocional durante a gestação.

4.5.1. Histórico Familiar

Para o eixo genético, considerando o HF, as questões foram agrupadas inicialmente de acordo com o transtorno ou doença correspondentes, conforme ilustrado na Tabela 1, levando em consideração o grau de parentesco da pessoa com

TEA. De acordo com o grau de parentesco, uma pontuação foi atribuída para cada resposta do questionário, sendo 3 pontos para parentes de primeiro grau, 2 pontos para parentes de segundo grau e 1 ponto para parentes de terceiro grau.

Tabela 1. Questões correspondentes aos transtornos e doenças psiquiátricas e neurológicas presentes em nosso grupo

Transtorno ou doença	Questões correspondentes						
Alzheimer	215	232	250	268	285	302	320
Ansiedade	229	246	264	282	299	316	334
Deficiência Intelectual Não Especificada	227	244	262	280	297	314	332
Deficiência Intelectual	222	239	257	275	292	309	327
Depressão	223	240	258	276	293	310	328
Down	220	237	255	273	290	307	325
Epilepsia	218	235	253	271	288	305	323
Esquizofrenia	217	234	252	270	287	304	322
Hiperatividade	224	241	259	277	294	311	329
Pânico	228	245	263	281	298	315	333
Parkinson	216	233	251	269	286	303	321
Tique	219	236	254	272	289	306	324
Transtorno Bipolar (TB)	221	238	256	274	291	308	326
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	225	242	260	278	295	312	330
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	226	243	261	279	296	313	331
Outros	231	248	266	284	301	318	336
Grau de parentesco	primeiro	segundo	segundo	segundo	segundo	terceiro	terceiro
Identificação da variável	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7
Transtorno do Espectro Autista (TEA)	201	202	203	204	205	206	207
Grau de parentesco	primeiro	primeiro	primeiro	primeiro	segundo	segundo	segundo
Identificação da variável	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7
TEA (continuação)	208	209	210	211	212	213	214
Grau de parentesco	segundo	segundo	segundo	segundo	segundo	terceiro	terceiro
Identificação da variável	t8	t9	t10	t11	t12	t13	t14

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Na tabela 1, as perguntas aparecem com numeração diferente do que aparece no questionário. Para que pudéssemos rodar as análises, tivemos que renumerar as perguntas, pois, no questionário original, elas estavam de forma alfanumérica (exemplo: 122a., 122b. etc.), o que dificultaria rodar as análises de forma clara. Apesar da renumeração, não houve qualquer prejuízo na confiabilidade das respostas.

Para estas análises sobre transtornos ou doenças, com exceção do TEA, empregamos a seguinte fórmula:

$$y = (x1 * 3) + ((x2 + x3 + x4 + x5) * 2) + x6 + x7$$

Onde y representa o resultado correspondente ao transtorno ou doença e x representa a quantidade de parentes com a ocorrência correspondente.

Já para o TEA, onde perguntas específicas sobre irmãos foram realizadas, empregamos a seguinte fórmula:

$$y = ((t1 + t2 + t3 + t4) * 3) + ((t5 + t6 + t7 + t5 + t6 + t7 + t8 + t9 + t10 + t11 + t12) * 2) + t13 + t14$$

Onde y representa o resultado correspondente para TEA e t representa a quantidade de parentes com a ocorrência de TEA. Quando necessário, usamos dados dicotômicos como descrito abaixo.

Para qualquer patologia:

- Se 0, recebe 0;
- Se maior que 0, recebe 1.

4.5.2. Fatores de Risco

As questões referentes a fatores de risco ambiental, outro eixo analisado, foram utilizadas para formar variáveis de exposição a fatores biológicos e socioeconômicos de acordo com as formulações expostas abaixo:

Idade da mãe na gestação:

$$y = \text{ano de nascimento TEA} - \text{ano de nascimento da mãe}$$

Idade do pai na gestação:

$$y = \text{ano de nascimento TEA} - \text{ano de nascimento do pai}$$

Índice de massa corpórea (IMC) da gestante:

$$y = \frac{\text{massa na gestação}}{\text{altura}^2}$$

IMC atual da mãe:

$$y = \frac{\text{massa atual}}{\text{altura}^2}$$

Moradores por cômodos:

$$y = \frac{\text{moradores}}{\text{cômodos}}$$

Pré-natal:

$$y = \text{Quantidade de consultas} + \text{trimestres} + \text{ácido fólico}$$

Para esta variável, o número de trimestres foi atribuído de acordo com o trimestre de início do pré-natal, ou seja, as respostas foram recodificadas.

Problemas de Tireoide:

$$y_0 = \text{ausência de problema}$$

$$y_1 = \text{presença de problema e ausência de medicamento}$$

$$y_2 = \text{presença de problema e presença de medicamento}$$

Infecção na gestação:

$$y_0 = \text{ausência de infecção}$$

$$y_1 = \text{presença de infecção e febre}$$

$$y_2 = \text{presença de infecção, febre e antibiótico}$$

$$y_3 = \text{presença de infecção, febre, antibiótico e internação}$$

Uso de medicação de risco na gestação:

$$y = \text{antidepressivo} + \text{antiepiléptico}$$

Exposição a produtos tóxicos:

$$y = \text{agrotóxico} + \text{mercúrio} + \text{chumbo} + \text{formol} + \text{cádmio} + \text{arsênio} + \text{inseticida} \\ + \text{pouca poluição} + \text{muita poluição} + \text{outros tóxicos}$$

Fumo:

$$\text{cigarros} = \text{unidades por mês} * \text{trimestres em que fumou}$$

$$y_0 = 0 \text{ cigarros}$$

$$y_1 = 1 \text{ à } 19 \text{ cigarros}$$

$$y_2 = 20 \text{ à } 59 \text{ cigarros}$$

$$y_3 = 60 \text{ ou mais cigarros}$$

Maconha:

$$y = \text{pouco} + (\text{médio} * 2) + (\text{muito} * 3)$$

Álcool:

$$y = pouco + (médio * 2) + (muito * 3)$$

TORCH¹:

$$y = toxoplasmose + CMV^2 + herpes$$

Problemas na gestação:

$$y = contração uterina + (sangramento * 2) + (aborto * 3)$$

Hipertensão e pré-eclâmpsia:

$$y = hipertensão + (pré - eclâmpsia * 2)$$

Quando necessário, usamos dados dicotômicos como descrito:

Infecção na Gestação, TORCH, Problemas na Gestação, Hipertensão e Pré – eclâmpsia, Diabetes Gestacional, Contato com Droga na Gestação, Fumo, Maconha, Álcool, Segurança

- Se 0, recebe 0;
- Se maior que 0, recebe 1.

Para escolaridade, renda e trabalho foram usados diretamente as categorias das respostas.

Renda da Casa, Trabalho do Pai, Trabalho da Mãe, Escolaridade do Pai e Escolaridade da Mãe.

- Se menor ou igual a 4, recebe 0;
- Se maior que 4, recebe 1.

Pré-Natal e Tóxico.

- Se menor ou igual a 2, recebe 0;
- Se maior que 2, recebe 1;

¹ TORCH: exame pré-natal que avalia se a gestante já teve contato com os patógenos Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Vírus Herpes Simples.

² CMV: Citomegalovírus

4.5.3. Estresse Emocional

No terceiro eixo analisado, atribuímos nomes às questões conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros avaliados e número das questões correspondentes

Descrição	Questão	Descrição	Questão
Sentimento de tristeza	131	Depressão na gestação	150
Sentimento de ansiedade	132	Estresse na gestação	151
Choro	133	Nota emocional	152
Sentimento de desmotivação	134	Agressão física pelo parceiro	153
Sentimento de irritabilidade	135	Agressão física por familiar	154
Insônia	136	Agressão física por outro	155
Apetite	137	Agressão psicológica pelo parceiro	156
Sentimento de culpa	138	Agressão psicológica por familiar	157
Sentimento de morte	139	Agressão psicológica por outro	158
Mudou de emprego	140	Agressão verbal pelo parceiro	159
Parceiro mudou de emprego	141	Agressão verbal por familiar	160
Mudou de casa	142	Agressão verbal por outro	161
Morte de alguém próximo	143	Agressão sexual pelo parceiro	162
Problema com justiça	144	Agressão sexual por familiar	163
Foi assaltada	145	Agressão sexual por outro	164
Presenciou crime	146	Agressão geral pelo parceiro	165
Catástrofe climática	147	Agressão geral por familiar	166
Morou sozinha	148	Agressão geral por outro	167
Pobreza	149	Segurança local	168

Fonte: Brito, A. (2020)

Quando necessário, usamos dados dicotômicos como descrito abaixo.

Nota Emocional:

- Se menor ou igual a 6, recebe 0;
- Se maior que 6, recebe 1.

Todos os tipos de Estresse, Sentimentos e Agressões.

- Se 0, recebe 0;
- Se maior que 0, recebe 1.

4.5.4. Análises de Agrupamentos

De acordo com as variáveis formadas, conforme descrito acima, todos os dados eram dados ordinais em categorias crescentes. Assim, primeiro foi feita uma análise usando a estatística gama G, que é especialmente apropriada para medir a

relação entre variáveis ordinais, desde que elas estejam na mesma ordem. A partir das matrizes, foram realizadas análises de agrupamento hierárquico, com distância Euclidiana e *complete linkage*.

4.5.5. Análise de MCA

As análises de MCA (MCA, do inglês, *Multiple Correspondence Analyses*) foram feitas para que pudéssemos explorar o relacionamento entre diferentes variáveis de exposição dentro de cada grupo, sendo um grupo de genética, outro de exposição ambiental, o qual engloba fatores biológicos e socioeconômicos, e um outro grupo sobre estresse emocional. Todos foram analisados separadamente e a contribuição das variáveis nas dimensões mais importantes foram selecionadas pela regra do cotovelo. Podemos entender que, como nossos dados são categóricos e não com distribuição normal, o uso de PCA baseado em correlações ou covariância para buscar dimensões e reduzir a dimensionalidade dos dados não é adequado. Para estes casos, podemos usar MCA.

Para as análises de MCA, primeiro usamos os valores totais marginais de linha e coluna para calcular o valor esperado. Assim todas as variáveis foram padronizadas pelo χ^2 (Qui Quadrado) e buscamos não variância compartilhada, mas similaridade de ocorrências de resposta. Para a MCA, utilizamos as recomendações padrão do pacote *factoMineR*. Os gráficos da MCA foram construídos através do pacote *factoExtra*.

Antes de cada MCA foram feitos, para cada variável, gráficos de frequências das classes, o que mostrou que, na maioria das vezes, uma classe era muito representada e as demais muito pouco representadas. Desta forma foram feitas análises com as classes originais ou recategorizadas, quando necessário.

Para cada análise foram usados todos os indivíduos que tinham respostas para as perguntas referidas, ou seja, nenhuma análise foi feita com dados faltantes assim como nenhum tipo de imputação foi realizada.

4.5.6. Perguntas excluídas da análise

Para que pudéssemos fazer as análises, tivemos que renumerar as perguntas, pois, no questionário original, elas estavam de forma alfanumérica (exemplo: 122a., 122b., etc.), sem causar qualquer prejuízo nas respostas. Após a renumeração, algumas perguntas foram descartadas de nossa análise preliminar por serem referentes aos dados de identificação da pessoa com TEA ou de membros da família, como vemos no Quadro 6:

Quadro 6. Perguntas excluídas das análises

Nome completo da pessoa com TEA, sem abreviações.
Qual o DIA de nascimento da pessoa com TEA?
Qual o MÊS de nascimento da pessoa com TEA?
Endereço atual completo (Rua/Avenida/Travessa etc., Bairro, Cidade, Estado, CEP, Complementos)
Nome completo da Mãe
E-mail mais usado pela Mãe para contato.
Telefone mais usado pela Mãe para contato (com DDD).
Nome completo do Pai. Caso não saiba, responda escrevendo "Não Sei".
E-mail mais usado pelo Pai. Caso não saiba, escreva "Não sei".
Telefone mais usado pelo Pai para contato (com DDD). Caso não saiba, escreva "Não sei".
Nome do especialista que diagnosticou. Se não souber, ou se a pessoa com TEA ainda não foi diagnosticada, responda escrevendo "Não sei".
Existem outras informações importantes que você queira relatar sobre seu filho?
Tenho total ciência que o Projeto a Fada do Dente não faz diagnóstico, exames individuais ou propõe tratamento para nenhum dos participantes. Sei que seus esforços são para o coletivo e os resultados sempre serão apresentados em forma de estudo científico e nunca enviado individualmente.
Declaro ter lido, compreendido e aceito que minhas respostas sejam usadas unicamente para fins acadêmicos e de informação. Declaro ainda que todas as respostas são verdadeiras e de minha inteira responsabilidade.

Fonte: Brito, A. (2020)

Em relação à pergunta **“Existem outras informações importantes que você queira relatar sobre seu filho?”**, desconsideramos dessa primeira análise por se tratar de respostas muito abertas, o que nos trouxe uma gama de informações de tamanha diversidade e complexidade, que não foi possível gerar dados relevantes para a pesquisa neste

momento. Para estudos futuros, possivelmente, algumas respostas dadas poderão ser úteis.

5. RESULTADOS

5.1. Participantes

Neste trabalho, um total de 2.183 pessoas, tanto responsáveis por pessoas com TEA, quanto autistas adultos, responderam ao questionário do G-TEA. O prazo de captação de respostas do questionário foi de 30 de outubro de 2018 a 19 de maio de 2019. Os respondentes que duplicaram o questionário por algum erro no sistema, ou que responderam às perguntas de forma inválida, ou inconsistente, foram retirados da análise deste trabalho. Sendo assim, para este trabalho foram considerados 2.141 respondentes. Dentre estes, 27 respondentes foram excluídos das respostas sobre fatores ambientais na fase pré-natal e HF, por serem filhos adotivos, mas foram computados para outras análises em que o fato de serem adotados não interferisse nos resultados, como sexo, idade, escolaridade e local de nascimento, por exemplo, conforme mencionado no item 4.4.

Para que pudéssemos validar o questionário e verificar se as respostas dadas *on-line* seriam de pessoas com TEA, perguntamos aos respondentes se a pessoa com TEA foi diagnosticada por algum profissional e pedimos para que nos enviassem um laudo, relatório ou qualquer documento que comprovasse o diagnóstico de TEA. Recebemos 225 laudos e/ou relatórios. Este grupo, G-TEAL, foi analisado em separado em algumas variáveis e foi usado como controle positivo deste trabalho. Em relação ao G-C, obtivemos 408 respondentes.

Antes de analisarmos o HF dos respondentes, verificamos alguns dados demográficos, como distribuição populacional por área, sexo e faixa de idade, bem como grau de autismo e dados relevantes para comparação de G-C e G-TEA, como o uso de cigarro durante a gestação e tipo de parto.

5.1.1. Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo

As respostas para este estudo foram captadas *on-line* e em palestras em todo o território nacional. Alguns brasileiros, que atualmente moram no exterior, também responderam. Entre todos os respondentes, houve uma prevalência maior nas regiões Sul e Sudeste, tanto no G-TEA e G-TEAL, quanto no G-C, sobretudo no estado de São Paulo (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5 – Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo – G-TEA

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Número de respondentes por Estado do G-TEA. Dos 2.141 respondentes, o estado que teve o maior número de participantes neste estudo foi São Paulo.

Figura 6 – Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo – G-TEAL

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Número de respondentes por Estado do G-TEAL. Dos 205 respondentes, o estado que teve o maior número de participantes neste estudo também foi São Paulo.

Figura 7 – Distribuição demográfica por estado dos respondentes deste estudo – G-C

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Número de respondentes por Estado. Dos 408 respondentes, o estado que teve o maior número de participantes neste estudo também foi São Paulo.

5.1.2. Sexo dos respondentes deste estudo

A maioria dos respondentes deste estudo nos grupos G-TEA e G-TEAL eram do sexo masculino, o que corrobora com os dados mundiais sobre prevalência entre meninos e meninas (Tabela 3). Além disso, nós tivemos cerca de 4 respondentes meninos para cada menina nos grupos mencionados acima, corroborando também a prevalência mundial de 4:1. Portanto, mesmo que haja um subdiagnóstico para meninas também no Brasil, nosso estudo teve equivalência com os estudos mundiais.

Já em relação ao G-C, houve cerca de 50% de respondentes para cada um dos sexos.

Tabela 3. Dados sobre o sexo dos respondentes deste estudo

G-TEA			N	%	
Sexo da pessoa					
N	Válido	2141	Feminino	398	18.6
			Masculino	1743	81.4

Omisso		0	Total	2141	100.0	
G-TEAL				N	%	
Sexo da pessoa			Feminino	39	17.3	
N	Válido	225	Válido	Masculino	186	82.7
	Omisso	0	Total	225	100.0	
G-C				N	%	
Sexo da pessoa			Feminino	193	47.3	
N	Válido	408	Válido	Masculino	215	52.7
	Omisso	0	Total	408	100.0	

Fonte: Brito, A. (2020)

5.1.3. Idade dos respondentes deste estudo

Na Tabela 4, separamos os respondentes deste estudo primeiramente por grupo (G-TEA, G-TEAL e G-C), depois, por sexo para verificarmos a média de idade, mínima e máxima, de cada grupo.

Os respondentes do sexo masculino do G-TEA tiveram média de idade máxima de 11,5 anos e mínima de 2 anos, sendo o respondente mais velho com 41 anos de idade. No sexo feminino, a média de idade máxima foi de 13,5 e 2 anos para idade mínima, sendo a respondente mais velha com 54 anos.

No G-TEAL, os respondentes do sexo masculino tiveram média de idade máxima de 8,5 anos, e mínima de 3 anos, sendo o respondente mais velho com 40 anos de idade. Para as meninas do G-TEAL, a média de idade máxima foi de 9 anos e mínima, 3 anos, sendo a respondente mais velha com 32 anos.

No G-C, a média de idade dos respondentes do sexo masculino foi de 9,5 anos de máxima e 2 anos de idade mínima, sendo o respondente mais velho com 33 anos. No sexo feminino, a média de idade foi de 10,5 anos de idade máxima e de 2 anos para idade mínima, sendo a respondente mais velha com 38 anos.

Em todos os grupos tivemos respondentes excluídos por motivo de incongruência na resposta. Por exemplo, algumas pessoas responderam no lugar da data de nascimento, a data do dia em que estava preenchendo, mesmo com a questão muito clara. Ou, a data de nascimento do filho era igual à da mãe ou do pai. Devido a essas incongruências, eliminamos esses respondentes de nossas análises para esta questão (Tabela 4).

Tabela 4. Ano de nascimento dos respondentes deste estudo

G-TEA				
Sexo	Respondentes	Média de idade	Idade Mínima	Idade Máxima
Meninos	1723	11.5	2	41
Meninas	392	13.5	2	54
Excluídos	26	-	-	-
Total:		2.141		
G-TEAL				
Sexo	Respondentes	Média de idade	Idade Mínima	Idade Máxima
Meninos	184	8.5	3	40
Meninas	39	9	3	32
Excluídos	2	-	-	-
Total:		225		
G-C				
Sexo	Respondentes	Média de idade	Idade Mínima (anos)	Idade Máxima
Meninos	206	9.5	2	33
Meninas	186	10.5	2	38
Excluídos	16	-	-	-
Total:		408		

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Idade mínima e máxima dos respondentes do sexo masculino e feminino nos G-TEA, G-TEAL e G-C. Devido à incongruência em algumas respostas, foram excluídos 26 respondentes do G-TEA, 2 respondentes do G-TEAL e 16 do G-C.

5.1.4. Grau de autismo dos respondentes deste estudo

Em relação ao grau de autismo, devido às mudanças de nomenclatura nos últimos anos, deixamos somente as opções “leve”, “moderado” e “severo” para que pudéssemos ter um melhor recorte das amostras. Em um trabalho anterior, havíamos deixado como pergunta aberta e ficou inviável analisar as respostas devido ao número de variáveis possíveis. Para a versão final do questionário, deixamos somente estas três opções, além da opção “não sei responder”, para que pudéssemos captar e analisar melhor as respostas. Para os que foram diagnosticados com Síndrome de Asperger, tanto antes, quanto depois do DSM-V, pedimos que assinalassem a opção “leve”. Podemos observar que as ocorrências de todos os graus são muito

semelhantes em ambos os grupos. Assim, em nossa amostra, a ocorrência de TEA de grau leve e moderado se mostraram mais recorrentes que os de grau severo, como vemos na Tabela 5.

Tabela 5. Dados sobre o grau de autismo dos respondentes deste estudo

G-TEA			N	%	
Grau de autismo			Leve	1014	47.4
N	Válido	2141	Moderado	773	36.1
	Omisso	0	Não sei responder	189	8.8
			Severo	165	7.7
			Total	2141	100.0
G-TEAL			N	%	
Grau de autismo			Leve	91	40.4
N	Válido	225	Moderado	92	40.9
	Omisso	0	Não sei responder	25	11.1
			Severo	17	7.6
			Total	225	100.0

Fonte: Brito, A. (2020)

5.1.5. Tipos de parto dos respondentes deste estudo

Alguns estudos sugerem que possa haver uma relação entre parto cesárea e risco para autismo (YIP et al., 2017), mas sem deixar claro quais seriam os mecanismos possivelmente envolvidos. No nosso trabalho, levamos em consideração essas sugestões e observamos os tipos de partos realizados. Obtivemos uma distribuição semelhante nos três grupos, com uma maior incidência para o parto cesárea. Nossas análises mostram que os três grupos analisados mostraram resultados muito próximos entre si, como vemos na Tabela 6.

Tabela 6. Dados sobre o tipo de parto referidos pelos respondentes deste estudo

G-C			N	%
Tipo de parto				
N Válido	408	Cesárea	309	75.7
		Normal	93	22.8
		Normal com auxílio de fórceps	3	.7
		Outro	3	.7
		Total	408	100.0
Omisso	0			

G-TEA			N	%	
Tipo de parto			Cesárea	1674	78.2
N	Válido	2141	Normal	417	19.5
	Omisso	0	Normal com auxílio de fórceps	34	1.6
			Não sei responder	6	.3
			Outro	10	.5
			Total	2141	100.0

G-TEAL			N	%	
Tipo de parto			Cesárea	179	79.6
N	Válido	225	Normal	41	18.2
	Omisso	0	Normal com auxílio de fórceps	5	2.2
			Total	225	100.0

Fonte: Brito, A. (2020)

5.1.6. Consumo de cigarros durante a gestação dos respondentes deste estudo

É sabido que fumar durante a gravidez pode causar danos ao feto e seu consumo é um fator de risco que se correlaciona com o baixo peso ao nascer (KATAOKA et al., 2018). Porém, são poucas, ou fracas, as evidências que correlacionam risco maior para o TEA em filhos de mães fumantes ativas ou passivas (Ng et al., 2017). No nosso estudo, verificamos que houve um consumo maior de cigarro entre as mães do G-C, se comparadas aos G-TEA e G-TEAL, revelando que 5.1% das mães do G-C relataram ter fumado durante toda a gestação, contra 3.9% no G-TEA e apenas 0.4% das mães do G-TEAL (Tabela 7).

Tabela 7. Dados sobre o consumo de cigarro durante a gestação referidos pelos respondentes deste estudo

G-C			N	%	
Cigarro durante a gravidez			1º Trimestre	10	2.5
N	Válido	408	2º Trimestre	3	.7
			3º Trimestre	0	.0
	Omisso	0	Fumou durante toda a gestação	21	5.1
			Não fumou	374	91.7
			Total	408	100.0

G-TEA			N	%	
Cigarro durante a gravidez			1º Trimestre	49	2.3
N	Válido	2141	2º Trimestre	1	.0
			3º Trimestre	7	.3
	Omisso	0	Fumou durante toda a gestação	83	3.9
			Não fumou	2001	93.5
			Total	2141	100.0
G-TEAL			N	%	
Cigarro durante a gravidez			1º Trimestre	7	3.1
N	Válido	225	2º Trimestre	0	.0
			3º Trimestre	0	.0
	Omisso	0	Fumou durante toda a gestação	1	.4
			Não fumou	217	96.4
			Total	225	100.0

Fonte: Brito, A. (2020)

5.1.7. Problemas gastrointestinais e distúrbios alimentares referidos pelos respondentes deste estudo

Problemas gastrointestinais são frequentemente relatados por pais ou responsáveis de pessoas com TEA (DE LA TORRE-UBIETA et al., 2016; VORSTMAN, 2017). No nosso trabalho, corroborando com a literatura, os grupos TEA relataram uma maior frequência de problemas gastrointestinais que o G-C, como vemos na Tabela 8.

Tabela 8. Problemas gastrointestinais referidos pelos respondentes deste estudo

TIPO DE PROBLEMA	Refluxo	Cólicas intestinais	Dificuldade para engolir	Flatulência (excesso de gases)	Constipação (Prisão de ventre, Ressecamento)
G-TEA	10.09%	7.38%	4.72%	18.31%	25.41%
G-TEAL	10.67%	9.78%	4.00%	19.11%	24.00%
G-C	6.13%	2.21%	1.23%	5.88%	11.52%
TIPO DE PROBLEMA	Sempre alterna entre diarreia e ressecamento	Diarreia frequente	Dores de estômago	Apresenta outros problemas não listados aqui	Não sei responder

G-TEA	7.89%	6.78%	5.04%	3.13%	3.08%
G-TEAL	9.78%	10.22%	4.44%	3.56%	0.00%
G-C	1.96%	1.47%	1.23%	2.70%	1.72%

Fonte: Brito, A. (2020)

O mesmo tipo de resultado foi observado em relação a problemas alimentares com o G-TEA e G-TEAL relatando maior frequência de distúrbios alimentares em relação ao G-C, como vemos na Tabela 9.

Tabela 9. Problemas com alimentação referidos pelos respondentes deste estudo

COMO SE ALIMENTA	<i>Parece não sentir fome ou parece sentir pouca fome</i>	<i>Alimentação compulsiva (come o tempo inteiro e parece ter mais fome que o normal)</i>	<i>Alimenta-se mal, pois só quer um ou dois tipos de alimentos não saudáveis em todas as refeições (exemplo: bolachas, pães etc.)</i>	<i>Alimentação restritiva devido a dietas, alergias, intolerâncias etc.</i>	<i>Outro não especificado aqui</i>
G-TEA	8.83%	23.35%	17.09%	6.31%	3.32%
G-TEAL	7.96%	20.35%	16.37%	7.08%	2.65%
G-C	5.39%	5.64%	6.13%	1.96%	1.72%
COMO SE ALIMENTA	<i>Alimentação seletiva, mas saudável</i>	<i>Alimenta-se normalmente e não tem restrições ou seletividade. Come como qualquer outra criança</i>	<i>Só se alimenta com ajuda de alguém</i>	<i>Parece ter problemas com texturas, cores, cheiros etc.</i>	<i>Alimentação seletiva e pouco (ou nada) saudável</i>
G-TEA	32.41%	21.49%	9.39%	17.75%	11.63%
G-TEAL	32.30%	25.22%	9.73%	26.55%	0.00%
G-C	19.85%	63.24%	1.47%	5.64%	0.00%

Fonte: Brito, A. (2020)

5.2. Análise de Histórico Familiar e Exposição Ambiental dos respondentes deste estudo

5.2.1. Resultados para HF

Para análise de HF e Exposição Ambiental, excluimos o G-C e, dos 2141 participantes, 891 puderam ser analisados após exclusão de respostas incongruentes.

A Figura 8 nos mostra exemplos de frequências das classes de alguns transtornos psiquiátricos.

Figura 8 - Gráficos de barras de alguns transtornos psiquiátricos

Continuação da Figura 8 - Gráficos de barras de alguns transtornos psiquiátricos

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Análises feitas com respostas de 891 participantes sobre transtornos psiquiátricos, sendo Hiperatividade (Hiper), Esquizofrenia (Esquiz), Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Depressão (Depre), Transtorno de Ansiedade (Ans), Caso de Suicídio ou tentativa de Suicídio (Sui), Transtorno de Déficit de Atenção (TDA), Transtorno Bipolar (TB), Síndrome do Pânico (Panico), Tiques (Tique) e Outros.

5.2.1.1. Resultado da Análise de agrupamentos de perguntas

Após análise das variáveis, agrupamos perguntas sobre Histórico de Transtornos Psiquiátricos (HTP) e Histórico de Transtornos Neurológicos (HTN). O *cluster* na Figura 9, nos mostra um agrupamento de Transtornos Psiquiátricos de um lado, e de Transtornos Neurológicos de outro, formando assim, dois grupos distintos, mas interligados.

Figura 9 – Cluster de análises feitas a partir de um agrupamento de perguntas sobre HTP e HTN

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Análises feitas a partir de um agrupamento de perguntas sobre transtornos psiquiátricos e neurológicos, sendo Transtorno Bipolar (TB), Transtorno de Ansiedade (ANS), Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Caso de Suicídio ou tentativa de Suicídio (Sui), Depressão (Depre), Síndrome do Pânico (Panico), Tiques (Tique), Outros, Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), Hiperatividade (Hiper), Transtorno de Déficit de Atenção (TDA), Alzheimer (Alz), Parkinson (Park), Síndrome de Down (Down), Esquizofrenia (Esq), Epilepsia (Epi), Deficiência Intelectual Sem Outra Especificação (DISOE) e Deficiência Intelectual (DI).

5.2.1.2. Resultado de MCA

Os dados para HF foram realizados com variáveis dicotômicas. A Figura 10, nos mostra que pela regra do cotovelo apenas duas dimensões seriam importantes, e mostra, também, a explicação da inércia por cada dimensão formada. A primeira dimensão explica quase 20% da inércia dos dados e a segunda, em torno de 8%.

Figura 10. Dimensões das variáveis relacionadas ao HF

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Dimensões após análise de MCA sobre HF. As dimensões 1 e 2 se mostram mais relevantes para nossos estudos, com 17,7% na Dimensão 1, e 8,1% na Dimensão 2.

A Figura 11, nos mostra as variáveis em relação à primeira e segunda dimensões, evidenciando que HTP se relaciona com o eixo 1, e HTN, com eixo 2, com exceção de Esquizofrenia, a qual se mostrou mais próxima a HTN.

Figura 11. MCA de variáveis relacionadas ao HF

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: O HF ficou dividido entre os dois eixos, sendo que HTP contribui mais para a Dimensão 1, e HTN contribui mais para a Dimensão 2.

As Figuras 12 e 13 abaixo mostram a contribuição das variáveis para a dimensão 1 e 2. A linha vermelha mostra o nível de significância estabelecido.

Figura 12. Contribuições das variáveis de transtornos psiquiátricos para Dimensão 1

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: As barras mostram a contribuição de cada variável para a Dimensão 1. O nível de significância foi estabelecido pela linha vermelha. As variáveis presentes na figura são Transtorno de Ansiedade (Ans), Transtorno de Déficit de Atenção (TDA), Hiperatividade (Hiper), Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Transtorno Bipolar (TB), Depressão (Depre), Síndrome do Pânico

(Pânico), Tiques (Tique), Deficiência Intelectual (DI), Deficiência Intelectual Sem Outra Especificação (DISOE), Caso de Suicídio ou tentativa de Suicídio (Sui), Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e Esquizofrenia (Esq).

Figura 13. Contribuições das variáveis de transtornos psiquiátricos e neurológicos para Dimensão 2

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: As barras mostram a contribuição de cada variável para a Dimensão 2. O nível de significância foi estabelecido pela linha vermelha. As variáveis presentes na figura são Deficiência Intelectual Sem Outra Especificação (DISOE), Deficiência Intelectual (DI), Epilepsia (Epi), Síndrome de Down (Down), Esquizofrenia (Esq), Hiperatividade (Hiper), Alzheimer (Alz), Parkinson (Park), Transtorno de Déficit de Atenção (TDA), Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Transtorno de Ansiedade (Ans).

A Figura 14 mostra que em nossa população existem 03 grupos com TEA com perfis muito diferentes, sendo um grupo sem HF relacionado, ou seja, não há casos de HTP e HTN na família; um outro grupo com HTP e, ainda, um terceiro grupo com HTN. De maneira consistente com as análises anteriores, Esquizofrenia ainda se manteve junto do grupo HTN.

Figura 14. MCA das dimensões de HTP, HTN e HF dos respondentes deste estudo

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Nesta MCA, binarizamos as respostas sobre HTP e HTN, sendo 0 equivalente a “sem casos na família”, e 1 equivalente a “presença de casos na família”. Os fatores de HTN contemplados nesse estudo foram Síndrome de Down (Down), Deficiência Intelectual Sem outra Especificação (DISOE), Deficiência Intelectual (DI), Esquizofrenia (Esq), Epilepsia (Epi), Parkinson (Park) e Alzheimer (Alz). Já os fatores de HTP contemplados nesse estudo foram Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), Depressão (Depre), Síndrome do Pânico (Panico), Transtorno de Ansiedade (Ans), Transtorno de Déficit de Atenção (TDA), Hiperatividade (Hiper), Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Transtorno Bipolar (TB), Transtorno de Tique (Tique) e Caso de suicídio ou tentativa de suicídio (Sui). A figura nos mostra claramente que podemos discriminar 3 grupos muito diferentes, mas relacionados entre si, sendo um grupo sem HF (todos posicionados próximos a 0 entre os eixos), outro com HTP e um terceiro com HTN, sendo que TEA se mostra um pouco mais isolado, mas próximo ao HTP e Esquizofrenia presente em HTN.

5.2.2. Resultados para exposição ambiental

5.2.2.1. Resultados para exposição a diferentes fatores associados a estresse emocional

Aqui foram considerados 1816 participantes que possuíam informações para todas as perguntas usadas. Considerando a presença de quadro depressivo na gestação, foram feitas perguntas diretas como “Em relação à Depressão, como a mãe se sentiu durante a gravidez?”, com as alternativas “Sentiu que ficou muito deprimida”, “Sentiu-se pouco deprimida, mas devido às preocupações normais da gestação”, “Não foi afetada de forma alguma por depressão durante essa gravidez” ou “Não sei responder”. Além disso, foram feitas perguntas independentes levando

em consideração os sintomas que denotam Depressão, como Tristeza, Ansiedade, Crises de choro, Perda de Interesse, Irritabilidade, Distúrbios do Sono, Excesso ou falta de apetite, Sentimento de Culpa ou Pensamentos de Morte. Os resultados dessas análises estão na Figura 15.

Figura 15. Análise dos sintomas que denotam Depressão mencionados pelos respondentes deste estudo

Continuação da Figura 15. Análise dos sintomas que denotam Depressão mencionados pelos respondentes deste estudo

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Foram feitas perguntas para saber se durante a gestação a mãe teve sintomas relacionados a quadro de Depressão, como, se sentiu tristeza (STristeza), Ansiedade (SAnsied), se chorou (SChoro), se teve insônia (SIinsonia), se teve perda do apetite (SApetite), se teve depressão durante a gestação (DepreGest), se teve sentimento de culpa (SCulpa), se se sentiu desmotivada (SDesmot), se sentiu Irritabilidade (SIrritab) e se teve sentimento de morte (SMorte).

Além da Depressão, avaliamos outros fatores associados com estresse durante a gestação. Para tanto, fizemos uma pergunta direta sobre estresse emocional e perguntas sobre alguns eventos que possam ser considerados como fatores de estresse para algumas pessoas, especialmente na gravidez, como se a mãe enfrentou algum problema como perda de emprego por parte dela ou do parceiro, estresse por ter que mudar de casa, se enfrentou problemas financeiros, se perdeu algum ente querido, se morou sozinha, se teve problemas com a justiça, se passou por alguma catástrofe, se foi assaltada, se presenciou algum assalto ou crime e como era a segurança do local em que morava durante a gestação.

É sabido que enfrentar problemas como os relatados acima, ou similares, podem desencadear estresse, o que pode vir a prejudicar a saúde da gestante. Na Figura 16, podemos observar gráficos de frequência para diferentes perguntas.

Figura 16. Análise dos sintomas de estresse durante a gestação mencionados pelos respondentes deste estudo

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Foram feitas perguntas para saber se durante a gestação a mãe teve sintomas que levassem a um quadro de estresse. Para tanto, foram considerados como eventos desencadeadores perda de emprego da mãe ou do parceiro (EEmpr e EEmprC), perda de algum ente querido (EMorte), problemas financeiros (EPobre), estresse por ter que mudar de casa (ECasa), se passou por alguma catástrofe (ECatastrofe), se a mãe morou sozinha (ESozinha), se teve problemas com a justiça (EJust), se foi assaltada (EAssalto), se presenciou algum crime (ECrime) e como era a segurança do local em que morava durante a gestação (Seguranca). Os níveis zero refletem negativa do fator questionado e os níveis 1, 2 e 3 refletem de forma crescente a presença do fator, logo maior nível de estresse. Para as variáveis Segurança Local, quantificamos a sensação de insegurança do respondente. O último gráfico (Seguranca), o nível zero significa que o respondente não teve sensação de insegurança, e os níveis 1, 2 e 3 indicam maior sensação de insegurança.

Sofrer agressão durante a gestação também é um fator de estresse, portanto consideramos que seria importante observar esse fator com mais atenção em nosso grupo. Então, formulamos perguntas específicas para isso, questionando se a gestante foi agredida psicologicamente por um parceiro, familiar ou outro (APsiPar, APsiFam, APsiOut, respectivamente); se a gestante foi agredida fisicamente por um parceiro, familiar ou outro (AFisiPar, AFisiFam, AFisiOut, respectivamente); se a gestante foi agredida sexualmente por um parceiro, familiar ou outro (ASexPar, ASexFam, ASexOut, respectivamente); ou verbalmente pelo parceiro, por um familiar ou por outras pessoas (AVerPar, AVerFam, AVerOut, respectivamente). Nossos resultados revelaram que a maioria dos respondentes não apresentaram exposição a agressão, com apenas uma pequena exposição se analisarmos todas as perguntas conjuntamente, formando um fator aqui chamado de “Agressão Geral” (Figura 17).

Figura 17. Análise de tipos de agressão sofrida durante a gestação referidas pelos respondentes deste estudo

Continuação Figura 17. Análise de tipos de agressão sofrida durante a gestação referidas pelos respondentes deste estudo

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: A avaliação relacionada a sofrimento de algum tipo de agressão durante a gestação levou em consideração agressão psicológica, física, sexual ou verbal por parte do parceiro, por um familiar ou por outras pessoas. Os níveis para estes dados vão de 0 a 5, onde 0 representa nenhuma agressão e de 1 a 5 níveis que denotam alguma agressão, sendo 5 o nível mais forte. Ao juntarmos todos os dados sobre Agressão em um mesmo grupo, nomeamos este novo grupo como AGer (Agressão Geral), por parte de um parceiro (AGerPar), por parte de um familiar (AGerFam) ou por parte de outro (AGerOut), e avaliamos os níveis de 0 a 3, sendo 0 para nenhuma Agressão sofrida por parte de um parceiro, familiar ou outro; e 1 e 3 alguma agressão sofrida.

5.2.2.1.A Resultados de análises de agrupamentos de perguntas relacionadas à Depressão, Exposição a estressores e Agressão

De acordo com a proposta do nosso estudo, foi feita uma análise de agrupamentos com todas as perguntas relacionadas à Depressão, a fatores estressantes e a Agressão para avaliarmos o agrupamento destas. Foi possível

observar dois grandes agrupamentos de variáveis, um relacionado à depressão e outro a fatores de estresse e agressão.

Figura 18 – Cluster das variáveis de Agressão, Exposição a estressores e Depressão

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: As variáveis sobre Agressão levaram em conta o sofrimento por algum tipo de agressão durante a gestação, levando em consideração agressão psicológica, física, sexual ou verbal por parte do parceiro, por um familiar ou por outras pessoas. Em relação à Exposição a Estressores, avaliamos situações que a mãe tenha enfrentado durante a gestação, como Estresse durante a Gestação (EGest), Pensamentos de Morte ou Suicídio (EMorte), se a mãe foi Assaltada (EAssalto), se a mãe passou por alguma catástrofe climática (ECatastrofe), se a mãe presenciou algum assalto ou crime (ECrime), se o companheiro da mãe perdeu o emprego (EEmprC), se a mãe mudou de casa (ECasa), se o companheiro ou parente muito próximo da mãe teve problemas com a justiça (EJust), se a mãe morou sozinha durante a gestação (ESozinha), se a mãe perdeu ou mudou de emprego (EEmpr) ou se a mãe passou por dificuldades financeiras (EPobre). Para Depressão, levamos em conta se a mãe relatou ter tido Depressão durante a gestação (DepreGest) ou se teve sentimentos que denotam Depressão, como excesso ou falta de apetite (SApetite), se teve perda de interesse por atividades diárias (SDesmot), se teve distúrbios do sono, como insônia ou sonolência exagerada (SInsonia), se se sentiu ansiosa (SAnsied), se se sentiu irritada (SIrritab), se se sentiu triste (STristeza), se teve crises de choro (SChoro), se teve sentimento de culpa (SCulpa) ou se morreu algum parente ou amigo muito próximo da mãe (SMorte).

S = sentimento

5.2.2.1.B MCA de perguntas relacionadas à Depressão, Estressores e Agressão

Como podemos observar na Figura 19, as perguntas relacionadas a sintomas de Depressão e a pergunta direta sobre Depressão durante a gestação foram agrupadas entre elas, como era de se esperar. Interessante observar, que perguntas de exposição a estressores durante a gestação também se agruparam entre si, porém mais próximas de zero, demonstrando uma menor contribuição. As perguntas sobre Agressão também ficaram agrupadas, tendendo a formar dois *clusters*.

Figura 19. Análise de perguntas que denotam Depressão, de exposição a fatores Estressantes e de Agressão sofrida durante a gestação pelos respondentes deste estudo

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Nesta MCA, avaliamos os níveis de Estresse, Depressão e Agressão dos respondentes deste estudo e percebemos que os fatores sobre Agressão Geral por parte de um parceiro (AGerPar), por parte de um familiar (AGerFam) ou por parte de outro (AGerOut) se aproximaram muito dos fatores de situações estressantes durante a gestação. Para este fator, perguntamos sobre Estresse por ter perdido um ente querido (EMorte), se passou por alguma catástrofe (ECastrofe), se ela ou alguém próximo teve problemas com a justiça (EJust), como é a segurança do local em que mora (Seguranca), se foi assaltada durante a gestação (EAssalto), se presenciou algum crime (ECrime), se mudou de casa (ECasa), se mudou de emprego (EEmpr), se o companheiro perdeu o emprego (EEmprC), se passou por alguma dificuldade financeira (EPobre) e se morou sozinha (ESozinha). Estes fatores ficaram mais próximos a zero, demonstrando pequena contribuição. Depressão durante a Gestação (DepreGest) e Sentimentos que denotam Depressão (SMorte, SApetite, SIsonia, SDesmot, SAnsiedade, SCulpa,

STristeza, SChoro, SIrritab) ficaram agrupados mostrando grande coocorrência de respostas assim como ocorreu com os fatores sobre Agressão Física (AFis), Agressão Sexual (ASex), Agressão Verbal (AVer) e Agressão Psicológica (APsi) por parte de um parceiro, familiar ou outro.

Na figura 20, podemos observar que as mesmas variáveis contribuem igualmente para as duas dimensões, ou seja, não podemos dizer por esta análise que as perguntas formam dimensões separadas, mas sim, que todas contribuem para caracterizar o estresse emocional.

Figura 20 - Comparação da contribuição das variáveis para a Dimensão 1 e Dimensão 2

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Contribuição das variáveis para Dimensão 1 e 2, sendo Agressão Sexual por parte de um Familiar (ASexFam_5), A Sexual por parte de Outro (ASexOut_5), Agressão Física por parte de uma Familiar (AFisFam_5), Agressão Física por parte do Parceiro (AFisPar_5), Agressão Sexual por parte de um Parceiro (ASexPar_5), Agressão Física por parte de Outro (AFisOut_5), Agressão Verbal por parte de Outro (AVerOut_5), Agressão Psicológica por parte de Outro (APsiOut_5), Agressão Verbal por parte de um Familiar (AVerFam_5), Agressão Psicológica por parte de um Familiar (APsiFam_5), Sentimento de Tristeza (STristeza_3), Depressão na Gestaço (DepreGest_2), Se teve crises de Choro (SChoro_3), Sentimento de Culpa (SCulpa_3), Se se sentiu Irritada (SIrritab_3), se se sentiu Ansiosa (SAnsied_3), se se sentiu Insnia (SInsonia_3), se se sentiu Triste (STristeza_0), Estresse durante a Gestaço (EGest_2), se se sentiu Desmotivada (SDesmot_3), Excesso ou falta de Appetite (SApetite_3), se se sentiu (Irritada SIrritab_0), Pensamentos de Morte ou suicdio (SMorte_3),

5.2.2.2. Resultados para exposição a fatores socioeconômicos e exposição ambiental a químicos e biológicos durante a gestação

5.2.2.2.A Gráficos de frequência

Na Figura 21, observamos a contribuição de algumas variáveis referentes à exposição a fatores socioeconômicos e problemas na gestação. Algumas variáveis, como Trabalho do Pai (TrabalhoPai), para fatores socioeconômicos, e Hipertensão e Eclâmpsia (HiperEcl), para problemas na gestação, parecem contribuir pouco para nossos resultados.

Figura 21 – Frequência nas variáveis relacionadas a fatores socioeconômicos e a problemas na gestação

Continuação da Figura 21 – Frequência nas variáveis relacionadas a fatores socioeconômicos e a problemas na gestação

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Exposição a fatores socioeconômicos, como Renda da Casa (CasaRenda), Escolaridade da Mãe (EscolaMae), Escolaridade do Pai (EscolaPai), Trabalho do Pai (TrabalhoPai) e Trabalho da Mãe (TrabalhoMae). Exposição a outros fatores, como Infecção durante a Gestação (InfGest), se a mãe fez Pré-Natal (PreNatal) e se teve Hipertensão ou Eclâmpsia (HiperEcl).

5.2.2.2.B Agrupamento

Na Figura 22, fizemos um agrupamento das variáveis relacionadas a fatores ambientais, a fatores socioeconômicos, a problemas na gestação e à exposição a infecções e drogas na gestação. Algumas variáveis, como as relacionadas à exposição ambiental a químicos e biológicos, não se mostraram tão relevantes como Problemas na Gestação, fatores emocionais e fatores socioeconômicos.

Figura 22 – Cluster de variáveis relacionadas a fatores ambientais, socioeconômico, exposição a infecções, problemas na gestão e drogas

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Cluster das variáveis Trabalho da Mãe (TrabalhoMae), Escolaridade do Pai (EscolaPai), Renda da Casa (CasaRenda), Escolaridade da Mãe (EscolaMae), se a mãe ingeriu bebida alcoólica durante a gestação (Alcool), se teve alguma patologia descrita no TORCH (TORCH), se teve problemas de Tireoide (Tireoide), se fumou durante a gestação (Fumo), se fez Pré-Natal (PreNatal), qual a idade da mãe durante essa gestação (IdadeGestMae), se tomou medicação durante a gestação (DrogaGest), qual a idade do pai durante essa gestação (IdadeGestPai), se fumou maconha durante essa gestação (Maconha), se foi exposta a algum produto tóxico durante a gestação (Toxico), se teve alguma infecção durante a gestação (InfGest), se teve outros problemas na gestação (ProbGest), se teve Hipertensão ou Eclâmpsia (HiperEcl), se teve diabetes gestacional (DiabetesGest), se engordou mais de 12 quilos durante a gestação (Engordou), Trabalho do Pai (TrabalhoPai), e estado emocional da mãe (EstadoMae).

5.2.2.2.C MCA de problemas gestacionais e fatores socioeconômicos

Foram usados dados dicotômicos na MCA apresentada na Figura 23. Como podemos observar, existem duas dimensões uma relacionada com problemas gestacionais e outra com fatores socioeconômicos.

Figura 23. Análise de fatores de Problemas na Gestação e fatores Socioeconômicos dos respondentes

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: As variáveis relacionadas ao período de gestação, como uso de cigarro (fumo), idade parental, se a mãe engordou mais de 12 quilos, se consumiu álcool, se fumou maconha, se teve problemas de tireoide, se teve alguma patologia presente no TORCH, se fez pré-natal, se teve infecções durante a gestação (infecção urinária, gripe ou resfriado, infecção na garganta, infecção nas gengivas, infecção vaginal, infecção intestinal, HIV, sífilis, Zika, dengue, hepatite B, outra infecção não listada no questionário), mais variáveis relacionadas a dados socioeconômicos, como renda da casa, escolaridade e empregabilidade dos pais, formaram dois eixos de FR.

5.2.3. Análise de cluster dos fatores ambientais usando dados ordinais originais das variáveis excluindo exposição a fatores estressores específicos

Na Figura 24, podemos observar dois grandes grupos, sendo o primeiro com Fatores Socioeconômicos e o segundo separado em dois grupos: um com Estresse Emocional (Depressão e Agressão) e outro com Problemas Gestacionais.

Figura 24. Cluster de Fatores Socioeconômicos, Estresse Emocional e Problemas Gestacionais

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: variáveis analisadas: Trabalho da mãe (TrabalhoMae), Escolaridade da Mãe (Escola Mae), Renda da Casa (CasaRenda), escolaridade do Pai, (EscolaPai), Agressão Geral sofrida por um Familiar (AGERFam), Agressão Geral sofrida por Outro (AGEROut), Nota emocional auto-atribuída pela Mãe (NotaEmocao), Depressão durante a Gestação (DepreGest), Estresse durante a Gestação (EGest), Trabalho do Pai (TrabalhoPai), se ingeriu Álcool durante a gestação (Alcool), se fumou cigarros durante a gestação (Fumo), se fumou maconha durante a gestação (Maconha), se fez Pré-Natal (PreNatal), se Engordou mais de 12 quilos (Engordou), se teve problemas de Tireoide (Tireoide), se usou antidepressivos e outros remédios durante a Gestação (DrogaGest), se teve Infecções durante a Gestação (InfGest), se teve qualquer patologia relacionado ao TORCH (TORCH), se foi exposta a produtos Tóxicos durante a gestação (Toxico), o quanto se sentia segura onde morava durante a gestação (Seguranca), Idade da Mãe e do Pai durante essa gestação da pessoa com TEA (IdadeGestMae e IdadeGestPai), outros Problemas na Gestação (ProbGest), se teve Hipertensão ou Eclâmpsia (HiperEcl) e se teve Diabetes Gestacional (DiabetesGest).

5.2.4. Análise de fatores genéticos e ambientais

Usando todas as variáveis dicotômicas, fizemos uma análise de MCA para entender o relacionamento dos componentes de Genética x Ambiente.

Como pode ser observado na Figura 25, Genética e Exposição Ambiental representam dimensões diferentes. Importante notar que a Dimensão 1 pode ser interpretada como Ambiente, mas claramente, da esquerda para direita, estamos falando da ausência para a presença de sintomas depressivos e estresse emocional.

Na Dimensão 2, o HTP, sendo Pânico, Ansiedade e Depressão os mais importantes, forma a Dimensão Genética.

Figura 25 – MCA Genética x Ambiente

Fonte: Brito, A. (2020)

A Figura 26 nos mostra os pacientes mapeados na MCA. Como podemos observar, não existe separação de pacientes, mas sim distribuição destes ao longo dos dois eixos. Por outro lado, esta análise nos dá a opção de selecionar casos

específicos. Por exemplo, o paciente 81 tem HTP baixo e exposição ambiental alta, enquanto o paciente 355 tem HTP alto e exposição ambiental baixa.

Figura 26 – MCA Genética x Ambiente

Fonte: Brito, A. (2020)

Assim sendo, não podemos dividir nosso grupo em “mais afetados pelo ambiente” e “mais afetados por histórico familiar”, mas entender que temos um único grupo onde genética e ambiente interagem.

Figura 27. Relação entre os fatores relacionados ao TEA: ambientais e genética

Fonte: Brito, A. (2020)

Legenda: Ambiente e Genética interagem em pacientes do nosso grupo. Importante salientar que a “genética” foi considerada a partir do HF, e não de exames genéticos.

6. DISCUSSÃO

Os Transtornos do Espectro do Autismo são quadros complexos do neurodesenvolvimento com etiologias distintas e ainda pouco conhecidas. Com os progressos científicos acerca do TEA, antigas associações causais foram definitivamente estabelecidas como errôneas, como a teoria da “Mãe geladeira” (teoria que culpa a mãe do autismo do filho, alegando falta de amor) e das vacinas (NG et al., 2017; HERTZ-PICCIOTTO; SCHMIDT; KRAKOWIAK, 2017). A etiologia do TEA tem se pautado na investigação de fatores genéticos e ambientais, sendo a associação com a genética responsável pela maioria dos casos de TEA. Entretanto, os mecanismos neurobiológicos envolvidos nos diferentes tipos de autismo ainda permanecem sem explicação clara (DE RUBEIS et al., 2014; CLARKE, 2016; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017; MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017; VORSTMAN et al., 2017; BAIO et al., 2018; BAI et al., 2019).

Associações causais têm sido bem descritas e identificadas para os autismos síndrômicos, onde encontramos mutações em um gene específico caracterizando uma síndrome monogênica com um fenótipo associado a distúrbios e/ou comportamentos que explicam o quadro de um grupo acometido pela síndrome, como é o caso das Síndromes de Rett, X-Frágil, Phelan-McDermid entre outras (FERNANDEZ; SCHERER, 2017; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017). Entretanto, os autismos síndrômicos representam uma parcela menor no TEA, sendo necessários estudos que considerem a influência do ambiente (intra e extrauterino) e

a natureza poligênica do TEA, bem como variantes raras, padrões de herdabilidade, papel da cromatina entre outros mecanismos envolvidos (CLARKE, 2016; HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2017; VORSTMAN, 2017; MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017; BAIO et al., 2018; O'CONNELL et al., 2018; BAI et al., 2019).

Nesse estudo, buscamos inferir a relevância dos fatores genéticos relacionados ao TEA utilizando informações relativas ao HF de cada paciente, onde os respondentes forneceram dados sobre histórico de doenças e transtornos psiquiátricos e neurológicos dos familiares consanguíneos das pessoas com TEA. Da mesma maneira, buscamos informações sobre os agentes ambientais que poderiam contribuir para a manifestação do TEA em cada um dos respondentes, através de questões relacionadas a exposição ambiental, principalmente, na fase pré-natal.

A caracterização inicial do grupo estudado foi feita levando em consideração dados como a localização geográfica, o sexo, a idade e o grau de TEA. Os respondentes se distribuíam por todo território nacional, porém em maior número nas regiões Sul e Sudeste nos 3 grupos (G-TEA, G-TEAL e G-C), sempre com uma predominância para São Paulo. Entretanto, não é possível inferir com base nesses resultados que haja melhor capacidade diagnóstica ou mais casos de TEA nestes estados.

A distribuição por sexo no TEA aponta uma frequência de 4 meninos para cada menina, ou seja, cerca de 80% de meninos para cerca de 20% de meninas (FOMBONNE; QUIRKE; HAGEN, 2009; KIM, Y.S. et al., 2011; BAI et al., 2019). Nossos estudos corroboraram com os dados da literatura, sendo 81,4% meninos:18,6% meninas no G-TEA, 82,7% meninos:17,3%meninas no G-TEAL, enquanto o G-C teve a frequência de 52,7%meninos:47,3% meninas. Logo, nosso estudo manteve a média mundial de 4:1, mesmo considerando a possibilidade de que haja subdiagnóstico para as mulheres com TEA (LOOMES; HULL; MANDY, 2017).

No que se refere à idade dos respondentes deste estudo, houve equivalência da média de idade para os 3 grupos, tanto para meninos, quanto para meninas. Além disso, a maioria dos respondentes nasceu predominantemente após os anos 2000, mais precisamente de 2005 em diante, mas não é possível inferir se isso foi em decorrência de um aumento dos casos de TEA no Brasil, ou se houve mais casos diagnosticados, ao passo que se entende melhor o transtorno.

Para verificarmos a ocorrência dos diferentes graus de TEA em nosso grupo, optamos por deixar somente as opções “leve”, “moderado”, “severo” e “não sei responder”. Em nossa amostra, houve uma maior ocorrência de TEA de grau leve e moderado. O grau “severo” foi menos frequente, com 7,7% no G-TEA e 7,6% no G-TEAL. Novamente, baseado nestes dados, não é possível inferir se os graus “leve” e “moderado” são os mais frequentes na população brasileira.

Para avaliar os componentes de risco para o TEA no grupo estudado, buscamos verificar a presença de alguns fatores considerados relevantes na literatura. Alguns trabalhos sugerem que o tipo de parto pode influenciar para o TEA, associando o parto Cesariana com um aumento do risco para o transtorno, principalmente entre as semanas 36 a 42 (CURRAN et al., 2015; YIP et al., 2017). Entretanto, tais estudos carecem de mais dados que possam comprovar uma real relação causal (MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017). No nosso estudo, observamos que o parto Cesárea em relação ao parto vaginal, tanto no G-C, quanto nos G-TEA e G-TEAL, são mais frequentes. Porém, não é possível inferir se este pode ser considerado um fator relevante ou não para o risco do TEA. Se levarmos em consideração apenas nossos dados, é possível dizer que o tipo de parto não tem relevância para o risco do TEA. Entretanto, é importante salientar que no Brasil existe uma grande prevalência de parto Cesárea em relação ao parto vaginal, em especial nas regiões Sudeste, Sul e Central do país (OLIVEIRA et al., 2016), que foram as regiões com o maior número de respondentes do nosso trabalho. Como ainda não temos estudos de prevalência no Brasil, não é possível estabelecermos um aumento de casos devido a Parto Cesárea.

O fumo é um fator conhecido como interferente no desenvolvimento fetal, especialmente associado à restrição de crescimento do feto, culminando com baixo peso ao nascimento (KATAOKA et al., 2018). Ao analisarmos dados sobre uso de cigarros durante a gestação, percebemos que a maior parte das mães que fumaram durante toda a gestação pertencem ao G-C, com 5,1%, e não ao G-TEA. No grupo TEA, tivemos apenas 3,9% de mães que fumaram durante toda a gestação e somente 0,4% do G-TEAL relataram ter fumado durante toda a gestação. A relação do fumo com o TEA já foi sugerida, mas ainda não existe comprovação científica de que cigarro possa estar relacionado diretamente com um maior risco de TEA, sendo necessários estudos desenhados para esta finalidade (NG et al., 2017).

Outro ponto bastante referido como importante no TEA é a presença de problemas gastrointestinais e distúrbios alimentares. Ao longo do tempo, muitos estudos têm mostrado que, apesar de haver uma maior ocorrência desses quadros em pessoas com TEA, não há uma correlação causal ou ainda fortes evidências de que dietas possam atuar diretamente no TEA (DE LA TORRE-UBIETA et al., 2016; VORSTMAN, 2017). Do mesmo modo, há trabalhos que refutem ou mostrem que há pouquíssimas evidências de associação de TEA com problemas gastrointestinais (SATHE et al., 2017). Em função disso, buscamos caracterizar nosso grupo considerando sinais e sintomas referidos por esses pacientes.

Nosso estudo corrobora com os dados da literatura, mostrando que houve uma maior incidência de problemas gastrointestinais e distúrbios alimentares nos G-TEA e G-TEAL, se comparados ao G-C. Importante salientar que, frequentemente, pais de pessoas com TEA, e até mesmo médicos e nutricionistas, associam o TEA diretamente com problemas gastrointestinais, relatando como ocorrem disbioses e problemas na microbiota (GOLDANI et al., 2014; RODAKIS, 2015; WASILEWSKA; KLUKOWSKI, 2015). Há ainda quem defenda o uso de dietas SGSC (Sem Gluten/Sem caseína), dieta SGSCSS (Sem glúten/Sem caseína/Sem soja) ou ainda a dieta cetogênica para se tratar quadros de TEA (DOENYAS, 2019). Apesar disso, ainda não é possível afirmar que estas diferentes dietas produzem benefício, necessitando de mais estudos (WASILEWSKA; KLUKOWSKI, 2015; CASTRO et al., 2017) e, por se tratar de um espectro, provavelmente será importante considerar cada paciente em separado e, se for o caso, sugerir uma dieta personalizada para aqueles que apresentam problemas gastrointestinais ou seletividade alimentar.

A seguir, buscando atender aos objetivos do nosso trabalho, analisamos o HF dos respondentes, ressaltando histórico de doença pregressa nos familiares consanguíneos em relação a doenças e a transtornos psiquiátricos e neurológicos. Para tanto, os respondentes indicavam se tinham casos de doenças, síndromes ou transtornos na família que já foram relatadas como histórico familiar em trabalhos prévios. No nosso trabalho, todos os transtornos psiquiátricos que foram perguntados no questionário, como Depressão, TOC, Hiperatividade, Transtorno Bipolar, Tique e Pânico, por exemplo, foram mencionados por nossos respondentes. O mesmo ocorreu para os transtornos neurológicos, corroborando dados da literatura que mencionam alguma relação familiar de pacientes com Alzheimer, Parkinson, Down,

Epilepsia, DI e DISOE e casos de TEA (DE RUBEIS et al., 2014; DE LA TORRE-UBIETA et al., 2016; VORSTMAN, 2017). Nosso estudo não realizou análises genéticas dos grupos estudados, mas essa associação entre HTP, HTN e TEA provavelmente se deve ao compartilhamento de alguns componentes genéticos (DE RUBEIS et al., 2014; BRAINSTORM CONSORTIUM et al., 2018).

Nossas análises nos mostraram claramente que duas dimensões estavam relacionadas com o grupo TEA estudado, sendo que uma referia-se mais aos Transtornos Neurológicos e outra mais aos Transtornos Psiquiátricos (Figura 14). Curiosamente, após as nossas análises, a Esquizofrenia, a qual é considerada um transtorno psiquiátrico (OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016), se mostrou mais próxima da dimensão do grupo de doenças neurológicas.

Outro dado muito interessante gerado em nossas análises foi verificar que para algumas famílias havia a contribuição de apenas um dos dois grupos (Transtornos Neurológicos ou Transtornos Psiquiátricos), enquanto que para um terceiro grupo, tanto os Transtornos Neurológicos, quanto os Transtornos Psiquiátricos tinham a mesma contribuição, sendo impossível identificar qual dos dois tinha a maior contribuição nessas famílias. No nosso conhecimento, não existem trabalhos na literatura que tenham observado essas contribuições dos Transtornos Neurológicos ou Transtornos Psiquiátricos de maneira abrangente, considerando o HF de pacientes com TEA.

Além da contribuição genética observada através do HF, nosso trabalho também buscou relacionar a influência do ambiente considerando variáveis de exposição na gestação. Para tanto, levamos em consideração a exposição a diferentes fatores associados ao estresse emocional, considerando, inclusive, se houve exposição a fatores de agressão, exposição a estressores e depressão. Esses pontos foram levantados em função da experiência clínica prévia do grupo PROTEA, mostrando-se de fato relevantes em nossas análises, se transformando em um único grupo.

Em nossos estudos, consideramos também fatores socioeconômicos e as exposições a agentes biológicos considerados como influenciador ambiental para o TEA durante a gestação. Curiosamente, as variáveis relacionadas a exposição ambiental a fatores químicos e biológicos não se mostraram tão relevantes como

fatores emocionais, fatores socioeconômicos e problemas biológicos durante a gestação (sangramento, contração uterina e aborto).

Além das análises estatísticas sobre dados encontrados na literatura mundial, como os relatados acima, nossos estudos sobre HF mostraram uma forte associação com os Fatores Ambientais, sendo difícil fazer uma separação entre esses dois fatores. No caso dos indivíduos sem HF, tanto psiquiátrico, quanto neurológico, foi possível observar gradientes de exposição ambiental (figuras 18,19 e 20). Interessante notar que quando analisamos a contribuição genética e a ambiental juntos, aparentemente, a contribuição genética foi dada pelo histórico de transtornos psiquiátricos, como Pânico, Depressão, Ansiedade, TB e outros, e a contribuição ambiental ficou principalmente relacionada a sintomas depressivos e estresse emocional. Entretanto, a contribuição de cada um desses fatores deve ser observada de maneira individual caso seja necessário buscar inferir a possível etiologia do TEA em cada indivíduo.

Com este trabalho, podemos inferir que há relação das diferentes variáveis de HF e sua ligação à exposição da mãe a estressores emocionais e a outros fatores de risco relacionados ao TEA. As dimensões apresentadas através das análises estatísticas, nos mostraram que tanto HF, quanto fatores de risco ambiental contribuem para o quadro de cada indivíduo. Por fim, nosso trabalho trouxe de maneira inédita uma compilação de dados informativos sobre a população de TEA, relacionando fatores de risco genético provavelmente ligados tanto a Transtornos Psiquiátricos, quanto aos Neurológicos, e fatores de risco ambiental, considerando exposição a fatores biológicos, a fatores emocionais e socioeconômicos.

Com isso, fica evidente que não existem dois grupos separados, mas um único grupo onde HF e fatores de risco ambientais estão interligados de maneira única em cada indivíduo.

7. CONCLUSÕES

- Em nosso estudo, os fatores genéticos e os fatores ambientais estão presentes na população estudada e podem ser separados como dois componentes diferentes, cada um com dimensões próprias;
- Através de análise exploratória das variáveis e redução da dimensionalidade de dados, verificamos que transtornos psiquiátricos e neurológicos formam dois grupos distintos, mas interligados no histórico familiar;
- Através de análise exploratória das variáveis e redução da dimensionalidade de dados, verificamos que exposição ambiental (biológica), vulnerabilidade social e exposição ao estresse emocional formam clusters distintos, mas interligados;
- Alguns fatores ambientais mostrados como de risco na literatura, como fumo e parto cesárea, não se mostraram relevantes em nosso grupo estudado.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, J. H.; SLOME, C.; KOSOVSKY, C. Food frequency interview as an epidemiological tool. **American Journal of Public Health and the Nation's Health**, v. 53, n. 7, p. 1093–1101, 1963.
- ALLEN, J. et al. Early Postnatal Exposure to Ultrafine Particulate Matter Air Pollution: Persistent Ventriculomegaly, Neurochemical Disruption, and Glial Activation Preferentially in Male Mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 4, p. 939-945, 2014.
- APA, American Psychiatry Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5. 5th.ed. Washington: **American Psychiatric Association**, 2013.
- ASPERGER, H. 'Autistic psychopathy' in childhood. In U. Frith (Ed.), Autism and Asperger Syndrome. Cambridge: **Cambridge University Press**, p. 37-92, 1991.
- BAI, D. et al. Association of Genetic and Environmental Factors with Autism In A 5-Country Cohort. **JAMA Psychiatry**, 2019.
- BAIELI, S. et al. Autism and Phenylketonuria. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 33, n. 2, 2003
- BAIO, J. et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 67, n. SS-6, p.1–23, 2018.
- BALLABRIGA, M.C.J.; ESCUDÉ, R.M.C.; LLABERIA, E.D. Escala d'avaluació dels trests autistes (A.T.A.). Validez y fiabilidad de una escala para el examen de las conductas autistas. **Revista de Psiquiatria Infanto-Juvenil**, v. 4, p. 254-263, 1994.
- BARON-COHEN, S., ALLEN, J., GILLBERG, C. Can autism be detected at 18 months? The needle, the haystack, and the CHAT. **British Journal of Psychiatry**, v. 161, p. 839-843, 1992.
- BAUMAN, M. L. Medical comorbidities in autism: Challenges to diagnosis and treatment. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 3, p.320–327, 2010.
- BECERRA, T. A. et al. Ambient Air Pollution and Autism in Los Angeles County, California. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 3, p.380–386, 2013.
- BETT, et al. A Mouse Model of Timothy Syndrome: a Complex Autistic Disorder Resulting from a Point Mutation in Cav1.2. **North American Journal of Medicine & Science**, v. 5, n. 3, p. 135–140, 2012.

BLAYLOCK, R.L., STRUNECKA, A. Immune- glutamatergic dysfunction as a central mechanism of the autism spectrum disorders. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p.157-170, 2009.

BRAINSTORM CONSORTIUM et al. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. **Science**, v. 360, n. 6395, 2018.

BRENTANI, H. et al. Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 1, p.62-72, 2013.

BRITO, A. et al. Modeling Autism Spectrum Disorders with Human Neurons. **Cell Tissue Research**, v. 371, n.1, p.153-160, 2018.

BROEK, J. A. et al. Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins. **Molecular Autism**, v. 5, p.41, 2014.

CAGLAYAN, A.O. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 52, n. 2, p. 130–138, 2010.

CAMPISTOL, J. et al. Inborn error metabolic screening in individuals with nonsyndromic autism spectrum disorders. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v.58, p. 842, 2016.

CASTRO, K. et al. The effect of ketogenic diet in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 343–350, 2017.

CAWTHORPE, D. Comprehensive description of comorbidity for autism spectrum disorder in a general population. **Permanente Journal**, v. 21, p.16-88, 2017.

CLARKE, T.-K., et al. Common polygenic risk for autism spectrum disorder (ASD) is associated with cognitive ability in the general population. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 419–425, 2016.

COHEN, I.L., et al. Why are autism and the fragile-x syndrome associated? Conceptual and methodological issues. **American Journal of Human Genetics**, v. 48, p.195–202, 1991.

COSTALES, J.L.; KOLEVZON, A. Phelan-McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. **Neurotherapeutics**, v.12, n. 3, p. 620–630, 2015.

COURCHESNE, E. et al. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. **New England Journal of Medicine**, v. 318, p.1349–1354, 1988.

CURRAN, E.A., et al. Research Review: Birth by caesarean section and development of autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 56, p. 500-508, 2015.

DE LA TORRE-UBIETA, L., et al. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. **Nature Medicine**, v. 22, n.4, p.345–361, 2016.

DE RUBEIS, S., et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. **Nature**, v. 13, n. 515, p. 209-215, 2014.

DIETERT, R.R., DIETERT, J.M. Potential for early-life immune insult including developmental immunotoxicity in autism and autism spectrum disorders: focus on critical windows of immune vulnerability. **Journal of Toxicology and Environmental Health – part B Critical Reviews**, v. 11, n.8, p.660-680, 2008.

DOENYAS, C. Gut Microbiota, Inflammation, and Probiotics on Neural Development in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience**, v. 374, p. 271–286, 2018.

DYKENS, E.M. et al. Assessment of hyperphagia in prader-Willi syndrome. **Obesity**, v. 15, p. 1816–1826, 2007.

ELENA, G. et al. Prader-Willi Syndrome: Clinical aspects. **Journal of Obesity**, v. 2012, n. 473941, 2012.

FERNANDEZ, B.A.; SCHERER, S.W. Syndromic autism spectrum disorders: moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, p. 353–371, 2017.

FOMBONNE, E., QUIRKE, S.; HAGEN, A. Prevalence and interpretation of recent trends in rates of pervasive developmental disorders. **McGill Journal of Medicine**, v. 12, n. 2, p. 73, 2009.

GESCHWIND, D. H.; STATE, M. W. Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 11, p.1109–1120, 2015.

GOLDANI, A. A. et al. Biomarkers in autism. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, n. 100, 2014.

GRIFFITHS, K. K.; LEVY, R. J. Evidence of Mitochondrial Dysfunction in Autism: Biochemical Links, Genetic-Based Associations, and Non-Energy-Related Mechanisms. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

GRZADZINSKI, R., HUERTA, M., LORD, C. DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. **Molecular Autism**, v. 4, p.12, 2013.

GRZADZINSKI, R., DICK, C., LORD, C., BISHOP, S. Parent-reported and clinician-observed autism spectrum disorder (ASD) symptoms in children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): implications for practice under DSM-5. **Molecular Autism**, v.7, p.7, 2016.

GUEDES, N.P.S.; TADA, I.N.C. A Produção Científica Brasileira sobre Autismo na Psicologia e na Educação. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 31, n. 3, p. 303-309, 2015.

GUTHRIE, W., SWINEFORD, L.B., NOTTKE, C., WETHERBY, A.M. Early diagnosis of autism spectrum disorder: Stability and change in clinical diagnosis and symptom presentation. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 54, n. 5, p.582–590, 2013.

HARRELL, F.; CHARLES, D. Hmisc: Harrell Miscellaneous. **CRAN project**. [Online] 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>.

HERTZ-PICCIOTTO, I.; SCHMIDT, R.J.; KRAKOWIAK, P. Understanding environmental contributions to autism: Causal concepts and the state of science. **Autism Research**, v. 11, n. 4, p.554-586, 2017.

HOANG, N.; CYTRYNBAUM, C.; SCHERER, S.W. Communicating complex genomic information: A counselling approach derived from research experience with Autism Spectrum Disorder. **Patient Education and Counseling**, v. 101, n. 2, p.352-361, 2017.

HOFF, L. A.; ROSENBAUM, L. A victimization assessment tool: instrument development and clinical implications. **Journal of Advanced Nursing**, v. 20, n. 4, p. 627–634, 1994.

HOWES, O.D et al. Autism spectrum disorder: Consensus guidelines on assessment, treatment and research from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 3-29, 2018.

HROLFSDOTTIR, L. et al. Development of a dietary screening questionnaire to predict excessive weight gain in pregnancy. **Maternal & Child Nutrition**, v. 15, n. 1, 2019.

IOSSIFOV, I. et al. The contribution of *de novo* coding mutations to autism spectrum disorder. **Nature**, v. 515, n. 7526, p.216–221, 2014.

JINNAH, H. A.; SABINA, R. L., VAN DEN BERGHE, G. Metabolic disorders of purine metabolism affecting the nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 113, p. 1827–1836, 2013.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, v. 2, p.217-250, 1943.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses, 2017.

KATAOKA, M.C., et al. Smoking during pregnancy and harm reduction in birth weight: a cross-sectional study. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 18, n. 67, 2018.

KIM, K.C. et al. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. **Toxicology Letters**, v. 201, p. 137-42, 2011.

KIM, Y.S. et al. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. **The American Journal of Psychiatry**, v. 168, n.9, p.904–912, 2011.

LASALLE, J. M. Autism genes keep turning up chromatin. **OA autism**, v. 1, n. 2, p. 14, 2013.

LE, S.; JOSS, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, 2008.

LEVINE, S.Z. et al. Association of maternal use of folic acid and multivitamin supplements in the periods before and during pregnancy with the risk of autism spectrum disorder in offspring. **JAMA Psychiatry**, v. 75, p. 176–184, 2018.

LOOMES, R.; HULL, L.; MANDY, W.P.L. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 56, n. 6, p. 466–474, 2017.

LORD, C.; RUTTER, M.; LE COUTEUR, A. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 24, n. 5, p. 659–685, 1994.

LORD, C. et al. The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 30, n. 3, p. 205-23, 2000.

LOSSIE, A.C. et al. Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 38, n. 12, p. 834–845, 2001.

LOVAAS, OI. Behavioral treatment and normal educational and intellectual functioning in young autistic children. **Journal of Consultant and Clinical Psychology**, v. 55, n. 1, p. 3–9, 1987.

LUBS, H. A. A marker X chromosome. **American Journal of Human Genetics**, v. 21, n. 3, p. 231–244, 1969.

MAATZ, A., HOFF, P., ANGST, J. Eugen Bleuler's schizophrenia - a modern perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v.17, n. 1, p.43–49, 2015.

MANZATO, A. J.; SANTOS, A. B. A elaboração de questionários na pesquisa quantitativa. Departamento de Ciência de Computação e Estatística – IBILCE – UNESP. Disponível em http://www.inf.ufsc.br/~verav/Ensino_2012_1/elaboracao_questionarios_pesquisa_quantitativa.pdf. Acesso em 30 out. 2018

MARTELETO, M.R.F.; PEDROMÔNICO, M.R.M. Validity of Autism Behavior Checklist (ABC): preliminary study. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 27, n. 4, p. 295-301, 2005.

MODABBERNIA, A., VELTHORST, E., REICHENBERG, A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. **Molecular Autism**, v. 8, p.13, 2017.

MOYSÉS, G.L.R.; MOORI, R.G. Coleta de dados para a pesquisa acadêmica: um estudo sobre a elaboração, a validação e a aplicação eletrônica de questionário. In:XXVII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. **A engenharia que move a produção: um diálogo sobre integração, projeto e sustentabilidade**. Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 09 a 11 de outubro de 2007. Disponível em: http://abepro.org.br/biblioteca/ENESEP2007_TR660483_9457.pdf

MUSKENS, J. B., VELDERS, F. P., STAAL, W. G. Medical comorbidities in children and adolescents with autism spectrum disorders and attention deficit hyperactivity disorders: a systematic review. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 26, n. 9, p.1093–1103, 2017.

NAHAS, F. X.; GRAZIOSI, M. E. S.; LIEBANO, R. Metodologia Científica 1: parte 1. Biblioteca Virtual PAB. Profissionais da Atenção Básica. Especialização em Saúde da Família. São Paulo: **UniFESP; Una-SUS**, 2014. 08 p. – (Unidades de Metodologia Científica, 1). Disponível em: http://www.unasus.unifesp.br/biblioteca_virtual/pab/5/unidades_metodologia_TC/C/unidade19_parte1/unidade19_parte2.pdf>. Acesso em: 30 out. 2018

National Research Council. Educating Children with Autism. Washington, D.C: **The National Academy Press**, 2001.

NG, M. et al. Environmental factors associated with autism spectrum disorder: a scoping review for the years 2003–2013. **Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada : Research, Policy and Practice**, v. 37, n. 1, p.1–23, 2017.

O'CONNELL, K.S. et al. The genetic architecture of schizophrenia, bipolar disorder, obsessive-compulsive disorder and autism spectrum disorder. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 88, p.300-307, 2018.

OLIVEIRA, R.R., et al. Factors associated to caesarean delivery in public and private health care systems. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 5, p. 733-740, 2016.

OROZCO, J.S. et al. Metabolomics analysis of children with autism, idiopathic-developmental delays, and Down syndrome. **Translational Psychiatry**, v. 9, 2019.

OWEN, M. J.; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. Schizophrenia. **Lancet**, v. 388, n. 10039, p. 86–97, 2016.

PAGE, T; COLEMAN, M. Purine metabolism abnormalities in a hyperuricosuric subclass of autism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1500, n. 3, p. 291-296, 2000.

PERRIN, J.M. How Can Quality Improvement Enhance the Lives of Children with Disabilities? **Future Child**, v. 22, n. 1, p. 149- 168, 2012.

PETERS, S.U. et al. Autism in Angelman syndrome: Implications for autism research. **Clinical Genetics**, v. 66, p. 530–536, 2004.

PINTO, D.; DELABY, E.; MERICO, D.; et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. **American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 5, p. 677–694, 2014.

PORTER, F.D. Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, n. 6, p. 715-724, 2002.

R Core Team. A language and environment for statistical computing. **R Foundation for statistical computing**. Viena, Austria : s.n., 2019.

RICCIARDI, S. et al. CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1-PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. **Nature Cell Biology**, v. 14, p. 911–923, 2012.

ROBINS, D.L. et al. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: An initial study investigating the early detection of autism and pervasive developmental disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 31, p. 131-144, 2001.

RODAKIS, J. An n=1 case report of a child with autism improving on antibiotics and a father's quest to understand what it may mean. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, n. 26382, 2015.

RUDIE, J. D. et al. Autism-Associated Promoter Variant in MET Impacts Functional and Structural Brain Networks. **Neuron**, v. 75, n. 5, p.904–915, 2012.

SANDIN, S. et al. The familial risk of autism. **JAMA**, v. 311, n. 17, p.1770-1777, 2014.

SATHE, N., et al. Nutritional and dietary interventions for autism spectrum disorder: a systematic review. **Pediatrics**, v. 139, n. 6, 2017.

SEALEY, A.L. et al. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. **Environment International**, v. 88, p.288-298, 2016.

SEBAT, J. et al. Strong Association of *de Novo* Copy Number Mutations with Autism. **Science**, v. 316, n. 5823, p.445–449, 2007.

SURÉN, P. et al. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. **JAMA**, v. 309, n. 6, p. 570–577, 2013.

TAYLOR, M. J., et al. Etiological influences on the stability of autistic traits from childhood to early adulthood: evidence from a twin study. **Molecular Autism**, v. 8, n. 5, 2017.

THOMPSON, M. et al. Measuring intimate partner violence victimization and perpetration: a compendium of assessment tools. **National Center for Injury Prevention and Control of the Centers for Disease Control and Prevention**: Atlanta, Georgia, 2006.

TRAZZI, S. et al. CDKL5 protein substitution therapy rescues neurological phenotypes of a mouse model of CDKL5 disorder. **Human Molecular Genetics**, v. 27, p. 1572–1592, 2018.

TRILLINGSGAARD, A.; ØSTERGAARD, J.R. Autism in Angelman syndrome: An exploration of comorbidity. **Autism**, v. 8, p. 163–174, 2004.

UDDIN, L.Q. The self in autism: An emerging view from neuroimaging. **Neurocase**, v. 17, n. 3, p.201–208, 2011.

URSINI, G. et al. Convergence of placenta biology and genetic risk for schizophrenia. **Nature Medicine**, v. 24, p. 792-801, 2018.

VAN DRENT, A. Rethinking the origins of autism: Ida Frye and the unraveling of children's inner world in the Netherlands in the late 1930s. **Journal of the History Behavioral Sciences**, v. 54, p.25–42, 2018.

VELINOV, M. Genomic Copy Number Variations in the Autism Clinic-Work in Progress. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. 57, 2019.

VIGNOLI, A. et al. Autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: Searching for risk markers. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10, p. 1–9, 2015.

VISMARA, L.A., ROGERS, S.J. Behavioral treatments in autism spectrum disorder: what do we know? **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 6, p. 447-68, 2010.

VOLK, H. E. et al. Residential Proximity to Freeways and Autism in the CHARGE Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 6, p.873–877, 2011.

VOLKMAR, F. R. et al. An evaluation of the Autism Behavior Checklist. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 18, n. 1, p. 81–97, 1988.

VOLKMAR, F.R.; CHAWARSKA, K. Autism in infants: an update. **World Psychiatry**. v. 7, n. 1, p. 19–21, 2008.

VORSTMAN, J.A.S. et al. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 6, p. 362-376, 2017.

WASILEWSKA, J.; KLUKOWSKI, M. Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks - a possible new overlap syndrome. **Pediatric Health, Medicine and Therapeutics**, v. 6, p. 153-166, 2015.

WEISS, L. et al. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. **Nature**, v. 461, p. 802–808, 2009.

WEN, Z. et al. Identification of the Genetic Cause for Childhood Disintegrative Disorder by Whole-Exome Sequencing. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 251–254, 2017.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Nova Iorque : **Springer-Verlag**, 2016.

WICKHAM, H.; HESTER, J.; CHANG, W. devtools: **Tools to Make Developing R Packages Easier**. 2019.

WING, L., The Definition and Prevalence of Autism: A Review. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 2, n. 2, p. 61-74, 1993.

WOLFENDEN, C.; WITTKOWSKI, A.; HARE, D.J. **Journal of Autism and Developmental Disorder**, v. 47 n. 11, p. 3620-3633, 2017.

WONG, H.; HOEFFER, C. Maternal IL-17A in autism. **Experimental Neurology**. v. 299, p. 228–240, 2018.

XU, W.; YAO, J.; LIU, W. Intervention Effect of Sensory Integration Training on the Behaviors and Quality of Life of Children with Autism. **Psychiatria Danubina**, v. 31, n. 3, p. 340–346, 2019.

YIP, B. et al. Caesarean section and risk of autism across gestational age: a multi-national cohort study of 5 million births. **International Journal of Epidemiology**, v. 46, n. 2, p. 429–439, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Ficha de Anamnese do “Projeto A Fada do Dente”

PROJETO A FADA DO DENTE

Ficha de Cadastro da Criança

Nome: _____ Sexo: ☐ F ☐ M

Data de Nascimento: _____ Etnia: _____ Naturalidade: _____

Nome da Mãe: _____ Data de Nascimento: _____

E-mail para contato: _____ Telefone (cel): _____

Nome do Pai: _____ Data de Nascimento: _____

E-mail para contato: _____ Telefone (cel): _____

Endereço residencial (rua, número, bairro, cidade, estado, CEP): _____

Tem diagnóstico de autismo? ☐ N ☐ S Se sim, tipo de autismo: _____

Com que idade começou apresentar algum sintoma? _____ Com que idade foi diagnosticado? _____

Nome e especialidade de quem diagnosticou: _____

Fez algum teste genético ☐ N ☐ S Se sim, qual? _____

Fez os seguintes testes ou exames?	Não / Sim	Se sim, qual o resultado?
ADI ou ADOS?	☐ N ☐ S	
CARS?	☐ N ☐ S	
QI (quociente de inteligência)	☐ N ☐ S	
Eletroencefalograma	☐ N ☐ S	
Ressonância magnética ou funcional?	☐ N ☐ S	
A criança apresenta:	Não / Sim	Se sim,
Hiperatividade	☐ N ☐ S	Início Faz tratamento?
Distúrbios do sono	☐ N ☐ S	Quais? Faz tratamento?
Agressividade	☐ N ☐ S	Grau ☐ pouco ☐ razoável ☐ muito Faz tratamento?
Epilepsia/Convulsão	☐ N ☐ S	Início Faz tratamento?
Problema cardíaco	☐ N ☐ S	Qual? Faz tratamento?
Característica facial relevante	☐ N ☐ S	Qual?
Estereotipia (movimentos repetitivos)	☐ N ☐ S	Quais? Quando começou?
Ecolalias (repete o mesmo som diversas vezes)	☐ N ☐ S	
Fala palavras	☐ N ☐ S	Início
Faz frases (pelo menos duas palavras, como “quero água”, “não quero”)	☐ N ☐ S	Início
Parou de falar em algum momento?	☐ N ☐ S	Com que idade parou/voltou?

Problemas de coordenação motora	☐ N ☐ S	Quais?	Quando começou?
A criança anda?	☐ N ☐ S	Aprendeu sozinha? ☐ N ☐ S	Teve dificuldade? ☐ N ☐ S Início:
Outro distúrbio além do autismo	☐ N ☐ S	Qual?	

Faz acompanhamento? ☐ N ☐ S Se sim, listar profissionais (nome do médico e especialidade):

Listar medicações que já tomou (indicar quando) ou toma atualmente:

A criança foi vacinada? ☐ N ☐ S Se sim, notou alguma reação pós-vacina que queira relatar? (IMPORTANTE: os cientistas do projeto Fada do Dente **NÃO** defendem a hipótese de que vacinas causam autismo, mas queremos averiguar os dados em nossas pesquisas)

Você percebeu se houve melhora no quadro clínico da criança ou alguma regressão com o passar do tempo?

☐ Melhora ☐ Regressão ☐ Nenhuma diferença

Existem outros casos de diagnóstico ou suspeita de autismo ou algum outro distúrbio neuropsiquiátrico na família?

☐ N ☐ S Se sim, qual distúrbio e grau de parentesco com a criança?

A criança tem irmãos? ☐ N ☐ S Se sim, quantos? _____ Algum irmão é gêmeo? ☐ N ☐ S

Algum irmão tem autismo? ☐ N ☐ S Se sim, especificar _____

Sobre a mãe: Quantas gestações? _____ Quantos partos? _____ Teve aborto? ☐ N ☐ S Se sim, quantos? _____

Idade materna na primeira gestação: _____ Idade materna desta gestação: _____

Idade paterna desta gestação: _____ Fez pré-natal na gestação desta criança? ☐ N ☐ S

Teve febre ou infecções na gestação desta criança? ☐ N ☐ S

Teve intercorrências na gestação desta criança? ☐ N ☐ S Se sim, qual? _____

Qual cidade passou maior parte da gestação? _____

Qual foi o índice Apgar no nascimento desta criança? _____

Com quantas semanas a criança nasceu (vem na certidão de nascimento do hospital)? _____

Parto: ☐ Normal ☐ Cesária Local: ☐ Casa ☐ Hospital Se hospital, qual? _____

Tamanho ao nascer (cm): _____ Peso ao nascer (kg): _____

Medida da circunferência da cabeça da criança quando nasceu? (em geral, pediatras têm essa medida) _____

Foi relatado pelo médico alguma alteração (macro ou microcefalia) ou algum dimorfismo? _____

Realizou o Teste do Pezinho? ☐ N ☐ S Se sim, teve alguma alteração? _____

Existem outras informações importantes que você gostaria de relatar sobre o (a) seu (sua) filho(a)?

*Caso tenha dificuldades em responder o questionário acima, por favor peça auxílio, se possível aos profissionais que o acompanham.

APÊNDICE B – Questionário *on-line*

Avaliação de componentes de risco para o TEA

Este questionário tem como objetivo coletar dados de pessoas com TEA e será usado somente para pesquisa científica. A identidade dos participantes/pais/responsáveis será mantida em sigilo e nunca será revelada. Caso necessário, os participantes poderão ser contatados por e-mail ou telefone pelos pesquisadores do Projeto a Fada do Dente para esclarecimento de dúvidas.
Responsável pelo Projeto a Fada do Dente:

Prof. Dra. Patrícia C. B. Beltrão Braga, Universidade de São Paulo

* Required

Projeto a Fada do Dente

1. Nome completo da pessoa com TEA, sem abreviações. *

2. Sexo da pessoa com TEA *

Mark only one oval.

- ☐ Masculino
☐ Feminino

3. Qual o DIA de nascimento da pessoa com TEA? **Mark only one oval.*

- ☐ 01
- ☐ 02
- ☐ 03
- ☐ 04
- ☐ 05
- ☐ 06
- ☐ 07
- ☐ 08
- ☐ 09
- ☐ 10
- ☐ 11
- ☐ 12
- ☐ 13
- ☐ 14
- ☐ 15
- ☐ 16
- ☐ 17
- ☐ 18
- ☐ 19
- ☐ 20
- ☐ 21
- ☐ 22
- ☐ 23
- ☐ 24
- ☐ 25
- ☐ 26
- ☐ 27
- ☐ 28
- ☐ 29
- ☐ 30
- ☐ 31

4. Qual o MÊS de nascimento da pessoa com TEA? **Mark only one oval.*

- ☐ Janeiro
- ☐ Fevereiro
- ☐ Março
- ☐ Abril
- ☐ Maio
- ☐ Junho
- ☐ Julho
- ☐ Agosto
- ☐ Setembro
- ☐ Outubro
- ☐ Novembro
- ☐ Dezembro

5. Qual o ANO de nascimento da pessoa com TEA? **Mark only one oval.*

- ☐ Antes de 1979
- ☐ 1979
- ☐ 1980
- ☐ 1981
- ☐ 1982
- ☐ 1983
- ☐ 1984
- ☐ 1985
- ☐ 1986
- ☐ 1987
- ☐ 1988
- ☐ 1989
- ☐ 1990
- ☐ 1991
- ☐ 1992
- ☐ 1993
- ☐ 1994
- ☐ 1995
- ☐ 1996
- ☐ 1997
- ☐ 1998
- ☐ 1999
- ☐ 2000
- ☐ 2001
- ☐ 2002
- ☐ 2003
- ☐ 2004
- ☐ 2005
- ☐ 2006
- ☐ 2007
- ☐ 2008
- ☐ 2009
- ☐ 2010
- ☐ 2011
- ☐ 2012
- ☐ 2013
- ☐ 2014
- ☐ 2015
- ☐ 2016
- ☐ 2017
- ☐ 2018

6. A pessoa com TEA foi adotada? **Mark only one oval.*

- ☐ Sim, é filho adotivo
- ☐ Não, é filho biológico

7. Com quem a pessoa com TEA vive atualmente? **Mark only one oval.*

- ☐ Ambos pais biológicos
- ☐ Mãe biológica e padrasto
- ☐ Pai biológico e madrasta
- ☐ Apenas mãe biológica
- ☐ Apenas pai biológico
- ☐ Pais adotivos
- ☐ Guarda compartilhada
- ☐ Mãe biológica e outros parentes
- ☐ Pai biológico e outros parentes
- ☐ Outros parentes
- ☐ Orfanato/Abrigo
- ☐ Sozinho
- ☐ Com cônjuge (Casado(a))
- ☐ Outro não especificado aqui

8. Estado em que a pessoa com TEA nasceu **Mark only one oval.*

- ☐ Acre
- ☐ Alagoas
- ☐ Amapá
- ☐ Amazonas
- ☐ Bahia
- ☐ Ceará
- ☐ Distrito Federal (Brasília)
- ☐ Espírito Santo
- ☐ Goiás
- ☐ Maranhão
- ☐ Mato Grosso
- ☐ Mato Grosso do Sul
- ☐ Minas Gerais
- ☐ Pará
- ☐ Paraíba
- ☐ Paraná
- ☐ Pernambuco
- ☐ Piauí
- ☐ Rio de Janeiro
- ☐ Rio Grande do Norte
- ☐ Rio Grande do Sul
- ☐ Rondônia
- ☐ Roraima
- ☐ Santa Catarina
- ☐ São Paulo
- ☐ Sergipe
- ☐ Tocantins
- ☐ Não nasceu no Brasil
- ☐ Não sei responder

9. Cidade em que a pessoa com TEA nasceu. *

10. Estado em que a pessoa com TEA foi criado(a) *

Mark only one oval.

- ☐ Acre
- ☐ Alagoas
- ☐ Amapá
- ☐ Amazonas
- ☐ Bahia
- ☐ Ceará
- ☐ Distrito Federal (Brasília)
- ☐ Espírito Santo
- ☐ Goiás
- ☐ Maranhão
- ☐ Mato Grosso
- ☐ Mato Grosso do Sul
- ☐ Minas Gerais
- ☐ Pará
- ☐ Paraíba
- ☐ Paraná
- ☐ Pernambuco
- ☐ Piauí
- ☐ Rio de Janeiro
- ☐ Rio Grande do Norte
- ☐ Rio Grande do Sul
- ☐ Rondônia
- ☐ Roraima
- ☐ Santa Catarina
- ☐ São Paulo
- ☐ Sergipe
- ☐ Tocantins
- ☐ Não foi criado(a) no Brasil
- ☐ Não sei responder

11. Cidade em que a pessoa com TEA foi criado(a)

*

12. Endereço atual completo (Rua/Avenida/Travessa etc., Bairro, Cidade, Estado, CEP, Complementos) *

13. A pessoa com TEA frequenta a escola? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Ainda não tem idade para ir à escola
- ☐ Não vai à escola (está em idade de cursar, mas não conseguimos matricular em nenhuma escola)
- ☐ Já terminou os estudos
- ☐ Nunca frequentou a escola
- ☐ Está matriculado, mas estuda em casa
- ☐ Até o momento, não conseguimos ensinar em casa e nem na escola
- ☐ Atualmente, faz cursos livres ou universidade
- ☐ Outro não especificado aqui
- ☐ Não sei responder

14. Se sim, que fase está cursando? **Mark only one oval.*

- ☐ Maternal
- ☐ Pré-escola
- ☐ Ensino Fundamental 1
- ☐ Ensino Fundamental 2
- ☐ Ensino Médio
- ☐ Ensino Técnico
- ☐ Faculdade (Graduação)
- ☐ Pós graduação
- ☐ Não vai à escola (está em idade de cursar, mas não conseguimos matricular em nenhuma escola)
- ☐ Já terminou os estudos
- ☐ Não sei responder

15. A pessoa com TEA frequenta, ou frequentou, escola regular ou especial? **Mark only one oval.*

- ☐ Regular, com inclusão
- ☐ Regular, mas não precisa de inclusão, pois acompanha bem as matérias
- ☐ Especial para pessoas com TEA
- ☐ Especial para pessoas com deficiência em geral (TEA, Down, Deficiência Intelectual etc.)
- ☐ Ensino superior com inclusão (necessita de apoio pedagógico)
- ☐ Ensino superior sem inclusão (não precisa de auxílio, pois acompanha bem as matérias)
- ☐ Não frequenta escola
- ☐ Não sei responder

Dados dos Pais**16. Nome completo da Mãe ***

17. Ano de nascimento da Mãe. **Mark only one oval.*

- ☐ Antes de 1949
- ☐ 1949
- ☐ 1950
- ☐ 1951
- ☐ 1952
- ☐ 1953
- ☐ 1954
- ☐ 1955
- ☐ 1956
- ☐ 1957
- ☐ 1958
- ☐ 1959
- ☐ 1960
- ☐ 1961
- ☐ 1962
- ☐ 1963
- ☐ 1964
- ☐ 1965
- ☐ 1966
- ☐ 1967
- ☐ 1968
- ☐ 1969
- ☐ 1970
- ☐ 1971
- ☐ 1972
- ☐ 1973
- ☐ 1974
- ☐ 1975
- ☐ 1976
- ☐ 1977
- ☐ 1978
- ☐ 1979
- ☐ 1980
- ☐ 1981
- ☐ 1982
- ☐ 1983
- ☐ 1984
- ☐ 1985
- ☐ 1986
- ☐ 1987
- ☐ 1988
- ☐ 1989
- ☐ 1990
- ☐ 1991
- ☐ 1992
- ☐ 1993
- ☐ 1994
- ☐ 1995
- ☐ 1996
- ☐ 1997
- ☐ 1998
- ☐ 1999
- ☐ 2000
- ☐ 2001
- ☐ 2002
- ☐ 2003
- ☐ 2004
- ☐ Não sei responder

18. Antes da gravidez, qual era o peso da mãe? Se a mãe pesava 56 quilos e 500 gramas, escreva apenas os números separados por vírgula. Exemplo: 56,5. Caso não saiba, responda escrevendo "Não sei". *
-

19. Qual o peso atual da mãe da pessoa com TEA? Responda somente com números separados por vírgula. Exemplo: 75,6. Caso não saiba, responda escrevendo "Não sei". *
-

20. Qual a altura da mãe? Responda somente com números separados por vírgula. Por exemplo: 1 metro e 63 centímetros, escreva 1,63. *
-

21. A mãe da pessoa com TEA tem alguma doença crônica? Ou seja, apresentava algum problema de saúde antes da gravidez que precise de tratamento e/ou acompanhamento médico? Marque todas as opções que se apliquem: *

Check all that apply.

- ☐ Diabetes
- ☐ Pressão alta
- ☐ Câncer
- ☐ Enxaqueca
- ☐ Doença Respiratória Crônica (asma, rinite, bronquite, doença pulmonar)
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não apresentava nenhuma doença crônica antes da gravidez

22. Caso tenha assinalado qualquer doença listada acima, qual remédio toma, ou tomava, para tratamento? Caso não tenha assinalado, ou não se lembre, responda escrevendo "não sei". *
-

23. E-mail mais usado pela Mãe para contato *
-

24. Telefone mais usado pela Mãe para contato (com DDD) *
-

25. Nome completo do Pai. Caso não saiba, responda escrevendo "Não Sei". *
-

26. Ano de nascimento do Pai. **Mark only one oval.*

- ☐ Antes de 1949
- ☐ 1949
- ☐ 1950
- ☐ 1951
- ☐ 1952
- ☐ 1953
- ☐ 1954
- ☐ 1955
- ☐ 1956
- ☐ 1957
- ☐ 1958
- ☐ 1959
- ☐ 1960
- ☐ 1961
- ☐ 1962
- ☐ 1963
- ☐ 1964
- ☐ 1965
- ☐ 1966
- ☐ 1967
- ☐ 1968
- ☐ 1969
- ☐ 1970
- ☐ 1971
- ☐ 1972
- ☐ 1973
- ☐ 1974
- ☐ 1975
- ☐ 1976
- ☐ 1977
- ☐ 1978
- ☐ 1979
- ☐ 1980
- ☐ 1981
- ☐ 1982
- ☐ 1983
- ☐ 1984
- ☐ 1985
- ☐ 1986
- ☐ 1987
- ☐ 1988
- ☐ 1989
- ☐ 1990
- ☐ 1991
- ☐ 1992
- ☐ 1993
- ☐ 1994
- ☐ 1995
- ☐ 1996
- ☐ 1997
- ☐ 1998
- ☐ 1999
- ☐ 2000
- ☐ 2001
- ☐ 2002
- ☐ 2003
- ☐ 2004
- ☐ Não sei responder

27. Email mais usado pelo Pai. Caso não saiba, escreva "Não sei". *

28. Telefone mais usado pelo Pai para contato (com DDD). Caso não saiba, escreva "Não sei". *

29. Como é o contato da pessoa com TEA com seus pais biológicos? *

Mark only one oval per row.

	Em contato frequente	Pouco contato	Sem contato	Falecida(o)	Não sabe responder
Contato com a mãe	☐	☐	☐	☐	☐
Contato com o pai	☐	☐	☐	☐	☐

30. Qual a situação atual dos pais da pessoa com TEA em relação à empregabilidade? Obs: a alternativa sobre auxílio doença refere-se a auxílio dos pais, não da criança. *

Check all that apply.

	Emprego fixo	Emprego temporário	Desempregada(o)	Autônoma(o) (trabalha por conta)	Do lar	Estudante	Recebe auxílio doença	Aposentada(o)	Não sabe responder
Situação atual da mãe	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Situação atual do pai	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

31. Qual o estado civil atual dos pais da pessoa com TEA? *

Mark only one oval per row.

	Casada(o) ou morando junto com o pai/mãe biológico da pessoa com TEA	Casada(o) ou morando junto com outro companheiro(a)	Solteira(o)	Separada(o)/Divorciada(o)	Viúva(o)	Não sabe responder
Estado Civil da mãe	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Estado Civil do pai	☐	☐	☐	☐	☐	☐

32. Qual é o nível de escolaridade dos pais da pessoa com TEA? *

Mark only one oval per row.

	Analfabeto	Ensino Fundamental I (antigo primário)	Ensino Fundamental II (antigo ginásio)	Ensino Médio (antigo colegial)	Ensino Técnico	Ensino Superior (graduação)	Especialização (Lato sensu)	Mestrado	Doutorado	Pós-doutorado	Não sabe responder
Escolaridade da mãe	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Escolaridade do pai	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Informações clínicas e comportamentais da pessoa com TEA

33. A pessoa com TEA foi diagnosticada por algum profissional da área da saúde? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não sei responder

34. Caso já tenha o laudo com diagnóstico, poderia enviar para nossa equipe? Se sim, enviar para contato@projetoafadado.dente.org.br *

Mark only one oval.

- ☐ Sim, enviarei o laudo.
☐ Ainda não tenho laudo
☐ Não sei responder

35. Qual a especialidade de quem diagnosticou a pessoa com TEA? *

Check all that apply.

- ☐ Pediatra
- ☐ Neuro (neuropediatra, neuropsiquiatra, neurologista)
- ☐ Psicólogo
- ☐ Psiquiatra
- ☐ Equipe Multidisciplinar
- ☐ Não foi diagnosticado
- ☐ Não sei responder

36. Nome do especialista que diagnosticou. Se não souber, ou se a pessoa com TEA ainda não foi diagnosticada, responda escrevendo "Não sei".

*

37. Qual o grau de autismo? (Leve: necessita de pouco ou nenhum apoio. Moderado: necessita de apoio em várias áreas. Severo: necessita de muito apoio em várias áreas.). Observação: Pessoas diagnosticadas com Síndrome de Asperger, responder a opção 1. Leve. *

Mark only one oval.

- ☐ Leve
- ☐ Moderado
- ☐ Severo
- ☐ Não sei responder

38. Com que idade a pessoa com TEA foi diagnosticada por algum médico ou especialista? *

Mark only one oval.

- ☐ Primeiros meses (antes de 01 ano)
- ☐ Entre 01 ano e 02 anos e 11 meses
- ☐ Entre 03 anos e 04 anos e 11 meses
- ☐ Entre 05 anos e 06 anos e 11 meses
- ☐ Entre 07 anos e 08 anos e 11 meses
- ☐ Entre 09 anos e 10 anos e 11 meses
- ☐ Entre 11 anos e 12 anos e 11 meses
- ☐ Após os 13 anos
- ☐ Não sei responder

39. Com que idade você ficou preocupado com o desenvolvimento da pessoa com TEA pela primeira vez? *

Mark only one oval.

- ☐ Primeiros meses (antes de 01 ano)
- ☐ Entre 01 ano e 02 anos e 11 meses
- ☐ Entre 03 anos e 04 anos e 11 meses
- ☐ Entre 05 anos e 06 anos e 11 meses
- ☐ Após os 07 anos e 08 anos e 11 meses.
- ☐ Após os 09 anos.
- ☐ Não sei responder

40. Qual (ou quais) sintoma(s) a pessoa com TEA apresentou primeiro que chamou sua atenção, ou a atenção de outra pessoa? Marque todas que se aplicarem. *

Check all that apply.

- ☐ Não olhava nos olhos
- ☐ Parecia ser surdo, pois não atendia quando era chamado
- ☐ Regressão da fala (falava e parou de repente)
- ☐ Não falava, apesar de já ter idade para falar
- ☐ Balançava as mãos (flapping)
- ☐ Balançava o corpo (ou outro movimento que tenha achado estranho)
- ☐ Era uma criança muito agitada
- ☐ Era uma criança muito calma, pouco reativa a estímulos
- ☐ Não se misturava com outras pessoas e preferia se isolar
- ☐ Batia a cabeça na parede
- ☐ Não batia palmas, não dava tchau, não apontava etc.
- ☐ Reação a barulhos de forma diferente das outras pessoas (ou reagia muito ao barulho ou não reagia)
- ☐ Enfileirava ou girava objetos (ou brincava de forma diferente das outras crianças)
- ☐ Fixação por algum assunto ou objeto
- ☐ Andava na ponta dos pés
- ☐ Chorava sem motivo aparente
- ☐ Não dormia bem
- ☐ Não se alimentava bem
- ☐ Outros não relatados aqui

41. Atualmente, a pessoa com TEA fala? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim, fala normalmente de acordo com a idade.
- ☐ Fala razoavelmente bem.
- ☐ Fala pouco para a idade
- ☐ Não fala nada
- ☐ Usa somente ecolalias (repetições de falas dos outros, repete trechos de filmes, comerciais de TV etc.)
- ☐ Vocabulário e gramática melhor que outras crianças da mesma idade
- ☐ Não sei responder

42. Com que idade a pessoa com TEA começou a falar? *

Mark only one oval.

- ☐ Antes de 01 ano
- ☐ Entre 01 e 02 anos e 11 meses
- ☐ Entre 03 anos e 04 anos e 11 meses
- ☐ Entre 05 anos e 06 anos e 11 meses
- ☐ Após 07 anos
- ☐ Nunca falou
- ☐ Não sei responder

43. A pessoa com TEA parou de falar em algum momento? *

Mark only one oval.

- ☐ Entre 01 ano e 02 anos e 11 meses
- ☐ Entre 03 anos e 04 anos e 11 meses
- ☐ Entre 05 anos e 06 anos e 11 meses
- ☐ Após os 07 anos
- ☐ Nunca falou
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não, nunca parou de falar

44. A pessoa com TEA voltou a falar? *

Mark only one oval.

- ☐ Entre 02 anos e 03 anos e 11 meses
- ☐ Entre 04 anos e 05 anos e 11 meses
- ☐ Entre 06 anos e 07 anos e 11 meses
- ☐ Após os 08 anos
- ☐ Ainda não voltou a falar
- ☐ Nunca parou de falar
- ☐ Nunca falou
- ☐ Não sei responder

45. Em relação à fala, a pessoa com TEA tem algum diagnóstico dado por um médico ou fonoaudiólogo?

Check all that apply.

- ☐ Apraxia da fala
- ☐ Disartria
- ☐ Afasia
- ☐ DEL (Distúrbio Específico de Linguagem)
- ☐ Dislexia
- ☐ Dislalia
- ☐ Transtorno Semântico Pragmático
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não tem nenhum diagnóstico em relação à fala

46. A pessoa com TEA tem diagnóstico de alguma síndrome? *

Mark only one oval.

- ☐ Síndrome do X Frágil
- ☐ Síndrome de Timothy
- ☐ Síndrome de Phelan-McDermid
- ☐ Síndrome de Prader-Willi
- ☐ Síndrome de Angelman
- ☐ Síndrome de Rett
- ☐ Esclerose Tuberosa Complexa
- ☐ Síndrome de Down
- ☐ Distrofia Muscular de Duchenne
- ☐ Qualquer outra síndrome não listada aqui
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não tem nenhuma outra síndrome

47. A pessoa com TEA foi diagnosticada, ou apresenta, algum problema de coordenação motora? *

Check all that apply.

- ☐ Dispraxia (dificuldade em desempenhar os movimentos motores corretamente)
- ☐ Problema de coordenação motora fina (ex: dificuldades em escrever, pintar, desenhar, recortar, encaixar, abotoar)
- ☐ Problema de coordenação motora grossa (ex: dificuldade para correr, pular, subir e descer escadas)
- ☐ Hipotonia de membros, ou seja, apresenta falta de força nos braços e/ou pernas
- ☐ Outro
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não tem nenhum diagnóstico

48. Marque abaixo se a pessoa com TEA apresenta sensibilidade nestes casos (hipersensibilidade sensorial). Marque todas as opções que se apliquem. *

Check all that apply.

- ☐ Mostra-se sensível ou incomodado com luz
- ☐ Mostra-se sensível ou incomodado com sons
- ☐ Mostra-se sensível ou incomodado com odores (cheiros)
- ☐ Mostra-se sensível ou incomodado com texturas (comidas, roupas, etiquetas das roupas, solos etc.)
- ☐ Mostra-se sensível ou incomodado quando é tocado por alguém
- ☐ Mostra-se sensível ou incomodado no banho (água ou produtos, como shampoo, sabonete etc.)
- ☐ Anda nas pontas dos pés
- ☐ Apresenta hipersensibilidade a outros pontos que não estão descritos aqui
- ☐ Não apresenta nenhuma hipersensibilidade sensorial
- ☐ Não sei responder

49. Marque abaixo se a pessoa com TEA apresenta sensibilidade nestes casos (hipossensibilidade sensorial). Marque todas as opções que se apliquem. *

Check all that apply.

- ☐ Parece precisar tocar em tudo o tempo todo
- ☐ Gosta de girar por vários minutos
- ☐ Parece não sentir frio
- ☐ Parece não sentir fome
- ☐ Pula com bastante frequência
- ☐ É resistente à dor
- ☐ Parece não se incomodar com barulho excessivo (TV muito alta, música, fogos etc.)
- ☐ Fala muito alto
- ☐ Leva muitos objetos ou roupas à boca
- ☐ Gosta de cheirar alimentos, bebidas etc.
- ☐ Apresenta hipossensibilidade a outros pontos que não estão descritos aqui
- ☐ Não apresenta nenhuma hipossensibilidade sensorial
- ☐ Não sei responder

50. A pessoa com TEA fez algum teste ou exame genético para complementar o diagnóstico de TEA? Marque todas as respostas que se apliquem. *

Check all that apply.

- ☐ Cariótipo
- ☐ CGH-Array
- ☐ Exoma
- ☐ Genoma
- ☐ Triagem urinária para erros inatos do metabolismo
- ☐ Fez outros testes ou exames genéticos que não estão relacionados aqui
- ☐ Não foi feito nenhum teste complementar
- ☐ Não sei responder

51. Caso tenha feito algum teste ou exame genético descrito acima para complementar o diagnóstico de TEA, poderia disponibilizar o(s) laudo(s) do(s) exame(s) para a equipe do Projeto a Fada do Dente? Caso afirmativo, enviar para o email contato@projetoafadadodente.org.br *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Nunca fez testes

52. A pessoa com TEA fez algum dos exames ou testes abaixo? Marque todas as respostas que se apliquem. *

Check all that apply.

- ☐ Eletroencefalograma
- ☐ Ressonância magnética ou funcional
- ☐ Tomografia
- ☐ Teste auditivo
- ☐ Teste de QI
- ☐ Outros
- ☐ Nunca fez nenhum dos testes ou exames listados
- ☐ Não sei responder

53. Apresentou alguma alteração em alguns dos testes? Se sim, qual exame apresentou alteração e qual foi a alteração? Caso não tenha feito, ou não saiba, responda escrevendo "Não se aplica". *

54. Marque todas as opções necessárias para descrever se a pessoa com TEA apresenta malformação ou alteração no formato: *

Check all that apply.

- ☐ das orelhas
- ☐ dos olhos
- ☐ das mãos
- ☐ dos pés
- ☐ do nariz
- ☐ dos dentes (muito grandes, muito separados, muito pequenos etc.)
- ☐ do queixo (muito para frente, muito pequeno etc.)
- ☐ da boca (palato aumentado "céu da boca"; fenda no lábio etc.)
- ☐ do pescoço
- ☐ na cabeça (macrocefalia)
- ☐ na cabeça (microcefalia)
- ☐ em outras partes do corpo não listadas aqui
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não apresenta nenhuma malformação

55. Se sim, descreva qual a malformação que a pessoa com TEA apresenta? Se não apresentar nenhuma malformação, responda escrevendo somente "Não". *

56. A pessoa com TEA apresenta algum dos problemas abaixo? Assinale todas as alternativas que se aplicarem. *

Check all that apply.

- ☐ Problema pulmonar (asma, bronquite, fibrose etc.)
- ☐ Alergias (rinite, alergias na pele)
- ☐ Problema cardíaco (problemas no coração)
- ☐ Problema renal (nos rins)
- ☐ Problema na tireóide (hipotireoidismo ou hipertireoidismo)
- ☐ Diabetes
- ☐ Cegueira total ou baixa visão
- ☐ Deficiência auditiva (total ou parcial)
- ☐ Intolerância alimentar (celíaco, alérgico ou intolerante ao glúten, alérgico ou intolerante à caseína etc.)
- ☐ Epilepsia/convulsões
- ☐ Não apresenta nenhum dos problemas relatados acima

57. A pessoa apresenta problemas gastrointestinais? Marque todas as alternativas que se aplicarem. *

Check all that apply.

- ☐ Constipação (Prisão de ventre, Ressecamento)
- ☐ Diarreia frequente
- ☐ Sempre alterna entre diarreia e ressecamento
- ☐ Cólicas intestinais
- ☐ Dores de estômago
- ☐ Refluxo
- ☐ Dificuldade para engolir
- ☐ Flatulência (excesso de gases)
- ☐ Apresenta outros problemas não listados aqui
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não apresenta nenhum problema gastrointestinal listado acima

58. Marque abaixo todas as respostas que se aplicam sobre a alimentação da pessoa com TEA. *

Check all that apply.

- ☐ Alimenta-se mal, pois só quer um ou dois tipos de alimentos não saudáveis em todas as refeições (exemplo: bolachas, pães etc.).
- ☐ Parece não sentir fome ou parece sentir pouca fome
- ☐ Alimentação seletiva, mas saudável
- ☐ Alimentação seletiva e pouco (ou nada) saudável
- ☐ Alimentação compulsiva (come o tempo inteiro e parece ter mais fome que o normal)
- ☐ Alimenta-se normalmente e não tem restrições ou seletividade. Come como qualquer outra criança
- ☐ Só se alimenta com ajuda de alguém
- ☐ Parece ter problemas com texturas, cores, cheiros etc.
- ☐ Alimentação restritiva devido a dietas, alergias, intolerâncias etc.
- ☐ Outro não especificado aqui
- ☐ Não sei responder

59. A pessoa com TEA apresenta estereotípias? Ou seja, faz movimentos repetitivos como balançar as mãos, girar, pular etc. Qualquer movimento ou ação que sejam repetitivos. *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei responder

60. Além do TEA, a pessoa foi diagnosticada, por um profissional de saúde, com mais algum dos diagnósticos abaixo? Marque todas as respostas que se apliquem. *

Check all that apply.

- ☐ TDAH (Transtorno de déficit de atenção com hiperatividade)
- ☐ Transtorno Bipolar
- ☐ Ansiedade
- ☐ TOD (Transtorno Opositivo-Desafiador)
- ☐ Esquizofrenia
- ☐ TOC (Transtorno Obsessivo Compulsivo)
- ☐ Síndrome do Pânico
- ☐ Depressão
- ☐ Outro não listado aqui
- ☐ Não apresenta nenhum dos diagnósticos listados acima
- ☐ Não sei responder

61. Caso tenha tido algum outro diagnóstico não listado acima, escreva aqui qual. Caso não tenha, responda escrevendo a palavra "Não". *

62. A pessoa com TEA se autolesiona? Ou seja, a pessoa se machuca com mordidas, puxa o cabelo, bate a cabeça na parede etc. *

Mark only one oval.

- ☐ Sim, com frequência
- ☐ Raramente
- ☐ Já fez, mas parou
- ☐ Somente quando está nervosa ou contrariada.
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não, a pessoa não se autolesiona

63. Atualmente, a pessoa com TEA toma medicação? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei responder

64. Se sim, quais medicamentos toma hoje em dia? Marque todas as respostas que se apliquem. *

Check all that apply.

- ☐ Risperidona
- ☐ Olanzapina
- ☐ Neuleptil
- ☐ Aripiprazol
- ☐ Ritalina
- ☐ Melatonina
- ☐ Risperdal
- ☐ Fluvoxamina
- ☐ Clozapina
- ☐ Outro não listado aqui
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não toma medicação

Dados gestacionais

Dados da mãe da pessoa com TEA

65. Quantos partos a mãe teve? *

Mark only one oval.

- ☐ 01
- ☐ 02
- ☐ 03
- ☐ 04
- ☐ 05
- ☐ Mais de 05 partos
- ☐ Não sei responder

66. A mãe da pessoa com TEA sofreu algum aborto? *

Mark only one oval.

- ☐ 01
- ☐ 02
- ☐ 03
- ☐ 04
- ☐ Acima de 04
- ☐ Não sei responder
- ☐ Nunca tive aborto

67. Quantas consultas pré-natal a mãe fez durante a gestação da pessoa com TEA? *

Mark only one oval.

- ☐ Menos de 06 consultas
- ☐ 06 consultas
- ☐ Mais de 06 consultas
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não fez pré-natal

68. Em qual trimestre da gestação da pessoa com TEA a mãe começou o pré-natal? *

Mark only one oval.

- ☐ Primeiro trimestre
- ☐ Segundo trimestre
- ☐ Terceiro trimestre
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não fez pré-natal

69. Durante a gestação da pessoa com TEA, a mãe teve contato, por mais de 03 dias seguidos, com produtos tóxicos, tanto em casa quanto no trabalho? *

Check all that apply.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Não sei responder	Não teve contato
Agrotóxicos (Pesticidas, Herbicidas etc.)	☐	☐	☐	☐	☐
Mercúrio	☐	☐	☐	☐	☐
Chumbo	☐	☐	☐	☐	☐
Formol	☐	☐	☐	☐	☐
Cádmium	☐	☐	☐	☐	☐
Arsênico	☐	☐	☐	☐	☐
Inseticidas (para dedetização, desratização etc.)	☐	☐	☐	☐	☐
Outro não listado aqui	☐	☐	☐	☐	☐

70. A mãe foi vacinada durante a gestação da pessoa com TEA? Caso afirmativo, em qual trimestre? *

Check all that apply.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Não sei responder	Não tomou essa vacina
dT - Dupla Adulto (difteria e tétano)	☐	☐	☐	☐	☐
dTpa - Tríplece Bacteriana Acelular (difteria/ tétano/ coqueluche)	☐	☐	☐	☐	☐
Hepatite B	☐	☐	☐	☐	☐
Influenza (vacina contra gripe)	☐	☐	☐	☐	☐
Hepatite A	☐	☐	☐	☐	☐
Meningocócica Conjugada (vacina contra meningite)	☐	☐	☐	☐	☐
Meningocócica B	☐	☐	☐	☐	☐
Febre Amarela	☐	☐	☐	☐	☐
Pneumocócicas	☐	☐	☐	☐	☐

71. A mãe tomou Ácido Fólico (vitamina B9) durante a gestação da pessoa com TEA? Caso afirmativo, em qual período? *

Mark only one oval.

- ☐ 1º Trimestre
☐ 2º Trimestre
☐ 3º Trimestre
☐ Somente antes da gravidez
☐ Durante toda a gravidez
☐ Não sei responder
☐ Não tomou ácido fólico

72. A mãe tomou algum tipo de medicamento durante o período dessa gestação? Se sim, quais medicamentos tomou? *

Mark only one oval per row.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Durante toda a gestação	Não sabe responder	Não tomou
Antibióticos (remédio contra infecção)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Antidepressivos (remédio contra depressão)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Remédio para epilepsia	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Analgésico (remédio contra a dor)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Antitérmico (remédio contra febre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Anti-inflamatório (remédio contra inflamações)	☐	☐	☐	☐	☐	☐

73. A mãe fumou cigarros durante a gestação da pessoa com TEA? Se sim, em qual trimestre? *

Mark only one oval.

- ☐ 1º Trimestre
☐ 2º Trimestre
☐ 3º Trimestre
☐ Fumou durante toda a gestação
☐ Não fumou

74. Se sim, quantos cigarros fumava por semana? Responda no campo "Outros" quantos cigarros aproximadamente. Exemplo: 40 *

Mark only one oval.

- ☐ Não fumante
- ☐ Não sei responder
- ☐ Other: _____

75. A mãe ficou em ambiente que outras pessoas fumavam (fumante passiva) durante a gestação da pessoa com TEA? Se sim, em qual trimestre? *

Mark only one oval.

- ☐ 1º Trimestre
- ☐ 2º Trimestre
- ☐ 3º Trimestre
- ☐ Foi fumante passiva durante toda a gestação
- ☐ Não foi fumante passiva

76. A mãe tomou bebida alcoólica durante essa gestação? Exemplo: vinho, cerveja, cachaça, uísque etc. *

Check all that apply.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Durante toda a gestação	Não sei responder	Não bebeu
Bebeu uma ou duas vezes	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Bebeu mais de três vezes	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Bebeu com muita frequência	☐	☐	☐	☐	☐	☐

77. A mãe fez uso de maconha durante a gestação da pessoa com TEA? *

Check all that apply.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Durante toda a gestação	Não sei responder	Não fumou maconha
Fumou uma ou duas vezes	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Fumou mais de três vezes	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Fumava com muita frequência	☐	☐	☐	☐	☐	☐

78. Durante a gestação da pessoa com TEA, a mãe engordou: *

Mark only one oval.

- ☐ Até 12 quilos
- ☐ Mais de 12 quilos
- ☐ Não sei responder

79. Durante essa gestação, a mãe teve convulsões ou desmaios? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei responder

80. A mãe apresentou problemas de tireoide durante a gestação da pessoa com TEA? *

Mark only one oval.

- ☐ Hipotireoidismo
- ☐ Hipertireoidismo
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não apresentou problemas de tireoide

81. Se sim, tomava remédio para tireoide durante essa gestação? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não apresentou problemas de tireoide

82. Durante a gestação da pessoa com TEA, a mãe apresentou febre igual ou maior que 37.8 graus, medida no termômetro? *

Mark only one oval per row.

	por um dia	por 2 dias	por 3 dias ou mais	Não sei responder	Não teve febre
1º Trimestre	☐	☐	☐	☐	☐
2º Trimestre	☐	☐	☐	☐	☐
3º Trimestre	☐	☐	☐	☐	☐

83. Durante essa gestação, a mãe apresentou algum dos problemas listados abaixo? Marque todas que se apliquem. *

Check all that apply.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Durante toda a gestação	Não apresentou problema
Pressão alta	☐	☐	☐	☐	☐
Pressão baixa	☐	☐	☐	☐	☐
diabetes gestacional	☐	☐	☐	☐	☐
Pré-eclâmpsia	☐	☐	☐	☐	☐
Sangramento	☐	☐	☐	☐	☐
Contrações uterinas frequentes e intensas (que tenham surgido durante toda a gravidez, ou antes da hora)	☐	☐	☐	☐	☐
Ameaça de aborto espontâneo	☐	☐	☐	☐	☐
Pedra nos rins (cálculo renal)	☐	☐	☐	☐	☐

84. A mãe teve alguma infecção durante a gestação da pessoa com TEA? Se sim, qual tipo de infecção? Assinale todas as que forem verdadeiras durante a gestação da pessoa com TEA. *

Check all that apply.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Não sei responder	Sem infecção
Infecção urinária	☐	☐	☐	☐	☐
Gripe ou resfriado	☐	☐	☐	☐	☐
Infecção na garganta (Amigdalite)	☐	☐	☐	☐	☐
Infecção nas gengivas (Doença periodontal)	☐	☐	☐	☐	☐
Infecção vaginal	☐	☐	☐	☐	☐
Rubéola	☐	☐	☐	☐	☐
Toxoplasmose	☐	☐	☐	☐	☐
Citomegalovírus	☐	☐	☐	☐	☐
Infecção intestinal (com ou sem diarreia)	☐	☐	☐	☐	☐
HIV	☐	☐	☐	☐	☐
Sífilis	☐	☐	☐	☐	☐
Herpes	☐	☐	☐	☐	☐
Zika	☐	☐	☐	☐	☐
Dengue	☐	☐	☐	☐	☐
Hepatite B	☐	☐	☐	☐	☐
Outra infecção não listada aqui	☐	☐	☐	☐	☐

85. A mãe precisou ficar internada por algum dos motivos listados acima, ou algum motivo não listado? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei responder

86. A mãe tem Síndrome do ovário policístico? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei responder

87. Durante essa gestação, a mãe morou ou trabalhou perto de avenidas, estradas ou rodovias? Ou seja, teve contato com poluição urbana (de carros, caminhões, empresas etc.)? Se sim, em qual período da gestação? *

Check all that apply.

[illegible]

88. Qual estado e cidade passou a maior parte dessa gestação? *

89. Durante a gravidez, algumas mulheres podem experimentar sentimentos diferentes, como estresse, por exemplo. Como você se sentiu durante a gestação da pessoa com TEA? Assinale abaixo todas que se apliquem. *

Mark only one oval per row.

	Aconteceu durante toda a gravidez e considero que tenha sido preocupante	Aconteceu somente em alguns períodos da gravidez, o que causou pouca preocupação	Aconteceu muito pouco durante a gravidez e não causou nenhuma preocupação	Não experimentei. Foi uma gravidez tranquila
Tristeza	☐	☐	☐	☐
Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Crises de choro	☐	☐	☐	☐
Perda de interesse por atividades diárias	☐	☐	☐	☐
Irritabilidade	☐	☐	☐	☐
Distúrbios do sono, como insônia ou sonolência exagerada	☐	☐	☐	☐
Excesso ou falta de apetite	☐	☐	☐	☐
Sentimento de culpa	☐	☐	☐	☐
Pensamentos de morte ou suicídio	☐	☐	☐	☐

90. Alguns eventos podem ser considerados como fator de estresse para algumas pessoas, especialmente na gravidez. A mãe enfrentou algum dos problemas listados abaixo durante a gestação da pessoa com TEA? Marque todas que se apliquem. *

Check all that apply.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Não aconteceu
A mãe perdeu ou mudou de emprego	☐	☐	☐	☐
O companheiro da mãe perdeu o emprego	☐	☐	☐	☐
A mãe mudou de casa	☐	☐	☐	☐
Morreu algum parente ou amigo muito próximo da mãe	☐	☐	☐	☐
O companheiro ou parente muito próximo da mãe teve problemas com a justiça	☐	☐	☐	☐
A mãe foi assaltada	☐	☐	☐	☐
A mãe presenciou algum assalto ou crime	☐	☐	☐	☐
A mãe passou por alguma catástrofe climática	☐	☐	☐	☐
A mãe morou sozinha durante a gestação	☐	☐	☐	☐
Passou por dificuldades financeiras	☐	☐	☐	☐

91. Em relação à depressão, como a mãe se sentiu durante a gravidez da pessoa com TEA? *

Mark only one oval.

- ☐ Sentiu que ficou muito deprimida
☐ Sentiu-se pouco deprimida, mas devido às preocupações normais da gestação
☐ Não foi afetada de forma alguma por depressão durante essa gravidez
☐ Não sei responder

92. Em relação ao estresse, como a mãe se sentiu durante a gravidez da pessoa com TEA? *

Mark only one oval.

- ☐ Sentiu que ficou muito mais estressada que o normal
☐ Sentiu-se pouco estressada, mas devido às preocupações normais da gestação
☐ Não foi afetada de forma alguma por estresse durante essa gravidez
☐ Não sabe responder

95. Caso tenha sofrido algum tipo de agressão, em qual trimestre? *

Mark only one oval per row.

	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	Durante toda gestação	Não sofreu agressão	Não sabe responder
Por parte do parceiro	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Por parte de uma familiar	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Por outras pessoas	☐	☐	☐	☐	☐	☐

96. Em relação à segurança do local, em uma escala de intensidade de 0 a 5, como você avalia o lugar em que passou a gestação da pessoa com TEA? *

Mark only one oval.

	0	1	2	3	4	5	
Nada violento	☐	☐	☐	☐	☐	☐	Muito violento

Dados do nascido que apresenta TEA

97. Com quantas semanas a pessoa com TEA nasceu? Essa informação pode ser encontrada na Certidão de Nascido Vivo (CNV) que a mãe recebe no hospital. Responder somente com números: Exemplo: 35. Caso não saiba, responda escrevendo "Não sei". *

98. Qual tipo de parto desta gestação? *

Mark only one oval.

- ☐ Normal
☐ Cesárea
☐ Normal com auxílio de fórceps
☐ Outro
☐ Não sei responder

99. Tamanho ao nascer. Colocar somente números. Exemplo: Se a criança nasceu com 49,5 centímetros, coloque somente o número 49,5 e não escreva mais nada. Caso não saiba, escreva "Não sei". *

100. Peso ao nascer. Coloque somente números separados por vírgula. Exemplo: Se a criança nasceu com 3 quilos e 200 gramas, coloque somente 3,200 e não escreva mais nada. Caso não saiba, responda escrevendo "não sei". *

101. Qual a circunferência da cabeça da criança ao nascer? Essa informação pode ser encontrada na Certidão de Nascido Vivo (CNV) que a mãe recebe no hospital. *

Mark only one oval.

- ☐ Menor que 32 cm
☐ Entre 32 e 34
☐ Entre 35 e 37
☐ Acima de 37
☐ Não sei responder

102. Qual o índice Apgar (os pediatras, geralmente, têm esse número). Essa informação pode ser encontrada na Certidão de Nascido Vivo (CNV) que a mãe recebe no hospital. *

Mark only one oval.

- ☐ Entre 10 e 08
☐ Entre 07 e 05
☐ Entre 04 e 03
☐ Entre 02 e 0
☐ Outro não especificado aqui
☐ Não sei responder

103. **A pessoa com TEA realizou o Teste do Pezinho? Se sim, qual tipo de teste? ***

Mark only one oval.

- ☐ Básico
- ☐ Ampliado
- ☐ Plus
- ☐ Master
- ☐ Expandido
- ☐ Completo
- ☐ Não fez o Teste do Pezinho
- ☐ Não sei responder

104. **Teve alguma alteração no teste? Se sim, qual?**

Caso não tenha dado alteração, responda escrevendo "Não". *

105. **Nas primeiras horas de vida, a pessoa com TEA apresentou algum dos problemas abaixo? Marque todas as que se apliquem. ***

Check all that apply.

- ☐ Anóxia neonatal
- ☐ Hipóxia neonatal
- ☐ Icterícia neonatal
- ☐ Convulsão
- ☐ Não chorou
- ☐ Não estava respirando
- ☐ Precisou ser reanimada (ressuscitação)
- ☐ Hipoglicemia (nível de açúcar baixo no sangue).
- ☐ Não apresentou problemas
- ☐ Não sei responder

106. **Assim que nasceu, a criança teve que ficar na UTI neonatal? Se sim, por quantos dias? ***

Mark only one oval.

- ☐ Menos de uma semana
- ☐ Cerca de 02 semanas
- ☐ Cerca de 03 semanas
- ☐ Por um mês
- ☐ Por mais de um mês
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não precisou ficar na UTI

107. **A criança precisou ficar na incubadora? ***

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei responder

108. **Ainda recém-nascido, o bebê apresentou problemas de tireoide? ***

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei responder

109. A pessoa com TEA tomou todas as vacinas nas datas corretas? *

Check all that apply.

	Sim, na data correta	Sim, mas com atraso	Ainda não está na idade	Não foi vacinado	Não sei responder
BCG (Bacilo Calmette-Guerin)	☐	☐	☐	☐	☐
Hepatite B	☐	☐	☐	☐	☐
Pentavalente (difteria, tétano, coqueluche, hepatite B e meningite e infecções por Hib) – 1ª, 2ª e 3ª dose	☐	☐	☐	☐	☐
Vacina Inativada Poliomielite (VIP) (paralisia infantil) – 1ª, 2ª e 3ª dose	☐	☐	☐	☐	☐
Pneumocócica 10 Valente (pneumonia, otite, meningite e outras doenças causadas pelo Pneumococo) – 1ª e 2ª dose	☐	☐	☐	☐	☐
Rotavírus (previne diarreia por rotavírus) – 1ª e 2ª dose	☐	☐	☐	☐	☐
Meningocócica C (doença meningocócica C) – 1ª e 2ª dose	☐	☐	☐	☐	☐
Febre Amarela – dose única (previne a febre amarela)	☐	☐	☐	☐	☐
Tríplice viral (previne sarampo, caxumba e rubéola) – 1ª e 2ª dose	☐	☐	☐	☐	☐
Hepatite A – dose única	☐	☐	☐	☐	☐
Tetra viral ou tríplice viral + varicela – (previne sarampo, rubéola, caxumba e varicela/catapora) - Uma dose	☐	☐	☐	☐	☐
Varicela atenuada (previne varicela/catapora) - 1ª e 2ª dose	☐	☐	☐	☐	☐

110. A pessoa com TEA foi amamentada no peito? Se sim, por quanto tempo? *

Mark only one oval.

- ☐ Mamou por até 04 meses
☐ Mamou por até 06 meses
☐ Mamou por até 08 meses
☐ Mamou por até 10 meses
☐ Mamou por 01 ano
☐ Mamou por 01 ano e meio
☐ Mamou até 02 anos
☐ Mamou por mais de 02 anos
☐ Não foi amamentada no peito
☐ Não sabe responder

Histórico Familiar

ATENÇÃO: Nesta seção, as questões sobre irmãos devem ser respondidas somente sobre irmãos consanguíneos, ou seja, de sangue.

111. Em relação à moradia (casa) da pessoa com TEA, você considera que seja em: *

Mark only one oval.

- ☐ Área urbana, mas afastada de grandes centros (bairro), com poluição.
☐ Área urbana, mas afastada de grandes centros (bairro), com MUITA poluição.
☐ Área urbana, no centro da cidade, com pouco verde (árvores) e com muito movimento de veículos (área com poluição)
☐ Perto de rodovias e/ou estradas movimentadas (muita poluição vinda dos veículos e/ou empresas)
☐ Perto de rodovias e/ou estradas com pouco movimento de veículos (pouca poluição vinda dos veículos)
☐ Área urbana ou rural, com bastante verde e pouco (ou pouquíssimo) poluída
☐ Perto de empresas (área com poucas árvores e bem poluída)
☐ Perto de plantações com uso de agrotóxicos
☐ Outro não especificado aqui
☐ Não sei responder

112. Durante a gestação da criança com TEA, quantos cômodos tinham na casa em que você morava? *

Mark only one oval.

- ☐ 01 cômodo
- ☐ 02 cômodos
- ☐ 03 cômodos
- ☐ 04 cômodos
- ☐ 05 cômodos
- ☐ Mais de 05 cômodos
- ☐ Não sei responder

113. Durante a gestação da criança com TEA, quantas pessoas moravam na casa? *

Mark only one oval.

- ☐ 01 pessoa
- ☐ 02 pessoas
- ☐ 03 pessoas
- ☐ 04 pessoas
- ☐ 05 pessoas
- ☐ Mais de 05 pessoas
- ☐ Não sei responder
- ☐ Other: _____

114. Atualmente, somando a sua renda com a renda das pessoas que moram com você, quanto é, aproximadamente, a renda familiar mensal? (Marque apenas uma resposta). *

Mark only one oval.

- ☐ Nenhuma renda
- ☐ Até 01 salário mínimo
- ☐ De R\$1.000,00 a R\$3.000,00
- ☐ De R\$3.500,00 a R\$6.000,00
- ☐ De R\$6.500,00 a R\$9.000,00
- ☐ De R\$9.500,00 a 12.000,00
- ☐ De R\$12.500,00 a 16.000,00
- ☐ Acima de R\$16.000,00
- ☐ Outro não informado aqui

115. A pessoa com TEA tem irmãos? Se sim, quantos irmãos e irmãs (vivos) no total? *

Mark only one oval.

- ☐ 01
- ☐ 02
- ☐ 03
- ☐ 04
- ☐ 05
- ☐ mais de 05
- ☐ Não tem irmãos

116. Qual a ordem de nascimento da pessoa com TEA? *

Mark only one oval.

- ☐ Filho único
- ☐ Primeiro filho
- ☐ Segundo filho
- ☐ Terceiro filho
- ☐ Quarto filho
- ☐ Quinto filho
- ☐ Sexto filho
- ☐ Sétimo filho
- ☐ Não sei responder

117. A pessoa com TEA tem irmãos gêmeos? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim, uma única placenta (univitelinos)
- ☐ Sim, placentas diferentes (bivitelinos)
- ☐ Trigêmeos
- ☐ Quadrigêmeos
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não tem irmãos gêmeos

118. O irmão gêmeo também está no TEA? *

Mark only one oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Talvez, ainda está em processo diagnóstico
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não tem irmão gêmeo

119. Há mais algum irmão ou irmã, que não seja gêmeo, que também está no TEA? Se sim, quantos irmãos ou irmãs também estão no TEA? *

Mark only one oval.

- ☐ 01
- ☐ 02
- ☐ 03
- ☐ Mais de 03 irmãos ou irmãs estão no TEA
- ☐ Ainda está em processo diagnóstico
- ☐ Não sei responder
- ☐ Não tem nenhum irmão no TEA

Dados dos familiares diretos da pessoa com TEA (Somente familiares de sangue).

ATENÇÃO: Nesta seção, TODAS AS QUESTÕES devem ser respondidas somente sobre parentes consanguíneos, ou seja, parentes de sangue (de primeiro grau). Não considerar cunhados, primos de segundo grau, irmãos adotivos, padrasto, madrasta etc. **Somente parentes consanguíneos.**

120. Existe mais alguém da família que tenha DIAGNÓSTICO ou SUSPEITA de diagnóstico de autismo? Marque todos os campos necessários em caso de haver mais de uma pessoa. *

Check all that apply.

	Com diagnóstico	Com suspeita	Não sei responder	Não
Pai	☐	☐	☐	☐
Mãe	☐	☐	☐	☐
Tios maternos (irmãos da mãe)	☐	☐	☐	☐
Tias maternas (irmãs da mãe)	☐	☐	☐	☐
Tios paternos (irmãos do pai)	☐	☐	☐	☐
Tias paternas (irmãs do pai)	☐	☐	☐	☐
Avó materna	☐	☐	☐	☐
Avó paterna	☐	☐	☐	☐
Avô materno	☐	☐	☐	☐
Avô paterno	☐	☐	☐	☐
Primos(as) maternos	☐	☐	☐	☐
Primos(as) paternos	☐	☐	☐	☐

121. O pai ou mãe da pessoa com TEA apresentam qualquer outro transtorno ou síndrome relatados abaixo? Marque todas as alternativas que se aplicarem. *

Check all that apply.

	Pai	Mãe	Sem síndromes ou transtornos	Não sei responder
Alzheimer	☐	☐	☐	☐
Parkinson	☐	☐	☐	☐
Esquizofrenia	☐	☐	☐	☐
Epilepsia	☐	☐	☐	☐
Tiques, como tricotilomania (arrancar os cabelos), piscar várias vezes os olhos etc.	☐	☐	☐	☐
Síndrome de Down	☐	☐	☐	☐
Transtorno Bipolar	☐	☐	☐	☐
Deficiência Intelectual	☐	☐	☐	☐
Depressão	☐	☐	☐	☐
Hipertividade	☐	☐	☐	☐
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	☐	☐	☐	☐
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	☐	☐	☐	☐
Apresenta deficiência mental não especificada	☐	☐	☐	☐
Síndrome do Pânico	☐	☐	☐	☐
Transtorno de Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Caso de suicídio ou de tentativa de suicídio	☐	☐	☐	☐
Outros	☐	☐	☐	☐

122. Os tios ou tias maternos da pessoa com TEA apresentam qualquer outro transtorno ou síndrome relatados abaixo? Marque todas as alternativas que se aplicarem. *

Check all that apply.

	Tios	Tias	Sem síndromes ou transtornos	Não sei responder
Alzheimer	☐	☐	☐	☐
Parkinson	☐	☐	☐	☐
Esquizofrenia	☐	☐	☐	☐
Epilepsia	☐	☐	☐	☐
Tiques, como tricotilomania (arrancar os cabelos), piscar várias vezes os olhos etc.	☐	☐	☐	☐
Síndrome de Down	☐	☐	☐	☐
Transtorno Bipolar	☐	☐	☐	☐
Deficiência Intelectual	☐	☐	☐	☐
Depressão	☐	☐	☐	☐
Hipertividade	☐	☐	☐	☐
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	☐	☐	☐	☐
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	☐	☐	☐	☐
Apresenta deficiência mental não especificada	☐	☐	☐	☐
Síndrome do Pânico	☐	☐	☐	☐
Transtorno de Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Caso de suicídio ou de tentativa de suicídio	☐	☐	☐	☐
Outros	☐	☐	☐	☐

123. Se sim, quantos tios ou tias maternas? Responda somente com número. Por exemplo: 2 *

124. Os tios ou tias paternos da pessoa com TEA apresentam qualquer outro transtorno ou síndrome relatados abaixo? Marque todas as alternativas que se aplicarem. *

Check all that apply.

	Tios	Tias	Sem síndromes ou transtornos	Não sei responder
Alzheimer	☐	☐	☐	☐
Parkinson	☐	☐	☐	☐
Esquizofrenia	☐	☐	☐	☐
Epilepsia	☐	☐	☐	☐
Tiques, como tricotilomania (arrancar os cabelos), piscar várias vezes os olhos etc.	☐	☐	☐	☐
Síndrome de Down	☐	☐	☐	☐
Transtorno Bipolar	☐	☐	☐	☐
Deficiência Intelectual	☐	☐	☐	☐
Depressão	☐	☐	☐	☐
Hipertividade	☐	☐	☐	☐
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	☐	☐	☐	☐
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	☐	☐	☐	☐
Apresenta deficiência mental não especificada	☐	☐	☐	☐
Síndrome do Pânico	☐	☐	☐	☐
Transtorno de Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Caso de suicídio ou de tentativa de suicídio	☐	☐	☐	☐
Outros	☐	☐	☐	☐

125. Se sim, quantos tios ou tias paternas?

Responda somente com número. Por exemplo:

2 *

126. O avô ou avó maternos da pessoa com TEA apresentam qualquer outro transtorno ou síndrome relatados abaixo? Marque todas as alternativas que se aplicarem. *

Check all that apply.

	Avô materno	Avó materna	Sem síndromes ou transtornos	Não sei responder
Alzheimer	☐	☐	☐	☐
Parkinson	☐	☐	☐	☐
Esquizofrenia	☐	☐	☐	☐
Epilepsia	☐	☐	☐	☐
Tiques, como tricotilomania (arrancar os cabelos), piscar várias vezes os olhos etc.	☐	☐	☐	☐
Síndrome de Down	☐	☐	☐	☐
Transtorno Bipolar	☐	☐	☐	☐
Deficiência Intelectual	☐	☐	☐	☐
Depressão	☐	☐	☐	☐
Hipertividade	☐	☐	☐	☐
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	☐	☐	☐	☐
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	☐	☐	☐	☐
Apresenta deficiência mental não especificada	☐	☐	☐	☐
Síndrome do Pânico	☐	☐	☐	☐
Transtorno de Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Caso de suicídio ou de tentativa de suicídio	☐	☐	☐	☐
Outros	☐	☐	☐	☐

127. O avô ou avó paternos da pessoa com TEA apresentam qualquer outro transtorno ou síndrome relatados abaixo? Marque todas as alternativas que se apliquem. *

Check all that apply.

	Avô paterno	Avó paterna	Sem síndromes ou transtornos	Não sei responder
Alzheimer	☐	☐	☐	☐
Parkinson	☐	☐	☐	☐
Esquizofrenia	☐	☐	☐	☐
Epilepsia	☐	☐	☐	☐
Tiques, como tricotilomania (arrancar os cabelos), piscar várias vezes os olhos etc.	☐	☐	☐	☐
Síndrome de Down	☐	☐	☐	☐
Transtorno Bipolar	☐	☐	☐	☐
Deficiência Intelectual	☐	☐	☐	☐
Depressão	☐	☐	☐	☐
Hipertividade	☐	☐	☐	☐
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	☐	☐	☐	☐
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	☐	☐	☐	☐
Apresenta deficiência mental não especificada	☐	☐	☐	☐
Síndrome do Pânico	☐	☐	☐	☐
Transtorno de Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Caso de suicídio ou de tentativa de suicídio	☐	☐	☐	☐
Outros	☐	☐	☐	☐

128. Os primos ou primas maternos da pessoa com TEA apresentam qualquer outro transtorno ou síndrome relatados abaixo? Marque todas as alternativas que se apliquem. *

Check all that apply.

	Primos	Primas	Sem síndromes ou transtornos	Não sei responder
Alzheimer	☐	☐	☐	☐
Parkinson	☐	☐	☐	☐
Esquizofrenia	☐	☐	☐	☐
Epilepsia	☐	☐	☐	☐
Tiques, como tricotilomania (arrancar os cabelos), piscar várias vezes os olhos etc.	☐	☐	☐	☐
Síndrome de Down	☐	☐	☐	☐
Transtorno Bipolar	☐	☐	☐	☐
Deficiência Intelectual	☐	☐	☐	☐
Depressão	☐	☐	☐	☐
Hipertividade	☐	☐	☐	☐
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	☐	☐	☐	☐
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	☐	☐	☐	☐
Apresenta deficiência mental não especificada	☐	☐	☐	☐
Síndrome do Pânico	☐	☐	☐	☐
Transtorno de Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Caso de suicídio ou de tentativa de suicídio	☐	☐	☐	☐
Outros	☐	☐	☐	☐

129. Se sim, quantos primos ou primas maternos? Responda somente com número. Por exemplo: 2. Caso não tenha nenhum, coloque o número 0. *

130. Os primos ou primas paternos da pessoa com TEA apresentam qualquer outro transtorno ou síndrome relacionados abaixo? Marque todas as alternativas que se aplicarem. *

Check all that apply.

	Primos	Primas	Sem síndromes ou transtornos	Não sei responder
Alzheimer	☐	☐	☐	☐
Parkinson	☐	☐	☐	☐
Esquizofrenia	☐	☐	☐	☐
Epilepsia	☐	☐	☐	☐
Tiques, como tricotilomania (arrancar os cabelos), piscar várias vezes os olhos etc.	☐	☐	☐	☐
Síndrome de Down	☐	☐	☐	☐
Transtorno Bipolar	☐	☐	☐	☐
Deficiência Intelectual	☐	☐	☐	☐
Depressão	☐	☐	☐	☐
Hipertividade	☐	☐	☐	☐
Transtorno do Déficit de Atenção (TDA)	☐	☐	☐	☐
Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC)	☐	☐	☐	☐
Apresenta deficiência mental não especificada	☐	☐	☐	☐
Síndrome do Pânico	☐	☐	☐	☐
Transtorno de Ansiedade	☐	☐	☐	☐
Caso de suicídio ou de tentativa de suicídio	☐	☐	☐	☐
Outros	☐	☐	☐	☐

131. Se sim, quantos primos ou primas paternos? Responda somente com número. Por exemplo: 2. Caso não tenha nenhum, coloque o número 0. *

Sessão Final

Outras informações relevantes e ciência do projeto

132. Existem outras informações importantes que você queira relatar sobre seu filho?

133. Você participaria de mais questionários, ou uma conversa, para ajudar em nossas pesquisas?

Mark only one oval.

- ☐ Sim
☐ Não

134. Tenho ciência que todos os dados e informações fornecidas serão mantidos em sigilo pela equipe do Projeto a Fada do Dente. Tenho ciência, também, que nenhum dado que possa me identificar ou identificar a pessoa com TEA será revelado. *

Mark only one oval.

- ☐ Ciente

135. Tenho total ciência que o Projeto a Fada do Dente não faz diagnóstico, exames individuais ou propõe tratamento para nenhum dos participantes. Sei que seus esforços são para o coletivo e os resultados sempre serão apresentados em forma de estudo científico e nunca enviado individualmente. *

Mark only one oval.

- ☐ Ciente

136. Declaro ter lido, compreendido e aceito que minhas respostas sejam usadas unicamente para fins acadêmicos e de informação. Declaro ainda que todas as respostas são verdadeiras e de minha inteira responsabilidade. *

Mark only one oval.

- ☐ Sim, aceito.

ANEXO A – Artigo na Revista Stem Cell: Autism Spectrum Disorders and disease modeling using stem cells

Cell Tissue Res
DOI 10.1007/s00441-017-2685-x

REVIEW

Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells

Anita Brito^{1,2} · Fabiele Baldino Russo^{1,2} · Alysson Renato Muotri³ ·
Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga^{1,2,4}

Received: 25 May 2017 / Accepted: 19 August 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Autism spectrum disorders (ASD) represent a variety of disorders characterized as complex lifelong neurodevelopment disabilities, which may affect the ability of communication and socialization, including typical compartments like repetitive and stereotyped behavior. Other comorbidities are usually present, such as echolalia, hypotonia, intellectual disability and difficulties in processing figured speech. Furthermore, some ASD individuals may present certain abilities, such as eidetic memory, outstanding musical or painting talents and special mathematical skills, among others. Considering the variability of the clinical symptoms, one autistic individual can be severely affected in communication while others can speak perfectly, sometimes having a vocabulary above average in early childhood. The same variability can be seen in other clinical symptoms, thus the “spectrum”

can vary from severe to mild. Induced pluripotent stem cell technology has been used to model several neurological diseases, including syndromic and non-syndromic autism. We discuss how modeling the central nervous system cells in a dish may help to reach a better understanding of ASD pathology and variability, as well as personalize their treatment.

Keywords Autism spectrum disorders · ASD · iPSC · Stem cells · Disease modeling

Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) belong to conditions in which neurodevelopment seems to be impaired at some point, affecting communication and socialization skills, with characteristic repetitive and stereotyped behaviors (Wing and Gould 1979; Quak et al. 2013). ASD clinical first signs vary from person to person, which makes the diagnosis more challenging. An early diagnosis seems to be the key to a better clinical trajectory, because it provides the opportunity for interventions early in life. Although those interventions can reduce symptoms of autism in children, responses are quite variable (Pierce et al. 2011).

Autism epidemiology varies with diagnostic criteria and occurs in about 1% in the general population (Nygren et al. 2012). In the United States, the estimated prevalence is about 1 in 68 children aged 8 years. The prevalence is higher among boys (23.6 per 1000) than among girls (5.3 per 1000) (Christensen et al. 2016).

People with ASD generally present heterogeneous clinical manifestations co-occurring with autism, such as echolalia, hypotonia, seizures, sleep disorder, intellectual disability and difficulties in processing figured speech. Considering the variability of the clinical symptoms, one ASD individual can

Anita Brito and Fabiele Baldino Russo contributed equally to this work.
Alysson Renato Muotri and Baleeiro Beltrão-Braga are last authors.

✉ Alysson Renato Muotri
muotri@ucsd.edu

✉ Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga
patriciaacbbbraga@yahoo.com.br

¹ Department of Surgery, Stem Cell Laboratory, University of São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil

² Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ School of Medicine, Department of Pediatrics/Rady Children's Hospital San Diego, Department of Cellular & Molecular Medicine, Stem Cell Program, University of California San Diego, La Jolla, CA 92037-0695, USA

⁴ Department of Obstetrics, School of Arts Sciences and Humanities, São Paulo, SP 03828-000, Brazil

be severely affected in communication, for example, while others can speak perfectly, sometimes having a vocabulary above average in early childhood (Cesaroni and Garber 1991; Kover et al. 2013).

The etiology of ASD remains unknown and there are still no biological markers but a set of genes has already been reported as ASD-related, which probably causes different types of autism. Epigenetic, genetic and environmental origins are linked with ASDs and their clinical trajectory (Geschwind 2011; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Pinto et al. 2014; State 2014), making the “spectrum” vary from severe to mild. It is also important to point out that ASD was defined based on clinical criteria, so people with autistic symptoms but with a mutation in one specific gene (monogenic mutation) can be part of a set of autisms known as syndromes called syndromic-autisms, such as Rett Syndrome, Fragile X Syndrome, Timothy Syndrome, Phelan–McDermid Syndrome and Angelman and Prader–Willi Syndromes, excluded in 2013 from the autism umbrella in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, while ASD with an uncertain genetic background can be called non-syndromic due to the lack of clear genetic information (Grzadzinski et al. 2013).

In order to understand the variability found in ASD, induced pluripotent stem cell (iPSC) technology is currently being used as a great tool to model neurological disorders, such as syndromic and non-syndromic ASD (Marchetto et al. 2010, 2016; Tian et al. 2014; Griesi-Oliveira et al. 2015; Mariani et al. 2015; Chailangkarn et al. 2016; Fink et al. 2017; Vicidomini et al. 2017). This review describes the latest efforts regarding ASD modeling using iPSCs as a resource to generate novel insights underlying ASD pathology. In addition, ASD in a dish has provided a platform for potential drug repurposing. The combination of pharmacological and behavioral treatment could improve efforts to help people with ASD to reach a better clinical trajectory. This technology helps understanding neurodevelopment disorders as well as testing drugs in a safe environment.

Syndromic types of ASD

Rett Syndrome

Rett Syndrome (RTT) is a postnatal neurodevelopmental disorder, which presents a progressive degenerative encephalopathy, hand-flapping and language impairment. RTT is linked to mutation in the methyl CpG-binding protein 2 (MeCP2), a gene in the chromosome X. RTT affects preferentially females, being 1 in 10,000 born alive (Amir et al. 1999; Samaco et al. 2004; Leonard et al. 2016). Other neurologic pathologies are also usually present in individuals with RTT, such as seizures, hypotonia and microcephaly, as well as autistic behavior (Amir et al. 1999; Chahrouh and Zoghbi 2007).

The *MECP2* gene is important for healthy brain activity and mutation on this gene can cause neuronal defects associated with RTT (Gomathi and Balachandar 2017). The iPSC technology has been used to model RTT in order to analyze cellular phenotypes and understand the mechanisms involved in this pathology, also being a good model for drug screening and repurposing. The first study using iPSC to investigate RTT revealed that neurons displayed reduced dendritic spine density, altered electrophysiology, smaller soma size, fewer synapses and alterations in Ca²⁺ influx. In addition, the addition of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) to treat neurons can rescue the synaptic number (Marchetto et al. 2010). Another study showed that astrocytes generated from RTT iPSC could induce abnormalities and affect the neurons. Reinforcing previous studies, when treated with IGF-1 and GPE, neurons rescued the morphological defects (Williams et al. 2014). IGF1 is currently in clinical trials for RTT patients (Khwaja et al. 2014).

Fragile X-Syndrome

Fragile X Syndrome (FXS) is frequently related to ASD and is the most common form of inherited intellectual disability (McLennan et al. 2011). FXS affects approximately 1 in every 4,000 boys and 1 in 8,000 girls worldwide (Callan and Zarnescu 2011; Halevy et al. 2015). Social anxiety, obsessive–compulsive disorder, attention deficits, seizures and stereotyped repetitive behaviors, among other characteristics, are also present in some individuals affected by FXS. Epigenetic silencing and loss of the gene *FMR1*, which is located in chromosome X, causes FXS because it produces none, or very little, protein. Nearly all cases of FXS are due to an abnormal extension of the CGG trinucleotide in the *FMR1* gene (from 200 to over 1,000 times). FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) binds to RNA and regulates translation of approximately 1,400 mRNA targets in a negative way (Damell et al. 2011). This protein is highly expressed in neurons and is responsible for regulating dendritic spine morphology and synaptogenesis (Huber et al. 2002). This loss of FMRP alters normal functions of the nervous system, causing all the features related to FXS, including ASD.

The first study using iPSC to model FXS iPSC revealed that the *FMR1* gene carried DNA methylation and histone modification after reprogramming, revealing that iPSC technology for FXS modeling is feasible (Urbach et al. 2010). In addition, the first study to investigate the neuronal phenotypes related to FMRP gene mutation showed an aberrant neuronal differentiation, which revealed epigenetic modification and a loss of FMRP expression. Through gene complementation, it was possible to rescue the neuronal phenotype, confirming that the *FMR1* gene is responsible for the FXS phenotype (Sheridan et al. 2011). Two other studies using iPSC-derived neurons to model FXS showed neuronal reduced length, fewer

pre- and post-synaptic protein levels, as well as an altered calcium influx (Hagerman 2013; Doers et al. 2014). Considering that iPSC-derived neuronal precursors can preserve epigenetic memory, the iPSC platform can be a good model to study epigenetics in FXS (Kaufmann et al. 2015). Six compounds were revealed as an indicator of increased FMR1 gene expression in a drug-screening study (Kumari et al. 2015).

Recently, a study performed RNA-seq and examined the transcriptional misregulation during neuronal differentiation of FXS-iPSC. They found up-regulation of many genes (WNT1, BMP4, POU3F4, TFAP2C and PAX3), down-regulation of potassium channels (KCNA1, KCNC3, KCNG2, KCNIP4, KCNJ3, KCNK9 and KCNT1) and altered temporal regulation of SHANK1 and NNAT, indicating impaired neuronal differentiation and function in FXS patients (Lu et al. 2016). Another study using iPSC technology to model FXS was recently carried out and found aberrant neurogenic phenotypes by gene expression and DNA methylation profiling (Boland et al. 2017). These FXS aberrant networks are enriched for genes associated with ASD, reinforcing the idea that there are similarities between these neurodevelopmental diseases.

Timothy Syndrome

Timothy Syndrome (TS) is a rare neurodevelopmental autosomal genetic disorder caused by a mutation in the gene *CACNA1C*. This gene is responsible for encoding the α -subunit of the voltage-gated calcium channel, $Ca_v1.2$. This calcium channel plays an important role for neuronal function, as it regulates an activity-signaling network that is essential for brain function (Bading 2013; Catterall et al. 2013; Ebert 2013). Mutations in *CACNA1C* cause an abnormal function of the calcium channel, leading to high intracellular calcium concentrations (Splawski et al. 2004) which have been associated with some psychiatric and neurological disorders, such as migraine, ataxia, epilepsy, bipolar disorder, schizophrenia and ASD (Tottene et al. 2002; Tonelli et al. 2006; Wang et al. 2009).

Phenotype manifestations in TS patients have been described and include developmental delay, heart malformations, arrhythmia, as well as ASD behaviors (Paşca et al. 2011). Up to 80% of TS patients present autism, which gives us insights into how studying rare monogenic diseases linked to ASD may open new windows to help us to understand ASD pathophysiology. Cortical neurons precursor cells and neurons produced from iPSC revealed a significant increase of $[Ca^{2+}]_i$ (intracellular calcium) in TS neurons (Paşca et al. 2011). Mutations in ion channel genes have also been related to cardiac arrhythmias and TS but the pathophysiological process is still unclear. Cardiomyocytes were derived from iPSC from TS patients and revealed an irregular and slow contraction in TS cells when compared with healthy

controls, as well as irregular and prolonged action potential and abnormal calcium handling (Yazawa et al. 2011).

Specific iPSCs from TS patients were generated to observe the effects of the mutation on dendritic arbors. These results were later compared to a rodent TS model and it was possible to observe that both models presented dendritic retraction (Krey et al. 2013). Another study using the iPSC technology showed that several molecular pathways deregulated by this specific *Cav1.2* mutation are shared with non-syndromic ASD, illustrating how the study and findings about syndromic autism may bring insights into the non-syndromic autism field (Tian et al. 2014).

Phelan–McDermid Syndrome

Phelan–McDermid syndrome (PMDS) is a complex and rare neurodevelopmental disorder caused by deletions in chromosome 22q13.3 (Wilson et al. 2003; Phelan and McDermid 2012; Sarasua et al. 2014) and characterized by clinical symptoms including hypotonia, intellectual disability, mental retardation, severe language delay and autism (Phelan and McDermid 2012). Although the prevalence of PMDS is unknown, there have been at least 1,400 cases reported worldwide, according to the Phelan–McDermid Syndrome Foundation. PMDS is considered a syndromic form of ASD resulting from deletions in the *SHANK3* (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3) gene, which encodes a protein involved in excitatory synapses and in postsynaptic density organization (Naisbitt et al. 1999; Durand et al. 2007; Kolevzon et al. 2014). Rare mutations in this gene have been linked to ASD and mouse models carrying *Shank3* deficiency display ASD behaviors, such as abnormal social skills, repetitive behaviors, communication patterns deficiency and synaptic dysfunction (Durand et al. 2007; Wang et al. 2011).

The iPSC–PMDS-derived neurons from PMDS individuals carrying large 22q13.3 deletions, which included *SHANK3*, showed fewer synapses and altered electrophysiology. This group revealed that excitatory synaptic transmission in PMDS neurons could be corrected by restoring *SHANK3* expression or by pharmacological treatment with insulin-like growth factor 1 (IGF1) (Shcheglovitov et al. 2013). IGF1 is currently in clinical trials for PMDS. Recently, iPSC-derived neurons from PMDS patients were maintained for 80 days in culture and revealed a reduced number of postsynaptic protein Homer 1b/c when compared with control iPSC-derived neurons (Vicidomini et al. 2017).

Angelman Syndrome and Prader–Willi Syndrome

Angelman syndrome (AS) and Prader–Willi syndrome (PWS) are neurodevelopmental disorders of genomic imprinting both caused by deletions in chromosome 15q11–q13 (Knoll et al. 1989; Chamberlain et al. 2010). Reduced expression of the

ubiquitin–protein ligase E3A gene (UBE3A) of the maternal chromosome is responsible for AS development (Rougeulle and Glatt 1997; Meng et al. 2015). PWS is caused by the deletion on the same chromosome but occurs on the paternal allele (Cassidy et al. 2000). AS is a disorder characterized by intellectual disability, absent speech, motor dysfunction and seizures (Lossie et al. 2001; Williams et al. 2006). PWS is characterized by small stature, hands and feet, hyperphagia and behavioral problems likened to obsessive–compulsive disorder (Cassidy et al. 2000).

AS and PWS modeled by iPSC technology revealed no phenotypic differences between AS and control neurons; however, they found that UBE3A imprinting occurred during neuronal differentiation in AS cells (Chamberlain et al. 2010).

A PWS patient with an atypical microdeletion on paternal chromosome 15q11–q13 was modeled using iPSC and these non-neuronal cells revealed expression of UBE3A antisense transcript (UBE3A-ATS) and the imprinted expression of UBE3A, whose expression is restricted to neurons. These data suggest that UBE3A imprinting in neurons only requires UBE3A-ATS expression and no other neuron-specific factors (Martins-Taylor et al. 2014).

In the same year, iPSC-derived neurons from patients with duplications of the chromosome 15q11–q13.1 (Dup15q syndromes) were generated and a gene expression analysis was performed to compare with neurons from AS patients. The results revealed that common neuronal pathways may be disrupted in both Angelman and Dup15q syndromes (Germain et al. 2014).

Another study using iPSC from AS individuals revealed that, during neuronal differentiation, a strong induction of SNHG14 expression is observed followed by silencing of the paternal UBE3A gene, indicating that this is a late event during neuronal differentiation (Stanurova et al. 2016).

Recently, the mechanisms underlying AS pathophysiology were explored using iPSC-derived neurons from AS and control individuals. AS-derived neurons showed impaired maturation, decreased synaptic activity and reduced synaptic plasticity (Fink et al. 2017).

Non-syndromic autism

ASDs are characterized as a diverse group of neurodevelopmental disorders. Unfortunately, there is still no cure for ASDs and they can bring challenges for people affected for their whole life. These challenges change from individual to individual and the heterogeneous clinical presentations of each individual bring a great challenge for sample characterization and restrict research studies. Nowadays, ASDs occur more often than childhood cancer, diabetes and pediatric AIDS combined (Grzadzinski et al. 2013). Besides having no cure, it is still difficult to fully understand ASD

neurologic manifestations due to their heterogeneity and lack of biomarkers.

Although genetics have been revealing genes related to ASDs, it is important to point out that not all genes have been mapped and fully understood. De novo genes play a significant role in the process of investigating ASDs; however, there are still no answers to all the questions around this disorder.

One non-syndromic ASD individual carrying a mutation in the TRPC6 gene was modeled using iPSC. This gene is responsible for encoding the protein channel transient receptor potential canonical 6 (TRPC6), an important protein that controls neuronal function, mainly the synapses in the brain. Derived neurons from TRPC6 mutant iPSC presented morphological and functional alterations, including reduced total length and dendritic arborization (Griesi-Oliveira et al. 2015). These data showed common phenotypes with syndromic autism (Chamberlain et al. 2010; Marchetto et al. 2010; Urbach et al. 2010; Paşca et al. 2011; Shcheglovitov et al. 2013). In addition, TRPC6 mutated neurons could rescue some neuronal abnormalities using hyperforin and IGF-1 in vitro. As already mentioned, IGF-1 also rescued neuronal defects in RTT-iPSC neurons (Marchetto et al. 2010).

Another work investigated neuronal phenotypes using brain organoids from non-syndromic ASD individuals presenting macrocephaly and mutation in the FOXG1 gene (Mariani et al. 2015). Quantification of inhibitory vesicular GABA transporter (VGAT) by puncta analyses revealed a significant increase when compared to excitatory vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1), suggesting an imbalance between inhibitory and excitatory synapses in ASD neurons. GABAergic progenitor cells and neurotransmitter GABA were also increased in organoid structures. Transcriptome analyses of organoids revealed that FOXG1 could be responsible for over-production of the GABAergic neuronal lineage. Interference in FOXG1 expression restored normal density of GABAergic neurons. The authors suggested that FOXG1 could be related to modulation of brain size (Mariani et al. 2015).

Types of non-syndromic ASDs usually co-occur with other comorbidities. Macrencephaly is one relevant pathophysiology that co-occurs with ASD. It has demonstrated an altered growth trajectory with early overgrowth and later normalization in a subset of affected individuals. Recently, Marchetto and colleagues conducted a study generating iPSC from fibroblasts of ASD patients, which showed larger brain size compared to normal average and control. They noticed that the copy number variation did not show the presence of any rare structural variant known to be associated with ASD. However, a total of 275 unique stop gain/loss mutations were detected: 222 were listed in dbSNP, while 53 rare mutations were not (Marchetto et al. 2016). NPCs derived from iPSC showed an increase in cell proliferation and iPSC-derived neurons displayed abnormal neurogenesis and reduced synaptogenesis.

Defects in neuronal networks could be rescued by IGF1, a drug that is currently in clinical trials for ASD (Marchetto et al. 2016).

Researching syndromic ASDs has provided us with information that may contribute to the understanding of non-syndromic ASDs. In addition, information derived from animal models in recent studies displayed similar synaptic phenotypes in non-syndromic and syndromic mouse models for autism, which has given us valuable information about ASD (Baudouin 2013).

Limitations and future perspectives for ASD-iPSC-disease modeling

Treating and diagnosing syndromic and non-syndromic ASDs are still a challenge to many physicians around the world. iPSC disease modeling has been used extensively worldwide by scientists in order to improve knowledge and open new possibilities for more specific treatments. However, as with any technology, this model has limitations. For example, the physiological conditions in cell culture mimics one's neurons but it is not the real brain, which can affect the full comprehension of any disease. Thus, to confirm what it is seen in vitro, a genuine model must be used to validate the data (Acab and Muotri 2015). Another point is the problem of using proper controls, mainly for non-syndromic ASD or any other disease with a non-specific genetic background. The ideal control would be to use cell lines from the patient, which contain the same genome but with no mutation. Nowadays, this approach is possible, once CRISPR technology for genome editing is available.

The iPSC technology, associated with genomic information, could offer new ways to stratify types of autisms and personalize treatment. In addition, the possibility of selecting individuals for specific clinical trials, such as RTT, Fragile X, etc., as well as the non-syndromic ASD population, might speed up the development of novel treatments, since drug testing could be performed in vitro in a previously defined cohort. The iPSC platform can also be used to test environmental contributions to autism. As an example, brain organoids derived from iPSCs infected with the Zika virus revealed potential developmental problems during corticogenesis, which might mimic the viral impact in babies born during the Zika epidemic in Brazil (Cugola et al. 2016). Finally, from the perspective of basic science, the iPSC model can be used to dissect the molecular and cellular mechanisms implicated in the autistic core symptoms. A recent work on iPSCs derived from Williams Syndrome individuals, characterized by a hyper-social behavior, provided important cues on the genes implicated in the social brain (Chailangkarn et al. 2016).

Acknowledgements We would like to thank the support of the agency FAPESP (2011/20683-0, 09/51180-03), the NGO “the tooth fairy project, Brazil”, the National Institutes of Health (R01MH108528, R01MH094753, R01MH109885, R01MH100175, R56MH109587, U19MH107367), the “Autour des Williams” Association, a NARSAD Independent Investigator Grant (to A.R.M.) and to the ASD and control individuals and their families for donation of their teeth to “the tooth fairy project”.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Acab A, Muotri AR (2015) The Use of Induced Pluripotent Stem Cell Technology to Advance Autism Research and Treatment. *Neurotherapeutics* 12:534–545. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0354-x>
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23:185–188. <https://doi.org/10.1038/13810>
- Bading H (2013) Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat Rev Neurosci* 14:593–608. <https://doi.org/10.1038/nrn3531>
- Baudouin SJ (2013) Mouse models of autism: a common basis for syndromic and non syndromic autisms ? *Med Sci* 29:121–123. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013292002>
- Boland MJ, Nazor KL, Tran HT, Szűcs A, Lynch CL, Paredes R, Tassone F, Sanna PP, Hagerman RJ, Loring JF (2017) Molecular analyses of neurogenic defects in a human pluripotent stem cell model of fragile X syndrome. *Brain* 140:582–598. <https://doi.org/10.1093/brain/aww357>
- Callan MA, Zarnescu DC (2011) Heads-up: New roles for the fragile X mental retardation protein in neural stem and progenitor cells. *Genesis* 49:424–440. <https://doi.org/10.1002/dvg.20745>
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA (2000) Prader-Willi and Angelman syndromes: Sister imprinted disorders. *Am J Med Genet - Semin Med Genet* 97:136–146. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(200022\)97:2%3C136::AID-AJMG5%3E3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1096-8628(200022)97:2%3C136::AID-AJMG5%3E3.0.CO;2-V)
- Catterall WA, Leal K, Nanou E (2013) Calcium channels and short-term synaptic plasticity. *J Biol Chem* 288:10742–10749. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.411645>
- Cesaroni L, Garber M (1991) Exploring the experience of autism through firsthand accounts. *J Autism Dev Disord* 21:303–313. <https://doi.org/10.1007/BF02207327>
- Chahrouh M, Zoghbi HY (2007) The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. *Neuron* 56:422–437. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.001>
- Chailangkarn T, Trujillo CA, Freitas BC, Hrvoj-Mihic B, Herai RH, Yu DX, Brown TT, Marchetto MC, Bardy C, McHenry L, Stefanacci L, Järvinen A, Searcy YM, DeWitt M, Wong W, Lai P, Ard MC, Hanson KL, Romero S, Jacobs B, Dale AM, Dai L, Korenberg JR, Gage FHMA (2016) A human neurodevelopmental model for Williams syndrome. *Nature* 536:338–343. <https://doi.org/10.1038/nature19067>
- Chamberlain SJ, Chen P, Ng KY, Bourgeois-Rocha F, Lentini-Chlich F, Levine ES, Lalande M (2010) Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader – Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:17668–17673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004487107/-/DCSupplemental>. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1004487107

- Christensen DL, Baio J, KVN B, Bilder D, Charles J, Constantino JN, Daniels J, Durkin MS, Fitzgerald RT, Kurzius-Spencer M, Lee LC, Pettygrove S, Robinson C, Schulz E, Wells C, Wingate MS, Zahorodny W, Yeargin-Allsopp M, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2016) Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morb Mortal Wkly Rep* 65:1–23
- Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandão WN, Rossato C, Andrade DG, Faria Dde P, Garcez AT, Buchpigiel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrão-Braga PCB (2016) The Brazilian Zika virus strain causes microcephaly. *Nature* 534:267–271. <https://doi.org/10.1038/nature18296>
- Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Pak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB (2011) FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 146:247–261. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.013>
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultnery CS, Samocha K, Cicek AE, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S, Singh T, Klei L, Kosmicki J, Shih-Chen F, Aleksic B, Biscaldi M, Bolton PF, Brownfeld JM, Cai J, Campbell NG, Carracedo A, Chahrouh MH, Chiochetti AG, Coon H, Crawford EL, Curran SR, Dawson G, Duketis E, Fernandez BA, Gallagher L, Geller E, Guter SJ, Hill RS, Ionita-Laza J, Jimenez Gonzalez P, Kilpinen H, Klauck SM, Klevzon A, Lee I, Lei I, Lei J, Lehtimäki T, Lin CF, Ma'ayan A, Marshall CR, AL MI, Neale B, Owen MJ, Ozaki N, Parellada M, Parr JR, Purcell S, Puura K, Rajagopalan D, Rehnström K, Reichenberg A, Sabo A, Sachse M, Sanders SJ, Schafer C, Schulte-Rüther M, Skuse D, Stevens C, Szatmari P, Tammimies K, Valladares O, Voran A, Li-San W, Weiss LA, Willsey AJ, Yu TW, Yuen RK, DDD Study; Homozygosity Mapping Collaborative for Autism; UK10K Consortium, Cook EH, Freitag CM, Gill M, Hultman CM, Lehner T, Palotie A, Schellenberg GD, Sklar P, State MW, Sutcliffe JS, Walsh CA, Scherer SW, Zwick ME, Barrett JC, Cutler DJ, Roeder K, Devlin B, Daly MJ, Buxbaum JD (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 515:209–215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>
- Doers ME, Musser MT, Nichol R, Berndt ER, Baker M, Gomez TM, Zhang SC, Abbeduto L, Bhattacharyya A (2014) iPSC-Derived Forebrain Neurons from FXS Individuals Show Defects in Initial Neurite Outgrowth. *Stem Cells Dev* 23:1777–1787. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0030>
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39:25–27
- Ebert DHGM (2013) Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature* 493:327–337. <https://doi.org/10.1038/nid.2014.371>
- Fink JJ, Robinson TM, Germain ND, Sirois CL, Bolduc KA, Ward AJ, Rigo F, Chamberlain SJ, Levine ES (2017) Disrupted neuronal maturation in Angelman syndrome-derived induced pluripotent stem cells. *Nat Commun* 8:15038. <https://doi.org/10.1038/ncomms15038>
- Germain ND, Chen P-F, Plocik AM, Glatt-Deeley H, Brown J, Fink JJ, Bolduc KA, Robinson TM, Levine ES, Reiter LT, Graveley BR, Lalande M, Chamberlain SJ (2014) Gene expression analysis of human induced pluripotent stem cell-derived neurons carrying copy number variants of chromosome 15q11-q13.1. *Mol Autism* 5:44. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-44>
- Geschwind DH (2011) Genetics of Autism Spectrum Disorders. *Trends Cogn Sci* 15:409–416. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.07.003>
- Gomathi M, Balachandrar V (2017) Novel therapeutic approaches: Rett syndrome and human induced pluripotent stem cell technology. *Stem Cell Investig* 4:20. [10.21037/sci.2017.02.11](https://doi.org/10.21037/sci.2017.02.11)
- Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, Nunez Y, Walker MF, Murdoch JD, Sanders SJ, Fernandez TV, Ji W, Lifton RP, Vadasz E, Dietrich A, Pradhan D, Song H, Ming GL, Gu X, Haddad G, Marchetto MC, Spitzer N, Passos-Bueno MR, State MW, Muotri AR (2015) Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol Psychiatry* 20:1350–1365. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.141>
- Grzadzinski R, Huerta M, Lord C (2013) DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. *Mol Autism* 4:12. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-12>
- Hagerman RHP (2013) Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol* 12:786–798. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70125-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70125-X)
- Halevy T, Czech C, Benvenisty N (2015) Molecular mechanisms regulating the defects in fragile x syndrome neurons derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 4:37–46. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.015>
- Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF (2002) Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7746–7750. <https://doi.org/10.1073/pnas.122205699>
- Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE, Smith JD, Paeppe B, Nickerson DA, Dea J, Dong S, Gonzalez LE, Mandell JD, Mane SM, Murtha MT, Sullivan CA, Walker MF, Waqar Z, Wei L, Willsey AJ, Yamrom B, Lee YH, Grabowska E, Dalkic E, Wang Z, Marks S, Andrews P, Leotta A, Kendall J, Hakker I, Rosenbaum J, Ma B, Rodgers L, Troge J, Narzisi G, Yoon S, Schatz MC, Ye K, McCombie WR, Shendure J, Eichler EE, State MW, Wigler M (2014) The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515:216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>
- Kaufmann M, Schuffenhauer A, Fruh I, Klein J, Thiemeyer A, Rigo P, Gomez-Mancilla B, Heidinger-Millot V, Bouwmeester T, Schopfer U, Mueller M, Fodor BD, Cobos-Correa A (2015) High-Throughput Screening Using iPSC-Derived Neuronal Progenitors to Identify Compounds Counteracting Epigenetic Gene Silencing in Fragile X Syndrome. *J Biomol Screen* 20:1101–1111. <https://doi.org/10.1177/1087057115588287>
- Khwaja OS, Ho E, Barnes KV, O'Leary HM, Pereira LM, Finkelstein Y, Nelson CA 3rd, Vogel-Farley V, DeGregorio G, Holm IA, Khatwa U, Kapur K, Alexander ME, Finnegan DM, Cantwell NG, Walco AC, Rappaport L, Gregas M, Fichorova RN, Shannon MW, Sur M, Kaufmann WE (2014) Safety, pharmacokinetics, and preliminary assessment of efficacy of mecamermin (recombinant human IGF-1) for the treatment of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311141111>
- Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM Jr, Lalande M, Latt SA (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32:285–290. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320320235>
- Klevzon A, Bush L, Wang A, Halpern D, Frank Y, Grodberg D, Rapaport R, Tavassoli T, Chaplin W, Soorya L, Buxbaum JD (2014) A pilot controlled trial of insulin-like growth factor-1 in children with Phelan-McDermid syndrome. *Mol Autism* 5:54. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-54>
- Kover ST, McDuffie AS, Hagerman RJ, Abbeduto L (2013) Receptive Vocabulary in Boys with Autism Spectrum Disorder: Cross-

- Sectional Developmental Trajectories. *J Autism Dev Disord* 43: 2696–2709. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Krey JF, Pasca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, Rasmussen R, Dolmetsch RE (2013) Timothy Syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci* 16:201–209. <https://doi.org/10.1038/nn.3307>
- Kumari D, Swaroop M, Southall N, Huang W, Zheng W, Usdin K (2015) High-Throughput Screening to Identify Compounds That Increase Fragile X Mental Retardation Protein Expression in Neural Stem Cells Differentiated from Fragile X Syndrome Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 4:800–808. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0278>
- Leonard H, Cobb S, Downs J (2016) Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. *Nat Publ Gr* 13:37–51. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2016.186>
- Lossie AC, Whitney MM, Amidon D, Dong HJ, Chen P, Theriaque D, Hutson A, Nicholls RD, Zori RT, Williams CA, Driscoll DJ (2001) Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* 38:834–845. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.12.834>
- Lu P, Chen X, Feng Y, Zeng Q, Jiang C, Zhu X, Fan G, Xue Z (2016) Integrated transcriptome analysis of human iPS cells derived from a fragile X syndrome patient during neuronal differentiation. *Sci China Life Sci* 59:1093–1105. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0194-6>
- Marchetto MCN, Carroumeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR (2010) A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 143:527–539. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016>
- Marchetto MC, Belinson H, Tian Y, Freitas BC, Fu C, Vadodaria KC, Beltrao-Braga PC, Trujillo CA, Mendes AP, Padmanabhan K, Nunez Y, Ou J, Ghosh H, Wright R, Brennand KJ, Pierce K, Eichenfield L, Pramparo T, Eyster LT, Barnes CC, Courchesne E, Geschwind DH, Muotri AR (2016) Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2014.05.001>
- Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, Amenduni M, Szekely A, Palejev D, Wilson M, Gerstein M, Grigorenko EL, Chawarska K, Pelphrey KA, Howe JR, Vaccarino FM (2015) FOXP1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* 162: 375–390. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.034>
- Martins-Taylor K, Hsiao JS, Chen PF, Glatt-Deeley H, De Smith AJ, Blakemore AI, Lalande M, Chamberlain SJ (2014) Imprinted expression of UBE3A in non-neuronal cells from a Prader-will syndrome patient with an atypical deletion. *Hum Mol Genet* 23:2364–2373. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt628>
- McLennan Y, Polussa J, Tassone F, Hagerman R (2011) Fragile X Syndrome. *Curr Genomics* 12:216–224. <https://doi.org/10.2174/138920211795677886>
- Meng L, Ward AJ, Chun S, Bennett CF, Beaudet AL, Rigo F (2015) Towards a therapy for Angelman syndrome by reduction of a long non-coding RNA. *Nature* 518:409–412. <https://doi.org/10.1038/nature13975>
- Naisbitt S, Eunjoon K, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtchanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23:569–582. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80809-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80809-0)
- Nygren G, Cederlund M, Sandberg E, Gillstedt F, Arvidsson T, Carina Gillberg I, Westman Andersson G, Gillberg C (2012) The prevalence of autism spectrum disorders in toddlers: A population study of 2-year-old Swedish children. *J Autism Dev Disord* 42:1491–1497. <https://doi.org/10.1007/s10803-011-1391-x>
- Pasca SP, Portmann T, Voineagu I, Yazawa M, Shcheglovitov A, Pasca AM, Cord B, Palmer TD, Chikahisa S, Nishino S, Bernstein JA, Hallmayer J, Geschwind DHDR (2011) Using iPS cell-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy Syndrome. *Nat Med* 17:1657–1662. <https://doi.org/10.1038/nm.2576>
- Phelan K, Mcdermid HE (2012) The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol Syndr* 2:186–201. <https://doi.org/10.1159/000334260>
- Pierce K, Carter C, Weinfeld M, Desmond J, Hazin R, Bjork R, Gallagher N (2011) Detecting, Studying, and Treating Autism Early: The One-Year Well-Baby Check-Up Approach. *J Pediatr* 159:458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.02.036>
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z, Vorstman JA, Thompson A, Regan R, Pilorge M, Pellicchia G, Pagnamenta AT, Oliveira B, Marshall CR, Magalhaes TR, Lowe JK, Howe JL, Griswold AJ, Gilbert J, Duketis E, Dombroski BA, De Jonge MV, Cuccaro M, Crawford EL, Correia CT, Conroy J, Conceição IC, Chiochetti AG, Casey JP, Cai G, Cabrol C, Bolshakova N, Bacchelli E, Anney R, Gallinger S, Cotterchio M, Casey G, Zwaigenbaum L, Wittemeyer K, Wing K, Wallace S, van Engeland H, Tryfón A, Thomson S, Soorya L, Rogé B, Roberts W, Poustka F, Moug S, Minshew N, McInnes LA, McGrew SG, Lord C, Leboyer M, Le Couteur AS, Kolevzon A, Jiménez González P, Jacob S, Holt R, Guter S, Green J, Green A, Gillberg C, Fernandez BA, Duque F, Delorme R, Dawson G, Chaste P, Café C, Brennan S, Bourgeron T, Bolton PF, Bölte S, Bernier R, Baird G, Bailey AJ, Anagnostou E, Almeida J, Wijsman EM, Vieland VJ, Vicente AM, Schellenberg GD, Pericak-Vance M, Paterson AD, Parr JR, Oliveira G, Nurnberger JI, Monaco AP, Maestrini E, Klauck SM, Hakonarson H, Haines JL, Geschwind DH, Freitag CM, Folstein SE, Ennis S, Coon H, Battaglia A, Szatmari P, Sutcliffe JS, Hallmayer J, Gill M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Gallagher L, Betancur C, Scherer SW (2014) Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *Am J Hum Genet* 94:677–694. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018>
- Quaak I, Brouns MR, van de Bor M (2013) The dynamics of Autism Spectrum Disorders: How neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *Int J Environ Res Public Health* 10:3384–3408. <https://doi.org/10.3390/ijerph10083384>
- Rougeulle C, Glatt HLM (1997) The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat Genet* 17:14–15. <https://doi.org/10.1038/nm0798-822>
- Samaco RC, Nagarajan RP, Braunschweig D, LaSalle JM (2004) Multiple pathways regulate MeCP2 expression in normal brain development and exhibit defects in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 13:629–639. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh063>
- Sarasua SM, Dwivedi A, Boccuto L, Chen CF, Sharp JL, Rollins JD, Collins JS, Rogers RC, Phelan K, DuPont BR (2014) 22q13.2q13.32 genomic regions associated with severity of speech delay, developmental delay, and physical features in Phelan-McDermid syndrome. *Genet Med* 16:318–328. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.144>
- Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, Portmann T, Shu R, Sebastiano V, Krawisz A, Froehlich W, Bernstein JA, Hallmayer JF, Dolmetsch RE (2013) SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* 503: 267–271. <https://doi.org/10.1038/nature12618>
- Sheridan SD, Theriault KM, Reis SA, Zhou F, Madison JM, Dameron L, Loring JF, Haggarty SJ (2011) Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026203>

ANEXO B – Artigo na Revista Neurobiology of disease: The use of iPSC technology for modeling Autism Spectrum Disorders

Neurobiology of Disease 130 (2019) 104483

Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Review

The use of iPSC technology for modeling Autism Spectrum Disorders

Fabiele Baldino Russo^{a,1}, Anita Brito^{a,1}, Ariane Miranda de Freitas^a, Andreilissa Castanha^a, Beatriz C. de Freitas^a, Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga^{a,b,*}

^a Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Obstetrics, School of Arts Sciences and Humanities, São Paulo, SP 03828-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Autism Spectrum Disorders
Stem cells
iPSC
Disease modeling
Brain cells
Brain organoid

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASDs) are a group of neurodevelopmental disorders that influence social skills, involving communication, interaction, and behavior, usually with repetitive and restrictive manners. Due to the variety of genes involved in ASDs and several possible environmental factors influence, there is still no answer to what really causes syndromic and non-syndromic types of ASDs, usually affecting each individual in a unique way. However, we know that the mechanism underlying ASDs involves brain functioning. The human brain is a complex structure composed of close to 100 billion cells, which is a big challenge to study counting just with post mortem tissue investigation or genetic approaches. Therefore, human induced pluripotent stem cells (iPSC) technology has been used as a tool to produce viable cells for understanding a working brain. Taking advantage of patient-derived stem cells, researchers are now able to generate neurons, glial cells and brain organoids in vitro to model ASDs. In this review we report data from different studies showing how iPSCs have been a critical tool to study the different phenotypes of ASDs.

1. Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASDs) are neurodevelopmental lifelong disorders, usually identified in early childhood (Ben-Itzhak et al., 2013; Wasilewska and Klukowski, 2015; Quaak et al., 2013). ASDs affected individuals display deficits in social communication and interactions, also exhibiting restrictive and repetitive behaviors (Baio et al., 2018; Ben-Itzhak et al., 2013; Brito et al., 2018; De La Torre-Ubieta et al., 2016). Sensory deficits and reliance to do routine activities can be likewise related. Differences in clinical phenotypes are frequently observed, being associated with strong genetic basis and comorbidities (Clarke et al., 2016; Hoang et al., 2017). The most frequently observed comorbidities displayed in ASDs individuals includes: ADHD (Attention Deficit Hyperactivity Disorder), OCD (Obsessive Compulsive Disorder), Schizophrenia, Epilepsy, Motor and Intellectual Disability (ID), Sleeping and Gastrointestinal Disorders (Bauman, 2010; De La Torre-Ubieta et al., 2016; Muskens et al., 2017).

Since the 1940's many theories around ASD's etiology were speculated, but nowadays, they are associated with the interplay between genetics and environmental factors (De Rubeis et al., 2014; De La Torre-Ubieta et al., 2016; Vorstman et al., 2017; Hoang et al., 2017; Ng et al., 2017). Strong evidences regarding the genetic impact around ASDs

suggest that more than one thousand genes can be implicated in the etiology of this disorder (SFARI gene, 2018). Other cases of autism or any other neurological disorder in the same family may be considered as genetic risk factors for ASDs, being the heritability estimated around 83% (Sandin et al., 2014; Geschwind and State, 2015; Iossifov et al., 2014; Karimi et al., 2017; Sealey et al., 2016). In addition, exposition to some environmental factors during pregnancy, such as the use of medication, active or passive smoking, pollution, consumption of drugs and alcohol, mother infections and parental age have been considered as risk factors for ASDs (Karimi et al., 2017; Modabbernia et al., 2017; Sealey et al., 2016).

ASDs prevalence studies suggest that 1–2% of the world population has some degree of autism, with an incidence increasing around the years probably related to a better understanding towards ASDs and diagnostic abilities (Cawthorpe, 2016; Fombonne et al., 2009). In the United States the last report with the ratio of people diagnosed with ASDs in North America was 1:59 (Baio et al., 2018).

Aiming to unveil the unknown etiology of ASDs and a better understanding of the interaction between genetics and environmental factors, several groups of scientists have been currently employing iPSC (induced Pluripotent Stem Cells) technology in order to grasp the mechanisms underlying autism and its complexity, as well as other

* Corresponding author at: 2nd floor, room 227b, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Butantã, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: patriciacbbbraga@usp.br (P.C.B. Beltrão-Braga).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104483>

Received 30 October 2018; Received in revised form 31 March 2019; Accepted 22 May 2019

Available online 24 May 2019

0969-9961/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Table 1
Types of ASD modeled by iPSC

Types of autism	Associated mutations	Models used	Number of patient's cell lines	Associated cellular phenotype	References
Non-syndromic ASD	Over 1,000 genes	Brain organoids	4	Increased GABAergic progenitor cells and neurotransmitter GABA	Mariani et al. (2015)
		Neurons	1	Reduced total length and dendritic arborization, fewer synapses and impaired calcium dynamics	Grisci-Oliveira et al. (2015)
		NPC and neurons	8	Increase in cell proliferation, upregulation of GABAergic genes in NPCs. Reduced density of excitatory synapses and inhibitory/excitatory neurotransmitters	Marchetto et al. (2017)
Phelan McDermid	Deletion of 22q13.3 or a pathogenic variant in SHANK3	Brain organoids	1	Alterations in DLX6-AS1 and DLX1 gene expression	Wang et al. (2017)
		NPC	6	Abnormal interplay between Reelin-DAB1 and mTORC1 networks	Sánchez-Sánchez et al. (2018)
		Neurons and astrocytes	3	Reduced synapses, less arborization, glial dysfunctions and IL6 increased level	Russo et al. (2018)
Fragile X	FMR1 gene mutation (X chromosome)	Neurons	2	Significant deficits in excitatory synaptic transmission	Shcheglovitov et al. (2013)
		Pyramidal neurons	2	Deficits in excitatory synaptic transmission	Darville et al. (2016)
		Neurons	4	Altered spines, decrease in spine densities	Goudier et al. (2018)
Timothy syndrome	A point mutation in an alternatively spliced exon of CACNA1C, the gene that encodes the α_1 subunit of Cav1.2	Neurons	3	Abnormal neuronal differentiation	Sheridan et al. (2011)
		Neurons	1	Altered synaptic, transcriptional and chromatin genes	Liu et al. (2012)
		Neurons	3	Show defects in initial neurite outgrowth	Doers et al. (2014)
Rett syndrome	Mutation of one allele of MeCP2 gene	Neurons	2	Deficits in calcium signaling, mutant channels exhibiting dendritic retraction activity-dependent, deficits in neuronal differentiation and abnormal expression of tyrosine hydroxylase	Pasca et al. (2011)
		Neurons	2	Dendritic retraction	Krey et al. (2013)
		Neurons	2	Fewer synapses, reduced spine density, smaller soma size, altered calcium signaling and electrophysiological defects	Marchetto et al. (2010)
CDKL5	Mutations in the X-linked CDKL5 gene	NPC and neurons	1	Increased frequency of de novo LINE-1 retrotransposon	Musiri et al. (2010)
		NPC	3	Altered expression of neural progenitor genes	Nageshappa et al. (2016)
		Neurons and astrocytes	3	Morphologic defects in neurons. Mutant astrocytes induce abnormalities in neurons	Williams et al. (2014)
Tuberous sclerosis complex	Mutation in TSC1 and in TSC2	Neurons	2	Decrease in density of dendritic spines	Ricciardi et al. (2012)
		Neurons	2	Reduced number of excitatory synapses and decrease in density of dendritic spines	Amenduni et al. (2011)
		Neurons	3	Altered microtubule dynamics	Baltussen et al. (2018)
Timothy syndrome	de-novo genetic mutation in Cav1.2	Neurons	3	Increased soma size, decreased neurite length and abnormal connections	Li et al. (2017)
		Neurons	3	Delayed neuronal differentiation	Zucco et al. (2018)
		Cortical neurons and oligodendrocyte (OLs)	2	Cellular hypertrophy and increased axonal density	Nadadur et al. (2019)
Angelman syndrome	Loss of function of UBE3A, a gene located at 15q11-q13 region from maternal chromosome	NPC and cortical neurons	5	Altered calcium signaling, dendrite retraction and neuronal differentiation deficits	Pasca et al. (2011)
		Neurons	2	Deficiency in calcium signaling, altered cellular structure and less complexity	Krey et al. (2013)
		Brain organoids	3	Abnormal migration of interneurons	Birey et al. (2017)
		Neurons	3	No phenotype alterations	Chamberlain et al. (2010)
		Neurons	3	Reduction of synaptic activity and plasticity	Fink et al. (2017)

neurological disorders (Fink et al., 2017; Griesi-Oliveira et al., 2015; Marchetto et al., 2017; Marchetto et al., 2010; Mariani et al., 2015; Russo et al., 2018; Tian et al., 2014; Vicidomini et al., 2017). Here, we will describe how iPSC technology can help to understand ASDs pathophysiology, uncovering the mechanisms of CNS cells while keeping the genetic background of individuals with ASDs in a dish. This technology not only may help us to understand neurodevelopmental disorders, but also enables to test drugs in a safe environment with human relevance and background (Brito et al., 2018).

1.1. Non-syndromic and syndromic forms of ASDs

Non-syndromic forms of autism are considered as having a multifactorial inheritance, in which genetic and environmental factors may play a role leading to different degrees or types of autism (Hoang et al., 2017). Although some progress has been made to understand ASDs genetic etiology, only 1% or fewer ASDs individuals have a known genetic culprit (Fernandez and Scherer, 2017). While syndromic ASDs have an established genetic cause and somatic abnormalities, it can also manifest typical ASDs behavior and phenotype (Fernandez and Scherer, 2017) (Table 1). Below, we will briefly present some syndromes already recognized and established as being part of syndromic ASDs.

1.1.1. Rett syndrome

Rett Syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder with a higher prevalence in females, being sometimes lethal in males and it was the first form of syndromic autism with a very defined genetic cause associated (Amir et al., 1999). The majority of RTT patients (95%) have a mutation in the X-linked transcriptional regulator MethylCpG-binding Protein 2 (*MECP2*). In the remaining 5% of cases, individuals affected by RTT or RTT-like features may present mutations in other genes, such as the Cyclin-dependent kinase-like 5 gene (*CDKL5*) (Neul, 2012) and Forkhead box protein G1 gene (*FOXP1*) (Ariani et al., 2008).

1.1.2. *CDKL5*

CDKL5 is a very rare neurodevelopmental disorder, caused by mutations in *CDKL5* gene (Ricciardi et al., 2012; Trazzi et al., 2018) and it was initially included in an atypical form of RTT. *CDKL5* affected patients display clinical features related to RTT, including motor impairment, intellectual disability, visual deficits, early-onset epilepsy and autism. However, due to the very early seizures variants not found in *MECP2* mutated patients, *CDKL5* condition is considered a distinct clinical entity rather than a variant of RTT (Archer et al., 2006).

1.1.3. Phelan-McDermid syndrome

Phelan-McDermid Syndrome (PMS) displays a deletion in the *SHANK3* gene (22q13). PMS is a neurodevelopmental disorder and affected individuals manifest autistic features (around 80%), intellectual disability, delayed or absent speech and hypotonia. Correlations between genotype-phenotype analysis have shown that the larger the deletion is in the *SHANK3* gene, the more apparent are the dysmorphic features and the impairments related to autism (Soorya et al., 2013).

1.1.4. Fragile X syndrome

Fragile X Syndrome (FXS) is correlated to an unstable expansion of the CGG trinucleotide repeat within Fragile X Mental Retardation (*FMR1*) gene, located in the X chromosome. Approximately one-third of people with FXS also have ASDs (Hernandez et al., 2009; U.S. National Library of Medicine, 2018a).

1.1.5. Tuberous sclerosis complex

Tuberous Sclerosis Complex (TSC) is considered a rare neurodevelopmental disorder resulting from mutations in the *TSC1* and *TSC2* genes (Nadadthur et al., 2019). TSC patients can present irregularity in lungs, kidneys, skin, eyes, heart, and brain. TSC affected individuals

also may exhibit behavioral, psychiatric, psychosocial and intellectual disabilities (Vignoli et al., 2015). ASDs are the most common psychiatric problem in TSC, affecting over 61% of individuals, whereas the mechanism remains unknown (Gipson, 2013; Vignoli et al., 2015).

1.1.6. Timothy syndrome

Timothy Syndrome (TS) is a multisystem rare disorder in which individuals present autism features, different cardiac problems, syndactyly, dysmorphic facial features, immune deficiency and neurological dysfunction (Bett et al., 2012). A common de novo genetic mutation in *Cav1.2* gene is responsible for the TS phenotypic abnormalities in different and multiple organ systems (Splawski et al., 2004). TS shares some of the features of ASDs, like deficit in communication and socialization skills and in developing language and speech. Intellectual disability and seizures, other common features present in people with ASDs, are also present in individuals with TS (U.S. National Library of Medicine, 2018b).

1.1.7. Angelman syndrome

Angelman Syndrome (AS) is a neurodevelopmental disorder caused by the loss of function of *UBE3A*, a gene located at 15q11-q13 region from maternal chromosome (Peters et al., 2004). AS affected individuals present profound mental retardation, ataxia, continual outbursts of laughter, severe language and speech delay, abnormal electroencephalogram and seizures. Besides the core symptoms described above, they also present hyperactivity, stereotypic behavior and impulsivity, phenotypes related to ASDs (Lossie et al., 2001; Peters et al., 2004; Trillingsgaard and Østergaard, 2004). Mutations in the same chromosome region 15q11-q13, but from the paternal homologue, cause Prader-Willi Syndrome (PWS), a complex neurodevelopmental disorder presenting a great variability of symptoms, such as mild to moderate intellectual disability, hypotonia, irritability, social dysfunction, compulsivity, hyperphagia, rigidity, growth hormone deficiencies, feeding problems, hypogonadism and, in some cases, psychosis (Dykens et al., 2007; Elena et al., 2012). A limited percentage of individuals with ASDs may present mutation in chromosome 15q11.2-q3 and there are not enough data on the rates and characteristics of ASDs in PWS.

2. iPSC to model ASDs

Pluripotent stem cells (PSC), including embryonic stem cells (ESC) and induced-PSC (iPSC), are undifferentiated cells with self-renewal capability and the potential to differentiate into most cell types of the body, providing the possibility to model human cells and tissues in vitro (Centeno et al., 2018; Romito and Cobellis, 2016). The use of iPSC offers opportunities for analyzing brain development and the consequences of its dysfunctions in neurodevelopmental disorders, without the ethical issues of embryonic lines or limited durability of primary cultures. It provides limitless in vitro CNS models for disease modeling, still keeping the genetic background of patients, which is very useful, both to study monogenic diseases as well as more complex polygenic diseases (Liu et al., 2018). Additionally, the enthusiasm of using iPSC for patient-specific autologous therapy or drug screening gives rise to a novel design of medicine practice, the personalized medicine.

Currently, iPSC have been largely used to model diseases that affect the CNS, especially because the difficulty to access the brain. Most iPSC disease modeling studies use the conventional 2D monolayer culture platform recreating well defined neural cell types disease-relevant (Fig. 1) (Russo et al., 2015). Different phenotypes in neural precursor cells, neurons and glial cells derived from iPSC were already reported for syndromic and non-syndromic autistic individuals (Griesi-Oliveira et al., 2015; Marchetto et al., 2017; Marchetto et al., 2010; Russo et al., 2018; Shcheglovitov et al., 2013). In addition, more complex 3D models were also developed (Lancaster et al., 2013; Lancaster and Knoblich, 2014) and could bring new insights to ASDs understanding (Fig. 1).

Here, we describe the findings obtained using conventional 2D

Disease Modeling Complexity

Fig. 1. Diagram of disease modeling and drug development with iPSC. Specific iPSC can be derived from individuals with ASDs. Human iPSC could be further differentiated into the affected neuronal and glial subtypes for disease modeling in vitro. The identified phenotypes could be used as readouts for drug discovery.

models in a dish.

2.1. Neural progenitor cells

Neural Progenitor Cells (NPC) are multipotent and self-renewing neural stem cells (Van Praag et al., 2002). Dysfunction of NPC has been associated with many neurological disorders, such as non-syndromic autism (Griesi-Oliveira et al., 2015; Marchetto et al., 2017) and syndromic autism, including RTT (Marchetto et al., 2010) and TS (Pasca et al., 2011).

NPC from non-syndromic autistic individuals mutants for TRPC6 gene did not show changes in proliferation (Griesi-Oliveira et al., 2015). In contrast, NPC from non-syndromic autistic individuals presenting macrocephaly revealed an increase in cell proliferation and an upregulation of GABAergic genes (Marchetto et al., 2017). An abnormal interplay between Reelin-DAB1 and mTORC1 networks was also reported in iPSC-derived NPC from non-syndromic ASDs individuals (Sánchez-Sánchez et al., 2018).

In regard of RTT syndrome, NPCs derived from RTT-iPSC were able to undergo X-inactivation when differentiating into functional neurons (Marchetto et al., 2010). Another report demonstrated that NPC derived from RTT-iPSC increased long interspersed nuclear element-1 retrotransposon (LINE-1), showing that MECP2 regulates these events (Muotri et al., 2010). Regarding NPC derived from iPSC models with MECP2 duplication, an altered expression of neural progenitor genes was reported (Nageshappa et al., 2016).

For TS, NPC and also cortical neurons showed phenotypes linked to the mutated channel malfunction, defects in calcium signaling, and gene expression-dependent activity (Pasca et al., 2011).

2.2. Neurons

Neurons process and transmit information through electrical and chemical signal via synapses. Abnormal formation of neuronal networks and synaptogenesis were previously associated with ASDs in postmortem brain tissues studies (Sajdel-Sulkowska et al., 2011). Human postmortem analysis have revealed neuronal cellular phenotypes such as altered neuronal morphology, reduced soma size, fewer dendritic spines, and reduced dendritic arborization (Armstrong et al.,

1998; Belichenko et al., 1997), in which similar findings were also reported using iPSC to model non-syndromic ASDs individuals. In one non-syndromic autistic individual carrying a mutation in the TRPC6 gene, iPSC-derived neurons revealed changes in neuronal morphology, including reduced total length and dendritic arborization, as well as in functionality such as fewer synapses and impaired calcium dynamics. In addition, hyperforin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) were able to rescue the neuronal abnormalities in vitro (Griesi-Oliveira et al., 2015).

Regarding neuronal functionality, the concept of excitatory and inhibitory balance is considered a key point during neurodevelopment. In ASDs, the imbalance between excitatory and inhibitory synapses were reported before, especially for some gene mutations related to synaptic function, leading to a disrupted social behavior and cognitive deficits (Rubenstein and Merzenich, 2003; Rubenstein, 2010; Hensch, 2005). Some previous work also reported that the modular arrangement of neocortex minicolumns in the brain of ASDs is narrower, with a defect in GABAergic fibers, leading to an increase in seizure episodes (Casanova et al., 2003). On the other hand, iPSC-derived neurons from FOXG1 mutated patients showed an overproduction of GABAergic neurons (Mariani et al., 2015). Other study using iPSC-derived neurons from a cohort of ASDs-macrocephalic individuals revealed significant reduction in both inhibitory and excitatory neurotransmitters and a reduced density of excitatory synapses, with functionality rescued by IGF-1 treatment (Marchetto et al., 2017). Recently, our group modeled a cohort of non-syndromic ASDs individuals, matching clinical criteria, including stereotyping, language impairment, nonaggressive behavior, sleep disturbance, with no history of epileptic seizures, not macrocephalic at birth and without genetic variants in common. Neurons derived from these cohort presented a significant decrease in excitatory neurotransmitters, synaptic events and spontaneous spike rate, thus revealing reduced activity of neurons (Russo et al., 2018).

Human iPSC technology has also been used to study syndromic form of ASDs. iPSC-derived neurons from RTT patients exhibited increased frequency of de novo LINE 1 retrotransposon, as also reported for NPC (Muotri et al., 2010). In addition, neurons displayed reduced dendritic spine density, smaller soma size, fewer synapses, alterations in Ca²⁺ influx, and altered electrophysiology. Also, in this study the treatment using IGF-1 was able to rescue the synaptic number (Marchetto et al.,

2010). IGF1 is currently in clinical trials for RTT patients. In contrast, a duplication on MeCP2 gene produced an increase in the synaptogenesis and dendritic complexity in cortical neurons, with an alteration in neuronal network synchronization (Nageshappa et al., 2016). For the CDKL5, an atypical form of RTT, two groups taking advantage of iPSC technology, produced post mitotic neurons from patients with the referred gene mutation. However, the results didn't find consent, varying from none phenotypical differences and reduction on the number of excitatory synapses and decrease in density of dendritic spines (Amenduni et al., 2011; Ricciardi et al., 2012). More recently, CDKL5 KO neurons revealed altered microtubule dynamics (Baltussen et al., 2018).

Defects in the development, maintenance, and plasticity of neuronal network connectivity are implicated in FXS. iPSC-derived neurons from FXS showed epigenetic differences on FMR1 gene expression, resulting in abnormal neuronal differentiation (Sheridan et al., 2011). In addition, a reduced postsynaptic and synaptic puncta density, less neurite length, and elevated calcium influx were reported in iPSC-derived neurons (Doers et al., 2014; Liu et al., 2012).

Human iPSC-derived neurons from PMDS revealed significant deficits in excitatory synaptic transmission. These deficits were recovered by the expression of SHANK3 and by the pharmacological treatment with IGF-1. According to the results presented, there is a strong link between the SHANK3 gene and the synaptic abnormalities, which can be treated both pharmacologically and genetically (Shcheglovitov et al., 2013). In addition, SHANK3 protein levels and its recruitment to the glutamatergic synapses was tested using iPSC-derived platform (SA001 hESC line). Aripiprazole, BWB 70C, Fendiline HCl, Fluoxetine, Lithium and Valproic Acid were tested, the last three being able to increase SHANK3 levels in neurons (Darville et al., 2016). More recently, a model using iPSC-derived pyramidal neurons showed alterations in synaptogenesis and spine densities (Gouder et al., 2018).

TSC iPSC-derived neurons showed increased soma size, decreased neurite length and abnormal connections (Li et al., 2017). Delayed neuronal differentiation related to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT was also reported in iPSC-derived neurons (Zucco et al., 2018). More recently, cortical neurons and oligodendrocyte (OLs) cultures were generated to investigate neuron-glia interactions (Nadadthur et al., 2019). The authors showed an increased network activity and dendritic branching in mono cultures of neurons. However, in co-cultures with OLs, neuronal alterations became more apparent, presenting cellular hypertrophy and increased axonal density. Pharmacological treatment using mTOR regulator rapamycin suppressed these defects (Nadadthur et al., 2019).

In TS, neurons derived from iPSC demonstrated deficits in calcium signaling, with mutant channels exhibiting dendritic retraction activity-dependence, deficits in neuronal differentiation and abnormal expression of tyrosine hydroxylase (TH). The abnormal expression of TH was reversed by roscovitine treatment (Pasca et al., 2011). Another study observed an increase in intracellular calcium in human iPSC-derived neurons and in rodents after membrane depolarization suggesting that neurons present deficiency in calcium signaling. It has also been seen that some changes in the membrane potential have occurred, in which they regulate the signaling by controlling the arborization and decreasing the complexity of the cellular structure (Krey et al., 2013).

The first study modeling AS and PWS from iPSC derived patients did not reveal any phenotypic differences between AS and control neurons, but that UBE3A imprinting occurred during neuronal differentiation in AS cells (Chamberlain et al., 2010). Induction of SNHG14 expression was observed behind silencing of the paternal UBE3A gene, suggesting that this is a late event during neuronal differentiation (Stanurova et al., 2016). In addition, another study that generated iPSC from AS patients with large deletion of 15q11-q13 chromosome, and differentiated into functional neurons showed a decrease of synaptic activity and reduction of synaptic plasticity (Fink et al., 2017).

2.3. Glial cells

Glial cells are the most abundant cell type in the CNS and play essential roles in maintaining brain homeostasis providing support and protection for neurons (Barres and Raff, 1993; Kettenmann and Verkhratsky, 2008; Zhang, 2001; Zheng et al., 2018). More specifically, astrocytes support neuronal networks, axonal guidance, give nourishment of neurons, respond to inflammation and form along with other cells the blood brain barrier. In addition, astrocytes contribute to neuronal morphology and synaptogenesis (Erglu and Barres, 2010; Johnson et al., 2007; Pekny et al., 2014; Ullian et al., 2004; Zhang and Barres, 2010). Current applications of iPSC technologies in patient-specific models tend to focus on neuronal phenotypes. However non-neuronal cell types of CNS have been shown to play a very important role in several pathologies, including ASDs. Glial alterations have also been described in postmortem ASDs samples (Edmonson et al., 2014). Generation of glia cells from patient-derived iPSC could help understanding the mechanisms involved in ASDs.

Astrocytes-derived from iPSC revealed their role in RTT patient's cell model. Mutant astrocytes could induce abnormalities and affect the neurons, but using IGF-1 and GPE (a peptide containing the first 3 amino acids of IGF-1) morphologic defects were rescued (Williams et al., 2014).

Our group was the first to describe an iPSC model of non-syndromic autism focusing on the interplay between neurons and astrocytes. Based on co-culture experiments, we observed that ASDs-derived astrocytes interfered with proper neuronal development. In contrast, we observed an improvement in ASDs neuronal morphology and synaptogenesis combining these neurons with control astrocytes. Furthermore, after identifying an increased level of interleukin-6 (IL-6) secretion from astrocytes in individuals with ASDs as a possible culprit for neural defects, we were able to increase synaptogenesis by blocking IL-6 levels (Russo et al., 2018). IL-6, one of the most important neuroimmune factors, is normally expressed at relatively low levels and increases under pathological conditions (Gadient and Otten, 1997; Jüttler et al., 2002; Spooren et al., 2011). Previous studies already reported an increasing of IL-6 in plasma (Ashwood et al., 2008; Emanuele et al., 2010; Malik et al., 2011), peripheral blood cells (Enstrom et al., 2011), postmortem brain (Li et al., 2009; Vargas et al., 2005; Wei et al., 2011) and cerebrospinal fluid in autism (Vargas et al., 2005). Our work demonstrated that glial dysfunctions could contribute to non-syndromic autism pathophysiology generating novel insights and providing a platform for drug discovery and future potential therapies (Russo et al., 2018).

Other type of glial cells in CNS is the microglia, the resident macrophages in the brain and spinal cord. In recent years microglia have aroused more attention as significant modulators of neurogenesis, development, and pathogenesis of the CNS (Zheng et al., 2018). Abnormal microglial function was demonstrated in postmortem tissue from autistic individuals as well as in mouse models of ASDs (Edmonson et al., 2014). For example, ASDs postmortem brain tissue exhibits an increased microglial density in gray matter, activated microglial morphology and altered cytokine profiles (Morgan et al., 2010; Suzuki et al., 2013; Vargas et al., 2005), as well as an increased number of markers in the surface of the microglial cells was reported in the prefrontal cortex of postmortem brain tissue from children with ASDs (Edmonson et al., 2014). Additionally, for RTT, altered microglial function was also described (Derecki et al., 2012; Derecki et al., 2013; Tsai, 2012). Microglia from MECP2 null mice, a model of RTT, produced a conditioned media that damaged synaptic connectivity via a glutamate-excitotoxicity mechanism (Derecki et al., 2012). Interestingly, investigating cells with same pathway of differentiation of microglia, macrophage and monocyte from autistic patients presented higher plasma levels of factors involved in immune system regulation (Goines et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011; Sweeten et al., 2003).

There are some described protocols to produce microglia cells from

iPSC (Douvaras et al., 2017; Pandya et al., 2017; Yanagimachi et al., 2013). However, there are still no specific studies in this field for ASDs. The use of iPSC technology could help understanding the mechanisms involved in this type of CNS cell and help in the autism field.

Oligodendrocytes are the glial cells that produce myelin sheaths around nerve fibers in the CNS and have become the optimal cell source for modeling and treating demyelinating diseases (Zheng et al., 2018). Studies have suggested the possible role of oligodendrocytes in the pathogenesis of autism. Reduced concentrations of *N*-acetyl aspartate (NAA), an amino acid considered very important to support myelination, were found in brain regions in autistic patients, specifically in the left frontal cortex (Corrigan et al., 2013; Kleinhans et al., 2007). Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) isolated from the cortex of TS mice showed a more complex morphology and higher levels of myelin protein expression (Cheli et al., 2018). There are few developed protocols to produce oligodendrocytes from iPSC for disease modeling (Wang et al., 2013). The development of this technology may be the guidance we need to fully understand the mechanisms involved in this cellular type and also in autism pathology.

2.4. 3D model of brain organoids

Organoids could be defined as 3D multicellular aggregates derived from stem cells that differentiate and self-organize, mimicking the whole developing organs, keeping structural features and preserving diverse cell types interactions (Dutta et al., 2017). The progress on iPSC-derived brain organoids provided more accurate models for assessing the pathogenesis of ASDs (Lancaster et al., 2013; Lancaster and Knoblich, 2014; Sasai, 2013; Yin et al., 2016). It is also available increments of brain organoids protocols, leading to a production of specific regions of the brain, like hippocampus and cerebellum, as well as cortical folding (Quadrato et al., 2016).

In addition, the use of this technology will possibly allow us to recreate early stages of corticogenesis, studying prenatal brain organization and function (Birey et al., 2017).

Neuronal phenotypes using brain organoids from non-syndromic ASDs individuals, presenting a mutation in the *FOXG1* gene, were investigated and an upregulation of genes involved in neuronal differentiation and synaptic formation was reported. In this work, GABAergic progenitor cells and neurotransmitter GABA were increased in organoid structures suggesting an imbalance in ASDs. In addition, transcriptome analyses of organoids revealed that *FOXG1* could be responsible for over-production of the GABAergic neuronal lineage, which could be restored by interfering in *FOXG1* expression, revealing that *FOXG1* could be related to modulation of brain size (Mariani et al., 2015).

Another study also investigated a role of a single mutation for ASDs using cerebral organoids. Transcriptomic analysis of cerebral organoids carrying a mutation in the *CHD8* gene showed that *DLX6-AS1* and *DLX1*, genes involved in interneuron differentiation, are among the top differentially expressed genes in *CHD8* knockout organoids (Wang et al., 2017). Additionally, cellular phenotypes of TS were studied using three-dimensional spheroids and an abnormal migration of interneurons was observed for the first time (Birey et al., 2017). Similar studies have been performed in schizophrenia (Ye et al., 2017).

Recently, methods of iPSC derived brain organoids within a physiological tissue environment were developed by using efficient *in vivo* engraftment mouse models, which can help in drug screening (Basuodan et al., 2018; Mansour et al., 2018). The platform of the brain organoids is the only platform that recreates the 3D architecture of the human brain and recapitulates the process of human neurodevelopment. The main disadvantages of this method include: the variability between protocols that can lead to different cell types generated or variable 3D structure shapes and size, the difficulties to apply to it for high-throughput screening, the time in culture can be sometimes longer than 2D and, specifically in the ASDs studies, there is no synaptic assay such as puncta staining or neurite outgrowth phenotype described in

the literature due to technique limitations.

3. Current and future scenarios

Induced Pluripotent Stem cells represent an unprecedented tool to investigate disorders that affect the CNS. Thus, taking advantage of iPSC disease modeling sounds like a complementary strategy to better uncover the mechanisms of ASDs, using alive cells and maintaining genetic background of autistic individuals, which is particularly interesting considering that ASDs is polygenic. In the case RTT for example, iPSC technology unveiled cellular and molecular phenotypes regarding *MECP2* gene mutation and also provided evidences that addition of *IGF-1* could rescue synaptic events on neurons (Marchetto et al., 2010). Furthermore, co-culture models, as illustrated by ASDs-derived neurons cultured on top of astrocytes, provided valuable insights regarding astrocyte's role on ASDs and neuroinflammation (Russo et al., 2018).

Another valuable tool that could be combined with iPSC technology is the production of isogenic cell lines. For syndromic ASDs or single cell mutation, isogenic cell lines could be a valuable tool to verify the role of one gene, connecting it with a clinical phenotype. This could be provided either using genome editing technology, such as clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) or selecting clones based on X inactivation, for mutated genes located on chromosome X, like RTT for example (Freitas et al., 2019).

However, as any experimental method, iPSC disease modeling for ASDs also presents some limitations that should be run through, like the diversity between iPSC clones, the appropriate experimental methods and validations in order to generate robust phenotypes, which in turns could be directed linked with the genetic background of ASDs individual. Besides, it is important to consider that correction of gene mutated in patient-derived iPSC generating isogenic cell lines could provide ideal control iPSC for use as controls in disease models. Additionally, it is important to consider the number of individuals modeled or, at least, identify clinical endophenotypes to cluster them in order to identify *in vitro* phenotypes that could be later related to clinical signals of ASDs. Considering that and thinking on ASDs genetic diversity, our group created an initiative to collect dental pulp stem cells from many ASDs individual, using it as cell sources to modeled ASDs. This initiative turns into a biobank in Brazil, called "The Tooth Fairy Project" (Russo et al., 2018). Started in 2009, the project collected teeth from ASDs individuals from all parts of Brazil. Our goal was to give visibility to the project, thus we created a NGO, with a site, a Facebook page and e-mail address, promoting the family's contact and teeth donations. Actually, we have about 300 of stem cells waiting to be modeled.

Regarding the use of iPSC technology to replace a 2D monolayer culture model by 3D brain organoids, this empowered scientists to recreate self-organized cortical layers, with regional specifications, multiple cell interactions and migration, observed during brain development. 3D models bring us closer to human brain development than ever before, contributing to a better understanding of ASDs. Thus, comparing 2D with 3D systems, organoids gave us the possibility to enhance our understanding of the pathobiology of neurological diseases. However, despite some sophistication already available in brain organoid technology, like production of specific regions and folding, there is still much to be improved. For example, human brain contains billions of cells, not only neuronal cell types. Brain organoids in a dish have only a fraction of the different cellular subtypes expected in the brain, missing for example endothelial cells, blood, and microglia. For this last cell, the incorporation of immune and inflammatory cells, will lead brain organoid model to another level of complexity, especially useful to model infectious diseases, but also to investigate neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. Additionally, blood vessels are not a feature of *in vitro* brain organoids, and the lack of vascularization presumably leads to an abnormal distribution of nutrients to the cells. Also, this represent a gap to study interactions of the blood-brain-

barrier (BBB), especially relevant to consider drug delivery to the brain. One way proposed to overcome BBB lack was the engraftment of human brain organoids into mice-brain, as a way to incorporate vasculature, leading the interaction with blood and host physiology (Mansour et al., 2018).

Not only the etiology of ASDs has been uncovered using iPSC, but therapeutic areas are also making progress using this great tool. Based on either mechanism of cellular toxicity or on neurite outgrowth, iPSC-diseases modeling technology is accelerating clinical trials. For example, based on results of iPSC RTT modeling, the IGF-1 is ongoing for clinical trials (Kolevzon et al., 2014; Khwaja et al., 2014; <https://ClinicalTrials.gov>; protocols numbers: NCT01970345; NCT01894958; NCT01777542; NCT01525901; NCT01253317). Compounds like Luteolin have been used for anti-inflammatory properties in in vitro astrocytes and were already tested in ASDs patients diet with success, proving the ability of iPSCs to address cell-specific compounds (Jeon et al., 2014; Tsilioni et al., 2015; Zuiki et al., 2017).

In summary, iPSC brought a tool to investigate the molecular and functional pathways of brain cells and target drug testing for ASDs treatment, transforming it into clinical trials, improving the quality of life of ASDs individuals and their families.

Acknowledgements

We would like to thank the support of the agency FAPESP (2011/20683-0, 09/51180-03, 2016/02978-6), CNPq for PhD fellowship and to the ASDs and control individuals and their families for donation of their teeth to “the tooth fairy project”. We also thank Thomas McGilvray for manuscript revision.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Amenduni, M., De Filippis, R., Cheung, A.Y.L., Disciglio, V., Epistolato, M.C., Ariani, F., Mari, F., Mencarelli, M.A., Hayek, Y., Renieri, A., Ellis, J., Meloni, I., 2011. IPS cells to model CDKL5-related disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 1246–1255. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.131>.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y., 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188. <https://doi.org/10.1038/13810>.
- Archer, H.L., Evans, J., Edwards, S., Colley, J., Newbury-Ecob, R., O'Callaghan, F., Huyton, M., O'Regan, M., Tolmie, J., Sampson, J., Clarke, A., Osborne, J., 2006. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *J. Med. Genet.* 43, 729–734. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.041467>.
- Ariani, F., Hayek, G., Rondinella, D., Artuso, R., Mencarelli, M.A., Spanhol-Rosseto, A., Pollazzon, M., Buoni, S., Spiga, O., Ricciardi, S., Meloni, I., Longo, I., Mari, F., Broccoli, V., Zappella, M., Renieri, A., 2008. FOXG1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.015>.
- Armstrong, D.D., Dunn, K., Antalffy, B., 1998. Decreased dendritic branching in frontal, motor and limbic cortex in Rett syndrome compared with trisomy 21. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* <https://doi.org/10.1097/00005072-199811000-00003>.
- Ashwood, P., Enstrom, A., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R.L., Croen, L.A., Ozonoff, S., Pessah, I.N., Van de Water, J., 2008. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *J. Neuroimmunol.* 204, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.07.006>.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D.L., Maenner, M.J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Robinson Rosenberg, C., White, T., Durkin, M.S., Imm, P., Nikolau, L., Yearig-Allsopp, M., Lee, L.-C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R.T., Hewitt, A., Pettygrove, S., Constantino, J.N., Vehorn, A., Shenouda, J., Hall-Lande, J., Van Naarden Braun, K., Dowling, N.F., 2018. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. *MMWR Surveill. Summ.* 67, 1–23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>.
- Baltussen, L.L., Nagraes, P.D., Silvestre, M., Claxton, S., Moeskops, M., Christodoulou, E., Flynn, H.R., Snijders, A.P., Muotri, A.R., Ulltanir, S.K., 2018. Chemical genetic identification of CDKL5 substrates reveals its role in neuronal microtubule dynamics. *EMBO J.* e99763. <https://doi.org/10.15252/embj.201899763>.
- Barres, B.A., Raff, M.C., 1993. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 361, 258–260. <https://doi.org/10.1038/361258a0>.
- Basudan, R., Basu, A.P., Clowry, G.J., 2018. Human neural stem cells dispersed in artificial ECM form cerebral organoids when grafted in vivo. *J. Anat.* 233, 155–166. <https://doi.org/10.1111/joa.12827>.
- Bauman, M.L., 2010. Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics* 7, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.06.001>.
- Belichenko, P.V., Hagberg, B., Dahlström, A., 1997. Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathol.* 93, 50–61. <https://doi.org/10.1007/s004010050582>.
- Ben-Itzhak, E., Ben-Shachar, S., Zachor, D.A., 2013. Specific neurological phenotypes in autism spectrum disorders are associated with sex representation. *Autism Res.* 6, 596–604. <https://doi.org/10.1002/aur.1319>.
- Bett, G.C., Lis, A., Wersinger, S.R., Baizer, J.S., Duffey, M.E., Rasmussen, R.L., 2012. A mouse model of Timothy syndrome: a complex autistic disorder resulting from a point mutation in Cav1.2. *N. Am. J. Med. Sci. (Boston)* 5, 135–140. <https://doi.org/10.7156/v5i3p135>.
- Birey, F., Andersen, J., Makinson, C.D., Islam, S., Wei, W., Huber, N., Fan, H.C., Metzler, K.R.C., Panagiotakos, G., Thom, N., Rourke, N.A.O., Steinmetz, L.M., Bernstein, J.A., Hallmayer, J., Huguenard, J.R., Pasca, S.P., 2017. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature* 545, 54–59. <https://doi.org/10.1038/nature22330>.
- Brito, A., Russo, F.B., Muotri, A.R., Beltrão-Braga, P.C.B., 2018. Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells. *Cell Tissue Res.* 371, 153–160. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2685-x>.
- Casanova, M.F., Buxhoeveden, D., Gomez, J., 2003. Disruption in the inhibitory architecture of the cell minicolumn: implications for autism. *Neuroscientist* 9, 496–507. <https://doi.org/10.1177/1073858403253552>.
- Cawthorpe, D., 2016. Comprehensive description of comorbidity for autism Spectrum disorder in a general population. *Perm. J.* 2016, 86–90. <https://doi.org/10.7812/TPP/16-088>.
- Centeno, E.G.Z., Cimarosti, H., Bithell, A., 2018. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Mol. Neurodegener.* 13, 27. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0258-4>.
- Chamberlain, S.J., Chen, P., Ng, K.Y., Bourgeois-rocha, F., Lemtiri-chlieh, F., Levine, E.S., Lalande, M., 2010. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader–Willi syndromes. *Pnas* 107, 17668–17673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004487107>.
- Cheli, V.T., Santiago González, D.A., Zamora, N.N., Lama, T.N., Spreuer, V., Rasmussen, R.L., Bett, G.C., Panagiotakos, G., Paez, P.M., 2018. Enhanced oligodendrocyte maturation and myelination in a mouse model of Timothy syndrome. *Glia* 1–16. <https://doi.org/10.1002/glia.23468>.
- Clarke, T.K., Lupton, M.K., Fernandez-Pujals, A.M., Starr, J., Davies, G., Cox, S., Pattie, A., Liewald, D.C., Hall, L.S., Macintyre, D.J., Smith, B.H., Hocking, L.J., Padmanabhan, S., Thomson, P.A., Hayward, C., Hansell, N.K., Montgomery, G.W., Medland, S.E., Martin, N.G., Wright, M.J., Porteous, D.J., Deary, J.J., McIntosh, A.M., 2016. Common polygenic risk for autism spectrum disorder (ASD) is associated with cognitive ability in the general population. *Mol. Psychiatry* 21, 419–425. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.12>.
- Corrigan, N.M., Shaw, D.W.W., Estes, A.M., Richards, T.L., Munson, J., Friedman, S.D., Dawson, G., Artru, A.A., Dager, S.R., 2013. Atypical developmental patterns of brain chemistry in children with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry* 70, 964–974. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.1388>.
- Darville, H., Poulet, A., Rodet-Amsellem, F., Chatrousse, L., Pernelle, J., Boissart, C., Héron, D., Nava, C., Perrier, A., Jarrige, M., Cogé, F., Millan, M.J., Bourgeron, T., Peschanski, M., Delorme, R., Benchoua, A., 2016. Human pluripotent stem cell-derived cortical neurons for high throughput medication screening in autism: a proof of concept study in SHANK3 haploinsufficiency syndrome. *EBioMedicine* 9, 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.032>.
- De La Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J.L., Geschwind, D.H., 2016. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nat. Med.* 22, 345–361. <https://doi.org/10.1038/nm.4071>.
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., Poultney, C.S., Samocha, K., Ercument Cicek, A., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S.-C., Alekic, B., Biscaldi, M., Bolton, P.F., Brownfield, J.M., Cai, J., Campbell, N.G., Carracedo, A., Chahrouh, M.H., Chiochetti, A.G., Coon, H., Crawford, E.L., Crooks, L., Curran, S.R., Dawson, G., Duketis, E., Fernandez, B.A., Gallagher, L., Geller, E., Guter, S.J., Sean Hill, R., Ionita-Laza, I., Jimenez Gonzalez, P., Kilpinen, H., Klauk, S.M., Kolevzon, A., Lee, I., Lei, J., Lehtimäki, T., Lin, C.-F., Ma'ayan, A., Marshall, C.R., McInnes, A.L., Neale, B., Owen, M.J., Ozaki, N., Parellada, M., Parr, J.R., Purcell, S., Puura, K., Rajagopalan, D., Rehnström, K., Reichenberg, A., Sabo, A., Sachse, M., Sanders, S.J., Schafer, C., Schulte-Rüther, M., Skuse, D., Stevens, C., Szatmari, P., Tammimies, K., Valladares, O., Voran, A., Wang, L.-S., Weiss, L.A., Jeremy Willsey, A., Yu, T.W., Yuen, R.K.C., Cook, E.H., Freitag, C.M., Gill, M., Hultman, C.M., Lehner, T., Palotie, A., Schellenberg, G.D., Sklar, P., State, M.W., Sutcliffe, J.S., Walsh, C.A., Scherer, S.W., Zwick, M.E., Barrett, J.C., Cutler, D.J., Roeder, K., Devlin, B., Daly, M.J., Buxbaum, J.D., 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 515, 209–215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S.B.G., Guyenet, P.G., Kipnis, J., 2012. Wild type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 484, 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature10907>.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C., Kipnis, J., 2013. The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends Immunol.* 34, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.002>.
- Doers, M.E., Musser, M.T., Nichol, R., Berndt, E.R., Baker, M., Gomez, T.M., Zhang, S.,

- Abbeduto, L., Bhattacharyya, A., 2014. iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem Cells Dev.* 23, 1777–1787. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0030>.
- Douvaras, P., Sun, B., Wang, M., Kruglikov, I., Lallós, G., Zimmer, M., Terrenoire, C., Zhang, B., Gandy, S., Schadt, E., Freytes, D.O., Noggle, S., Fossati, V., 2017. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to microglia. *Stem Cell Rep.* 8, 1516–1524. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.023>.
- Dutta, D., Heo, I., Clevers, H., 2017. Disease modeling in stem cell-derived 3D organoid systems. *Trends Mol. Med.* 23, 393–410. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.007>.
- Dykens, E.M., Maxwell, M.A., Pantino, E., Kossler, R., Roof, E., 2007. Assessment of hyperphagia in prader-Willi syndrome. *Obesity* 15, 1816–1826. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.216>.
- Edmonson, C., Ziats, M.N., Rennett, O.M., 2014. Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Mol. Autism* 5, 3. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-3>.
- Elena, G., Bruna, C., Benedetta, M., Stefania, D.C., Giuseppe, C., 2012. Prader-Willi syndrome: clinical aspects. *J. Obs.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/473941>.
- Emanuele, E., Orsi, P., Bosio, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., di Nemi, S.U., Politi, P., 2010. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neurosci. Lett.* 471, 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.033>.
- Enstrom, A.M., Onore, C.E., Van De Water, J.A., Ashwood, P., 2011. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav. Immun.* 24, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.08.001>.
- Eroglu, C., Barres, B.A., 2010. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223–231. <https://doi.org/10.1038/nature09612>.
- Fernandez, B.A., Scherer, S.W., 2017. Syndromic autism spectrum disorders: moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. *Diagnostics Clin. Neurosci.* 19, 353–371. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.269>.
- Fink, J.J., Robinson, T.M., Germain, N.D., Sirois, C.L., Bolduc, K.A., Ward, A.J., Rigo, F., Chamberlain, S.J., Levine, E.S., 2017. Disrupted neuronal maturation in Angelman syndrome-derived induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms15038>.
- Fombonne, E., Quirke, S., Hagen, A., 2009. Prevalence and interpretation of recent trends in rates of pervasive developmental disorders. *Mcgill J. Med.* 12, 73.
- Freitas, B.C., Mei, A., Mendes, A.P.D., Beltrão-Braga, P.C.B., Marchetto, M.C., 2019. Modeling inflammation in autism Spectrum disorders using stem cells. *Front. Pediatr.* 6, 394.
- Gadient, R.A., Otten, U.H., 1997. Interleukin-6 (IL-6) – a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog. Neurobiol.* 52, 379–390. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00021-X).
- Geschwind, D.H., State, M.W., 2015. Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine. *Lancet Neurol.* 14, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1473-4422\(15\)00044-7](https://doi.org/10.1016/S1473-4422(15)00044-7).
- Gipson, T.T., 2013. Potential for treatment of severe autism in tuberous sclerosis complex. *World J. Clin. Pediatr.* 2, 16. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v2.i3.16>.
- Goines, P.E., Croen, L.A., Braunschweig, D., Yoshida, C.K., Grether, J., Hansen, R., Kharrazi, M., Ashwood, P., Van De Water, J., 2011. Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: a case-control study. *Mol. Autism* 2, 13. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-13>.
- Gouder, L., Vitrac, A., Goubran-Botros, H., Danckaert, A., Tinevez, J.Y., André-Leroux, G., Atanasova, E., Lemièrre, N., Biton, A., Leblond, C.S., Poulet, A., Boland, A., Deleuze, J.F., Benchoua, A., Delorme, R., Bourgeron, T., Cloëz-Tayarani, I., 2018. Altered spino-genesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations. *Sci. Rep.* 9, 94. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36993-x>.
- Griesi-Oliveira, K., Acab, A., Gupta, A.R., Sunaga, D.Y., Chailangkarn, T., Nicol, X., Nunez, Y., Walker, M.F., Murdoch, J.D., Sanders, S.J., Fernandez, T.V., Ji, W., Lifton, R.P., Vadasz, E., Dietrich, A., Pradhan, D., Song, H., Ming, G., Gu, X., Haddad, G., Marchetto, M.C.N., Spitzer, N., Passos-Bueno, M.R., State, M.W., Muotri, A.R., 2015. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol. Psychiatry* 20, 1350–1365. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.141>.
- Hensch, T.K., 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 877–888. <https://doi.org/10.1038/nrn1787>.
- Hernandez, R.N., Feinberg, R.L., Vaurio, R., Passanante, N.M., Thompson, R.E., Kaufmann, W.E., 2009. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: a longitudinal evaluation. *Am. J. Med. Genet.* 149A, 1125–1137. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32848>.
- Hoang, N., Cytrynbaum, C., Scherer, S.W., 2017. Communicating complex genomic information: a counselling approach derived from research experience with autism spectrum disorder. *Patient Educ. Couns.* 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.pec.2017.07.029>.
- Iossifov, I., O’Roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., Smith, J.D., Paepers, B., Nickerson, D.A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L.E., Mandell, J.D., Mane, S.M., Murtha, M.T., Sullivan, C.A., Walker, M.F., Waqar, Z., Wei, L., Willsey, A.J., Yamrom, B., Lee, Y., Grabowska, E., Dalkic, E., Wang, Z., Marks, S., Andrews, P., Leotta, A., Kendall, J., Hakker, I., Rosenbaum, J., Ma, B., Rodgers, L., Troge, J., Narzisi, G., Yoon, S., Schatz, M.C., Ye, K., McCombie, W.R., Shendure, J., Eichler, E.E., State, M.W., Wigler, M., 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nat. Educ.* 515, 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>.
- Jeon, I.H., Kim, H.S., Kang, H.J., Lee, H.S., Jeong, S.I., Kim, S.J., Jang, S.I., 2014. Anti-inflammatory and antipruritic effects of luteolin from *Perilla (P. frutescens L.)* leaves. *Molecules* 19, 6941–6951. <https://doi.org/10.3390/molecules19066941>.
- Johnson, M.A., Weick, J.P., Pearce, R. A., Zhang, S.-C., 2007. Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4562-06.2007>.
- Jüttler, E., Tarabin, V., Schwaninger, M., 2002. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuro-modulator induced by neuronal activity. *Neurosci* 8, 268–275. <https://doi.org/10.1177/1073858402008003012>.
- Karimi, P., Kamali, E., Mousavi, S.M., Karahmadi, M., 2017. Environmental factors influencing the risk of autism. *J. Res. Med. Sci.* 22. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.200272>.
- Kettenmann, H., Verkhratsky, A., 2008. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* 31, 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.003>.
- Khwaja, O.S., Ho, E., Barnes, K.V., O’Leary, H.M., Pereira, L.M., Finkelstein, Y., Nelson 3rd, C.A., Vogel-Farley, V., DeGregorio, G., Holm, I.A., Khatwa, U., Kapur, K., Alexander, M.E., Finnegan, D.M., Cantwell, N.G., Walco, A.C., Rappaport, L., Gregas, M., Fichorova, R.N., Shannon, M.W., Sur, M., Kaufmann, W.E., 2014. Safety, pharmacokinetics, and preliminary assessment of efficacy of mecamerin (recombinant human IGF-1) for the treatment of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4596–4601.
- Kleinhaus, N., Schweinsburg, B., Cohen, D., Muller, R., Courchesne, E., 2007. N-acetyl aspartate in autism spectrum disorders: regional effects and relationship to fMRI activation. *Brain Res.* 1162, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.081>.
- Kolevzon, A., Bush, L., Wang, A.T., Halpern, D., Frank, Y., Grodberg, D., Rappaport, R., Tavassoli, T., Chaplin, W., Soorya, L., Buxbaum, J.D., 2014. A pilot controlled trial of insulin-like growth factor-1 in children with Phe/McDermid syndrome. *Mol. Autism* 5, 54. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-54>.
- Krey, J.F., Pasca, S.P., Shcheglovitov, A., Yazawa, M., Schwemberger, R., Rasmussen, R., Dolmetsch, R.E., 2013. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 201–209. <https://doi.org/10.1038/nn.3307>.
- Lancaster, M.A., Knoblich, J., 2014. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 9, 2329–2340. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurler, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., Knoblich, J.A., 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>.
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A.M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X.M., Ji, L., Brown, T., Malik, M., 2009. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J. Neuroimmunol.* 207, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>.
- Li, Y., Cao, J., Chen, M., Li, J., Sun, Y., Zhang, Y., Zhu, Y., Wang, L., Zhang, C., 2017. Abnormal neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells partially mimicked development of TSC2 neurological abnormalities. *Stem Cell Rep.* 8, 883–893.
- Liu, J., Kościelka, K.A., Cao, Z., Hulsizer, S., Grace, N., Mitchell, G., Nacey, C., Githinji, J., McGee, J., Garcia-Arocena, D., Hagerman, R.J., Nolta, J., Pessah, I.N., Hagerman, P.J., 2012. Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3795–3805. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds207>.
- Liu, C., Oikonomopoulos, A., Sayed, N., Wu, J.C., 2018. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development* 145, dev156166. <https://doi.org/10.1242/dev.156166>.
- Lossie, A.C., Whitney, M.M., Amidon, D., Dong, H.J., Chen, P., Theriaque, D., Hutson, A., Nicholls, R.D., Zori, R.T., Williams, C.A., Driscoll, D.J., 2001. Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J. Med. Genet.* 38, 834–845. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.12.834>.
- Malik, M., Sheikh, A.M., Wen, G., Spivack, W., Brown, W.T., Li, X., 2011. Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. *Immunobiology* 216, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.03.001>.
- Mansour, A.A., Gonçalves, J.T., Bloyd, C.W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., Johnston, S., Parylak, S.L., Jin, X., Gage, F.H., 2018. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat. Biotechnol.* 36, 432–441. <https://doi.org/10.1038/nbt.4127>.
- Marchetto, M.C., Carroumeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., Muotri, A.R., 2010. A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016>.
- Marchetto, M.C., Belinson, H., Tian, Y., Freitas, B.C., Fu, C., Vadodaria, K.C., Beltrão-Braga, P.C., Trujillo, C.A., Mendes, A.P.D., Padmanabhan, K., Nunez, Y., Ou, J., Ghosh, H., Wright, R., Brennand, K.J., Pierce, K., Eichenfield, L., Pramparo, T., Eyler, L.T., Barnes, C.C., Courchesne, E., Geschwind, D.H., Gage, F.H., Wynshaw-Boris, A., Muotri, A.R., 2017. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Mol. Psychiatry* 22, 820–835. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.95>.
- Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., Amenduni, M., Szekely, A., Palejev, D., Wilson, M., Gerstein, M., Grigorenko, E.L., Chawarska, K., Pelphrey, K.A., Howe, J.R., Vaccarino, F.M., 2015. FOXP1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell* 162, 375–390. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.034>.
- Modabbernia, A., Velthorst, E., Reichenberg, A., 2017. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol. Autism* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>.
- Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., Everall, I.P., 2010. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol. Psychiatry* 68, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.024>.
- Muotri, A.R., Marchetto, M.C.N., Coufal, N.G., Oefner, R., Nakashima, K., Gage, F.H., 2010. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468, 443–446. <https://doi.org/10.1038/nature09544.1.1>.
- Muskens, J.B., Velders, F.P., Staal, W.G., 2017. Medical comorbidities in children and

- adolescents with autism spectrum disorders and attention deficit hyperactivity disorders: a systematic review. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 26, 1093–1103. <https://doi.org/10.1007/s00787-017-1020-0>.
- Nadadur, A.G., Alsaqati, M., Gasparotto, L., Cornelissen-Steijger, P., van Hughte, E., Dooves, S., Harwood, A.J., Heine, V.M., 2019. Neuron-glia interactions increase neuronal phenotypes in tuberous sclerosis complex patient iPSC-derived models. *Stem Cell Rep.* 12, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.019>.
- Nageshappa, S., Carroneu, C., Trujillo, C.A., Mesci, P., Espuny-Camacho, I., Pasciuto, E., Vanderhaeghen, P., Verfaillie, C.M., Raitano, S., Kumar, A., Carvalho, C.M.B., Bagni, C., Ramocki, M.B., Araujo, B.H.S., Torres, L.B., Lupski, J.R., Van Esch, H., Muotri, A.R., 2016. Altered neuronal network and rescue in a human MECP2 duplication model. *Mol. Psychiatry* 21, 178–188. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.128>.
- Neul, J.L., 2012. The relationship of Rett syndrome and MECP2 disorders to autism. *Dialogues Clin. Neurosci.* 14, 253–262.
- Ng, M., De Montigny, J.G., Ofner, M., Do, M.T., 2017. Environmental factors associated with autism spectrum disorder: a scoping review for the years 2003–2013. *Heal. Promot. Chronic Dis. Prev. Can.* 37, 1–23.
- Pandya, H., Shen, M.J., Ichikawa, D.M., Sedlock, A.B., Choi, Y., Johnson, K.R., Kim, G., Brown, M.A., Elkhahoun, A.G., Maric, D., Sweeney, C.L., Gossa, S., Malech, H.L., McGavern, D.B., Park, J.K., 2017. Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat. Neurosci.* 2–11. <https://doi.org/10.1038/nn.4534>.
- Pasca, S.P., Portmann, T., Voineagu, I., Yazawa, M., Shcheglovitov, A., Pasca, A.M., Cord, B., Palmer, T.D., Chikahisa, S., Nishino, S., Bernstein, J.A., Hallmayer, J., Geschwind, D.H., Dolmetsch, R.E., 2011. Using iPS cell-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat. Med.* 17, 1657–1662. <https://doi.org/10.1038/nm.2576>.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci. Lett.* 565, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071>.
- Peters, S.U., Beaudet, A.L., Madduri, N., Bacino, C.A., 2004. Autism in Angelman syndrome: implications for autism research. *Clin. Genet.* 66, 530–536. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00362.x>.
- Quack, I., Brouns, M.R., van de Bor, M., 2013. The dynamics of autism spectrum disorders: how neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 3384–3408. <https://doi.org/10.3390/ijerph10083384>.
- Quadrato, G., Brown, J., Arlotta, P., 2016. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. *Nat. Med.* 22, 1220–1228. <https://doi.org/10.1038/nm.4214>.
- Ricciardi, S., Ungaro, F., Hambrock, M., Rademacher, N., Stefanelli, G., Brambilla, D., Sessa, A., Magagnoli, C., Bachi, A., Giarda, E., Vercelli, C., Kilstrup-Nielsen, C., Sala, C., Kalscheuer, V.M., Broccoli, V., 2012. CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1-PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. *Nat. Cell Biol.* 14, 911–923. <https://doi.org/10.1038/ncb2566>.
- Romito, A., Cobellis, G., 2016. Pluripotent stem cells: current understanding and future directions. *Stem Cells Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9451492>.
- Rubenstein, J.L., 2010. Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. *Curr. Opin. Neurol.* 23, 118–123. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328336eb13>.
- Rubenstein, J.L., Merzenich, M.M., 2003. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* 2, 255–267.
- Russo, F.B., Cugola, F.R., Fernandes, I.R., Pignatari, G.C., Beltrão-braga, P.C.B., Cell, S., Paulo, S., 2015. Induced pluripotent stem cells for modeling neurological disorders. *World J. Transplant.* 5, 209–222. <https://doi.org/10.5500/wjt.v5.i4.209>.
- Russo, F.B., Freitas, C., Pignatari, G.C., Fernandes, I.R., Sebat, J., Muotri, A.R., Beltrão-braga, P.C.B., 2018. Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. *Biol. Psychiatry* 83, 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.021>.
- Sajdel-Sulkowska, E.M., Xu, M., McGinnis, W., Koibuchi, N., 2011. Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). *Cerebellum*. <https://doi.org/10.1007/s12311-010-0223-4>.
- Sánchez-Sánchez, S.M., Magdalon, J., Griesi-Oliveira, K., Yamamoto, G., Santacruz-Perez, C., Fogo, M., Passos-Bueno, M.R., Sertié, A.L., 2018. Rare *RELN* variants affect Reelin-DAB1 signal transduction in autism spectrum disorder. *Hum. Mutat.* 1–32. <https://doi.org/10.1002/humu.23584>.
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C.M., Reichenberg, A., 2014. The familial risk of autism. *JAMA* 311, 1770–1777. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144>.
- Sasai, Y., 2013. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* 12, 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.009>.
- Schlegelmilch, T., Henke, K., Peri, F., 2011. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.004>.
- Sealey, L.A., Hughes, B.W., Sriskanda, A.N., Guest, J.R., Gibson, A.D., Johnson-Williams, L., Pace, D.G., Bagasra, O., 2016. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environ. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.021>.
- SFARI gene, 2018. Simons Foundation Autism Research Initiative. <https://www.sfari.org> accessed 18 October.
- Shcheglovitov, A., Shcheglovitova, O., Yazawa, M., Portmann, T., Shu, R., Sebastiano, V., Krawisz, A., Froehlich, W., Bernstein, J.A., Hallmayer, J.F., Dolmetsch, R.E., 2013. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* 503, 267–271. <https://doi.org/10.1038/nature12618>.
- Sheridan, S.D., Theriault, K.M., Reis, S.A., Zhou, F., Madison, J.M., Daheron, L., Loring, J.F., Haggarty, S.J., 2011. Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026203>.
- Soorya, L., Kolevzon, A., Zweifach, J., Lim, T., Dobry, Y., Schwartz, L., Frank, Y., Wang, A.T., Cai, G., Parkhomenko, E., Halpern, D., Grodberg, D., Angarita, B., Willner, J.P., Yang, A., Canitano, R., Chaplin, W., Betancur, C., Buxbaum, J.D., 2013. Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. *Mol. Autism* 4 (1). <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-18>.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Sharpe, L.M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Joseph, R.M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S.G., Sanguinetti, M.C., Keating, M.T., 2004. CaV1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.011>.
- Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., Gerlo, S., 2011. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev.* 67, 157–183. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.01.002>.
- Stanurova, J., Neureiter, A., Hiber, M., de Oliveira Kessler, H., Stolp, K., Goetzke, R., Klein, D., Bankfalvi, A., Klump, H., Steenpass, L., 2016. Angelman syndrome-derived neurons display late onset of paternal UBE3A silencing. *Sci. Rep.* 6, 30792. <https://doi.org/10.1038/srep30792>.
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K.J., Iwata, Y., Tsujii, M., Sugiyama, T., Mori, N., 2013. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry* 70, 49. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.272>.
- Sweeten, T.L., Posey, D.J., McDougle, C.J., 2003. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder (Author Abstract). *Am. J. Psychiatry* 160, 1691.
- Tian, Y., Voineagu, I., Pasca, S.P., Won, H., Chandran, V., Horvath, S., Dolmetsch, R.E., Geschwind, D.H., 2014. Alteration in basal and depolarization induced transcriptional network in iPSC derived neurons from Timothy syndrome. *Genome Med.* 6, 75. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0075-5>.
- Trazzi, S., De Franceschi, M., Fuchs, C., Bastianini, S., Viggiano, R., Lupori, L., Mazzotti, R., Medici, G., Martire, V. Lo, Ren, E., Rimondini, R., Zoccoli, G., Bartesaghi, R., Pizzorusso, T., Ciani, E., 2018. CDKL5 protein substitution therapy rescues neurological phenotypes of a mouse model of CDKL5 disorder. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1572–1592. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy064>.
- Trillingsgaard, A., Østergaard, J.R., 2004. Autism in Angelman syndrome: an exploration of comorbidity. *Autism* 8, 163–174. <https://doi.org/10.1177/1362361304042720>.
- Tsai, S.-J., 2012. Peripheral administration of brain-derived neurotrophic factor to Rett syndrome animal model: a possible approach for the treatment of Rett syndrome. *Med. Sci. Monit.* 18 HY33–36. doi:883251[pil].
- Tsilioni, I., Taliou, A., Francis, K., Theoharides, T.C., 2015. Children with autism spectrum disorders, who improved with a luteolin-containing dietary formulation, show reduced serum levels of TNF and IL-6. *Transl. Psychiatry* 5, e647. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.142>.
- U.S. National Library of Medicine, 2018a. Fragile X Syndrome – Genetics Home Reference. pp. 1–6.
- U.S. National Library of Medicine, 2018b. Timothy syndrome – genetics home reference. Genet. Home Ref. 16, 1–6.
- Ullian, E.M., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2004. Role for glia in synaptogenesis. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.20082>.
- Van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030a>.
- Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A., 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* 57, 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>.
- Vicidomini, C., Ponzoni, L., Lim, D., Schmeisser, M.J., Reim, D., Morello, N., Orellana, D., Tozzi, A., Durante, V., Scalmani, P., Mantegazza, M., Genazzani, A.A., Giustetto, M., Sala, M., Calabresi, P., Boeckers, T.M., Sala, C., Vercelli, C., 2017. Homer1b/c clustering is impaired in Phelan-McDermid syndrome iPSCs derived neurons. *Mol. Psychiatry* 22, 637. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.82>.
- Vignoli, A., La Briola, F., Peron, A., Turner, K., Vannicola, C., Saccani, M., Magnaghi, E., Scornavacca, G.F., Canevini, M.P., 2015. Autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: searching for risk markers. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0371-1>.
- Vorstman, J.A.S., Parr, J.R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R.J.L., Nurnberger Jr., J.I., Hallmayer, J.F., 2017. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nat. Rev. Genet.* 18, 362–376. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.4>.
- Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochendlinger, K., Windrem, M., Goldman, S.A., 2013. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitors can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* 12, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.002>.
- Wang, P., Mokhtari, R., Pedrosa, E., Kirschenbaum, M., Bayrak, C., Zheng, D., Lachman, H.M., 2017. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPSC cells. *Mol. Autism* 8, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0124-1>.
- Wasilewska, J., Klukowski, M., 2015. Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks - a possible new overlap syndrome. *Pediatr. Heal. Med. Ther.* 153. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S85717>.
- Wei, H., Zou, H., Sheikh, A.M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W.T., Li, X., 2011. IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *J. Neuroinflammation* 8, 52. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-52>.

- Williams, E.C., Zhong, X., Mohamed, A., Li, R., Liu, Y., Dong, Q., Ananiev, G.E., Choongmok, J.C., Lin, B.R., Lu, J., Chiao, C., Cherney, R., Li, H., Zhang, S.C., Chang, Q., 2014. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wildtype neurons. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2968–2980. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu008>.
- Yanagimachi, M.D., Niwa, A., Tanaka, T., Honda-Ozaki, F., Nishimoto, S., Murata, Y., Yasumi, T., Ito, J., Tomida, S., Oshima, K., Asaka, I., Goto, H., Heike, T., Nakahata, T., Saito, M.K., 2013. Robust and highly-efficient differentiation of functional Monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS One* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059243>.
- Ye, F., Kang, E., Yu, C., Qian, X., Jacob, F., Yu, C., Mao, M., Poon, R.Y.C., Kim, J., Song, H., Ming, G. li, Zhang, M., 2017. Erratum: DISC1 regulates neurogenesis via modulating kinetochore attachment of Ndel1/Nde1 during mitosis. *Neuron* 96, 1204. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.034>.
- Yin, X., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M., Levy, O., 2016. Engineering stem cell organoid. *Cell Stem Cell* 18, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>.
- Zhang, S.C., 2001. Defining glial cells during CNS development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 840–843. <https://doi.org/10.1038/35097593>.
- Zhang, Y., Barres, B.A., 2010. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.005>.
- Zheng, W., Li, Q., Zhao, C., Da, Y., Zhang, H.-L., Chen, Z., 2018. Differentiation of glial cells from iPSCs: potential applications in neurological diseases and Cell replacement therapy. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 239. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00239>.
- Zucco, A.J., Pozzo, V.D., Afinogenova, A., Hart, R.P., Devinsky, O., D'Arcangelo, G., 2018. Neural progenitors derived from tuberous sclerosis complex patients exhibit attenuated PI3K/AKT signaling and delayed neuronal differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* 92, 149–163.
- Zuiki, M., Chiyonobu, T., Yoshida, M., Maeda, H., Yamashita, S., Kidowaki, S., Hasegawa, T., Gotoh, H., Nomura, T., Ono, K., Hosoi, H., Morimoto, M., 2017. Luteolin attenuates interleukin-6-mediated astrogliosis in human iPSC-derived neural aggregates: a candidate preventive substance for maternal immune activation-induced abnormalities. *Neurosci. Lett.* 653, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.004>.

ANEXO C – Livro: Tudo o que eu posso ser, 2017

S163t SALES, Nicolas Brito.
Tudo o que eu posso ser / Nicolas Brito Sales; Anita Brito. 1.ed.- São Paulo: Edição do Autor, 2017.
110p., 15,8 x23 cm.

Contém notas de rodapé.
ISBN: 978-85-913089-4-1

1. Autismo. 2. Superação 3. Autobiografia. 4. TEA
I. Anita Brito. II. Título.

CDD-. 618.928982

Índice para catálogo sistemático:
Autismo: 618.928982
Autobiografia: 920.71
Superação: 158.1
Creuza Inácio Junkes- CRB-8/7441

ANEXO D – Livro: O direito de ser estranho, 2018

O DIREITO DE SER ESTRANHO

Arnaldo Carvalho Brito

Quando o
diagnóstico
derruba muros e
constrói
caminhos

"Com esse livro, vidas poderão ser tocadas, histórias reescritas e caminhos poderão ser retomados e reorganizados. Mas, para mim, o mais importante foi presenciar meu irmão encontrar seu direito de ser estranho."
– Anita Brito

B862d

BRITO, Arnaldo Carvalho

Direito de ser estranho, O. / Arnaldo Carvalho Brito; Anita Brito. São Paulo: Edição do Autor, 2018.

112p.

Correção e revisão de Anderson Carvalho Brito e Anita Brito

1. Autismo. 2. TEA. 3. Sociabilização. 4. Diagnóstico.
I. BRITO, Anita. II. BRITO, Anderson Carvalho. I. Título.

CDD 618.928982

Índice para catálogo sistemático:
Autismo infantil- 618.928982
Serviços e bem-estar social -362.4

Bib. Creuza Inácio Junkes- CRB/8 -7441

ANEXO E – Livro: Ivana e a cura para o preconceito, 2019

S163q

SALES, Nicolas Brito

Ivana e a cura para o preconceito / Nicolas Brito Sales (et-al). São Paulo: Edição do autor, 2019.

90p.; il,

Contém ilustrações.

(Série infanto-juvenil/infantil.V1.)

1.Preconceito. 2.Bullying. 3.Discriminação.4.Inclusão.5.Autoajuda. 6.Autismo.

I. BRITO, Anderson Carvalho. (rev.). II MIRABILE, Fernanda (rev.). III Sales, Alexsander. (ed.). IV. BRITO, Anita (ed.de texto). V. JERONIMO, Fábio Terço (il). VI. Título.

Índice para catálogo sistemático

Bib. Creuza Inácio Junkes- CRB/8 -7441

Preconceito – 303.385

Bullying- 371.58

Autoajuda -158.1