Danielle de Paula Moreira

Estudos de comorbidades e dos aspectos
genéticos de pacientes com transtorno do
espectro autista

Study of comorbidities and genetic aspects in autism
spectrum disorder patients

São Paulo

2012

Danielle de Paula Moreira

Estudos de comorbidades e dos aspectos
genéticos de pacientes com transtorno do
espectro autista

Study of comorbidities and genetic aspects in autism
spectrum disorder patients

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Dra. Maria Rita
dos Santos e Passos-Bueno

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Danielle de Paula
Estudos de comorbidades e dos
aspectos genéticos de pacientes com
transtorno do espectro autista
Número de páginas: 93p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Transtorno do Espectro Autista
2. Variações de Número de Cópias 3.
Comorbidades associadas ao ASD I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Orientador(a)

Dedico esta obra científica
aos meus pais, que têm
acreditado em mim e dado
todo o apoio necessário para
eu tentar contribuir com a
ciência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de demonstrar a minha gratidão por todas as pessoas que participaram direto ou indiretamente da finalização desta etapa de aquisição de conhecimento e de contribuição científica, mas não será possível. Então, deixo estas curtas frases para que fique registrado o meu agradecimento:

À papai e mamãe vocês por serem as minhas referências mais nobre de todos os bons sentimentos, da moral e de dedicação (familiar, ao trabalho, etc.). À Lincoln e minhas pretinhas, vô e demais parentes agradeço, principalmente, por terem acreditado que eu poderia fazer algo, já que a maioria não entende o que eu faço, diferente. Muito obrigada! Agradeço a Max pelo companheirismo, dedicação, motivação e por cada discussão que tivemos, pois, independente do assunto, todas foram muito construtivas.

À Dra. Maria Rita por ter me dado a oportunidade de integrar o seu grupo, por ter me permitido executar o estudo de uma doença (tão) complexa e interessante, pelas discussões, críticas e ensinamentos, que me ajudaram a melhorar o meu desempenho e conhecimento.

À Cintia, Naila e Juliana, por terem me ensinado as técnicas, executado alguns experimentos, que foram essências neste trabalho, e por terem ouvido e discutido muitas dúvidas a respeito deste trabalho.

Agradeço a todo o grupo por terem me ensinado tanto ao compartilhar o conhecimento, pelo apoio, por me permitirem ajudar-lhes (especialmente Van), por terem passado calor (Atique e Felipe), sem isso eu não teria sobrevivido em São Paulo (risos!).

Agradeço a todas as pessoas que trabalharam e trabalham com autismo no nosso laboratório, pois todo o meu trabalho dependeu da participação de vocês. Muito obrigada, também, a todas as famílias de pacientes com ASD, pois são essenciais na execução dos nossos trabalhos.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
ASPECTOS CLÍNICOS	1
ASPECTOS GENÉTICOS	2
VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS (<i>COPY NUMBER VARIATION</i> – CNV) E O ASD	3
OBJETIVOS	8
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E CLÍNICA DE PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	10
RESUMO	11
1.1 - INTRODUÇÃO	12
1.2 - METODOLOGIA	13
1.3 - RESULTADOS	16
1.4 - DISCUSSÃO	21
1.5 - CONCLUSÃO	26
1.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2 – PREVALENCE OF 15Q, 16P AND 22Q DELETIONS/ DUPLICATIONS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
2.1 - INTRODUCTION	35
2.2 - MATERIALS AND METHODS	36
2.3 - RESULTS	38
2.4 - DISCUSSION	43
2.5 - CONCLUSIONS	45
2.6 - REFERENCE	46
CAPÍTULO 3 – MODELO DE MÚLTIPLOS LOCOS, ENVOLVENDO O CHR7, EM PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	50
RESUMO	51
3.1 - INTRODUÇÃO	52
3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.4 - DISCUSSÃO	62
3.5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	72
RESUMO	77
ABSTRACT	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUÇÃO GERAL

ASPECTOS CLÍNICOS

Na década de 40, o autismo foi descrito pela primeira vez e caracterizado como uma doença de contato afetivo. Com o passar dos anos esta doença passou a ser considerada uma psicose, até que, pouco tempo depois, a designaram como um transtorno neuropsiquiátrico grave (GESCHWIND, 2009; ZALLA *et al.*, 2010). Atualmente, o autismo, ou transtorno do espectro autista (ASD, do inglês, *Autism Spectrum Disorder*), denominação que usaremos ao longo do trabalho, é conhecido por ser um distúrbio com características bastante variáveis que, de forma geral, causa dificuldade na comunicação e socialização, assim como um padrão de comportamento restrito, repetitivo e estereotipado, sendo que uma destas características manifesta-se antes dos três anos de idade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000).

Dentro deste grande grupo do ASD pode haver pacientes com diagnóstico de um dos três subgrupos deste transtorno, que são: a Síndrome de Asperger (*Asperger's Syndrome* - AS), considerada a forma mais branda do ASD, nesta subclasse não há relatos de atraso da fala e o desenvolvimento intelectual e cognitivo é normal (GHAZIUDDIN & MOUNTAIN-KIMCHI, 2004); o Transtorno Invasivo do desenvolvimento – sem outra especificação (*Pervasive Developmental Disorder – not otherwise specified* – PDD-NOS), os pacientes normalmente não se enquadram em um dos critérios de diagnóstico, por causa da ausência de disfunção da comunicação ou da socialização ou de comportamento (LEVY *et al.*, 2009); e, o Transtorno Autista (*Autistic Disorder* – AD), neste grupo inserem os pacientes que apresentam dificuldade nos três componentes de caracterização da síndrome (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000).

Alguns pacientes, além do ASD, podem manifestar outras comorbidades, incluindo as deficiências neurológicas, as complicações gastrointestinais e os

problemas motores (LOSH *et al.*, 2009; MATSON & SHOEMAKER, 2009; MULLIGAN *et al.*, 2009; GILLBERG *et al.*, 2011; MATSON, *et al.*, 2011). A associação ASD/comorbidades, comumente, faz parte de um quadro clínico sindrômico (CAGLAYAN, 2010). Assim, identificar e entender como estão distribuídas essas outras comorbidades nas amostras de pacientes com ASD pode facilitar o conhecimento desta complexa doença e, até mesmo, das síndromes que possui este distúrbio como uma das características.

A prevalência do ASD nas diferentes populações varia entre 0,2–2%, sendo quatro vezes mais frequente nos homens do que nas mulheres (GIARELLI *et al.*, 2010; ISAKSEN *et al.*, 2012; KOGAN *et al.*, 2009; LAZOFF *et al.*, 2010; MONTIEL-NAVA & PEÑA, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2012). O risco de recorrência do ASD idiopático, ou seja, o risco para um casal ter outra criança com este transtorno quando já existe um afetado na família sem etiologia conhecida, é de cerca de 10%, na presença de dois afetados o risco pode ser superior a 25% (JORDE *et al.*, 1991; OZONOFF *et al.*, 2011; SIMONOFF, 1998). Entre os distúrbios neuropsiquiátricos o ASD é considerado, por muitos pesquisadores, um dos de maior herdabilidade (NEWSCHAFER *et al.*, 2007; TANIAI *et al.*, 2008; EDELSON & SAUDINO, 2009), porém há controversa (HALLMAYER *et al.*, 2011; CONSTANTINO *et al.*, 2012) e são necessários outros estudos para averiguar estes dados em diferentes populações.

As alterações encontradas no sistema nervoso central de pacientes com ASD não mantém um padrão, podendo haver modificações em diversas estruturas, incluindo o corpo caloso, o hipocampo, a amígdala e o cerebelo. Comumente, observa-se o aumento do volume cortical, o que pode estar associado com a macrocefalia que acomete cerca de 20% dos casos (revisado por O'HEARN *et al.*, 2008).

ASPECTOS GENÉTICOS

Nos últimos anos, tem havido um grande esforço mundial na tentativa de se esclarecer os fatores genéticos associados à etiologia do ASD. Caracterizar as alterações genéticas e os principais genes envolvidos certamente trará um grande benefício para a compreensão da causa deste transtorno, o que poderá abrir perspectivas para desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e abordagens terapêuticas.

Sabe-se que cerca de 10% dos casos de ASD são decorrentes de mutações patogênicas associadas a doenças monogênicas como, por exemplo, a Síndrome de Rett (WULFFAERT *et al.*, 2009), a Síndrome do X-frágil (CHONCHAIYA *et al.*, 2009), a Esclerose Tuberosa e a Fenilcetonúria (PKU) (FREITAG *et al.*, 2010). Alterações cromossômicas, tanto microscopicamente visíveis quanto variações de número de cópia (CNV – do inglês, *Copy Number Variations*), são observadas em outros 5–15% dos casos (BETANCUR, 2011; QIAO *et al.*, 2012). De acordo com a revisão de Vorstman e col. (2006) já foram encontradas alterações cromossômicas associadas ao ASD em todos os cromossomos do genoma humano, sendo que a maioria dos rearranjos tem baixa recorrência entre os pacientes com ASD (COOK & SCHERER, 2008). Algumas das CNVs recorrentes no ASD estão localizadas nas regiões cromossômicas 7q11, 15q11-q13, 16p11-p12, 17p11, 22q13 (SZATMARI *et al.*, 2007; KUSENDA & SEBAT, 2008; CHO *et al.*, 2009; KUMAR & CHRISTIAN, 2009).

VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS (*COPY NUMBER VARIATION* – CNV) E O ASD

A CNV é um tipo de alteração cromossômica, que pode variar de 1Kb à menos de 3Mb e incluir microdeleções ou microduplicações de um dado segmento do DNA (Wassink *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2010), frequentemente identificadas no genoma humano (Iafrate *et al.*, 2004; Freedman *et al.*, 2006; Redon *et al.*, 2006). Diferentes CNVs podem sobrepor uma mesma região genômica, sendo, então, esta região

conhecida como de região de variação do número de cópia (Copy Number Variation Region – CNVR) (Redon *et al.*, 2006).

Diferentes trabalhos sobre ASD mostram a sobreposição de CNVs e uma ampla distribuição destas alterações citogenéticas (Figura 1). Na revisão de Cook e Scherer (2008) várias CNVR são relatadas, entre estas a 15q11-q13, 16p11 e 22q13, que são as regiões cromossômicas alvo deste estudo. Estas três regiões cromossômicas se destacam também devido à alta recorrência, as quais, em conjunto, podem representar de 3-5% da amostra de ASD (DURAND *et al.*, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2010; NURMI *et al.*, 2003).

Figura 1: CNVs nos cromossomos de pacientes com ASD. CNVs identificadas em pacientes estudados por MARSHALL e col (2008) (barras pretas) e recorrentes alterações cromossômicas reportadas na revisão de BETANCUR (2010) (barras azuis). As regiões alvo deste estudo estão cercadas por retângulo vermelho. Adaptado de Marshall e col. (2008).

A identificação dos CNVs pode ser feita por vários métodos de alta resolução, tais como o *Array Comparative Genomic Hybridization* (Array-CGH), o *Array Genome-Wide Single Nucleotide Polymorphism* (Array – SNP) e o *Multiplex Ligation Dependent*

Probe Amplification (MLPA). Recentemente, o sequenciamento de nova geração também tem sido usado para detectar tais variantes genômicas (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2010). As técnicas de *array-CGH*, *array-SNP* e o sequenciamento de nova geração permitem realizar a varredura de todo o genoma do indivíduo em único experimento, entretanto, quando se deseja investigar alterações em regiões específicas do genoma, visando diagnosticar alguma síndrome, por exemplo, o MLPA é uma técnica eficaz e com o custo inferior ao das técnicas citadas anteriormente.

CROMOSSOMO 15q

As CNVs na região cromossômica 15q11-q13 estão entre as alterações continuamente relatadas em pacientes com ASD. Diversos tipos de CNVs foram descritos envolvendo esta região, tais como a duplicação intersticial da região toda (15q11-q13), que abrange aproximadamente 4 megabases, a tetrassomia desta mesma região, as microdeleções e microduplicações das regiões proximal (15q11.2) e distal (15q13.3), entre outras alterações de diferentes tamanhos (SUTCLIFFE & NURMI, 2003; OULDIM *et al.*, 2007; DOORNBOS *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2009; PAGNAMENTA *et al.*, 2009). Observa-se que as duplicações englobando a região total, na grande maioria das vezes, são de origem materna (NURMI *et al.*, 2003; NURMI *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2009). Por outro lado, para as CNVs nas extremidades distal e proximal, ou mesmo de outros tamanhos, o modo de herança não interfere na presença do fenótipo. A maioria dos pais portadores não apresenta diagnóstico de algum transtorno psiquiátrico, mas isto não descarta a possibilidade de eles terem características subclínicas de um determinado quadro neurológico (BABATZ *et al.*, 2009; PIARD *et al.*, 2010).

O fenótipo associado aos diferentes tipos de CNVs na região 15q11-q13 é heterogêneo, porém predomina o atraso de desenvolvimento global, a hipotonia, a dificuldade na linguagem e as estereotipias motoras (DELAHANTY *et al.*, 2009;

REPETTO *et al.*, 1998; SUTCLIFFE, JAMES S *et al.*, 2003). Nem todos os pacientes com estas alterações apresentam o ASD, alguns indivíduos podem ser acometidos pelo transtorno de hiperatividade e déficit de atenção, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno bipolar e pela epilepsia. Pode haver também indivíduos clinicamente normais (ELMSLIE *et al.*, 1997; STEFANSSON *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2009; SPIELMANN *et al.*, 2011).

Múltiplos fenótipos são identificados em pacientes com as deleções ou duplicações no 15q. Esta variação fenotípica pode estar associada tanto à região quanto à extensão ou mesmo à existência de outras alterações (mutações) em genes envolvidos pela CNV. Portanto, identificar novos casos portadores destas deleções ou duplicações do cromossomo 15q poderá facilitar a descrição do quadro clínico associado a cada uma delas.

CROMOSSOMO 16p

A microdeleção e a microduplicação da região 16p11.2, envolvendo aproximadamente 600Kb (chr16:29.500.00-30.100.000; NCBI16/hg18), estão presente em cerca de 1% dos pacientes com ASD (KUMAR *et al.*, 2008; MARSHALL *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2008). Essa região é flanqueada por duplicações segmentares de aproximadamente 147Kb com mais do que 99% de similaridade, os quais medeia a recombinação alélica não homóloga (NAHR, do inglês, *non-allelic homologous recombination*) (LUPSKI, 1998; WEISS *et al.*, 2008). Estas CNVs também foram identificadas em pacientes afetados por outras doenças neurológicas tais como a esquizofrenia, a deficiência intelectual, o transtorno bipolar, o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e a epilepsia (BEDOYAN *et al.*, 2010; SHINAWI *et al.*, 2010; DEGENHARDT *et al.*, 2012). Na população aparentemente normal, esta alteração foi descrita em uma parcela ínfima, aproximadamente 0,01% (WEISS *et al.*, 2008).

Além do envolvimento das CNVs no 16p11.2 com os distúrbios neurológicos, previamente foi relatada a associação com o perímetro cefálico e o peso. A microdeleção aumenta o risco de o paciente ter sobrepeso ou mesmo obesidade e macrocefalia. Em contrapartida, a microduplicação aumenta as chances dos indivíduos terem baixo peso e microcefalia (BOCHUKOVA *et al.*, 2010; WALTERS *et al.*, 2010; JACQUEMONT *et al.*, 2011). Embora exista essa oposição entre a microdeleção e a microduplicação em relação a estas duas condições clínicas, outras características têm sido comum a pacientes com qualquer um dos dois tipos de CNVs, como, por exemplo, os dismorfismos faciais, as múltiplas malformações congênitas (defeitos cardíacos, pulmonares e renais, hemivértebra e siringomielia), a dificuldade na coordenação motora fina e grossa e a hipotonia (KUMAR *et al.*, 2008; FERNANDEZ *et al.*, 2009; SHIMOJIMA *et al.*, 2009; HANSON *et al.*, 2010; SCHAAF *et al.*, 2011).

CROMOSSOMO 22q

As CNVs, principalmente a deleção, da região 22q13 são frequentemente relatadas em pacientes com o ASD (~1% dos casos) (MOESSNER; MARSHALL, C.R. *et al.*, 2007; SYKES *et al.*, 2009). A deleção desta região causa uma síndrome conhecida como Síndrome da Deleção do 22q13 ou Síndrome de Phelan-McDermid (PHELAN, M.C., 2008). Além de deleções, também são observados outros tipos de alterações genéticas (translocações, duplicações, anéis cromossômicos do 22 e mutações pontuais) nesta região, as quais podem causar o ASD ou mesmo outros distúrbios neuropsiquiátricos correlatos (BONAGLIA *et al.*, 2009; GAUTHIER *et al.*, 2009; OKAMOTO *et al.*, 2007; PHELAN *et al.*, 2001).

As deleções de novo correspondem a aproximadamente 75% dos casos, os outros 24% são devido a rearranjos cromossômicos nos pais e o 1% restante é causado por mutações no gene *SHANK3* (PHELAN & BETANCUR, 2011), que é considerado o principal responsável pelas características neurológicas da síndrome e

pela deficiência na linguagem e interação social (BONAGLIA *et al.*, 2011; DURAND *et al.*, 2011). O tamanho das deleções envolvidas na síndrome pode variar entre 200kb a mais do que 9Mb, sendo que os indivíduos com maiores alterações têm problemas neurológicos mais graves (SARASUA *et al.*, 2011). Em cerca de 70% dos indivíduos a alteração ocorre no cromossomo de origem paterna (PHELAN & BETANCUR, 2011).

Os pacientes com a síndrome de Phelan-McDermid podem apresentar características bastante heterogêneas, contudo, mais do que 75% dos casos apresentam: unhas dos pés displásicas/ hipoplásicas, mãos dos pés carnudas e grandes, hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento motor, problemas para alimentar e dismorfismos faciais. Além disso, mais do que 50% dos pacientes não falam e outros 25% têm grave problema de fala (falam apenas frases curtas, formadas por mais ou menos três palavras) (PHELAN, M C *et al.*, 2001; SARASUA *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2008). Segundo BONAGLIA *e col.* (2011), os quais acompanharam 3 pacientes por cerca de 40 anos, esta síndrome é progressiva, pois os pacientes apresentaram deterioração clínica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

- A. Caracterizar do ponto de vista genético e clínico (comorbidades) os pacientes com TEA;
- B. Verificar a frequência de microdeleções ou microduplicações das regiões cromossômicas 15q, 16p e 22q, em uma amostra de indivíduos com transtorno do espectro autista da população brasileira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar a ocorrência de comorbidades no conjunto amostral de pacientes autistas atendidos pelo nosso grupo entre os anos de 2001 e 2011.
- b. Caracterizar a frequência de mutações associadas à Síndrome do X-Frágil e alterações citogenéticas nessa amostra de pacientes;
- c. Avaliar a importância de fatores genéticos na determinação do ASD da nossa amostra atendida nos últimos 10 anos;
- d. Realizar a triagem dos pacientes autistas que apresentam alterações nas regiões cromossômicas 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13.3 (*SHANK3*);
- e. Verificar se há correlação fenótipo/ genótipo nos pacientes que detectarmos CNVs nas regiões cromossômicas 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13.3 (*SHANK3*).

CAPÍTULO 1

Caracterização genética e clínica de pacientes com Transtorno do Espectro Autista

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista, de etiologia complexa, frequentemente apresenta outras comorbidades associadas ao quadro clínico. Na população brasileira há poucos trabalhos que caracterizam as condições clínicas dos pacientes com ASD bem como a importância da contribuição genética na determinação do ASD. Portanto, os objetivos principais do nosso trabalho foram realizar a caracterização clínica, o que inclui avaliação de comorbidades e correlação destas com comprometimento de fala, e genética, englobando a estimativa da herdabilidade, do risco de recorrência, da proporção de casos com síndrome de X-Frágil e das alterações cromossômicas de pacientes com o ASD. Entre as comorbidades avaliadas as crises convulsivas foram as mais frequentes (14,7%), seguidas pela hiperatividade, hipotonia e pelos distúrbios gastrointestinais, os quais apresentaram prevalência superior a 8%. As outras comorbidades avaliadas, déficit auditivo, problemas ópticos e as cardiopatias, acometeram menos de 5% dos pacientes cada. Exceto pela hipotonia que apresentou maior prevalência no sexo feminino, as outras comorbidades não apresentaram diferença entre os sexos. A ausência de fala foi significativamente mais prevalente no grupo com comorbidades, havendo correlação positiva com os pacientes com crises convulsivas. O cariótipo de cerca de 5% dos pacientes apresentou-se alterado. Menos de 3% dos meninos foram positivos para o teste do X-frágil. Verificamos que o risco de recorrência foi de 4,7% e a herdabilidade de 76%. Os nossos resultados sugerem que os fatores genéticos contribuem para a ocorrência do ASD e que o ASD e as comorbidades estudadas podem ter uma causa etiológica comum.

1.1 - INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (sigla do inglês, ASD) se caracteriza pela dificuldade na interação social e na comunicação e pelo comportamento restrito e repetitivo de interesse (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994). Estão incluídos dentro deste grupo do ASD a síndrome de Asperger, o transtorno invasivo do desenvolvimento – sem outra especificação (sigla do inglês PDD-NOS), também conhecido como autismo atípico, e o transtorno autista. Mesmo havendo a distinção destes três subgrupos, há grande variabilidade clínica dentro de cada subgrupo. Por exemplo, a comunicação verbal entre os pacientes com o transtorno autista pode variar entre ausente, que pode ser precedida pela regressão da fala, e presente, sendo comum o prejuízo da fala, tal como o déficit no uso da linguagem pragmática (dificuldade do uso da linguagem para a comunicação social), o déficit semântico (dificuldade no entendimento do sentido não literal), a ecolalia e a troca pronominal (RAPIN & DUNN, 2003; MATSON & NEAL, 2010).

Além das alterações de comportamento, é frequente a ocorrência de outras comorbidades, como, por exemplo, a epilepsia, a macrocefalia, os distúrbios auditivos e outras condições clínicas, em associação com o ASD (MATSON *et al.*, 2011). A sobreposição do ASD com outras doenças neuropsiquiátricas, tais como o transtorno de hiperatividade e déficit de atenção (TDAH) e o transtorno bipolar (TB), também têm sido relatadas (STAHLBERG *et al.*, 2004). Ainda, há uma sobreposição clínica com algumas síndromes genéticas de causa bem estabelecida, como a síndrome de X-Frágil, causada por mutação no gene *FMR1* (HAGERMAN & HARRIS, 2008; KUMAR & CHRISTIAN, 2009).

Estudos de herdabilidade para o ASD, cujas estimativas variam entre 40-90% em populações norte-americanas e europeias, tem apontado a importância da contribuição

dos fatores genéticos na determinação do fenótipo (HALLMAYER *et al.*, 2011; RONALD & HOEKSTRA, 2011; CONSTANTINO *et al.*, 2012). Houve um grande avanço na compreensão dos mecanismos genéticos associados ao ASD, dentre estes se verificou que 5 – 15% dos casos apresentam alterações citogenéticas, microscopicamente visíveis e variações de número de cópias (sigla do inglês, CNVs) (VORSTMAN *et al.*, 2006; SEBAT *et al.*, 2007; GLESSNER *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2010). Todavia, ainda não é possível determinar o fator causal da maioria dos casos, assim, continua sendo relevante, para a orientação das famílias de pacientes com ASD, a informação do risco de recorrência deste distúrbio, o qual tem sido estimado em famílias de ASD do hemisfério norte entre 4 – 10% (JORDE *et al.*, 1991; SUMI *et al.*, 2006).

A caracterização genética e clínica dos pacientes com ASD é extremamente importante para o delineamento de pesquisas na área de genética e para a realização de aconselhamento genético. Diante da escassez destas informações para as famílias dos pacientes com ASD na população brasileira, este trabalho teve como objetivos principais: a) caracterizar a proporção de casos positivos para a Síndrome do X-Frágil ou com alterações cromossômicas; b) estimar o risco de recorrência do ASD; c) estimar a herdabilidade para nossa população; d) caracterizar as comorbidades mais comuns em uma amostra da população Brasileira de pacientes com ASD; e) verificar se a gravidade da fala está associada a algum tipo de comorbidade, a partir da análise de mais de 500 famílias com pacientes com ASD investigados pelo nosso grupo nestes últimos 10 anos.

1.2 - METODOLOGIA

1.2.1 - CASUÍSTICA

De 2001 a 2011 foram encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), para aconselhamento genético, 639 indivíduos brasileiros com hipótese diagnóstica de transtorno do espectro autista. Estes pacientes foram encaminhados por psiquiatras e/ou neurologistas, os quais realizaram o diagnóstico clínico segundo os critérios do DSM-IV (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

1.2.2 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA PARA AVALIAÇÃO DAS COMORBIDADES E ANÁLISE DA LINGUAGEM

Aos responsáveis pelos pacientes, foi aplicado um questionário sobre os dados da gestação e do desenvolvimento neuropsicomotor inicial do paciente e, ainda, um questionário baseado no ADI (*Autism Diagnostic Interview*). Entre os 639 pacientes, excluímos 84 devido aos pais não terem respondido completamente o questionário, e 9 casos, que apresentaram alteração do sistema nervoso central (microcefalia, hidrocefalia e escafocefalia), que podem ser a causa primária do ASD.

Foi realizado o teste do X-Frágil para todos os meninos, seguindo o protocolo sugerido por Haddad e col. (1999). A síndrome do X-Frágil é causada pela expansão trinucleotídica (CGG) na região 5' não traduzida do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) localizado na região cromossômica X q27.3, o qual consequentemente leva à metilação anormal da ilha CpG e à inativação do gene (LOESCH *et al.*, 2009; GODLER *et al.*, 2010). Baseado no tamanho da expansão trinucleotídica os alelos são classificados como normal (6-45), “gray zone” (46-54), pré-mutado (55-200) e mutação completa (>200) (WILLEMSSEN *et al.*, 2011). Os resultados positivos no teste por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram confirmados pelo método de *Southern Blot*, sendo este último realizado pelo grupo da Profa. Ângela Vianna-Morgante. O cariótipo, por bandamento G, foi realizado em 264 crianças.

As informações clínicas foram obtidas a partir do relato dos pais e, quando necessário, dos exames realizados pelos pacientes que constataavam aquela condição. As comorbidades avaliadas foram: a) *crises convulsivas* – sendo incluídos apenas os pacientes que apresentaram duas ou mais crises convulsivas não provocadas por, por exemplo, febre ou medicamento; b) *hipotonia*; c) *problemas gastrointestinais*, tais como o refluxo e a prisão de ventre; d) *déficit auditivo*; e) *problemas de visão*; e, f) *problemas cardiovasculares*.

A comunicação verbal foi classificada como presente, incluindo pacientes com diferentes tipos distúrbios de fala ou não, e ausente.

1.2.3 - HERDABILIDADE E RISCO DE RECORRÊNCIA

Realizamos o cálculo do risco de recorrência (RR) empírico para a irmandade do probando, utilizando a seguinte fórmula para calculá-lo: $RR = (npa - nif) / (npa - nif + nin)$; onde *npa* é o número de prole afetada, *nif* é o número de irmãos ou famílias, e *nin* é o número de irmãos normais. Para correção do viés amostral, considere “*npa-nif*” o número de famílias com excesso de uma criança afetada (EMERY, 1986).

O valor da herdabilidade foi estimado usando um diagrama proposto por C.A.B. Smith (EMERY, 1986). O gráfico correlaciona a prevalência do transtorno entre os parentes dos propósitos, porém usamos apenas os parentes em primeiro grau, e a frequência do ASD na população geral. O valor do h^2 (herdabilidade) é igual a 2 vezes “*r*” para parentes de primeiro grau ($h^2 = 2r$), no qual o “*r*” é a correlação entre parentes dos propósitos e frequência do ASD na população geral.

1.2.4 - ANÁLISE DOS DADOS:

Os dados descritivos foram obtidos como porcentagens e média e desvio padrão. Aplicamos o teste estatístico exato de Fisher (bicaudal) para examinar as diferenças entre sexos das condições clínicas estudadas e da comunicação verbal e para verificar as diferenças da comunicação verbal entre os grupos com e sem comorbidades associadas ao ASD. O programa R, versão 2.9.2 (HORNIK, 2011), foi usado para esta última análise estatística.

1.3 - RESULTADOS

1.3.1 - ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS, HERDABILIDADE E RISCO DE RECORRÊNCIA

A expansão do gene *FMR1* foi avaliada em todos os indivíduos com ASD do sexo masculino (Tabela 1). Nós identificamos 13 indivíduos com expansão completa e 1 com a pré-mutação, enquanto os casos restantes apresentaram fragmentos dentro do tamanho normal.

Detectamos alterações cromossômicas em 15 (9 homens e 6 mulheres) (Tabela 2) dentre os 264 (205 homens e 59 mulheres) em que realizamos o cariótipo.

As famílias positivas para a mutação no gene *FMR1* ou que apresentaram alteração cromossômica foram excluídas das análises subsequentes.

Observamos também que o ASD acometeu outro irmão ou irmã em 22 famílias, sendo o total de 472 irmãos [450 clinicamente normais e 22 (18 homens e 4 mulheres) com diagnóstico de ASD], assim estimamos que o risco de recorrência seja de 4,7% (22/472). A herdabilidade estimada na nossa casuística foi de 76%, considerando a recorrência na irmandade e a frequência 0,3% estimada para a população brasileira ($r=0,38$).

Tabela 1: Proporção de pacientes com ASD que apresentaram alterações em testes genéticos e exames neurológicos.

	Mulheres Af/N (%)	Homens Af/N (%)	Total Af/N (%)
Testes Genéticos			
Cariótipo ^a	6/ 59 (10,2)	9/ 205 (4,4)	15/ 264 (5,7)
Teste do X-Frágil			
<i>Mutação</i>	–	13/ 409 (3,2)	–
<i>Pré-mutação</i>	–	1/ 409 (0,2)	–
Exames Neurológicos			
EEG	16/ 59 (27,1)	39/ 179 (21,8)	55/ 238 (23,1)
Exames de Neuroimagem	19/ 67 (28,4)	28/ 223 (12,6)	47/ 290 (16,2)
<i>(TC + RMC)</i>	10/ 21 (47,6)	7/ 45 (15,5)	17/ 66 (25,8)
<i>RMC</i>	6/ 11 (54,5)	7/ 42 (16,7)	13/ 53 (24,5)
<i>TC</i>	3/ 35 (8,6)	14/ 136 (10,3)	17/ 171 (9,9)

Um mesmo paciente pode ter realizado mais de um teste genético e exame neurológico. N = total de indivíduos que fizeram o exame; Af – afetados; TC = Tomografia Cerebral. RMC = Ressonância Magnética Cerebral. a – Descrição das alterações cromossômicas na tabela 2.

Tabela 2: Cariótipo dos pacientes com alteração citogenética.

Paciente	Sexo	Cariótipo
F1486-1	F	47, XX, + inv dup (15)(q11-q13)/ 46, XX
F1500-1	F	46, XX, del (11) (q14.1-q21)
F1558-1	M	46, XY, del (11)
F1779-1	M	47, XY, + 22
F2297-1	F	46, XX; t (2;X)(q11;q22)
F2622-1	F	46,X, der(X) t(X;Y)(p22;q11)
F2749-1	M	46, XY, t (3;11) (p21;q22)
F3008-1	M	46, XY, ins (22;2)(q13;q22qter)
F3034-1	M	46, XY, inv (9)
F3078-1	M	47, XY, + inv dup (15)(q11-q13)
F3101-1	M	46, XY, del(12)(p13p11.2)
F3538-1	F	46XX, t (3;5) (p25;q11)
F4174-1	F	46 XX; t (9;14) (q22;q22)
F6097-1	M	47, XY + inv dup (15)(q11-q13)/ 46, XY
F6326-1	M	46, XY/ 46XY, fra(16)(q22)

1.3.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS COMORBIDADES

Dentre os 517 pacientes (409 do sexo masculino e 108 do sexo feminino e idade variando entre 1 e 39 [média $\pm$ SD = 8,8 anos $\pm$ 6 anos]) com ASD avaliados quanto a presença de outras comorbidades, nós constatamos que a frequência da hipotonia foi significativamente mais comum nas mulheres (Teste exato de Fisher – bicaudal; IC95%; $p=0,006$) (Tabela 3). Os problemas cardíacos acometeram somente os indivíduos do sexo masculino, em baixa proporção (4 dos 409 indivíduos do sexo masculino). A ocorrência de crises convulsivas (14,7%), hiperatividade (12,8%) e doenças gastrointestinais (8,5%) não apresentaram diferenças entre os sexos. Também não observamos diferença entre aos sexos quanto à ocorrência das doenças ópticas e da deficiência auditiva, que acometeram, respectivamente, 4,8% e 3,3% dos pacientes.

O EEG identificou alterações, tais como a atividade paroxismal e a atividade paroxística difusa, em 55 de 238 pacientes que realizaram este exame. Já os exames de neuroimagem, a tomografia cerebral e a ressonância magnética cerebral, mostram alterações em 47 indivíduos de 290 que realizaram este exame (Tabela 1).

1.3.3 - COMUNICAÇÃO VERBAL E CORRELAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DE COMORBIDADES

A ausência de comunicação verbal foi observada em 163 pacientes do total de 517 (31,5%). No grupo de pacientes que desenvolveram a fala, o qual é composto por 354 indivíduos, pudemos observar que 118 falavam apenas palavras soltas, 124 falavam frases curtas (compostas por cerca de três palavras) e apenas 112 apresentavam fala normal, com ou sem os problemas de linguagem (Tabela 4).

Tabela 3: Prevalência das comorbidades nos pacientes com ASD.

Comorbidade	Mulheres	Homens	p-valor (IC 95%)	Total
N (%)	108 (20,9)	409 (79,1)	-	517 (100)
Idade em anos, média (DP)	8,9 (4,5)	8,8 (4,5)	-	8,8 (6,0)
Crises Convulsivas (%)	19 (17,6)	57 (13,9)	0,3599	76 (14,7)
Hiperatividade (%)	13 (12,0)	53 (13,0)	0,8724	66 (12,8)
Problemas Gastrointestinais (%)	7 (6,5)	37 (9,0)	0,5602	44 (8,5)
Hipotonia (%)	19 (17,6)	33 (8,1)	0,0062 ^a	52 (10,1)
Problemas Ópticos (%)	10/16* (3,7)	15/28* (9,3)	0,753	25/44* (4,8)
Déficit auditivo (%)	1/47* (0,9)	16/219* (3,9)	0,3224	17/266* (3,3)
Problemas Cardio-Vascular (%)	0	4 (1,0)	-	4(0,8)

Um mesmo paciente pode apresentar mais de uma condição clínica, ou não. N = Número absoluto de pacientes que foram atendidos. *Número de pacientes que realizaram o exame. A proporção foi estimada baseando-se no número total de indivíduos. ^a p <0,05

Tabela 4: Comunicação verbal dos pacientes com ASD.

Comunicação Verbal	Sexo		Total (%)
	Feminino (%)	Masculino (%)	
Presente	77 (71,3)	277 (67,7)	354 (68,5)
Normal*	22 (20,4)	90 (22)	112 (21,7)
Sentenças curtas	30 (27,8)	94 (23)	124 (24)
Somente palavras soltas	25 (23,1)	93 (22,7)	118 (22,8)
Ausente	31 (28,7)	132 (32,3)	163 (31,5)
Total	108	409	517

* Pode haver neste subgrupo pacientes com outros tipos de distúrbios de linguagem.

Verificamos que o padrão de comunicação verbal não varia entre os sexos (Tabela 4), porém observamos que a presença da fala é significativamente maior nos indivíduos do grupo sem comorbidade (Teste exato de Fisher, bicaudal; IC 95%; p=0,019), isto é, a ausência de fala é significativamente mais comum entre os pacientes ASD que apresentam alguma outra comorbidade (Tabela 5). Esta diferença parece ser decorrente

dos pacientes com ASD com crises convulsivas, uma vez que a ausência de fala é significativamente maior nos pacientes com convulsões (Teste exato de Fisher; bicaudal; IC 95%; $p=0.006$), enquanto não há diferença da prevalência da ausência de fala entre os grupos com problemas gastrointestinais ou hipotonia quando comparados ao grupo sem comorbidade (Figura 1).

Tabela 5: Comunicação verbal dos pacientes com e sem comorbidades associadas ao ASD.

Comunicação Verbal	Comorbidades		Total (%)
	Presente (%)	Ausente (%)	
Presente	101 (61,2)	253 (71,9)	354 (68,5)
Normal*	26 (15,7)	86 (24,4)	112 (21,7)
Sentenças curtas	42 (25,5)	82 (23,3)	124 (24)
Somente palavras soltas	33 (20)	85 (24,1)	118 (22,8)
Ausente	64 (38,8)	99 (28,1)	163 (31,5)
Total	165	352	517

* Foram incluídos neste subgrupo pacientes com outros tipos de problemas de fala (ecolalia, atraso da fala, troca pronominal, etc.)

Figura 1: Comunicação verbal dos pacientes com diferentes tipos de comorbidades (crises convulsivas, GID – distúrbios gastrointestinais e hipotonia) e sem comorbidade. Barra azul claro – fala presente; barra azul escuro – fala ausente. Número de pacientes com a fala presente ou ausente está localizado acima das barras. O asterisco indica que o $p < 0,05$.

1.4 - DISCUSSÃO

Neste estudo caracterizamos uma amostra composta por mais de 500 pacientes com ASD quanto aos dados genéticos, comorbidades e espectro de variabilidade da linguagem, sendo a primeira casuística brasileira com um número expressivo de pacientes.

Entre os pacientes estudados, 3,4% exibiram a mutação associada à síndrome do X-frágil, o que está de acordo com os dados da literatura, sendo a frequência entre 2–8% (WASSINK *et al.*, 2001; ESTÉCIO *et al.*, 2002; SHEN *et al.*, 2010). Os nossos resultados sugerem, portanto, que apenas os casos com maior dificuldade de serem clinicamente classificados como portadores da Síndrome do X-Frágil estão sendo encaminhado ao nosso serviço. Nota-se que um destes casos com número alterado de repetições se trata de uma pré-mutação (1/409). Este resultado favorece a hipótese de que a pré-mutação no gene FMR1 seja também um fator de risco para o ASD (FARZIN *et al.*, 2006; CLIFFORD *et al.*, 2007).

A proporção de alterações citogenéticas encontradas neste estudo, 5,7%, também está de acordo com estudos internacionais, os quais relatam uma frequência de alterações cromossômicas microscopicamente visíveis em cerca de 5–10% dos pacientes com ASD (GILLBERG, 1998; WASSINK *et al.*, 2001; ABDUL-RAHMAN; HUDGINS, 2006). Os nossos dados reforçam a importância de se realizar estes testes nos pacientes com ASD para diagnóstico e mesmo para o delineamento de pesquisas na área de genética, como é o caso de identificação de rearranjos balanceados (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Observamos que a recorrência do ASD em outros irmãos, 4,7%, está no limite inferior das estimativas realizadas em indivíduos com ASD de ancestralidade europeia, que variam entre 4-15% (SUTCLIFFE, 2008; CONSTANTINO *et al.*, 2010, 2012). Ainda desconhecemos os fatores ambientais que podem explicar a variabilidade deste valor.

A herdabilidade estimada neste trabalho foi de 76%, tendo sido considerada a frequência do ASD para população brasileira, de 3/1000 (PAULA *et al.*, 2011). Contudo, se estimarmos a herdabilidade baseado na prevalência mundial (LAZOFF *et al.*, 2010; BRUGHA *et al.*, 2011), de aproximadamente 1%, obteremos um resultado de 48% de contribuição dos fatores genéticos. De qualquer forma, na nossa amostra, fatores genéticos parecem também ter uma contribuição significativa na determinação da etiologia.

Em relação à presença de outra comorbidade, verificamos que 32% dos pacientes exibiram, pelo menos, uma segunda doença associada ao quadro clínico de ASD. Este valor é menor do aquele estimado em estudos anteriores, os quais referem que as comorbidades, tais como epilepsia e/ou desordens motoras, retardo mental, transtornos de humor ocorrem em cerca de 70-88% dos pacientes (GILLBERG & BILLSTEDT, 2000; SIMONOFF *et al.*, 2008; MING *et al.*, 2008). Nós não incluímos, por exemplo, a presença ou não do retardo mental e dos transtornos de humor, os quais acometem cerca de 50% dos pacientes (FOMBONNE, 2003; LORD & SPENCE, 2006; MING *et al.*, 2008), o que possivelmente, contribuiu para a discrepância entre os nossos dados e os resultados previamente publicados.

As deficiências auditivas, os problemas ópticos e as cardiopatias foram raros no ASD, com frequência inferior a 5%. A primeira e a segunda condição clínica, respectivamente, acometem por volta 2-20% e 1-26% dos pacientes com ASD (ROSENHALL *et al.*, 1999; GILLBERG & BILLSTEDT, 2000; OSLEJSKOVA *et al.*, 2007; LEVY *et al.*, 2010), porém ainda não foi determinada a prevalência das cardiopatias, possivelmente devido à baixa frequência com que estas doenças se manifestam nesse transtorno. Normalmente, as cardiopatias fazem parte de quadros clínicos sindrômicos, que apresentam o ASD como uma característica secundária, podendo coocorrerem, por exemplo, na Síndrome Velocardiofacial e na Síndrome de Potocki-Lupski (ANTSHEL *et*

al., 2007; SANCHEZ-VALLE *et al.*, 2011). Portanto, verificar se os pacientes com ASD/cardiopatia apresentam mutações relacionadas a essas síndromes, e outras que têm ambas as condições clínicas como características, pode facilitar o diagnóstico.

Entre as comorbidades avaliadas as crises convulsivas (14,7%) foram as mais frequentes. Estima-se que as crises convulsivas, isoladas ou associadas ao quadro de epilepsia, afetem cerca de 5-44% dos pacientes com ASD (TUCHMAN & RAPIN, 1997; COSTA & NUNESMAIA, 1998; DANIELSSON *et al.*, 2005; MATSUO *et al.*, 2010; CLOSE *et al.*, 2012;). Esta variabilidade na proporção destas condições clínicas pode ser influenciada, por exemplo, pelo grupo amostral avaliado, pois, em virtude do ASD ser bastante heterogêneo, algumas amostras podem ter enriquecimento de quadros clínicos extremos. Além disso, o quadro convulsivo está diretamente relacionado à gravidade do ASD, assim os indivíduos com convulsões têm maior probabilidade de apresentar prejuízo na socialização, na adaptação e da comunicação, além de tenderem a ter menor QI do que os pacientes com o ASD somente (TREVATHAN, 2004; DANIELSSON *et al.*, 2005; YASUHARA, 2010; MATSUO *et al.*, 2011). Nós verificamos que a ausência de fala exibiu maior prevalência no grupo de pacientes com crises convulsivas, estando, portanto, em concordância com estudos anteriores (BOLTON *et al.*, 2011; CLOSE *et al.*, 2012). Os nossos resultados sugerem que um mesmo mecanismo genético básico pode atuar na etiologia do problema de fala, da epilepsia e do ASD.

O EEG e os exames por neuroimagem são utilizados para auxiliar o diagnóstico das crises convulsivas e epilepsia (KERR, 2009). No presente estudo, por volta de 23% e 16% dos pacientes exibiram alterações no EEG e nos exames de neuroimagem, respectivamente. No EEG de pacientes com ASD observam-se alterações, incluindo os focos epileptiformes e a desaceleração do ritmo básico difuso e focal, em torno 14–60% dos casos (VALENTE & VALÉRIO, 2004; KAGAN-KUSHNIR *et al.*, 2005; SACCO *et al.*, 2007; SO, 2010). Nos exames de neuroimagem a frequência destas alterações é em

torno de 35-42% (OSLEJSKOVA *et al.*, 2007; VERVERI *et al.*, 2011). As alterações neurológicas identificadas por estes exames são bastante difusas e não há um padrão que possa ser usado para diagnóstico (GIEDD & RAPOPORT, 2010; KIM *et al.*, 2010; KUOKAWA *et al.*, 2010; COURCHESNE *et al.*, 2011; LO *et al.*, 2011; SHIH *et al.*, 2011). Contudo, saber se há ou não alteração nestes exames pode facilitar o prognóstico e tratamento dos pacientes, uma vez que estas alterações no sistema nervoso central, frequentemente, estão associadas às crises convulsivas e estas, por fim, têm sido correlacionadas à ausência da comunicação verbal, como mostramos neste trabalho.

O transtorno de hiperatividade foi relatado pelos pais de 12,8% dos nossos pacientes, não havendo diferença entre os sexos. Este transtorno, que tem sido relatado em cerca de 3% dos casos do ASD, faz parte do espectro do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (STAHLBERG *et al.*, 2004; LEYFER *et al.*, 2006). O TDAH foi anteriormente identificado em cerca de 20 – 51% dos pacientes com ASD (STAHLBERG *et al.*, 2004; SIMONOFF *et al.*, 2008; LEVY *et al.*, 2010; LICHTENSTEIN *et al.*, 2010; CHRISTAKOU *et al.*, 2012), sendo mais comum em pacientes do sexo masculino (MULLIGAN *et al.*, 2009; GIARELLI *et al.*, 2010; MUKADDES *et al.*, 2010; GARGARO *et al.*, 2011). Essa discordância em relação os dados previamente publicados pode ser devido ao fato de termos descrito apenas um dos subtipos de TDAH e, talvez, para esta condição isolada não exista a distinção da prevalência entre os sexos. Estudos recentes tem mostrado que há modificações funcionais e estruturais no SNC (BRIEBER *et al.*, 2007; CHRISTAKOU *et al.*, 2012), alterações comportamentais e cognitivas (GARGARO *et al.*, 2011), assim como vias de sinalização (LIONEL *et al.*, 2011) comuns ao ASD e ao TDAH.

Os problemas gastrointestinais, tais como refluxo, esofagite, constipação e diarreia, acometeram 8,5% dos pacientes avaliados. A nossa estimativa é próxima ao limiar mínimo previamente descrito, o qual varia amplamente (9 – 70%) (BAUMAN, 2010;

MING *et al.*, 2008; VALICENTI-MCDERMOTT *et al.*, 2006). Bem como constatamos no presente trabalho (dado não apresentado), outros estudos também mostraram que a constipação, a diarreia e o refluxo são os problemas gastrointestinais mais comuns nos pacientes com ASD (HORVATH & PERMAN, 2002; VALICENTI-MCDERMOTT *et al.*, 2006; BAUMAN, 2010). Apesar de haver relatos constantes da maior prevalência dos problemas gastrointestinais no ASD, ainda há controversa. Por exemplo, HORVATH *e col.* (1999) e Ibrahim *e col.* (2009) não identificaram diferença significativa entre os casos de ASD e os controles. Assim como para o TDAH, também têm sido observadas vias de sinalização comuns aos problemas gastrointestinais e ao ASD (CAMPBELL, D. B.; SUTCLIFFE, JAMES S; *et al.*, 2006; CAMPBELL, D. B. *et al.*, 2009), o que pode explicar o quadro clínico de muitos pacientes.

Uma das deficiências motoras comumente encontradas entre os pacientes com quadro do ASD é a hipotonia, a qual foi constatada em 10% dos pacientes estudados. MING *e col.* (2007) estudaram alguns tipos de deficiência motora (apraxia, hipotonia, caminhar na ponta dos dedos, redução da mobilidade do tornozelo, atraso da atividade motora grossa) em uma amostra de 154 pacientes com diagnóstico de ASD e observaram que a hipotonia foi a mais prevalente. De forma geral, esta condição clínica tem sido relatada em cerca de 10-51% dos casos (MING *et al.*, 2007; OSLEJSKOVA *et al.*, 2007; SACCO *et al.*, 2007; KLINTWALL *et al.*, 2011). OSLEJSKOVA *e col.* (2007) observaram também que a hipotonia foi significativamente prevalente nos casos de problemas de fala grave e ausência de fala. Embora tenhamos observado que a frequência da ausência de fala é alta nos indivíduos com hipotonia, nós não verificamos diferença significativa entre esses pacientes e aqueles que não apresentaram nenhuma comorbidade associada ao quadro clínico. Vale ressaltar que nós mostramos que a prevalência da hipotonia é significativamente maior no sexo feminino ($p > 0,0001$). Ao nosso conhecimento, nenhum trabalho anterior verificou diferença da prevalência da hipotonia entre os sexos.

Neste estudo, verificamos que a ausência da linguagem verbal ocorreu em 31,5% dos pacientes. No ASD, o comprometimento da comunicação verbal é bastante variável entre os indivíduos com e sem a fala. Contudo, a ausência de fala e a fala inadequada, tais como a troca pronominal e a ecolalia, são predominantes (RAPIN & DUNN, 2003). A ausência de fala pode ser precedida por um período curto de presença da fala, geralmente inadequada, a qual regride, normalmente, culminando com a perda da fala, que tem sido observada em 15-54% dos pacientes (KURITA, 1996; GOLDBERG *et al.*, 2003; HANSEN *et al.*, 2008; MEILLEUR & FOMBONNE, 2009; PICKLES *et al.*, 2009). O estudo da perda de linguagem realizado por PICKLES *e col.* (2009) ressalta que esta condição está fortemente vinculada ao ASD, pois é rara na disfunção específica de linguagem. Desta forma, faz-se necessário um estudo detalhado e longitudinal para a melhor compreensão dos padrões da comunicação e da aquisição e perda da fala em pacientes com ASD da nossa população.

Adicionalmente, os problemas de fala podem estar associados à gravidade da capacidade intelectual dos indivíduos (DOMINICK *et al.*, 2007; RAPIN & DUNN, 2003), à convulsões (como mostramos aqui e como vem sendo relatado em outros trabalhos) (TUCHMAN & RAPIN, 2002; TREVATHAN, 2004), e à hipotonia (OSLEJSKOVA *et al.*, 2007). Portanto, é importante estudar os mecanismos genéticos, neurológicos e fisiológicos que fundamentam a interação entre estas diferentes comorbidades.

1.5 - CONCLUSÃO

Este estudo é o primeiro a descrever as características genética e condições clínicas associados ao ASD em uma amostra expressiva da população brasileira. Verificamos que na nossa amostra a proporção de casos de X-Frágil e de alterações citogenéticas é relativamente pequena, e portanto que as formas sindrômicas não estão

sendo encaminhadas como TEA. A importância dos fatores genéticos na etiologia do TEA na nossa amostra foi evidenciada pela estimativa da herdabilidade em 76% e o risco de recorrência para irmãos em aproximadamente 5%, o que equivale a um risco 30 vezes maior do que da população geral. Do ponto de vista das comorbidades, a hipotonia foi uma condição clínica predominante nas mulheres e corroboramos a correlação entre a ausência de fala e a ocorrência de crises convulsivas, que foi a comorbidade mais frequente.

1.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-RAHMAN, OA & HUDGINS, L. The diagnostic utility of a genetics evaluation in children with pervasive developmental disorders. *Genetics in Medicine*, v. 8, n. 1, p. 50-54, 2006.
- ANTSHEL, KM; ANEJA, A; STRUNGE, L. et al. Autistic spectrum disorders in velo-cardio facial syndrome (22q11.2 deletion). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 37, n. 9, p. 1776-86, 2007.
- BAUMAN, M. L. Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics*, v. 7, n. 3, p. 320-7, 2010.
- BOLTON, P. F.; CARCANI-RATHWELL, I.; HUTTON, J. et al. Epilepsy in autism: features and correlates. *The British Journal of Psychiatry*, v. 198, n. 4, p. 289-94, 2011.
- BRIEBER, S.; NEUFANG, S.; BRUNING, N. et al. Structural brain abnormalities in adolescents with autism spectrum disorder and patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 48, n. 12, p. 1251-8, 2007.
- BRUGHA, T. S.; MCMANUS, S.; BANKART, J. et al. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders in Adults in the Community in England. *Archives of General Psychiatry*, v. 68, n. 5, p. 459-466, 2011.
- CAMPBELL, D. B.; BUIE, T. M.; WINTER, H. et al. Distinct genetic risk based on association of MET in families with co-occurring autism and gastrointestinal conditions. *Pediatrics*, v. 123, n. 3, p. 1018-24, 2009.
- CAMPBELL, D. B.; SUTCLIFFE, JAMES S; EBERT, P. J. et al. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *PNAS*, v. 103, n. 45, p. 16834-9, 2006.
- CHRISTAKOU, A.; MURPHY, C. M.; CHANTILUKE, K. et al. Disorder-specific functional abnormalities during sustained attention in youth with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and with Autism. *Molecular Psychiatry*, p. 1-9, 2012.
- CLIFFORD, S.; DISSANAYAKE, C.; BUI, Q. M. et al. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 37, n. 4, p. 738-47, 2007.
- CLOSE, H. A.; LEE, L-C; KAUFMANN, C. N.; ZIMMERMAN, A. W. Co-occurring conditions and change in diagnosis in autism spectrum disorders. *Pediatrics*, v. 129, n. 2, p. e305-16, 2012.
- CONSTANTINO, J. N.; TODOROV, A.; HILTON, C. et al. Autism recurrence in half siblings: strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Molecular Psychiatry*, p. 1-2, 2012.
- CONSTANTINO, J. N.; ZHANG, Y.; FRAZIER, T.; ABBACCHI, A. M.; LAW, P. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *The American Journal of Psychiatry*, v. 167, n. 11, p. 1349-

56, 2010.

COSTA, M. I. F.; NUNESMAIA, H. G. DA S. DIAGNÓSTICO GENÉTICO E CLÍNICO DO AUTISMO INFANTIL. *Arquivo de Neuropsiquiatria*, v. 56, n. 1, p. 24-31, 1998.

COURCHESNE, E.; KARNS, C.; DAVIS, H. et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI study. *Neurology*, v. 76, n. 24, p. 2111-2111, 2011.

DANIELSSON, S.; GILLBERG, I. C.; BILLSTEDT, EVA; GILLBERG, CHRISTOPHER; OLSSON, I. Epilepsy in young adults with autism: a prospective population-based follow-up study of 120 individuals diagnosed in childhood. *Epilepsia*, v. 46, n. 6, p. 918-23, 2005.

DOMINICK, K. C.; DAVIS, N. O.; LAINHART, J.; TAGER-FLUSBERG, H.; FOLSTEIN, S. Atypical behaviors in children with autism and children with a history of language impairment. *Research in Developmental Disabilities*, v. 28, n. 2, p. 145-62, 2007.

EMERY AEH. 1986. *Methodology in Medical Genetics*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 198 p. (Colocar na ordem certa!)

ESTÉCIO, M. R. H.; FETT-CONTE, A. C.; VARELLA-GARCIA, M.; FRIDMAN, C.; SILVA, A. E. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2002.

FARZIN, F.; PERRY, H.; HESSL, D. et al. Autism Spectrum Disorders and Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder in Boys with the Fragile X Premutation. *Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 27, n. 2, p. 137-144, 2006.

FOMBONNE, ERIC. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 33, n. 4, p. 365-82, 2003.

GARGARO, B. A.; RINEHART, N. J.; BRADSHAW, J. L.; TONGE, B. J.; SHEPPARD, D. M. Autism and ADHD: how far have we come in the comorbidity debate? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 5, p. 1081-8, 2011.

GIARELLI, E.; WIGGINS, L. D.; RICE, C. E. et al. Sex differences in the evaluation and diagnosis of autism spectrum disorders among children. *Disability and Health Journal*, v. 3, n. 2, p. 107-16, 2010.

GIEDD, J. N.; RAPOPORT, J. L. Structural MRI of pediatric brain development: what have we learned and where are we going? *Neuron*, v. 67, n. 5, p. 728-34, 9 set 2010.

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

GILLBERG, C. Chromosomal disorders and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 28, n. 5, p. 415-25, out 1998.

GLESSNER, J. T.; WANG, K.; CAI, G. et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, v. 459, n. 7246, p. 569-73, 28 2009.

GODLER, DAVID EUGENY; TASSONE, F.; LOESCH, DANUTA ZUZANNA; et al. Methylation of novel markers of fragile X alleles is inversely correlated with FMRP expression and FMR1 activation ratio. *Human Molecular Genetics*, v. 19, n. 8, p. 1618-32, 2010.

GOLDBERG, W. A.; OSANN, K.; FILIPEK, P. A. et al. Language and other regression: assessment and timing. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 33, n. 6, p. 607-16, 2003.

HADDAD, L. A.; AGUIAR, M. J. B.; COSTA, S. et al. Fully Mutated and Gray-Zone FRAXA Alleles in Brazilian Mentally Retarded Boys. *American Journal of Medical Genetics*, v. 84, p. 198-201, 1999.

HAGERMAN, R. J.; HARRIS, S. W. Autism profiles of males with fragile X syndrome. *American Journal of Mental Retardation*, v. 113, n. 6, p. 427-438, 2008.

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

HANSEN, R. L.; OZONOFF, S.; KRAKOWIAK, P. et al. Regression in autism: prevalence and associated factors in the CHARGE Study. *Ambulatory Pediatrics*, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2008.

- HORNIK K. (2011). The R FAQ. Available at: <http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/>.
- HORVATH, K.; PAPADIMITRIOU, J. C.; RABSZTYN, A.; DRACHENBERG, C.; TILDON, J. T. Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *Journal of Pediatrics*, v. 135, p. 559-63, 1999.
- HORVATH, K.; PERMAN, J. A. Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Current Opinion in Pediatrics*, v. 14, n. 5, p. 583-7, 2002.
- IBRAHIM, S. H.; VOIGT, R. G.; KATUSIC, S. K.; WEAVER, A. L.; BARBARESI, W. J. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics*, v. 124, n. 2, p. 680-6, 2009.
- JORDE, L.; HASSTEDT, S.; RITVO, E. et al. Complex segregation analysis of autism. *American Journal of Human Genetics*, v. 49, p. 932-938, 1991.
- KAGAN-KUSHNIR, T.; ROBERTS, S. W.; SNEAD, O. C. Screening electroencephalograms in autism spectrum disorders: evidence-based guideline. *Journal of Child Neurology*, v. 20, n. 3, p. 197-206, 2005.
- KERR, M.; SCHEEPERS, M.; ARVIO, M. et al. *Consensus guidelines into the management of epilepsy in adults with an intellectual disability. Journal of Intellectual Disability Research*, v. 53, n. 8, p. 687-94, 2009.
- KIM, J. E.; LYOO, I. K.; ESTES, A. M. et al. Laterobasal amygdalar enlargement in 6- to 7-year-old children with autism spectrum disorder. *Archives of General Psychiatry*, v. 67, n. 11, p. 1187-97, 2010.
- KLINTWALL, L.; HOLM, A.; ERIKSSON, M. et al. Sensory abnormalities in autism. A brief report. *Research in Developmental Disabilities*, v. 32, n. 2, p. 795-800, 2011.
- KUMAR, R. A.; CHRISTIAN, S. L. Genetics of autism spectrum disorders. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 9, n. 3, p. 188-97, 2009.
- KURITA, H. Specificity and developmental consequences of speech loss in children with pervasive developmental disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 50, n. 4, p. 181-184, 1996.
- KUROKAWA, T.; YOKOMIZO, Y.; LEE, S.; KUSUDA, T. Clinical features of epilepsy with pervasive developmental disorder. *Brain & Development*, v. 32, n. 9, p. 764-8, 2010.
- LAZOFF, T.; ZHONG, L.; PEPERNI, T.; FOMBONNE, ERIC. Among Children at the English Montreal School Board. *Canadian Journal of Psychiatry*, v. 55, n. 11, p. 715-720, 2010.
- LEVY, S. E.; GIARELLI, E.; LEE, L.-C. et al. Autism spectrum disorder and co-occurring developmental, psychiatric, and medical conditions among children in multiple populations of the United States. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 31, n. 4, p. 267-75, 2010.
- LEYFER, O. T.; FOLSTEIN, S. E.; BACALMAN, S. et al. Comorbid psychiatric disorders in children with autism: interview development and rates of disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, v. 36, n. 7, p. 849-61, 2006.
- LICHTENSTEIN, P.; CARLSTRÖM, E.; RÅSTAM, M.; GILLBERG, CHRISTOPHER; ANCKARSÄTER, H. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *The American Journal of Psychiatry*, v. 167, n. 11, p. 1357-63, 2010.
- LIONEL, A. C.; CROSBIE, J.; BARBOSA, N. et al. Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Science Translational Medicine*, v. 3, n. 95, p. 95ra75, 2011.
- LO, Y.-CHUN; SOONG, W.-TSUEN; GAU, S. S.-FEN; et al. The loss of asymmetry and reduced interhemispheric connectivity in adolescents with autism: a study using diffusion spectrum imaging tractography. *Psychiatry Research*, v. 192, n. 1, p. 60-6, 2011.
- LOESCH, DANUTA Z; GODLER, DAVID E; KHANIANI, M. et al. Linking the FMR1 alleles with small CGG expansions with neurodevelopmental disorders: preliminary data suggest an involvement of epigenetic mechanisms. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 149A, n. 10, p. 2306-10, 2009.
- LORD C & SPENCE, S. Autism spectrum disorders: Phenotype and diagnosis. In S. Moldin and J. Rubenstein (Eds.), *Understanding autism: From basic neuroscience to treatment* (pp. 1-23). New

York: cRc taylor and Francis, 2006.

MATSON, J. L.; NEAL, D. Differentiating communication disorders and autism in children. *Research in Autism Spectrum Disorders*, v. 4, n. 4, p. 626-632, 2010.

MATSON, M. L.; MATSON, J. L.; BEIGHLEY, J. S. Comorbidity of physical and motor problems in children with autism. *Research in Developmental Disabilities*, v. 32, n. 6, p. 2304-2308, 2011.

MATSUO, M.; MAEDA, T.; ISHII, K. et al. Characterization of childhood-onset complex partial seizures associated with autism spectrum disorder. *Epilepsy & Behavior*, v. 20, n. 3, p. 524-7, 2011.

MATSUO, M.; MAEDA, T.; SASAKI, K.; ISHII, K.; HAMASAKI, Y. Frequent association of autism spectrum disorder in patients with childhood onset epilepsy. *Brain and Development*, v. 32, n. 9, p. 759-763, 2010.

MEILLEUR, A.-A. S.; FOMBONNE, E. Regression of language and non-language skills in pervasive developmental disorders. *Journal of Intellectual Disability Research*, v. 53, n. 2, p. 115-24, 2009.

MING, X.; BRIMACOMBE, M.; CHAABAN, J.; ZIMMERMAN-BIER, B.; WAGNER, G. C. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *Journal of Child Neurology*, v. 23, n. 1, p. 6-13, 2008.

MING, X.; BRIMACOMBE, M.; WAGNER, G. C. Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain & Development*, v. 29, n. 9, p. 565-70, 2007.

MUKADDES, N. M.; HERGÜNER, S.; TANIDIR, C. Psychiatric disorders in individuals with high-functioning autism and Asperger's disorder: similarities and differences. *The World Journal of Biological Psychiatry*, v. 11, n. 8, p. 964-71, 2010.

MULLIGAN, A.; ANNEY, R. J. L.; O'REGAN, M. et al. Autism symptoms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a familial trait which correlates with conduct, oppositional defiant, language and motor disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 39, n. 2, p. 197-209, 2009.

OLIVEIRA KG, Moreira, DP, Davis N, Sanders S, Mason CE, Vadasz E, Bertonla D, Passos-Bueno, MR State MW. A complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 5 and X in autism spectrum disorder. *American Journal of Medical Genetics*. In Press 2012.

OSLEJSKOVA, H.; DUSEK, L.; MAKOVSKA, Z.; REKTOR, I. Epilepsia, epileptiform abnormalities, non-right-handedness, hypotonia and severe decreased IQ are associated with language impairment in autism. *Epileptic Disorders*, v. 9, p. S9-18, 2007.

PAULA, C.; RIBEIRO, S.; FOMBONNE, ERIC; MERCADANTE, M. Brief report: Prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: A pilot study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 41, n. 12, p. 1738-1742, 2011.

PICKLES, A.; SIMONOFF, E.; CONTI-RAMSDEN, G. et al. Loss of language in early development of autism and specific language impairment. *Journal Of Child Psychology And Psychiatry*, v. 50, n. 7, p. 843-52, 2009.

PINTO, D.; PAGNAMENTA, A. T.; KLEI, L. et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, v. 466, n. 7304, p. 368-72, 2010.

RAPIN, I.; DUNN, M. Update on the language disorders of individuals on the autistic spectrum. *Brain and Development*, v. 25, n. 3, p. 166-172, abr 2003.

RONALD, A.; HOEKSTRA, R. A. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 3, p. 255-74, 2011.

ROSENHALL, U.; NORDIN, V.; SANDSTRÖM, M.; AHLSEN, G.; GILLBERG, CHRISTOPHER. Autism and hearing loss. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 29, n. 5, p. 349-357, 1999.

SACCO, R.; MILITERNI, R.; FROLLI, A. et al. Clinical, Morphological, and Biochemical Correlates of Head Circumference in Autism. *Biological Psychiatry*, v. 62, p. 1038-1047, 2007.

SANCHEZ-VALLE, A.; PIERPONT, M. E.; POTOCKI, L. The severe end of the spectrum: Hypoplastic left heart in Potocki-Lupski syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 155A, n. 2, p. 363-6, 2011.

SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; MALHOTRA, D. et al. Strong association of de novo copy number

mutations with autism. *Science*, v. 316, n. 5823, p. 445-9, 2007.

SHEN, Y.; DIES, K. A.; HOLM, I. A. et al. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, v. 125, n. 4, p. e727-35, 2010.

SHIH, P.; KEEHN, B.; ORAM, J. K. et al. Functional differentiation of posterior superior temporal sulcus in autism: a functional connectivity magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry*, v. 70, n. 3, p. 270-7, 2011.

SIMONOFF, E.; PICKLES, A.; CHARMAN, T. et al. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 47, n. 8, p. 921-9, 2008.

SO, E. L. Interictal epileptiform discharges in persons without a history of seizures: what do they mean? *Journal of Clinical Neurophysiology*, v. 27, n. 4, p. 229-38, 2010.

STAHLBERG, O.; SODERSTROM, H.; RASTAM, M.; GILLBERG, C. Bipolar disorder, schizophrenia, and other psychotic disorders in adults with childhood onset AD/HD and/or autism spectrum disorders. *Journal of Neural Transmission*, v. 111, n. 7, p. 891-902, 2004.

SUMI, S.; TANIAI, H.; MIYACHI, T.; TANEMURA, M. Sibling risk of pervasive developmental disorder estimated by means of an epidemiologic survey in Nagoya, Japan. *Journal of human genetics*, v. 51, n. 6, p. 518-22, 2006.

SUTCLIFFE, J. S. Insights into the pathogenesis of autism. *Science*, v. 321, n. 5886, p. 208-209, 2008.

TREVATHAN, E. Seizures and Epilepsy Among Children With Language Regression and Autistic Spectrum Disorders. *Journal of Child Neurology*, v. 19, p. S49-S57, 1 ago 2004.

TUCHMAN, R. F.; RAPIN, I. Regression in Pervasive Developmental Disorders: Seizures and Epileptiform Electroencephalogram Correlates. *PEDIATRICS*, v. 99, n. 4, p. 560-566, 1997.

TUCHMAN, R.; RAPIN, I. Review Epilepsy in autism. *The Lancet*, v. 1, p. 352-358, 2002.

VALENTE, KDR & VALERIO, RM. Transtorno Invasivo do Desenvolvimento e Epilepsia. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, Brasil*, v.10, n. 4, p. 41-46, 2004.

VALICENTI-MCDERMOTT, M.; MCVICAR, K.; RAPIN, I. et al. Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 27, n. 2 Suppl, p. S128-36, 2006.

VERVERI, A.; VARGIAMI, E.; PAPADOPOULOU, V.; TRYFONAS, D.; ZAFEIRIOU, D. I. Clinical and Laboratory Data in a Sample of Greek Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2011.

VORSTMAN, J.; STAAL, W.; DAALEN, E. et al. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular Psychiatry*, v. 11, n. 1, p. 18-28, 2006.

WASSINK, T. H.; PIVEN, J.; PATIL, S. R. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatric Genetics*, v. 11, n. 2, p. 57-63, 2001.

WILLEMSSEN, R.; LEVENGA, J.; OOSTRA, B. A. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clinical Genetics*, v. 80, n. 3, p. 214-25, 2011.

YASUHARA, A. Correlation between EEG abnormalities and symptoms of autism spectrum disorder (ASD). *Brain & Development*, v. 32, n. 10, p. 791-8, 2010.

CAPÍTULO 2

Prevalence of 15q, 16p and 22q deletions/duplications in Brazilian patients with Autism Spectrum Disorders

RESUMO

A ampla heterogeneidade genética do transtorno do espectro autista (ASD) tem sido extensivamente reportada, sendo que nos últimos anos foram identificadas muitas CNVs, porém poucas são recorrentes. Entre estas CNVs, as que envolvem as regiões cromossômicas 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13 são as mais recorrentes nos estudos realizados em pacientes com ASD da Europa e dos EUA. Assim, os objetivos deste trabalho foram identificar a prevalência de CNVs nestas regiões cromossômicas em pacientes brasileiros com ASD e verificar se a penetrância corresponde a que foi anteriormente relatada. Na nossa amostra, a prevalência das CNVs nas regiões 15q13.3 (3 casos), 16p11.2 (4 casos) e 22q13 (3 casos) foi de 2,7%. A origem parental das CNVs foi verificada em 8 casos e constatamos que em apenas 3 as CNVs foram herdadas: dois pacientes com duplicação na região 15q13.3 e um com duplicação na região 16p11.2. Para estas regiões estimamos que a penetrância seja incompleta, uma vez que identificamos outros portadores destas duplicações nas famílias dos pacientes. Dada a penetrância incompleta destas CNVs nossos resultados também sugerem que a ocorrência de ASD pode depender da presença de pelo menos 2 alterações genéticas patogênicas.

ABSTRACT

High genetic heterogeneity on Autism Spectrum Disorder (ASD) has been extensively reported by many studies. Over the last years, a large number of CNVs have been identified, however, only the CNVs located in the chromosomal regions 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 have been shown to be recurrent among ASD patients of Europe and USA. Therefore, the goals of this work were to estimate the prevalence of the CNVs within these regions in Brazilian ASD patients and to compare their penetrance with prior estimates. Through the analysis of 363 patients, we estimated the prevalence of CNVs in the regions 15q13.3 (n=3), 16p11.2 (n=4) and 22q13 (n=3) as 2.7%. The parental origin of these CNVs was investigated in 8 cases and we found that three were inherited from their unaffected fathers (two 15q13.3 duplication and one 16p11.2 duplication). The penetrance of the 15q and 16p duplications is low, as we identified others carriers of these duplications in the patients families. Given the incomplete penetrance, our data also suggest that the ASD phenotype associated to 15q duplication depends on at least two pathogenic mutations.

2.1 - INTRODUCTION

Autism Spectrum Disorders (ASD) is a group of neurodevelopmental diseases characterized by communication and social impairment, restricted interests, as well as repetitive and stereotyped behavior (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000), which manifests before 3 years of age. ASD affects about 1% of the world population (KOGAN *et al.*, 2009; LAZOFF *et al.*, 2010; BRUGHA *et al.*, 2011), being four times more common in males than in females (Giarelli *et al.*, 2010). Although a high heritability for ASD has been estimated, its genetic architecture is still unclear (RONALD & HOEKSTRA, 2011).

It has been demonstrated that 5-10% of ASD cases are caused by microchromosomal structural rearrangements – the Copy Number Variations (CNVs) (SEBAT *et al.*, 2007; BETANCUR, 2011). Except for the CNVs at 16p11.2, 22q13 and 15q11-q13 with an average frequency each of 1%, all the others are very rare (PRASAD *et al.*, 2000; DURAND *et al.*, 2007; MOESSNER *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2008; MARSHALL *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2010; HOGART *et al.*, 2010; SANDERS *et al.*, 2011). These studies have been conducted mostly in populations of European ancestry and it is not known if they occur with similar frequency among patients of other ancestries, such as the Brazilian population, which is tri-hybrid, with an important contribution of African and Amerindian ancestries (SANTOS *et al.*, 2010; GIOLO *et al.*, 2012).

The size of the micro-rearrangements at 16p11.2, 22q13 and 15q11-q13 varies among the ASD patients and a precise correlation between size of alteration and phenotype is still not established. Incomplete penetrance has been associated with the occurrence of the CNVs in 15q and 16p, but a precise estimate of the penetrance, which is important for recurrence risks estimates in genetic counseling, is lacking due to the limited

number of cases so far reported. Therefore, identification of additional cases can contribute to the clarification of these questions.

Given that, our main aims were to verify: a) if the frequency of the CNVs at 16p11.2, 22q13 and 15q11-q13 in a sample of 402 Brazilian patients with autism spectrum disorder (ASD) was similar to the values observed in ASD of European ancestry and b) if the penetrance of the phenotype associated with these CNVs is comparable to the previous estimates of 80%-90% (COOPER *et al.*, 2011). Whenever was possible, we defined the extension of the rearrangement.

2.2 - MATERIALS AND METHODS

2.2.1 - PATIENTS MATERIALS

Four-hundred two ASD Brazilian patients were recruited to this study. These patients were ascertained at the “Centro de Estudos do Genoma” (CEGH), Institute of Biosciences (IB), University of São Paulo (USP), where the molecular test and genetic counseling were performed. The probands were diagnosed by experienced psychiatrists from Instituto de Psiquiatria (IPq), Hospital das Clínicas, USP, according to DSM-IV criteria. Whenever possible, CARS evaluation was applied. This project was approved by the Ethics Committee of the IB-USP. All participants and legal guardians were recruited after informed consent for use of biological material and of photographs for research purposes.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using the Autopure LS automated workstation (Gentra Systems, Minneapolis). All male patients were screened for Fragile X syndrome using a standard protocol (Haddad *et al.*, 1996). Patients positive for the mutation at the FMR1 gene were excluded.

2.2.2 - MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

MLPA probe sets targeting the chromosomal regions 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13, SALSA P343, were purchased from MRC-Holland (Amsterdam, Netherlands) and used according to the manufacturer's protocol. Briefly, the genomic DNA (50-200ng/μl) was denatured and hybridized with the probe set, and, consecutively, the ligation and amplification were performed, being all procedures carried out on a PTC-200 DNA thermal cycler (Bio-Rad Inc., California, USA). Subsequently, PCR products were separated by capillary electrophoreses on an ABI3130 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The data generated were imported into GeneMarker v1.95 software (SoftGenetics, State College, PA, USA) for MLPA analysis, which was performed using population normalization method (CAI *et al.*, 2008). Initially, all samples were considered as controls; once a possible mutation was identified, this patient was excluded of this group and compared with the remaining samples. A threshold of peak ratio of less than 0.75 and more than 1.3 were used to identify deletions and duplications, respectively. Those with peak ratio score less than 10 were excluded.

All patients with an identified deletion or duplication were invited to return and we recollected another blood sample. The new DNA sample was tested to confirm or not the alterations. The cases of 22q13 deletion were also tested with MLPA P036 and P070 commercial kits (MRC-Holland).

2.2.3 - GENOTYPING

Seven microsatellite markers distributed throughout the 15q11-q13 region were genotyped to identify the parental origin of the duplication of the patient F5240-1. The

markers D15S1002, D15S1007 and D15S1012, ABI PRISM Linkage Mapping Set version 2.0 (Applied Biosystems, California, USA), were genotyped following the manufacturer's protocol. The other primers sequence pairs, D15S1043, D15S976, D15S1031 and D15S1010, were obtained from UCSC human genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, Feb 2009 GRCh37/hg19) and a M13 tail at the 5'-end of the specific-sequence of each forward primer was added following the protocol developed by (SCHUELKE, 2000). The results were analyzed with GeneMarker v1.95 software (SoftGenetics).

2.2.4 - MICROARRAY-BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) from Affymetrix (GeneChip Mapping 500k Array) and Agilent technologies (Human Custom CGH Microarray) (RIBEIRO, manuscript in preparation) were used to detect the size of alterations of six patients. Each methodology was carried out according to the manufacturers' recommendations (KENNEDY *et al.*, 2003; AGILENT TECHNOLOGIES, 2011). Data analysis were managed using Genotyping Console (Affymetrix) and PennCNV (<http://www.openbioinformatics.org/penncnv/>) for Affymetrix microarrays and Agilent Genomic Workbench (Agilent) for Agilent ones, using the hg19.

2.3 - RESULTS

We successfully obtained results from 363 (282 males and 81 females) out of 402 patients with ASD screened for CNVs at the chromosomal regions 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13. The microalterations were identified in 10 patients (Table 1): three patients presented microalterations at 15q13.3 (0.82%; one deletion and two duplications), four

patients had microalterations at 16p11.2 (1.1%; one deletion and, 3 duplications), and the other three (0.82%) had deletions at the 22q13. Clinical features of these patients are described in table 2.

Except for two deletions at 22q, we assessed the size of the microrrearrangement in all the others through the use of MLPA or arrayCGH. The deletions at 15q and 22q were larger than 1 Mb. The duplications at 15q had about 500 kb and include only the *CHRNA7* gene, while the duplications at 16p had about 600 kb and encompass at least 27 genes (Figure 1).

Figure 1: Chromosomal region 16p11.2 where is localized the MLPA markers (blue bars). Patients' alterations are showed in red (duplication) and green bars (deletion).

Table 1: Patients with alteration in the chromosomal regions 15q13, 16p11.2 and 22q13.

CAR	#	Patient	MLPA Kit		Array-CGH		Microalterations			
			P070	P343	SNP-500K ^a	aCGH-60K ^b	Type	Position	Size	Inheritance
15q11-q13	1	F4290-1		X		X	del	chr15:30,941,572-32,509,926	~1,56Mb	De novo
	2	F5240-1		X	X	X	dup	chr15:32,024,192-32,509,926	~486Kb	Inherited
	3	F2299-1		X	X		dup	chr15:31,956,036-32,511,581	~555Kb	Inherited
16p11.2	4	F1739-1		X		X	dup	chr16:29,652999-30,194,001	~541Kb	Inherited
	5	F1626-1		X			dup	chr16:29,582,828-30,036,474 ^c	-	father n.a.
	6	F4227-1		X			dup	chr16:29,582,828-30,036,474 ^c	-	De novo
	7	F6507-1		X			del	chr16:29,582,828-30,036,474 ^c	-	father n.a.
22q13	8	F2021-1	X	X			del	-	-	De novo
	9	F3555-1 [‡]	X	X			del	chr22:50,282,986-51,304,566	1.02Mb	De novo
	10	F4296-1	X	X		X	del	chr22:49,033,233-51,193,680	~2.16Mb	De novo

CAR – chromosomal alteration region;

^{*} - patient described by Jehee et al, 2011; **a** – Affymetrix Platform; **b** – Agilent Genomic Platforms; **c** – size based on MLPA probes; **del** – deletion; **dup** – duplication;; **n.a.** – not available.

Table 2: Summary of the clinical features of patients with CNV in 15q13, 16p11.2 and 22q13.

CAR	15q13			16p11.2				22q13		
Patient	F4290-1	F5240-1	F2299-1	F1739-1	F1626-1	F4227-1	F6507-1	F2021-1	F3555-1#	F4296-1
#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
sex	M	M	M	F	M	M	M	M	F	M
Age (y, last visit)	11	16	12	21	17	9	5	11	6	14
Height (percentile)	137 cm (p10-25)	156cm (p3-10)	135cm (p3)	166 cm (p50-75)	165cm (p10)	148 cm (>p95)	113 cm (p75)	160 cm (>p97)	110 cm (<p3)	145.5cm (≤p3)
Weight (percentile)	56 Kg (p97)	50Kg (p25)	26Kg (p3)	51.8 Kg (p10-25)	48kg (<p3)	36 Kg (>p95)	19 Kg (p50)	50,5 Kg (p90-97)	15.3 Kg (<p3)	38Kg (p=5)
Head Circumference (percentile)	56 cm (p98)	54,5 cm (p50)	51cm (p2)	54 cm (p2-50)	55,5 cm (p2- 50)	53 cm (p2-50)	52 cm (p50-98)	54,5 cm (p50-98)	51 cm (p50)	51.5cm (<p5)
Hypotonia	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Seizure	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
Speech	absent	absent	Absent	Only few words	Only few words	Short phrases	absent	absent	absent	absent
Gastrointestinal Dysfunctions	-	-	-	-	+	(5a)	+	(6a)	-	-
Deafness	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Consanguinity	-	1st cousin	1st cousin	-	-	-	-	-	-	-
Exams										
CT			alt. (3a)		nl	nl	-	NI		
CMR	nl	+	(2a)	-		nl	nl	nl	NI	
EEG			alt. (3a)	nl	nl	nl	-	alt. (8a)		
Craniofacial Dysmorphisms	+	(1a)	+	(2b)	+	(3b)	+	(4a)	+	(5b)
Limbs anomalies	-	+	(2c)	+	(3c)	+	(4b)	+	(5c)	-
Other Characteristics		(2d)		(4c)	(5d)			(8d)		(10a)

CAR – chromosomal alteration region; “+” – present feature; “-” – absent feature; CT – cerebral tomography; CMR – cerebral magnetic resonance; EEG – electroencephalogram; nl - normal

(1) a – Bulbous nose tip and synophrys;

(2) a – mild diffuse reduction in cerebral volume and left inferior parietal white matter change with nonspecific appearance ; b - Prominent supraorbital ridges, deep set eyes, downslanting palpebral fissures, short philtrum, thick lips; tendency to keep mouth open; c - long fingers; d - supernumerary nipple; sacral pit;

(3) a – epileptiform activity ; b – deep set eyes, bulbous nose tip, short philtrum, spaced teeth; prominent ears; c – contractures of hands and feet; regression of neuropsychomotor developmental; long limbs; restriction of extension of the fifth chirodactylo of the left hand and flat feet;

(4) a – straight palpebral fissure; epicanthus, short philtrum; thickened superior ears helices; thick lips; prognathism; long neck; b – restriction of extension at the elbows and knees; long toes; c – Hypermenorrhea; systolic cardiac murmur; hyperlordosis;

(5) a – Limitrophe glycemic blood Level, constipation; b – brachycephaly; hypertelorism; c – neuropsychomotor developmental delay;

(6) a – gastroesophageal reflux;

(7) a – Prominent forehead, epicanthus large ears;

(8) a – epileptiform activity; b – chewing/ tooth grinding; c – flat feet; moderate muscular atrophy of the leg; large, fleshy hands; dysplastic toenail; d – decreased sensitivity to pain;

(9) a – fifth finger clinodactyly;

(10) a – puffy eyelids; long eyelashes; micrognathia; b – splenomegaly; dorsal kyphosis

We have also investigated whether the chromosomal alterations were inherited or *de novo* in 8 of the 10 cases by the molecular analysis of the parents of the affected individuals. We observed that in five of them the chromosomal alteration was *de novo*, in three cases they were inherited from the father. In one case (F5240), parents were first cousins and both carried the alteration. In this case, microsatellite genotyping indicated that the duplication was inherited from the father (Figure 2). All the parents with duplications did not present clinically relevant behavior alteration.

Figure 2: Pedigree diagram and haplotype analysis of the F5240 family with microduplication of 15q13.3. The genotype of the microsatellite markers show that the duplication was inherited from patient's father. The red marker is into the duplicated region. Solid square – affected male; Circle and square with solid circle – carrier; open circle – not available.

2.4 - DISCUSSION

Copy number variations (CNVs) have been predominantly studied in ASD patients and control individuals of European background populations. Latin-American populations, such as the ethnically admixed Brazilian population, have unknown prevalence of the CNVs associated with ASD.

Our analyses of the CNVs at the chromosomal regions 15q11–q13, 16p11.2, and 22q13 of the Brazilian patients with ASD did not diverge from data of samples with European background (FREITAG *et al.*, 2010; BETANCUR, 2011; QIAO *et al.*, 2012). Although our population has an important African and Amerindian contribution, about 17 and 16%, respectively (BRITO *et al.*, 2011), it seems that ancestry is not significantly influencing the CNVs origin associated to the ASD in our population. Moreover, we observed that approximately 40% of the CNVs identified here were inherited from a parent, being in accordance with previously studies in European ASD samples (about 50% inherited) (ZHAO *et al.*, 2007; MARSHALL *et al.*, 2008; ROSENFELD *et al.*, 2010).

The frequency of *de novo* deletion at the 15q13.3 detected in one patient (0.27%), is in accordance with the previous worldwide reported frequency of 0.3% among ASD (STEFANSSON *et al.*, 2008; BEN-SHACHAR *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2009; van BON *et al.*, 2009; MASUREL-PAULET *et al.*, 2010;). Although this deletion has been reported in individuals with other psychiatric disorders (THE INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM, 2008; DIBBENS *et al.*, 2009; HELBIG *et al.*, 2009; VU *et al.*, 2011), our results further support the importance of this CNV in the predisposition of ASD.

The two duplications spanning only the *CHRNA7* gene were paternally inherited, who were referred as clinically healthy. As previously suggested by others, *de novo* duplication involving *CHRNA7* gene is not common as all duplications of *CHRNA7* so far reported among ASD patients have been inherited from one of the parents (SZAFRANSKI

et al., 2010). Microalterations involving *CHRNA7* gene have also been associated to several neurodevelopmental disorders, epilepsy, bipolar disorder and personality disorders and still they have also been identified in healthy individuals, however, with lower frequency (HELBIG *et al.*, 2009; SHINAWI *et al.*, 2009; JOO *et al.*, 2010; SZAFRANSKI *et al.*, 2010; VU *et al.*, 2011). As previously suggested by others, it is possible that the full penetrance and the specificity of the phenotype is dependent on at a least a second-hit (COOK & SCHERER, 2008; GIRIRAJAN *et al.*, 2010; LEBLOND *et al.*, 2012). Indeed, some studies have already shown that ASD patients with *CHRNA7* duplication had a second CNV or mutation in other genes, including *SHANK2* gene (SZAFRANSKI *et al.*, 2010; LEBLOND *et al.*, 2012). Although our sample is very small, it seems that the penetrance of the ASD phenotype associated with *CHRNA7* is low, as three parents of these two cases were normal, suggesting a penetrance around 50%. These preliminary estimates are thus very different from the 87% penetrance previously reported in the literature (COOPER *et al.*, 2011). However, it should be noted that the mentioned study considered as affected all individuals presenting any form of developmental delay. The low penetrance associated with duplication of *CHRNA7* found in our study reinforces the idea that another hit might be necessary for ASD development. Identification of additional cases worldwide will be fundamental to establish the actual penetrance of ASD associated with *CHRNA7* duplication, which is important for a more precise genetic counseling of couples at risk of having a second ASD child as well as for better understanding of the contributing effect of this gene to this disorder.

CNVs at the 16p11.2 were the most common microalteration in our screening (1.1%). The submicroscopic 16p11.2 chromosomal rearrangements have clear evidences of association with various behavioral, cognitive and language disorders, and, as the 15q13.3 CNVs, they have been also observed in healthy individuals but in a lower proportion (MARSHALL *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009; HANSON *et*

al., 2010; SHINAWI *et al.*, 2010; SANDERS *et al.*, 2011). These chromosomal rearrangements have been found in about 0.6-1.5% of patients with ASD and approximately 20-33% of patients with these alterations meet criteria for this disorder diagnosis (HANSON *et al.*, 2010; SHINAWI *et al.*, 2010). In our sample, one case of duplication at 16p11.2 was inherited from a healthy father (F1739-1), while another was *de novo* (F4227-1). In the literature, some cases have been inherited and it is well known that the deletion and duplication have incomplete penetrance (KUMAR *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2008; FERNANDEZ *et al.*, 2010). Therefore, the study of patients with ASD and other related disorders carriers of 16p11.2 microalterations as well as their relatives is necessary to better characterize their phenotypic consequences.

All the 22q13 deletions identified in this screening represent *de novo* events. These patients, as expected, present clinical features such as hypotonia and speech absence (Table 2) compatible with Phelan-McDermid Syndrome, also called 22q13 deletion syndrome (NESSLINGER *et al.*, 1994; PHELAN, 2008). The main gene within this segment responsible for the neurobehavioral phenotype associated this syndrome is the *SHANK3* gene, as punctual mutations and small deletions involving only the *SHANK3* gene produces a similar phenotype to the largest deletions (BONAGLIA *et al.*, 2006; DURAND *et al.*, 2007; DELAHAYE *et al.*, 2009; BOZDAGI *et al.*, 2010; PHELAN & BETANCUR, 2011). Currently, it is accepted haploinsufficiency as the mechanism by which *SHANK3* plays a role in the phenotype and the clinical heterogeneity had also been associated to the size of deletion (BONAGLIA *et al.*, 2011; SARASUA *et al.*, 2011). However, it is still not possible predict the severity of phenotype of patients based on molecular characterization only.

2.5 - CONCLUSIONS

In summary, this study is the first to describe that the prevalence of microalterations in 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 is about 3% in ASD Brazilian patients. Our studies confirm the relevance of *CHRNA7* in ASD etiology; however, how the duplication leads to ASD is unknown. Penetrance of *CHRNA7* duplication or 16p11.2 duplication seems to be low. Therefore, the study of deletions/duplications of these three chromosomal regions in Brazilian population is relevant to better characterization of patients and identification of interesting cases that can help in the understanding of the mechanisms causing the ASD phenotype.

2.6 - REFERENCE

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV). Washington D.C.: American Psychiatric Association; 1994.
- AGILENT TECHNOLOGIES. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling for Blood , Cells or Tissues (with a High Throughput option) Protocol. Disponível em: <www.genomics.agilent.com>.
- BEN-SHACHAR, S.; LANPHER, B.; GERMAN, J. R. et al. Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *Journal of Medical Genetics*, v. 46, n. 6, p. 382-8, 2009.
- BETANCUR, C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research*, v. 1380, p. 42-77, 22 2011.
- BON, B. W. M. VAN; MEFFORD, H C; MENTEN, B. et al. Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *Journal of Medical Genetics*, v. 46, n. 8, p. 511-23, 2009.
- BONAGLIA, M C; GIORDA, R; MANI, E. et al. Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 10, p. 822-8, 2006.
- BONAGLIA, MARIA CLARA; GIORDA, ROBERTO; BERI, S. et al. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid syndrome. *PLoS Genetics*, v. 7, n. 7, p. e1002173, 2011.
- BOZDAGI, O.; SAKURAI, T.; PAPAPETROU, D. et al. Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular Autism*, v. 1, n. 1, p. 15, 2010.
- BRITO, L. A; CRUZ, L. A; ROCHA, K. M. et al. Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 155A, n. 7, p. 1581-7, 2011.
- BRUGHA, T. S.; MCMANUS, S.; BANKART, J. et al. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders in Adults in the Community in England. *Archives of General Psychiatry*, v. 68, n. 5, p. 459-466, 2011.
- COOK, E. H.; SCHERER, S. W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, v. 455, n. 7215, p. 919-23, 2008.
- COOPER, G. M.; COE, B. P.; GIRIRAJAN, S. et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics*, v. 43, n. 9, p. 838-46, 2011.

- DELAHAYE, A.; TOUTAIN, A.; ABOURA, A. et al. Chromosome 22q13.3 deletion syndrome with a de novo interstitial 22q13.3 cryptic deletion disrupting SHANK3. *European Journal of Medical Genetics*, v. 52, n. 5, p. 328-32, 2009.
- DIBBENS, L. M.; MULLEN, S.; HELBIG, I. et al. Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance. *Human Molecular Genetics*, v. 18, n. 19, p. 3626-31, 2009.
- DURAND, C. M.; BETANCUR, C.; BOECKERS, T. M. et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genetics*, v. 39, n. 1, p. 25-7, jan 2007.
- FERNANDEZ, B. A.; ROBERTS, W.; CHUNG, B. et al. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *Journal of Medical Genetics*, v. 47, n. 3, p. 195-203, 2010.
- FREITAG, C. M.; STAAL, W.; KLAUCK, S. M.; DUKETIS, E.; WALTES, R. Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *European Child & Adolescent Psychiatry*, v. 19, n. 3, p. 169-78, 2010.
- GIOLO, S. R.; SOLER, J. M. P.; GREENWAY, S. C. et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *European Journal of Human Genetics*, v. 20, n. 1, p. 111-6, 2012.
- GIRIRAJAN, S.; ROSENFELD, J. A.; COOPER, G. M. et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nature Genetics*, v. 42, n. 3, p. 203-9, 2010.
- HANSON, E.; NASIR, R. H.; FONG, A. et al. Cognitive and behavioral characterization of 16p11.2 deletion syndrome. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 31, n. 8, p. 649-57, 2010.
- HELBIG, I.; MEFFORD, HEATHER C; SHARP, A. J. et al. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nature Genetics*, v. 41, n. 2, p. 160-2, 2009.
- HOGART, A.; WU, D.; LASALLE, J. M.; SCHANEN, N. C. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiology of Disease*, v. 38, n. 2, p. 181-91, 2010.
- JOO, E.-J.; LEE, K. Y.; KIM, H. S. et al. Genetic Association Study of the Alpha 7 Nicotinic Receptor (CHRNA7) with the Development of Schizophrenia and Bipolar Disorder in Korean Population. *Psychiatry Investigation*, v. 7, n. 3, p. 196-201, 2010.
- KENNEDY, G. C.; MATSUZAKI, H.; DONG, S. et al. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nature Biotechnology*, v. 21, n. 10, p. 1233-7, 2003.
- KOGAN, M. D.; BLUMBERG, S. J.; SCHIEVE, L. A. et al. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics*, v. 124, n. 5, p. 1395-403, 2009.
- KUMAR, R. A.; KARAMOHAMED, S.; SUDI, J. et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics*, v. 17, n. 4, p. 628-38, 2008.
- KUMAR, R. A.; MARSHALL, C. R.; BADNER, J. A. et al. Association and mutation analyses of 16p11.2 autism candidate genes. *PloS One*, v. 4, n. 2, p. e4582, jan 2009.
- LAZOFF, T.; ZHONG, L.; PIPERNI, T.; FOMBONNE, E. Prevalence of pervasive developmental disorders among children at the English Montreal School Board. *The Canadian Journal of Psychiatry*, v. 55, n. 11, p. 715-20, 2010.
- LEBLOND, C. S.; HEINRICH, J.; DELORME, R. et al. Genetic and Functional Analyses of SHANK2 Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 2, p. e1002521, 2012.
- MARSHALL, C. R.; NOOR, A.; VINCENT, J. B. et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *The American Journal of Human Genetics*, v. 82, n. 2, p. 477-488, 2008.
- MASUREL-PAULET, A.; ANDRIEUX, J.; CALLIER, P. et al. Delineation of 15q13.3 microdeletions. *Clinical Genetics*, v. 78, n. 2, p. 149-61, 2010.

- MILLER, D T; SHEN, Y; WEISS, L A; et al. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *Journal of Medical Genetics*, v. 46, n. 4, p. 242-8, 2009.
- MILLER, DAVID T; NASIR, R.; SOBEIH, M. M. et al. 16p11. 2 Microdeletion. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews*TM [Internet]. [S.l.]: Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. p. 1-13, 2009.
- MOESSNER, R.; MARSHALL, C. R.; SUTCLIFFE, J. S. et al. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, v. 81, n. 6, p. 1289-97, 2007.
- NESSLINGER, N. J.; GORSKI, J. L.; KURCZYNSKI, T. W. et al. Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of seven patients with deletions of chromosome 22q13.3. *American Journal of Human Genetics*, v. 54, n. 3, p. 464-72, 1994.
- PHELAN, K.; BETANCUR, C. Clinical utility gene card for: deletion 22q13 syndrome. *European Journal of Human Genetics*, v. 19, n. 4, p. 1-3, 2011.
- PHELAN, M. C. Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 3, p. 14, 2008.
- PRASAD, C.; PRASAD, A. N.; CHODIRKER, B. N. et al. Genetic evaluation of pervasive developmental disorders: the terminal 22q13 deletion syndrome may represent a recognizable phenotype. *Clinical Genetics*, v. 57, n. 2, p. 103-9, 2000.
- QIAO, Y.; TYSON, C.; HRYNCHAK, M. et al. Clinical application of 2.7M Cytogenetics array for CNV detection in subjects with idiopathic autism and/or intellectual disability. *Clinical Genetics*, 2012.
- RONALD, A.; HOEKSTRA, R. A. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 3, p. 255-74, 2011.
- ROSENFELD, J. A.; BALLIF, B. C.; TORCHIA, B. S. et al. Copy number variations associated with autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders. *Genetics in Medicine*, v. 12, n. 11, p. 694-702, 2010.
- SANDERS, S. J.; ERCAN-SENCICEK, A. G.; HUS, V. et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*, v. 70, n. 5, p. 863-85, 2011.
- SANTOS, N. P. C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human Mutation*, v. 31, n. 2, p. 184-90, 2010.
- SARASUA, S. M.; DWIVEDI, A.; BOCCUTO, L. et al. Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermid syndrome (22q13 deletion syndrome). *Journal of Medical Genetics*, v. 48, n. 11, p. 761-6, 2011.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 233-4, 2000.
- SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; MALHOTRA, D. et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, v. 316, n. 5823, p. 445-9, 20 abr 2007.
- SHINAWI, M.; LIU, P.; KANG, S.-HAE L. et al. Recurrent reciprocal 16p11. 2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of Medical Genetics*, v. 47, p. 332-342, 2010.
- SHINAWI, M.; SCHAAF, C. P.; BHATT, S. S. et al. A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, v. 41, n. 12, p. 1269-71, 2009.
- STEFANSSON, H.; RUJESCU, D.; CICHON, S. et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, v. 455, n. 7210, p. 232-6, 2008.
- SZAFRANSKI, P.; SCHAAF, C. P.; PERSON, R. E. et al. Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving CHRNA7: benign or pathological? *Human Mutation*, v. 31, n. 7, p. 840-50, 2010.
- THE INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature*, v. 455, n. 7210, p. 237-41, 2008.

VU, T. H.; COCCARO, E. F.; EICHLER, E. E.; GIRIRAJAN, S. Genomic architecture of aggression: rare copy number variants in intermittent explosive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 7, p. 808-16, dez 2011.

WEISS, LAUREN A; SHEN, YIPING; KORN, J. M. et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 7, p. 667-75, 2008.

ZHAO, X.; LEOTTA, A.; KUSTANOVICH, V. et al. A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. *PNAS*, v. 104, n. 31, p. 12831-6, 2007.

CAPÍTULO 3

***Modelo de múltiplos locos, envolvendo o CHRNA7, em pacientes com
Transtorno do Espectro Autista.***

RESUMO

O receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (*CHRNA7*) têm sido fortemente associado a doenças neurológicas, contudo, duplicações que envolvem este gene tem sido encontradas também em indivíduos normais. Assim sendo, decidimos melhor investigar os dois pacientes com ASD e portadores de duplicação do *CHRNA7* previamente identificada em uma triagem desta região em mais de 350 pacientes com ASD. Verificamos que em ambos os casos, esta duplicação foi herdada dos pais, que são clinicamente normais e consanguíneos. Primeiramente, investigamos se havia outras CNVs e verificamos que um dos casos (F5240) era também portador de uma deleção na região 15q11.2, onde estão presentes genes importantes para o desenvolvimento neuronal. Considerando-se que os pais são consanguíneos, levantamos também a hipótese de que alguma mutação em homozigose, além da duplicação, poderia contribuir para o quadro clínico. Assim sendo, com marcadores SNPs dispersos ao longo do genoma caracterizamos as regiões em homozigose nestes dois pacientes e, em seguida, investigamos *in silico* quais os genes localizados nestas regiões em homozigose que apresentam interação funcional com o *CHRNA7*. No caso F2299, identificamos os genes *CHRND*, *CHRNA7*, *EGR1* e *RIC3* e no caso F5240, o *JAK2*. Estes genes foram, portanto, considerados como candidatos a conterem mutações patogênicas, assim sendo, o próximo passo será sequenciá-los. Estes resultados parciais sugerem que o quadro clínico de ASD depende da duplicação de *CHRNA7* e de pelo menos um segundo evento mutacional.

3.1 - INTRODUÇÃO

O gene alfa-7 do receptor nicotínico de acetilcolina (*CHRNA7*) está localizado no cromossomo 15 na banda q13.3, sendo composto por 10 exons (CHINI *et al.*, 1994; GAULT *et al.*, 1998). A proteína humana codificada por esse gene, que é constituída por 502 aminoácidos, forma um canal homopentamérico transportador de íons, principalmente Ca^{2+} (BOULTER *et al.*, 1985; BREJC *et al.*, 2001). Essa proteína apresenta alta expressão nas células do sistema nervoso central (FAGHIIH *et al.*, 2008), podendo ser observada no cérebro dos fetos a partir da 4ª – 6ª semana de gestação (HELLSTRÖM-LINDAHL; COURT, 2000; LEVIN, 2002; GOTTI *et al.*, 2006). Durante o período fetal humano, as regiões cerebrais que apresentam os maiores níveis de expressões da proteína *CHRNA7* são o hipocampo, o neocórtex, o tálamo e o tronco encefálico (AGULHON *et al.*, 1999; GUAN *et al.*, 1999). Em algumas regiões do cérebro a expressão de *Chrna7* é mantida durante a vida adulta. Isto ocorre, por exemplo, no hipocampo, região cerebral relacionada aos processos cognitivos, memória e aprendizado dos mamíferos (KELLER, J. J. *et al.*, 2005).

A ligação de diferentes agonistas ao *CHRNA7* em diversas fases do desenvolvimento ativa diferentes vias de sinalização que modulam, por exemplo, as respostas neuronais, a neurogênese e a plasticidade sináptica (KLEIN & YAKEL, 2005; RÓZSA *et al.*, 2008; SZABO *et al.*, 2008). Além disso, a *Chrna7* realiza sinalizações no sistema colinérgico, atua na excitação e inibição por múltiplos neurotransmissores, na sensibilidade e tolerância à nicotina e na neuroproteção (BROIDE *et al.*, 1996; LEONARD & BERTRAND, 2001; ADAMS *et al.*, 2002; FALK *et al.*, 2002;).

Várias doenças neurológicas, tais como a esquizofrenia, a doença de Alzheimer, o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e o transtorno do espectro autista, que é a doença alvo neste estudo, (ROBINSON *et al.*, 1998; GUILMATRE *et al.*,

2009; BENCHERIF & LIPPIELLO, 2010; MASUREL-PAULET *et al.*, 2010) têm sido associadas a alterações do *CHRNA7*. Sugere-se que essas alterações induzam, por exemplo, o déficit da sinalização célula-célula, da homeostase, do transporte de íons e da transmissão sináptica (WALL *et al.*, 2009).

Em pacientes com ASD, vários tipos de microrrearranjos na região 15q11.2-q13.3, que incluem o *CHRNA7*, têm sido identificados. Supõe-se que as deleções envolvendo o *CHRNA7* sejam suficientes para causar algum tipo de distúrbio neuropsiquiátrico (PAGNAMENTA *et al.*, 2009; COOPER *et al.*, 2011; MIKHAIL *et al.*, 2011). No entanto, ainda é uma incógnita como duplicações, principalmente aquelas que abrangem somente a região distal (15q13.3) entre os pontos de quebra 4 e 5 (BP4-BP5), levam a um transtorno psiquiátrico, uma vez que este tipo de alteração é também observado na população normal (SHINAWI *et al.*, 2009). Possivelmente, é necessária uma segunda alteração, que juntamente com a duplicação do *CHRNA7*, leva a determinação do quadro clínico (SZAFRANSKI *et al.*, 2010), sendo a especificidade do fenótipo dada por este segundo evento, cujo mecanismo ou moléculas envolvidas ainda são desconhecidos.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi descrever o perfil fenotípico dos pacientes e investigar outros possíveis mecanismos patológicos em dois pacientes com TEA que apresentam duplicação do *CHRNA7*.

3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 - PACIENTES, GENOTIPAGEM DOS SNP E ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR

Dois pacientes com duplicação na região 15q13.3, as quais foram identificadas com o uso do método MLPA (descrito no capítulo 2), foram estudados com o intuito de investigar outras CNVs ou mutações que poderiam atuar na etiologia do TEA.

O uso do MLPA (SALSA P343; MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o termociclador PTC-200 DNA Engine Cycler (Bio-Rad Inc., California, USA). A análise dos dados foi realizada no programa GeneMarker v1.95 (SoftGenetics, State College, PA, USA).

O GeneChip® Mapping 500K Array Set (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA; <http://www.affymetrix.com>) foi usado para a genotipagem dos pacientes. A preparação da digestão do DNA, marcação, hibridação e *scanning* foram realizadas de acordo com o protocolo da Affymetrix (KENNEDY *et al.*, 2003). O software Genotyping Console (Affymetrix) foi usado para análise dos genótipos dos SNPs e de número de cópias. Adicionalmente, utilizamos o PennCNV (<http://www.openbioinformatics.org/penncnv/>) para a análise dos CNVs (WANG *et al.*, 2008).

Foram consideradas CNVs importantes para o fenótipo apenas aquelas presentes nos bancos de dados de alterações cromossômicas: *Simons Foundation for Autism Research Initiative* (SFARI – <https://s1gene.sfari.org/autdb/CNVHome.do>), *Autism Chromosome Rearrangement Database* (ACRD - <http://projects.tcag.ca/autism/>) e *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER – <http://decipher.sanger.ac.uk/>).

3.2.2 - ANÁLISE DAS REGIÕES DE HOMOZIGOSE

Foram investigadas as extensas séries de SNPs consecutivos em homozigose em cada cromossomo autossomo pelo '*runs of homozygosity*' (ROHs), do programa PLINK (versão 1.07) (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) (PURCELL *et al.*, 2007). O limiar padrão de 100 SNPs consecutivos dentro de uma região de no mínimo 1MB com uma densidade mínima de 1SNP/50kb, permitindo no máximo cinco genótipos 'perdidos' e um genótipo heterozigoto por região em homozigose foi utilizado. Para cada SNP, a

proporção das regiões em homozigose que sobrepõe esta posição é calculada e baseada no $p \leq 0.05$. Este padrão de análise permite a exclusão algorítmica das regiões centroméricas e daquelas pobres em SNPs. A análise foi feita separadamente para cada paciente.

3.2.3 - ANÁLISE DE GENES NA MESMA VIA BIOLÓGICA DO *CHRNA7*

Após a coleta dos genes (RefSeq, *hg18*), no UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>), presentes dentro dessas regiões em homozigose de cada paciente, realizamos a investigação, usando o *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA – Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com), dos genes que interagiam diretamente com o *CHRNA7*.

3.2.4 - GENOTIPAGEM DE MARCADORES DO TIPO MICROSATÉLITE

Foram realizadas as genotipagens dos marcadores microssatélites D2S206, D2S2176, D2S2344, D9S1681, D9S1686 e D9S1810 contendo cauda M13 (SCHUELKE, 2000), utilizando o termociclador PTC-200 DNA Engine Cyclor (Bio-Rad Inc., California, USA). A análise dos marcadores foi realizada com o uso do programa GeneMarker v1.95 (SoftGenetics, State College, PA, USA).

3.3 - RESULTADOS

3.3.1 - APRESENTAÇÃO DOS CASOS

HISTÓRICO CLÍNICO

Paciente F2299: o paciente, 12 anos, do sexo masculino, foi produto da primeira gestação de pais primos de 1º grau clinicamente normais e jovens (mãe, 28 anos e pai, 25 anos). Não há relato de intercorrências durante o período gestacional. O paciente nasceu a termo de parto normal com uso de fórceps. O peso ao nascimento foi 2975g (10<percentil<25) e o tamanho 51 cm (percentil=50). O perímetro cefálico não foi avaliado. O Apgar foi 7 e 9 ao primeiro e quinto minutos, respectivamente. Aos seis meses, o paciente começou a sentar sem apoio e aos nove começou a dar os primeiros passos. Aos nove meses teve a primeira convulsão e alterações epileptiformes foram confirmadas por eletroencefalograma. Após as primeiras convulsões, o paciente evoluiu com quadro de contraturas das mãos e dos pés e regressão no desenvolvimento neuropsicomotor. Com aproximadamente 2 anos, parou de andar e falar, sendo que a ausência de fala persistia até a última consulta. O paciente não apresenta problemas oftalmológicos nem auditivos. O diagnóstico de TEA, baseado no DSM-IV, foi estabelecido aos seis anos de idade. Alguns dismorfismos faciais leves foram constatados: face com olhos fundos, nariz com ponta alargada, filtro nasolabial curto, macrostomia, diástase dentária e orelhas um pouco proeminentes. O paciente possui membros alongados, com restrição da extensão do quinto dedo da mão esquerda e pés planos. Aos 12 anos, o propósito pesava 26 Kg (percentil < 3), a estatura era de 135 cm (percentil = 3), o perímetro cefálico era de 51 cm (percentil = 2), a medida do tamanho total da mão e o do dedo médio eram, respectivamente, 16.5 cm (percentil = 50) e 7 cm (25 < percentil < 50). Na última consulta, o paciente fazia uso de carbamazepina e risperidona.

Paciente F5240: o paciente, 15 anos, do sexo masculino, é produto da primeira gestação de um casal consanguíneo, primos de primeiro grau, jovem (mãe, 25 anos e pai, 22 anos) e clinicamente normal. A gestação progrediu sem intercorrências. O paciente

nasceu a termo de parto cesáreo, com 3.500g (percentil = 50). Durante o primeiro ano de vida, o propósito teve várias otites e, aos dois anos, foi diagnosticada a deficiência auditiva leve bilateral. Os primeiros passos foram dados aproximadamente com 1 ano e 4 meses, mas não houve até o presente momento o desenvolvimento da fala. Aos 7 anos de idade, foi estabelecido o diagnóstico do TEA, segundo os critérios do DSM-IV. Há relato da primeira convulsão aos 15 anos de idade. A ressonância magnética cerebral mostrou sinais de discreta redução volumétrica encefálica difusa e tênue foco de alteração de sinal na substância branca parietal inferior esquerda de aspecto inespecífico. Aos 15 anos, o paciente pesava 50 Kg (percentil 25), apresentava estatura de 156 cm (3 < percentil <10) e o perímetro cefálico era de 54,5 cm (percentil = 50). Discretos distúrbios faciais foram observados: cristas supraorbitais proeminentes, olhos fundos com fendas palpebrais inclinadas para baixo, filtro nasolabial curto e lábios grossos. O paciente também apresenta mamilo extra-numerário do lado esquerdo do tórax, dedos alongados com *pads* fetais e fosseta sacral. Além disso, o paciente deambula com as pernas fletidas. Na última consulta, as medicações usadas eram risperidona, rivotril, neuleptil e fenergan.

3.3.2 - ESTUDO DAS CNVs E DAS REGIÕES EM HOMOZIGOSE

CNVs

Em ambos os pacientes nós identificamos uma duplicação na região cromossômica 15q13.3, envolvendo somente o gene *CHRNA7* (Figura 1A), as quais foram de origem paterna (Capítulo 2, Tabela 1, página 39). No caso F2299 a duplicação, além de estar presente no pai, também foi identificada no irmão mais novo, no avô e em uma tia, irmã do pai. Todos os indivíduos adultos estudaram e trabalham, e nenhum deles

apresenta diagnóstico de doença psiquiátrica ou neurológica. O irmão mais novo, no momento da avaliação com 3 anos de idade, apresentou desenvolvimento neuropsicomotor adequado a idade. A tia paterna apresenta surdez, diagnosticada na infância. No segundo caso (F5240), a duplicação foi identificada também na mãe, porém herdada do pai (Capítulo 2, Figura 2, página 42).

Além da duplicação no *CHRNA7*, o paciente F5240 apresentou uma microdeleção na região 15q11.2 (Tabela 1; Figura 1B). Não detectamos outras CNVs relevantes para o fenótipo no paciente F2299.

Figura 1: CNVs apresentadas pelos pacientes F2299 e F5240. A – Duplicação na região 15q13.3 (barras verdes); B – Deleção na região 15q11.2 (barra vermelha), presente apenas no paciente F5240.

INVESTIGAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS EM HOMOZIGOSE

Investigamos nestes 2 pacientes com duplicação de *CHRNA7*, quais as regiões do genoma maiores do que 1MB estão em homozigose, pois em ambas as famílias os pais

são consanguíneos e parece haver um enriquecimento de regiões em homozigose nos pacientes com TEA (Wang et al., 2010). Identificamos 31 e 13 regiões em homozigose respectivamente nos casos 1 e 2, as quais não se sobrepõem (Tabela 2).

Inicialmente, investigamos *in silico* quais os genes dentro destas regiões em homozigose que interagem com o *CHRNA7*, pois pode haver a co-segregação de mutações em diferentes genes pertencentes a uma mesma via de sinalização contribuindo para o efeito fenotípico. Através da análise de redes de interações gênicas identificamos no paciente F2299 os genes *CHRNA7*, *CHRNA7* (2q37.1), *EGR1* (5q31.2) e *RIC3* (11p15.4) (Figura 2A), enquanto o paciente F5240 apresentou apenas um, *JAK2* (9p24) (Figura 2B), localizados nas regiões de homozigose e que interagem diretamente com o *CHRNA7*.

Tabela 1: Características das CNVs apresentadas pelos pacientes F2299 e 5240.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	CNVs				
			Cr	Posição	Tamanho (Kb)	Tipo	Herança
F2299-1	M	12	15	chr15:29,743,328-30,298,873	555	Dup	Herdado
F5240-1	M	16	15	chr15:29,811,484-30,297,218	486	Dup	Herdado
			15	chr15:20,329,239-20,773,725	444	Del	n.a.

Cr – Cromossomo; **Del** – deleção; **Dup** – duplicação; **n.a.** – não avaliado

Tabela 2: Regiões em homozigose identificadas nos paciente F2299 e F5240.

Paciente	#	CR	POS do SNP1	POS do SNP2	Tamanho (KB)	# SNP	DENS	# Genes
F2299	1	1	18143950	24932015	6.788.065	490	13.853	68
	2	1	23449660	30674160	7.224.500	560	12.901	98
	3	1	48137369	57331259	9.193.890	863	10.653	56
	4	1	54592903	62950284	8.357.381	988	8.459	17
	5	2	33750031	36782433	3.032.402	450	6.739	4
	6	2	36795770	50397848	13.602.078	1562	8.708	19
	7	2	41508568	63199425	21.690.857	1874	11.575	108

	8	2	63369259	70164515	6.795.256	644	10.552	44
	9*	2	221279406	235603782	14.324.376	1243	11.524	109
	10	4	7098724	16197827	9.099.103	1190	7.646	65
	11	5	116252776	125339167	9.086.391	961	9.455	23
	12	5	124572054	135760364	11.188.310	950	11.777	84
	13*	5	135778451	147316068	11.537.617	974	11.846	160
	14	5	174375839	179192448	4.816.609	293	16.439	74
	15	7	17494572	22764605	5.270.033	476	11.071	15
	16	7	49243784	55745805	6.502.021	585	11.115	17
	17	7	61269841	65132372	3.862.531	121	31.922	27
	18	7	67165830	73927865	6.762.035	501	13.497	39
	19	7	74991720	87573306	12.581.586	734	17.141	33
	20	7	148733104	152855453	4.122.349	332	12.417	50
	21	8	102906748	106507154	3.600.406	300	12.001	19
	22	9	94957073	115429110	20.472.037	1972	10.381	145
	23	9	116504063	125662845	9.158.782	1065	8.600	66
	24	9	128076597	136913608	8.837.011	798	11.074	157
	25*	11	6026590	10833697	4.807.107	562	8.554	86
	26	12	37882928	40271174	2.388.246	185	12.909	7
	27	12	114045475	124468839	10.423.364	1046	9.965	122
	28	14	58996886	60894885	1.897.999	136	13.956	17
	29	17	14894213	18205989	3.311.776	206	16.077	33
	30	17	18747803	27904495	9.156.692	405	22.609	34
	31	17	67022105	72761884	5.739.779	569	10.087	115
<hr/>								
	1	2	10264593	23360522	13.095.929	1419	9.229	52
	2	3	173374426	180871100	7.496.674	419	17.892	21
	3*	5	79613516	97024838	17.411.322	934	18.642	69
	4	6	123796179	127537919	3.741.740	400	9.354	12
	5	9*	4566451	10488582	5.922.131	936	6.327	28
	6	10	5681354	11879196	6.197.842	943	6.572	31
F5240	7	14	28923592	33094185	4.170.593	318	13.115	16
	8	14	62189746	73042288	10.852.542	1028	10.557	81
	9	14	73143077	94164755	21.021.678	1906	11.029	65
	10	15	94521758	100210760	5.689.002	508	11.199	25
	11	16	1119032	8740596	7.621.564	982	7.761	4
	12	18	59798933	66607158	6.808.225	466	14.610	13
	13	19	56807761	58246052	1.438.291	117	12.293	39

* - regiões onde localizam os genes que interagem diretamente com o *CHRNA7*. **CR** – cromossomo; **POS SNP1** – posição do SNP do início; **POS SNP2** – posição do SNP do fim; **DENS** – densidade.

Figura 1: Genes localizados nas regiões em homozigose e que foram identificados como relacionados funcionalmente com o *CHRNA7* com o programa IPA: A – no paciente F2299 e B – no paciente F5240.

Figura 2: Genotipagem das regiões em homozigose contendo os genes que *in silico* interagem funcionalmente com o *CHRNA7*. A – Haplótipo da região 2q37.1 na família F2299. B – Haplótipo da região 9p24 da família F5240. Quadrado preto – propósito; círculos e quadrados com círculo no centro – portadores da duplicação da região 15q13.3; círculos com preenchimento branco – normais para o número de cópias da região 15q13.3; círculos com preenchimento cinza – indivíduos não avaliados.

A genotipagem de marcadores microssatélites para as regiões 2q37 e 9p24, onde estão localizados os genes *CHRND/CHRNA7* e *JAK2*, respectivamente, mostrou que apenas os pacientes são homozigotos para tais loci (Figura 3). Diante deste resultado, podemos considerar que talvez haja alguma mutação em homozigose nesses dois loci contribuindo para o fenótipo.

3.4 - DISCUSSÃO

O ASD é uma doença complexa e diversos mecanismos moleculares têm sido envolvidos na etiologia, entre eles: as mutações em homozigose, com padrão de herança recessivo, CNVs, interação entre 2 ou mais genes, a epistasia e o mosaïcismo somático (POOT *et al.*, 2011).

Na nossa amostra, identificamos dois pacientes com microduplicação na região 15q13.3, abrangendo apenas *CHRNA7*, de um total de 364 pacientes triados (capítulo 2, Tabela 1 e 2, páginas 39 e 40). A duplicação da região que envolve o *CHRNA7* tem sido identificada em indivíduos com uma variedade de doenças neuropsiquiátricas, incluindo o TEA, e em indivíduos da população normal (MAGRI *et al.*, 2010; COOPER *et al.*, 2011; VU *et al.*, 2011; LEBLOND *et al.*, 2012). O quadro clínico associado à duplicação do *CHRNA7* é ainda pouco caracterizado. Por isto, realizamos uma melhor caracterização clínica dos pacientes e nos dois casos observamos que as crises convulsivas estavam presentes, condição que foi relatada anteriormente em apenas um paciente (SZAFRANSKI *et al.*, 2010).

Uma vez que há indícios de que a patogenicidade da duplicação do 15q13.3 é dependente da presença de outras alterações genéticas, decidimos buscar pelas mesmas. Constatamos que um dos dois pacientes (F5240) estudados apresentou uma segunda CNV relevante para o fenótipo, a qual está localizada na região cromossômica

15q11.2. CNVs em 15q11.2, duplicação e deleção, foram anteriormente descritas em pacientes com TEA (DEPIENNE *et al.*, 2009; GIRIRAJAN *et al.*, 2011; LEBLOND *et al.*, 2012; NORD *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2010). Nessa região há 4 genes, com expressão amplamente difusa no cérebro, considerados importantes para as características neurocomportamentais e cognitivas, os quais são: *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA1* e *NIPA2* (DEPIENNE *et al.*, 2009; DOORNBOS *et al.*, 2009; von der LIPPE *et al.*, 2011). O *TUBGCP5*, que faz parte do complexo gama-tubulina, e o *CYFIP1* são relevantes para o crescimento, direcionamento e ramificação axonal (MURPHY *et al.*, 2001; CHAI *et al.*, 2003; SCHENCK *et al.*, 2003). Já os genes *NIPA1/2* atuam no transporte de Mg^{2+} , que é importante para a manutenção de diversas funções celulares, tais como o crescimento e desenvolvimento (GOYTAIN *et al.*, 2007, 2008). Assim sendo, muito possivelmente esta duplicação também está contribuindo para o fenótipo ASD deste paciente.

Ambos os pacientes são filhos de pais consanguíneos, o que aumenta a probabilidade deles terem alguma mutação em homozigose que poderia contribuir para ASD. Em uma primeira análise, verificamos que o número das regiões em homozigose (> 1MB) nesses dois indivíduos variou, sendo que o caso F2299 apresentou 31 enquanto o caso F5240 apresentou 13 regiões em homozigose, não havendo sobreposição entre estas regiões. Apesar de ter sido relatado que o número médio das regiões em homozigose em pacientes com ASD é maior do que em controles (Wang *et al.*, 2009) tanto neste quanto no nosso estudo, o número médio dessas regiões identificadas é comparável a outros exemplos da literatura, que relatam uma variação na população geral entre 4-60 regiões em homozigose por indivíduo (GIBSON *et al.*, 2006; NALLS *et al.*, 2009; NOTHNAGEL *et al.*, 2010). Por outro lado, o tamanho médio das regiões foi semelhante entre os dois paciente [8,3MB (variou entre ~1,9 – 21,7 MB) no caso F2299 e 8,5MB (variou entre ~1,4 – 21MB) no caso F5240] e, também, foram maiores do que o tamanho médio descrito para a população geral de aproximadamente 1,4MB (GIBSON *et*

al., 2006; MCQUILLAN & LEUTENEGGER, 2008; NALLS *et al.*, 2009; NOTHNAGEL *et al.*, 2010; SIMS *et al.*, 2011). Isto se deve possivelmente ao fato que os dois casos aqui relatados são descendentes de pais consangüíneos, o que favorece a segregação de blocos grandes em comum que não sofreram recombinação (KIRIN *et al.*, 2010). CASEY *e col.* (2012) estudaram 2584 trios de propósitos com ASD e mostraram que alguns pacientes com ASD compartilham os mesmos segmentos em homozigose, indicando que estas regiões podem conter genes responsáveis pela doença. Ainda, muitos destes segmentos em homozigose sobrepõem CNVs e genes anteriormente associados ao ASD. Visto que estudamos apenas dois pacientes, não aparentados, eles não compartilhariam obrigatoriamente as mesmas regiões em homozigose, pois, como, também, mostrado por CASEY *e col.* (2012), nem todos os pacientes compartilharam os mesmos segmentos em homozigose. Assim sendo, é possível que em algum (alguns) destes blocos de homozigose nos pacientes aqui estudados estejam localizadas mutações patogênicas que estejam contribuindo para o fenótipo de ASD.

Estudos anteriores relataram que, comumente, os genes envolvidos na etiologia TEA podem pertencer a uma única via biológica (COOK & SCHERER, 2008; VELTMAN & BRUNNER, 2010; POOT *et al.*, 2011). Além disso, existe maior probabilidade que genes funcionalmente próximos, tais como aqueles que pertencem a um mesmo complexo proteico ou de uma mesma via bioquímica, juntamente, contribuam para um único fenótipo (OTI & BRUNNER, 2007). Pensando nisso, selecionamos genes por meio de análise *in silico*, dentre as regiões de homozigose, que interagem na mesma via biológica do *CHRNA7*. No paciente 1, identificamos os genes *CHRNA7* e *CHRNA8* (receptor nicotínico de acetilcolina gama e delta, respectivamente) em uma das regiões de homozigose, os quais codificam proteínas transportadoras de íons predominantes nas junções neuromusculares (JNM) (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993). Apesar de mutações de vários tipos, *non-sense*, *missense* entre outras, nestas moléculas estarem

associadas às síndromes miastênicas herdadas de forma dominante e recessiva (MICHALK *et al.*, 2008; VOGT *et al.*, 2008, 2012), já foram descritas duplicações da região que envolve esses dois genes em pacientes com ASD e deficiência intelectual (FRIEDMAN *et al.*, 2009; ROSENFELD, J. A *et al.*, 2010). Adicionalmente foi observada a alteração da expressão do gene *CHRND* no hipocampo de pacientes com esquizofrenia e Transtorno Bipolar (BENES *et al.*, 2008) e, também, o aumento da expressão deste gene em um modelo de célula neuronal expostos ao complexo beta-amilóide₁₋₄₂/ Alumínio ($A\beta$ -Al), os quais se acumulam em placas senis no cérebro e são neurotóxicas, sendo uma das possíveis causas da neurodegeneração na Doença de Alzheimer (GATTA *et al.*, 2011). Assim sendo, será importante verificar se este paciente apresenta alguma mutação patogênica nestes genes.

Os outros dois genes encontrados interagindo com o *CHRNA7*, dentro das regiões em homozigose, no paciente F2299 foram o *EGR1* e *RIC3*. O *EGR1* (*early growth response 1*), membro da família *Egr* de fatores de transcrição *zinc finger*, é ativado através do influxo de cálcio e apresenta expressão basal em diversas regiões do cérebro, entre estas o hipocampo e a amígdala (MCKEE *et al.*, 2006). Sabe-se que o *EGR1* medeia a expressão de genes que atuam no aprendizado e memória bem como a de genes relacionados à plasticidade sináptica (BOZON *et al.*, 2003; JAMES *et al.*, 2005). Já o *RIC3* (*resistence to inhibitors of cholinesterase 3*) é uma proteína chaperona da família de receptores nicotínicos de acetilcolina, a qual pertence o *CHRNA7* (HALEVI *et al.*, 2003; VALLÉS & BARRANTES, 2012). Visto que *EGR1*, *RIC3* também apresentam co-localização no hipocampo com o *CHRNA7* e, a *RIC3*, atua na regulação da atividade desta proteína, estes genes são candidatos importantes para serem investigados neste paciente.

O gene *JAK2* (*janus kinase 2*), que foi encontrado em uma região em homozigose do paciente F5240, é um dos membros da família das *Janus Kinases*, que é composta

por 4 proteínas (*Jak1*, *Jak2*, *Jak3* e *Tyk2*), e está envolvido no crescimento e proliferação celular (CATTANEO *et al.*, 1996; DE-FRAJA *et al.*, 1998). Apesar de essa proteína desempenhar importante função no sistema hematopoiético (CAMPBELL, P. J.; BAXTER; *et al.*, 2006; STEIN *et al.*, 2011), alguns trabalhos têm mostrado que ele é o membro das *Janus Kinases* de maior expressão no sistema nervoso central (SNC) (CATTANEO *et al.*, 1996; DE-FRAJA *et al.*, 1998). A *JAK2* é observada em abundância no cérebro nos primeiros estágios do período embrionário (DE-FRAJA *et al.*, 1998) e em menor quantidade durante a vida adulta, sendo importante para a sobrevivência e proliferação das células tronco neurais (CATTANEO *et al.*, 1996; KIM, Y. H.; CHUNG, J.-I. *et al.*, 2010). As principais funções da *JAK2* no SNC estão associadas à astrogliogênese (HE *et al.*, 2005), neuroproteção (MARRERO & BENCHERIF, 2009) bem como ao aprendizado e memória (NICOLAS *et al.*, 2012). A alteração da via de sinalização envolvendo *JAK2* foi relatada na Doença de Alzheimer (CHIBA *et al.*, 2009; BENCHERIF & LIPPIELLO, 2010) e em pacientes com TEA (PARKER-ATHILL *et al.*, 2009). Segundo PARKER-ATHILL *et al.* (2009), a alteração da via da *JAK2* pode acontecer através da ativação imune materna (*Maternal Immune Activation – MIA*). Assim, o aumento do *IL-6* no soro materno pode induzir ao aumento da ativação da *JAK2* no embrião, levando, assim, às alterações comportamentais (PARKER-ATHILL *et al.*, 2009). Caso sejam encontradas mutações patogênicas no gene *JAK2* neste pacientes, corroborará um modelo multi-alélico para a ocorrência de ASD.

3.5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os nossos resultados corroboram com a hipótese de que a duplicação do *CHRNA7* é um fator de risco para o TEA, porém outras CNVs e mutações devem ser necessárias para causar o fenótipo dos pacientes, pois, como mostramos neste trabalho,

um dos pacientes apresentou uma segunda CNV que foi relatada em outros casos de TEA. Além disso, detectamos genes na mesma via de sinalização que o *CHRNA7* mapeados em regiões em homozigose nestes 2 pacientes, o que sugere que um segundo evento mutacional possa estar presente nestes genes. Pretendemos como uma próxima etapa deste trabalho, sequenciar estes genes a fins de testarmos esta hipótese.

3.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C. E.; BROIDE, R. S.; CHEN, Y. et al. Development of the alpha7 nicotinic cholinergic receptor in rat hippocampal formation. *Brain Research Developmental*, v. 139, n. 2, p. 175-87, 2002.
- AGULHON, C.; ABITBOL, M.; BERTRAND, D; MALAFOSSE, A. Localization of mRNA for CHRNA7 in human fetal brain. *NeuroReport*, v. 10, n. 11, p. 2223-2227, 1999.
- BALICE-GORDON, R. J.; LICHTMAN, J. W. In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *The Journal of Neuroscience*, v. 13, n. 2, p. 834-55, 1993.
- BENCHERIF, M.; LIPPIELLO, P. M. Alpha7 neuronal nicotinic receptors: the missing link to understanding Alzheimer's etiopathology? *Medical Hypotheses*, v. 74, n. 2, p. 281-5, 2010.
- BENES, F. M.; LIM, B.; MATZILEVICH, D.; SUBBURAJU, S.; WALSH, J. P. Circuitry-based gene expression profiles in GABA cells of the trisynaptic pathway in schizophrenics versus bipolars. *PNAS*, v. 105, n. 52, p. 20935-40, 2008.
- BOULTER, J.; LUYTEN, W.; EVANS, K. et al. Isolation of a clone coding for the alpha-subunit of a mouse acetylcholine receptor. *The Journal of Neuroscience*, v. 5, n. 9, p. 2545-52, 1985.
- BOZON, B.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron*, v. 40, n. 4, p. 695-701, 2003.
- BREJC, K.; DIJK, W. J. VAN; KLAASSEN, R. V. et al. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, v. 411, n. 6835, p. 269-76, 2001.
- BROIDE, R. S.; ROBERTSON, R. T.; LESLIE, F. M. Regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the developing rat somatosensory cortex by thalamocortical afferents. *The Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 9, p. 2956-71, 1996.
- CAMPBELL, P. J.; BAXTER, E. J.; BEER, P. A; et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*, v. 108, n. 10, p. 3548-55, 2006.
- CASEY, J. P.; MAGALHAES, T.; CONROY, J. M. et al. A novel approach of homozygous haplotype sharing identifies candidate genes in autism spectrum disorder. *Human Genetics*, v. 131, n. 4, p. 565-79, 2012.
- CATTANEO, E.; FRAJA, C. DE; CONTI, L; et al. Activation of the JAK/STAT pathway leads to proliferation of ST14A central nervous system progenitor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 38, p. 23374-9, 1996.
- CHAI, J.-H; LOCKE, D. P.; GREALLY, J. M. et al. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *American journal of human genetics*, v. 73, n. 4, p. 898-925, 2003.

- CHIBA, T.; YAMADA, M.; SASABE, J. et al. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Molecular Psychiatry*, v. 14, n. 2, p. 206-22, 2009.
- CHINI, B.; RAIMOND, E.; ELGOYHEN, A. B. et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha 7-nicotinic receptor subunit gene (CHRNA7). *Genomics*, v. 19, n. 2, p. 379-81, 1994.
- COOK, E. H.; SCHERER, S. W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, v. 455, n. 7215, p. 919-23, 2008.
- COOPER, G. M.; COE, B. P.; GIRIRAJAN, S. et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics*, v. 43, n. 9, p. 838-46, 2011.
- DE-FRAJA, C.; CONTI, LUCIANO; MAGRASSI, L.; GOVONI, S.; CATTANEO, E. Members of the JAK/STAT proteins are expressed and regulated during development in the mammalian forebrain. *Journal of Neuroscience Research*, v. 54, n. 3, p. 320-30, 1998.
- DEPIENNE, C.; MORENO-DE-LUCA, D.; HERON, D. et al. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biological Psychiatry*, v. 66, n. 4, p. 349-59, 2009.
- DOORNBOS, M.; SIKKEMA-RADDATZ, B.; RUIJVENKAMP, C. A. L. et al. Nine patients with a microdeletion 15q11.2 between breakpoints 1 and 2 of the Prader-Willi critical region, possibly associated with behavioural disturbances. *European Journal of Medical Genetics*, v. 52, n. 2-3, p. 108-15, 2009.
- FAGHIH, R.; GOPALAKRISHNAN, M.; BRIGGS, C. A. Allosteric Modulators of the alfa-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Perspective*, v. 51, n. 4, p. 701-712, 2008.
- FALK, L.; NORDBERG, AGNETA; SEIGER, A.; KJAELDGAARD, A.; HELLSTRÖM-LINDAHL, EWA. The alpha7 nicotinic receptors in human fetal brain and spinal cord. *Journal of Neurochemistry*, v. 80, n. 3, p. 457-65, 2002.
- FRIEDMAN, J.; ADAM, S.; ARBOUR, L. et al. Detection of pathogenic copy number variants in children with idiopathic intellectual disability using 500 K SNP array genomic hybridization. *BMC Genomics*, v. 10, p. 526, 2009.
- GATTA, V.; DRAGO, D.; FINCATI, K. et al. Microarray analysis on human neuroblastoma cells exposed to aluminum, $\beta(1-42)$ -amyloid or the $\beta(1-42)$ -amyloid aluminum complex. *PloS One*, v. 6, n. 1, p. e15965, 2011.
- GAULT, J.; ROBINSON, M.; BERGER, R. et al. Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics*, v. 52, n. 2, p. 173-85, 1998.
- GIBSON, J.; MORTON, N. E.; COLLINS, A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Human Molecular Genetics*, v. 15, n. 5, p. 789-95, 2006.
- GIRIRAJAN, S.; BRKANAC, Z.; COE, B. P. et al. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS genetics*, v. 7, n. 11, p. e1002334, 2011.
- GOTTI, C.; ZOLI, M.; CLEMENTI, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, n. 9, p. 482-91, 2006.
- GOYTAIN, A.; HINES, R. M.; EL-HUSSEINI, A.; QUAMME, G. A. NIPA1(SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *The Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 11, p. 8060-8, 2007.
- GOYTAIN, A.; HINES, R. M.; QUAMME, G. A. Functional characterization of NIPA2, a selective Mg²⁺ transporter. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 295, n. 4, p. C944-53, 2008.
- GUAN, Z. Z.; ZHANG, X.; BLENNOW, K.; NORDBERG, A. Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport*, v. 10, n. 8, p. 1779-82, 1999.
- GUILMATRE, A.; DUBOURG, C.; MOSCA, A.-L. et al. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of General Psychiatry*, v. 66, n. 9, p. 947-56, 2009.

- HALEVI, S.; YASSIN, L.; ESHEL, M. et al. Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 36, p. 34411-7, 2003.
- HE, F.; GE, W.; MARTINOWICH, K. et al. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 616-25, 2005.
- HELLSTRÖM-LINDAHL, E.; COURT, J. A. Nicotinic acetylcholine receptors during prenatal development and brain pathology in human aging. *Behavioural Brain Research*, v. 113, n. 1-2, p. 159-168, ago 2000.
- JAMES, A. B.; CONWAY, A.-M.; MORRIS, B. J. Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor -- Zif268. *Journal of Neurochemistry*, v. 95, n. 3, p. 796-810, 2005.
- KELLER, J. J.; KELLER, A. B.; BOWERS, B. J.; WEHNER, J. M. Performance of alpha7 nicotinic receptor null mutants is impaired in appetitive learning measured in a signaled nose poke task. *Behavioural Brain Research*, v. 162, n. 1, p. 143-52, 2005.
- KENNEDY, G. C.; MATSUZAKI, H.; DONG, S. et al. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nature biotechnology*, v. 21, n. 10, p. 1233-7, 2003.
- KIM, Y. H.; CHUNG, J.-I.; WOO, H. G. et al. Differential regulation of proliferation and differentiation in neural precursor cells by the Jak pathway. *Stem Cells*, v. 28, n. 10, p. 1816-28, 2010.
- KIRIN, M.; MCQUILLAN, RUTH; FRANKLIN, C. S. et al. Genomic runs of homozygosity record population history and consanguinity. *PloS One*, v. 5, n. 11, p. e13996, 2010.
- KLEIN, R. C.; YAKEL, J. L. Paired-pulse potentiation of alpha7-containing nAChRs in rat hippocampal CA1 stratum radiatum interneurons. *The Journal of Physiology*, v. 568, n. Pt 3, p. 881-9, 2005.
- LEBLOND, C. S.; HEINRICH, J.; DELORME, R. et al. Genetic and Functional Analyses of SHANK2 Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 2, p. e1002521, 2012.
- LEONARD, S.; BERTRAND, DANIEL. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine & Tobacco Research*, v. 3, n. 3, p. 203-23, 2001.
- LEVIN, E. D. Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *Journal of Neurobiology*, v. 53, n. 4, p. 633-40, 2002.
- LIPPE, C. VON DER; RUSTAD, C.; HEIMDAL, K.; RØDNINGEN, O. K. 15q11.2 microdeletion - seven new patients with delayed development and/or behavioural problems. *European Journal of Medical Genetics*, v. 54, n. 3, p. 357-60, 2011.
- MAGRI, C.; SACCHETTI, E.; TRAVERSA, M. et al. New copy number variations in schizophrenia. *PloS One*, v. 5, n. 10, p. e13422, 2010.
- MARRERO, M. B.; BENCHERIF, M. Convergence of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-activated pathways for anti-apoptosis and anti-inflammation: central role for JAK2 activation of STAT3 and NF-kappaB. *Brain Research*, v. 1256, p. 1-7, 2009.
- MASUREL-PAULET, A.; ANDRIEUX, J.; CALLIER, P. et al. Delineation of 15q13.3 microdeletions. *Clinical Genetics*, v. 78, n. 2, p. 149-61, 2010.
- MCKEE, S. C.; THOMPSON, C. S.; SABOURIN, L. A.; HAKIM, A. M. Regulation of expression of early growth response transcription factors in rat primary cortical neurons by extracellular ATP. *Brain Research*, v. 1088, n. 1, p. 1-11, 2006.
- MCQUILLAN, R.; LEUTENEGGER, A. Runs of homozygosity in European populations. *The American Journal of Human Genetics*, v. 83, n. 3, p. 359-372, 2008.
- MICHALK, A.; STRICKER, S.; BECKER, J. et al. Acetylcholine Receptor Pathway Mutations Explain Various Fetal Akinesia Deformation Sequence Disorders. *The American Journal of Human Genetics*, v. 82, p. 464-476, 2008.
- MIKHAIL, F. M.; LOSE, E. J.; ROBIN, N. H. et al. Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay,

mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 155A, n. 10, p. 2386-96, 2011.

MURPHY, S. M.; PREBLE, A. M.; PATEL, U. K. et al. GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell*, v. 12, n. 11, p. 3340-52, 2001.

NALLS, M. A.; SIMON-SANCHEZ, J.; GIBBS, J. R. et al. Measures of autozygosity in decline: globalization, urbanization, and its implications for medical genetics. *PLoS Genetics*, v. 5, n. 3, p. e1000415, 2009.

NICOLAS, C. S.; PEINEAU, S.; AMICI, M. et al. The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron*, v. 73, n. 2, p. 374-90, 26 jan 2012.

NORD, A. S.; ROEB, W.; DICKEL, D. E. et al. Reduced transcript expression of genes affected by inherited and de novo CNVs in autism. *European Journal of Human Genetics*, v. 19, n. 6, p. 727-31, 2011.

NOTHNAGEL, M.; LU, T. T.; KAYSER, M.; KRAWCZAK, M. Genomic and geographic distribution of SNP-defined runs of homozygosity in Europeans. *Human Molecular Genetics*, v. 19, n. 15, p. 2927-35, 2010.

OTI, M.; BRUNNER, H. G. The modular nature of genetic diseases. *Clinical Genetics*, v. 71, n. 1, p. 1-11, 2007.

PAGNAMENTA, A. T.; WING, K.; SADIGHI AKHA, E. et al. A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *European Journal of Human Genetics*, v. 17, n. 5, p. 687-92, maio 2009.

PARKER-ATHILL, E.; LUO, D.; BAILEY, A. et al. Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism. *Journal of Neuroimmunology*, v. 217, n. 1-2, p. 20-7, 2009.

PINTO, D.; PAGNAMENTA, A. T.; KLEI, L. et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, v. 466, n. 7304, p. 368-72, 2010.

POOT, M.; SMAGT, J. J. VAN DER; BRILSTRA, E. H.; BOURGERON, T. Disentangling the myriad genomics of complex disorders, specifically focusing on autism, epilepsy, and schizophrenia. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 135, n. 3-4, p. 228-40, 2011.

PURCELL S, NEALE B, TODD-BROWN K, THOMAS L, FERREIRA MAR, BENDER D, MALLER J, SKLAR P, de BAKKER PIW, DALY MJ & SHAM PC. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based Linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 81. 2007.

ROBINSON, W. P.; DUTLY, F.; NICHOLLS, R. D. et al. The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *Journal of Medical Genetics*, v. 35, n. 2, p. 130-136, 1998.

ROSENFELD, J. A.; BALLIF, B. C.; TORCHIA, B. S. et al. Copy number variations associated with autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders. *Genetics in Medicine*, v. 12, n. 11, p. 694-702, 2010.

RÓZSA, B.; KATONA, G.; KASZÁS, A.; SZIPÖCS, R.; VIZI, E. S. Dendritic nicotinic receptors modulate backpropagating action potentials and long-term plasticity of interneurons. *The European Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 2, p. 364-77, 2008.

SCHENCK, A.; BARDONI, B.; LANGMANN, C. et al. CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron*, v. 38, n. 6, p. 887-98, 2003.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 233-4, 2000.

SHINAWI, M.; SCHAAF, C. P.; BHATT, S. S. et al. A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, v. 41, n. 12, p. 1269-71, 2009.

SIMS, R.; DWYER, S.; HAROLD, D. et al. No evidence that extended tracts of homozygosity are associated with Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 7, p. 764-71, 2011.

STEIN, B. L.; CRISPINO, J. D.; MOLITERNO, A. R. Janus kinase inhibitors: an update on the progress and promise of targeted therapy in the myeloproliferative neoplasms. *Current Opinion in Oncology*, v. 23, n. 6, p. 609-16, 2011.

SZABO, S. I.; ZELLES, T.; LENDVAI, B. Intracellular Ca^{2+} dynamics of hippocampal interneurons following nicotinic acetylcholine receptor activation. *Neurochemistry International*, v. 52, n. 1-2, p. 135-41, 2008.

SZAFRANSKI, P.; SCHAAF, C. P.; PERSON, R. E. et al. Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving CHRNA7: benign or pathological? *Human Mutation*, v. 31, n. 7, p. 840-50, 2010.

VALLÉS, A. S.; BARRANTES, F. J. Chaperoning $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1818, n. 3, p. 718-29, 2012.

VELTMAN, J. A.; BRUNNER, HAN G. Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes. *Nature Genetics*, v. 42, n. 3, p. 192-3, 2010.

VOGT, J.; HARRISON, B. J.; SPEARMAN, H. et al. Mutation analysis of CHRNA1, CHRNA1, CHRNA1, CHRNA1, and RAPSN genes in multiple pterygium syndrome/fetal akinesia patients. *American Journal of Human Genetics*, v. 82, n. 1, p. 222-7, 2008.

VOGT, J.; MORGAN, N. V.; REHAL, P. et al. CHRNA1 genotype-phenotype correlations in the multiple pterygium syndromes. *Journal of Medical Genetics*, p. 21-27, 2012.

VU, T. H.; COCCARO, E. F.; EICHLER, E. E.; GIRIRAJAN, S. Genomic architecture of aggression: rare copy number variants in intermittent explosive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 7, p. 808-16, 2011.

WALL, D. P.; ESTEBAN, F. J.; DELUCA, T. F. et al. Comparative analysis of neurological disorders focuses genome-wide search for autism genes. *Genomics*, v. 93, n. 2, p. 120-9, 2009.

WANG K, CHEN Z, TADESSE MG, GLESSNER J, GRANT SFA, HAKONARSON H, BUCAN M, LI M. Modeling genetic inheritance of copy number variations. *Nucleic Acids Research*. 36:e138, 2008.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO GERAL

O transtorno do espectro autista é uma doença complexa que tem sido alvo de estudos de diferentes áreas científicas. Embora sejam muitos os estudos, predominando os de populações com origem europeia, poucos dados são conclusivos, sendo isto mostrado, principalmente, pela prevalência de casos idiopáticos (~75%) (GESCHWIND, 2009; SCHAAF & ZOGHBI, 2011). Por causa desta grande quantidade de casos idiopáticos, diversos trabalhos focam os esforços na investigação das causas genéticas do ASD. Para a população brasileira existem poucos trabalhos relatando mutações em pacientes com ASD. Ainda menos trabalhos nesta população realizam a investigação das alterações genéticas recorrentes em amostras grandes. O estudo das alterações genéticas têm implicações no aconselhamento das famílias e, também, no estudo dos mecanismos genéticos que atuam nesta doença.

Ademais, na população brasileira há poucos estudos caracterizando o quadro clínico dos pacientes, o que muitas vezes dificulta, por exemplo, o delineamento de pesquisas na área de genética bem como a indicação dos testes genéticos mais apropriados. É possível que alterações genéticas relacionadas ao ASD comprometam diversas vias bioquímicas que podem também causar não apenas disfunções neurológicas, como também imune e motora, por exemplo. Sendo assim, o estudo multidisciplinar dos casos de ASD é importante para o entendimento da sua complexidade.

Visando o aspecto clínico da doença, verificamos que em cerca de um terço da amostra ocorreram outras comorbidades, sejam elas alterações fisiológicas, neurológicas ou motoras. Este resultado ressalta a importância de se avaliar estas outras

características já que muitos pacientes apresentam diferentes combinações das comorbidades, as quais podem fazer parte de um quadro clínico sindrômico. Neste sentido observamos a coocorrência das crises convulsivas e da ausência de fala nos casos com ASD. Possivelmente, esta combinação faz parte de síndromes ainda não caracterizadas, com mecanismos genéticos similares. Para outras comorbidade, tais como a hipotonia e as disfunções gastrointestinais, não verificamos esta combinação de condições clínicas, talvez devido ao número limitado de pacientes, que, embora grande em relação às amostras com ASD da população brasileira até então estudadas, é estatisticamente pequeno para a averiguação de tal dado.

Este trabalho, ao nosso conhecimento, é o primeiro a relatar diferença sexual para a hipotonia no ASD, o que indica que existe para pacientes do sexo feminino com ASD uma maior predisposição de ter esta condição clínica. A hipotonia pode ter diferentes origens, inclusive genética, o que abre espaço para a investigação de mutações em genes de função biológica comum a estas duas condições, principalmente nas mulheres.

Na nossa amostra verificamos que a herdabilidade foi de 76%. O valor da herdabilidade foi estimado a partir da prevalência de casos de ASD na população brasileira (~0,3%) (PAULA *et al.*, 2011), que é bastante inferior ao que se tem identificado para outras populações do hemisfério norte (~1%) (FOMBONNE, 2009; MATSON & KOZLOWSKI, 2011), mas é comparável com a que foi observada em outra população sul-americana (~0,2%) (MONTIEL-NAVA & PEÑA, 2008). Possivelmente, muitos pacientes com ASD desta região geográfica ainda apresentam diagnóstico incorreto ou mesmo não sejam diagnosticados, dificultando o cálculo mais preciso. Todavia, evidenciamos a forte contribuição dos fatores genéticos para este transtorno.

Estimamos que o risco de recorrência seja de aproximadamente 5%. Este resultado contribuirá significativamente para o aconselhamento genético de famílias da

população brasileira, uma vez que era inexistente a estimativa de risco de recorrência para tal população até o presente trabalho.

As abordagens genéticas utilizadas para a investigação das possíveis causas do ASD permitiu-nos identificar que ~3% e ~5% dos pacientes apresentam mutação no gene *FMR1* e alterações citogenéticas microscopicamente visíveis, respectivamente. Já as CNVs recorrentes nos pacientes com ASD, localizadas nas regiões cromossômicas 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13, foram presentes em ~3% da amostra. Estas diferentes metodologias possibilitaram a identificação da causa, ou mesmo, de um fator genético que contribui para o ASD em cerca de 10% da nossa amostra. Portanto, o uso de múltiplas abordagens permite a identificação da causa, neste caso mutações e alterações citogenéticas, envolvidas no ASD em um número maior de pacientes e um aconselhamento genético melhor. Além disso, alguns destes resultados abriram novas questões que estamos tentando responde-las no nosso laboratório.

Como vem sendo mostrado, o ASD é um distúrbio geneticamente heterogêneo, e têm sido propostos diversos mecanismos genéticos para explicá-lo. Atualmente, os modelos multi-locos, oligogênico e poligênico estão entre os mais aceitos e estudados (POOT *et al.*, 2011). Desta forma, explorar estes modelos pode favorecer o entendimento do complexo fenótipo apresentado pelos pacientes, os quais, muitas vezes, apresentam outras comorbidades.

Neste trabalho decidimos explorar o modelo multi-locos em dois casos com duplicação da região 15q13.3, envolvendo apenas o gene *CHRNA7*. A duplicação do 15q13.3 isolada, ou seja, apenas essa duplicação, parece não explicar o quadro clínico apresentado pelos pacientes. Assim, decidimos buscar outras mutações/CNVs que poderiam contribuir para o fenótipo apresentado por estes dois casos. No paciente F5240 verificamos a presença de uma deleção na região 15q11.2 e, homozigose na região contendo o gene *JAK2*, que interage funcionalmente com o *CHRNA7*. No segundo caso

(F2299) não identificamos outras CNVs, contudo, verificamos homozigose das regiões contendo quatro genes que interagem com o *CHRNA7*: *CHRND*, *CHRNA7*, *RIC3*, *ERG1*, sendo que até o momento genotipamos nos pais somente as regiões onde se localizam os genes *CHRNA7/CHRND* (2q37.1). Estes resultados dão suporte ao modelo multi-locos e, portanto, a investigação das mutações nessas regiões será realizada, para tentar entender o mecanismo da doença nestes pacientes.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho contribuiu de forma significativa para o conhecimento das características clínicas e genéticas de uma amostra de pacientes com ASD brasileiros, assim chegamos às seguintes conclusões:

1. A frequência das alterações genéticas (mutações no gene *FMR1* e alterações citogenéticas) e da maioria das comorbidades estudadas na nossa amostra da população brasileira de pacientes com ASD está de acordo com o que tem sido descrito em outros trabalhos;
 - a. O estudo das comorbidade é relevante para a descrição amostral, para entender se estas comorbidades têm alguma tendência a ocorrerem conjuntamente e até mesmo se estas podem apresentar uma mesma causa. Além disso, o nosso resultado sugere fortemente que as crises convulsivas, os problemas de fala grave, considerando principalmente a ausência de fala, e o ASD, têm uma mesma base etiológica;
 - b. Para a maioria das doenças que acometeu os pacientes com ASD não há diferença sexual, sendo esta diferença observada apenas para a hipotonia, que foi mais prevalente no gênero feminino;
 - c. Os fatores genéticos contribuem de forma significativa para o ASD;

d. As alterações citogenéticas e a mutação que causa a Síndrome do X-Frágil têm a representatividade dentro do limiar esperado. Portanto, a triagem destas mutações é importante para o aconselhamento genético e excluir da amostra para pesquisa de causa genética do ASD idiopático, casos com doença monogênica de causa bem estabelecida, como é a Síndrome do X-Frágil;

2. As CNVs nas regiões cromossômicas 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13 apresentam recorrência na nossa amostra, pois cada uma foi presente em cerca de 1% dos casos avaliados;

a. Os nossos resultados reforçaram as evidências de penetrância incompleta das CNVs nas regiões cromossômicas 15q e 16p, em contrapartida a deleção do 22q13 tem penetrância completa;

b. O fenótipo dos pacientes é bastante heterogêneo. Contudo, para poucas características comuns a cada tipo de alteração verificamos: a fala foi ausente em todos os pacientes com deleção do 22q13; e, os dois casos com duplicação no 15q13.3 apresentaram crises convulsivas.

c. O modelo multi-locos que tem sido sugerido para o ASD tem suporte nos resultados obtidos de dois pacientes, pois nesses indivíduos houve outras CNVs e possivelmente há outras mutações, talvez, em homozigose.

De forma geral, estes resultados mostram que a triagem de um grande número de pacientes possibilita o melhor entendimento das características relacionadas a determinadas alterações. Além disso, abrem perspectivas para estudos funcionais futuros, pois para poucas alterações genéticas recorrentes há estudos da expressão gênica, por exemplo, que permitem estudar como a variação molecular causa as condições similares e divergentes dos pacientes.

RESUMO

O transtorno do espectro autista (ASD) é uma doença clínica e geneticamente heterogênea, com mecanismo etiológico ainda pouco conhecido. Assim, os principais objetivos deste trabalho foram descrever as características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com ASD, bem como determinar o risco de recorrência e a herdabilidade. Verificamos que a maioria das comorbidades avaliadas tem prevalência similar àquelas anteriormente descritas. A hipotonia exibiu maior prevalência no sexo feminino. A ausência de fala apresentou prevalência significativamente maior no grupo de pacientes com comorbidades, sendo que a gravidade da fala foi positivamente correlacionada com a presença das crises convulsivas. A herdabilidade estimada foi de 76% e o risco de recorrência ~5%. As alterações citogenéticas e os casos positivos para a Síndrome do X-Frágil explicaram cerca de 8% dos casos de ASD da nossa amostra. As CNVs nas regiões estudadas foram detectadas em 2,7% da amostra. Nós verificamos que há penetrância incompleta do ASD para as regiões. O estudo mais detalhado dos dois casos de duplicação da região 15q13.3, envolvendo somente o gene *CHRNA7*, mostrou que um dos pacientes (F5240) exibiu uma segunda CNV, possivelmente patogênica. A análise *in silico* sugeriu que genes que interagem diretamente com o *CHRNA7* podem conter mutações patogênicas e, juntamente com a duplicação do 15q13.3, possivelmente estão envolvidos na etiologia do ASD. Este estudo mostrou que é necessário fazer uma ampla caracterização genética dos pacientes, para possibilitar o estudo dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na causa do ASD.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a clinically and genetically heterogeneous disease and its etiological mechanisms are still poorly understood. The main objectives of this study were to describe the clinical and genetic features of Brazilian patients with ASD, and to determine the recurrence risk and heritability. Great part of the comorbidities assessed here had comparable prevalence to those of previous works. The hypotonia was significantly prevalent in the female sex. Absent speech was significantly more frequent in patients with comorbidities, and severity of speech problems was positively correlated with presence of seizures. Heritability was estimated as 76% and the recurrence risk as approximately 5%. Cytogenetic alterations and positive results for Fragile X Syndrome explain about 8% of the ASD etiology of our sample. The CNVs at the chromosomal regions 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 were present in 2.7% of the sample. Incomplete penetrance of ASD was observed for the 16p and 15q regions. Further investigation of the two cases with duplication of the region 15q13.3, involving only the *CHRNA7* gene, revealed that one of them (F5240) exhibited a second possible pathogenic CNV. In silico analysis suggested that genes interacting directly with the *CHRNA7* could harbor pathogenic mutations and, together with the duplication at 15q13.3, could be involved in the ASD etiology. This study showed the necessity of a broad genetic characterization of patients with ASD, to enable the elucidation of possible molecular mechanisms related to ASD etiology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-RAHMAN, OA & HUDGINS, L. The diagnostic utility of a genetics evaluation in children with pervasive developmental disorders. *Genetics in Medicine*, v. 8, n. 1, p. 50-54, 2006.
- ADAMS, C. E.; BROIDE, R. S.; CHEN, Y. et al. Development of the alpha7 nicotinic cholinergic receptor in rat hippocampal formation. *Brain Research Developmental*, v. 139, n. 2, p. 175-87, 2002.
- AGILENT TECHNOLOGIES. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling for Blood , Cells or Tissues (with a High Throughput option) Protocol. Disponível em: <www.genomics.agilent.com>.
- AGULHON, C.; ABITBOL, M.; BERTRAND, D; MALAFOSSE, A. Localization of mRNA for CHR7A7 in human fetal brain. *NeuroReport*, v. 10, n. 11, p. 2223-2227, 1999.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV). Washington D.C.: American Psychiatric Association; 1994.
- ANTSHEL, KM; ANEJA, A; STRUNGE, L. et al. Autistic spectrum disorders in velocardio facial syndrome (22q11.2 deletion). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 37, n. 9, p. 1776-86, 2007.
- BABATZ, T. D.; KUMAR, R. A; SUDI, J.; DOBYNS, W. B.; CHRISTIAN, S. L. Copy number and sequence variants implicate APBA2 as an autism candidate gene. *Autism Research*, v. 2, n. 6, p. 359-64, 2009.
- BALICE-GORDON, R. J.; LICHTMAN, J. W. In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *The Journal of Neuroscience*, v. 13, n. 2, p. 834-55, 1993.
- BAUMAN, M. L. Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics*, v. 7, n. 3, p. 320-7, 2010.
- BENCHERIF, M.; LIPPIELLO, P. M. Alpha7 neuronal nicotinic receptors: the missing link to understanding Alzheimer's etiopathology? *Medical Hypotheses*, v. 74, n. 2, p. 281-5, 2010.
- BENES, F. M.; LIM, B.; MATZILEVICH, D.; SUBBURAJU, S.; WALSH, J. P. Circuitry-based gene expression profiles in GABA cells of the trisynaptic pathway in schizophrenics versus bipolars. *PNAS*, v. 105, n. 52, p. 20935-40, 2008.
- BEN-SHACHAR, S.; LANPHER, B.; GERMAN, J. R. et al. Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *Journal of Medical Genetics*, v. 46, n. 6, p. 382-8, 2009.
- BETANCUR, C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research*, v. 1380, p. 42-77, 2011.
- BOLTON, P. F.; CARCANI-RATHWELL, I.; HUTTON, J. et al. Epilepsy in autism: features and correlates. *The British Journal of Psychiatry*, v. 198, n. 4, p. 289-94, 2011.
- van BOM, B. W. M.; MEFFORD, H C; MENTEN, B. et al. Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *Journal of Medical Genetics*, v. 46, n. 8, p. 511-23, 2009.

- BONAGLIA, M C; GIORDA, R; MANI, E. et al. Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 10, p. 822-8, 2006.
- BONAGLIA, MARIA CLARA; GIORDA, ROBERTO; BERI, S. et al. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid syndrome. *PLoS Genetics*, v. 7, n. 7, p. e1002173, 2011.
- BOULTER, J.; LUYTEN, W.; EVANS, K. et al. Isolation of a clone coding for the alpha-subunit of a mouse acetylcholine receptor. *The Journal of Neuroscience*, v. 5, n. 9, p. 2545-52, 1985.
- BOZDAGI, O.; SAKURAI, T.; PAPAPETROU, D. et al. Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular Autism*, v. 1, n. 1, p. 15, 2010.
- BOZON, B.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron*, v. 40, n. 4, p. 695-701, 2003.
- BREJC, K.; DIJK, W. J. VAN; KLAASSEN, R. V. et al. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, v. 411, n. 6835, p. 269-76, 2001.
- BRIEBER, S.; NEUFANG, S.; BRUNING, N. et al. Structural brain abnormalities in adolescents with autism spectrum disorder and patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 48, n. 12, p. 1251-8, 2007.
- BRITO, L. A; CRUZ, L. A; ROCHA, K. M. et al. Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 155A, n. 7, p. 1581-7, 2011.
- BROIDE, R. S.; ROBERTSON, R. T.; LESLIE, F. M. Regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the developing rat somatosensory cortex by thalamocortical afferents. *The Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 9, p. 2956-71, 1996.
- BRUGHA, T. S.; MCMANUS, S.; BANKART, J. et al. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders in Adults in the Community in England. *Archives of General Psychiatry*, v. 68, n. 5, p. 459-466, 2011.
- CAGLAYAN, A. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. *Developmental Medicine and Child Neurology*, v. 52, n. 2, p. 130-138, 2010.
- CAMPBELL, D. B.; BUIE, T. M.; WINTER, H. et al. Distinct genetic risk based on association of MET in families with co-occurring autism and gastrointestinal conditions. *Pediatrics*, v. 123, n. 3, p. 1018-24, 2009.
- CAMPBELL, D. B.; SUTCLIFFE, JAMES S; EBERT, P. J. et al. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *PNAS*, v. 103, n. 45, p. 16834-9, 2006.
- CAMPBELL, P. J.; BAXTER, E. J.; BEER, P. A; et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*, v. 108, n. 10, p. 3548-55, 2006.
- CASEY, J. P.; MAGALHAES, T.; CONROY, J. M. et al. A novel approach of homozygous haplotype sharing identifies candidate genes in autism spectrum disorder. *Human Genetics*, v. 131, n. 4, p. 565-79, 2012.

- CATTANEO, E.; FRAJA, C. DE; CONTI, L; et al. Activation of the JAK/STAT pathway leads to proliferation of ST14A central nervous system progenitor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 38, p. 23374-9, 1996.
- CHAI, J.-H; LOCKE, D. P.; GREALLY, J. M. et al. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *American journal of human genetics*, v. 73, n. 4, p. 898-925, 2003.
- CHIBA, T.; YAMADA, M.; SASABE, J. et al. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Molecular Psychiatry*, v. 14, n. 2, p. 206-22, 2009.
- CHINI, B.; RAIMOND, E.; ELGOYHEN, A. B. et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha 7-nicotinic receptor subunit gene (CHRNA7). *Genomics*, v. 19, n. 2, p. 379-81, 1994.
- CHO, S. C.; YIM, S.-H.; YOO, H. K. et al. Copy number variations associated with idiopathic autism identified by whole-genome microarray-based comparative genomic hybridization. *Psychiatric Genetics*, v. 19, n. 4, p. 177-85, 2009.
- CHONCHAIYA, W.; SCHNEIDER, A.; HAGERMAN, R. J. Fragile X: A Family of Disorders. *Advances in Pediatrics*, v. 56, p. 165-186, 2009.
- CHRISTAKOU, A.; MURPHY, C. M.; CHANTILUKE, K. et al. Disorder-specific functional abnormalities during sustained attention in youth with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and with Autism. *Molecular Psychiatry*, p. 1-9, 2012.
- CLIFFORD, S.; DISSANAYAKE, C.; BUI, Q. M. et al. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 37, n. 4, p. 738-47, 2007.
- CLOSE, H. A.; LEE, L-C; KAUFMANN, C. N.; ZIMMERMAN, A. W. Co-occurring conditions and change in diagnosis in autism spectrum disorders. *Pediatrics*, v. 129, n. 2, p. e305-16, 2012.
- CONSTANTINO, J. N.; TODOROV, A.; HILTON, C. et al. Autism recurrence in half siblings: strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Molecular Psychiatry*, p. 1-2, 2012.
- CONSTANTINO, J. N.; ZHANG, Y.; FRAZIER, T.; ABBACCHI, A. M.; LAW, P. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *The American Journal of Psychiatry*, v. 167, n. 11, p. 1349-56, 2010.
- COOK, E. H.; SCHERER, S. W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, v. 455, n. 7215, p. 919-23, 2008.
- COOPER, G. M.; COE, B. P.; GIRIRAJAN, S. et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics*, v. 43, n. 9, p. 838-46, 2011.
- COSTA, M. I. F.; NUNESMAIA, H. G. DA S. DIAGNÓSTICO GENÉTICO E CLÍNICO DO AUTISMO INFANTIL. *Arquivo de Neuropsiquiatria*, v. 56, n. 1, p. 24-31, 1998.
- COURCHESNE, E.; KARNS, C.; DAVIS, H. et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI study. *Neurology*, v. 76, n. 24, p. 2111-2111, 2011.
- DANIELSSON, S.; GILLBERG, I. C.; BILLSTEDT, EVA; GILLBERG, CHRISTOPHER; OLSSON, I. Epilepsy in young adults with autism: a prospective population-based follow-up study of 120 individuals diagnosed in childhood. *Epilepsia*, v. 46, n. 6, p. 918-23, 2005.

- DE-FRAJA, C.; CONTI, LUCIANO; MAGRASSI, L.; GOVONI, S.; CATTANEO, E. Members of the JAK/STAT proteins are expressed and regulated during development in the mammalian forebrain. *Journal of Neuroscience Research*, v. 54, n. 3, p. 320-30, 1998.
- DELAHAYE, A.; TOUTAIN, A.; ABOURA, A. et al. Chromosome 22q13.3 deletion syndrome with a de novo interstitial 22q13.3 cryptic deletion disrupting SHANK3. *European Journal of Medical Genetics*, v. 52, n. 5, p. 328-32, 2009.
- DEPIENNE, C.; MORENO-DE-LUCA, D.; HERON, D. et al. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biological Psychiatry*, v. 66, n. 4, p. 349-59, 2009.
- DIBBENS, L. M.; MULLEN, S.; HELBIG, I. et al. Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance. *Human Molecular Genetics*, v. 18, n. 19, p. 3626-31, 2009.
- DOMINICK, K. C.; DAVIS, N. O.; LAINHART, J.; TAGER-FLUSBERG, H.; FOLSTEIN, S. Atypical behaviors in children with autism and children with a history of language impairment. *Research in Developmental Disabilities*, v. 28, n. 2, p. 145-62, 2007.
- DOORNBOS, M.; SIKKEMA-RADDATZ, B.; RUIJVENKAMP, C. A. L. et al. Nine patients with a microdeletion 15q11.2 between breakpoints 1 and 2 of the Prader-Willi critical region, possibly associated with behavioural disturbances. *European Journal of Medical Genetics*, v. 52, n. 2-3, p. 108-15, 2009.
- DURAND, C. M.; BETANCUR, C.; BOECKERS, T. M. et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genetics*, v. 39, n. 1, p. 25-7, jan 2007.
- EDELSON, L. R.; SAUDINO, K. J. Genetic and environmental influences on autistic-like behaviors in 2-year-old twins. *Behavior genetics*, v. 39, n. 3, p. 255–264, 2009.
- EMERY AEH. 1986. *Methodology in Medical Genetics*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 198 p. (Colocar na ordem certa!)
- ESTÉCIO, M. R. H.; FETT-CONTE, A. C.; VARELLA-GARCIA, M.; FRIDMAN, C.; SILVA, A. E. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2002.
- FAGHIH, R.; GOPALAKRISHNAN, M.; BRIGGS, C. A. Allosteric Modulators of the alfa-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Perspective*, v. 51, n. 4, p. 701-712, 2008.
- FALK, L.; NORDBERG, AGNETA; SEIGER, A.; KJAELDGAARD, A.; HELLSTRÖM-LINDAHL, EWA. The alpha7 nicotinic receptors in human fetal brain and spinal cord. *Journal of Neurochemistry*, v. 80, n. 3, p. 457-65, 2002.
- FARZIN, F.; PERRY, H.; HESSL, D. et al. Autism Spectrum Disorders and Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder in Boys with the Fragile X Premutation. *Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 27, n. 2, p. 137-144, 2006.
- FERNANDEZ, B. A.; ROBERTS, W.; CHUNG, B. et al. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *Journal of Medical Genetics*, v. 47, n. 3, p. 195-203, 2010.
- FOMBONNE, E. Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders. *Pediatric Research*, v. 65, n. 6, p. 591-598, 2009.
- FOMBONNE, ERIC. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 33, n. 4, p. 365-82, 2003.

FREITAG, C. M.; STAAL, W.; KLAUCK, S. M.; DUKETIS, E.; WALTES, R. Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *European Child & Adolescent Psychiatry*, v. 19, n. 3, p. 169-78, 2010.

FRIEDMAN, J.; ADAM, S.; ARBOUR, L. et al. Detection of pathogenic copy number variants in children with idiopathic intellectual disability using 500 K SNP array genomic hybridization. *BMC Genomics*, v. 10, p. 526, 2009.

GARGARO, B. A.; RINEHART, N. J.; BRADSHAW, J. L.; TONGE, B. J.; SHEPPARD, D. M. Autism and ADHD: how far have we come in the comorbidity debate? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 5, p. 1081-8, 2011.

GATTA, V.; DRAGO, D.; FINCATI, K. et al. Microarray analysis on human neuroblastoma cells exposed to aluminum, $\beta(1-42)$ -amyloid or the $\beta(1-42)$ -amyloid aluminum complex. *PLoS One*, v. 6, n. 1, p. e15965, 2011.

GAULT, J.; ROBINSON, M.; BERGER, R. et al. Genomic organization and partial duplication of the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics*, v. 52, n. 2, p. 173-85, 1998.

GESCHWIND, D. H. Advances in Autism. *Annual Review of Medicine*, v. 60, p. 367-380, 2009.

GHAZIUDDIN, M.; MOUNTAIN-KIMCHI, K. Defining the intellectual profile of Asperger Syndrome: comparison with high-functioning autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 34, n. 3, p. 279–284, 2004.

GIARELLI, E.; WIGGINS, L. D.; RICE, C. E. et al. Sex differences in the evaluation and diagnosis of autism spectrum disorders among children. *Disability and Health Journal*, v. 3, n. 2, p. 107-16, 2010.

GIBSON, J.; MORTON, N. E.; COLLINS, A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Human Molecular Genetics*, v. 15, n. 5, p. 789-95, 2006.

GIEDD, J. N.; RAPOPORT, J. L. Structural MRI of pediatric brain development: what have we learned and where are we going? *Neuron*, v. 67, n. 5, p. 728-34, 9 set 2010.

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

GILLBERG, C. Chromosomal disorders and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 28, n. 5, p. 415-25, out 1998.

GILLBERG, C.; HALLERBA, M. U.; LUGNEGA, T. Research in Developmental Disabilities Psychiatric comorbidity in young adults with a clinical diagnosis of Asperger syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, 2011.

GIOLO, S. R.; SOLER, J. M. P.; GREENWAY, S. C. et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *European Journal of Human Genetics*, v. 20, n. 1, p. 111-6, 2012.

GIRIRAJAN, S.; BRKANAC, Z.; COE, B. P. et al. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS genetics*, v. 7, n. 11, p. e1002334, 2011.

GIRIRAJAN, S.; ROSENFELD, J. A.; COOPER, G. M. et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nature Genetics*, v. 42, n. 3, p. 203-9, 2010.

GLESSNER, J. T.; WANG, K.; CAI, G. et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, v. 459, n. 7246, p. 569-73, 28 2009.

- GODLER, DAVID EUGENY; TASSONE, F.; LOESCH, DANUTA ZUZANNA; et al. Methylation of novel markers of fragile X alleles is inversely correlated with FMRP expression and FMR1 activation ratio. *Human Molecular Genetics*, v. 19, n. 8, p. 1618-32, 2010.
- GOLDBERG, W. A.; OSANN, K.; FILIPEK, P. A. et al. Language and other regression: assessment and timing. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 33, n. 6, p. 607-16, 2003.
- GOTTI, C.; ZOLI, M.; CLEMENTI, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, n. 9, p. 482-91, 2006.
- GOYTAIN, A.; HINES, R. M.; EL-HUSSEINI, A.; QUAMME, G. A. NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *The Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 11, p. 8060-8, 2007.
- GOYTAIN, A.; HINES, R. M.; QUAMME, G. A. Functional characterization of NIPA2, a selective Mg²⁺ transporter. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 295, n. 4, p. C944-53, 2008.
- GUAN, Z. Z.; ZHANG, X.; BLENNOW, K.; NORDBERG, A. Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport*, v. 10, n. 8, p. 1779-82, 1999.
- GUILMATRE, A.; DUBOURG, C.; MOSCA, A.-L. et al. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of General Psychiatry*, v. 66, n. 9, p. 947-56, 2009.
- HADDAD, L. A.; AGUIAR, M. J. B.; COSTA, S. et al. Fully Mutated and Gray-Zone FRAXA Alleles in Brazilian Mentally Retarded Boys. *American Journal of Medical Genetics*, v. 84, p. 198-201, 1999.
- HAGERMAN, R. J.; HARRIS, S. W. Autism profiles of males with fragile X syndrome. *American Journal of Mental Retardation*, v. 113, n. 6, p. 427-438, 2008.
- HALEVI, S.; YASSIN, L.; ESHEL, M. et al. Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 36, p. 34411-7, 2003.
- HALLMAYER, J.; CLEVELAND, S.; TORRES, A. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of General Psychiatry*, v. 68, n. 11, p. 1095-1102, 2011.
- HANSEN, R. L.; OZONOFF, S.; KRAKOWIAK, P. et al. Regression in autism: prevalence and associated factors in the CHARGE Study. *Ambulatory Pediatrics*, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2008.
- HANSON, E.; NASIR, R. H.; FONG, A. et al. Cognitive and behavioral characterization of 16p11.2 deletion syndrome. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 31, n. 8, p. 649-57, 2010.
- HE, F.; GE, W.; MARTINOWICH, K. et al. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 616-25, 2005.
- HELBIG, I.; MEFFORD, HEATHER C; SHARP, A. J. et al. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nature Genetics*, v. 41, n. 2, p. 160-2, 2009.

- HELLSTRÖM-LINDAHL, E.; COURT, J. A. Nicotinic acetylcholine receptors during prenatal development and brain pathology in human aging. *Behavioural Brain Research*, v. 113, n. 1-2, p. 159-168, ago 2000.
- HOGART, A.; WU, D.; LASALLE, J. M.; SCHANEN, N. C. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiology of Disease*, v. 38, n. 2, p. 181-91, 2010.
- HORNIK K. (2011). The R FAQ. Available at: <http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/>.
- HORVATH, K.; PAPADIMITRIOU, J. C.; RABSZTYN, A.; DRACHENBERG, C.; TILDON, J. T. Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *Journal of Pediatrics*, v. 135, p. 559-63, 1999.
- HORVATH, K.; PERMAN, J. A. Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Current Opinion in Pediatrics*, v. 14, n. 5, p. 583-7, 2002.
- IBRAHIM, S. H.; VOIGT, R. G.; KATUSIC, S. K.; WEAVER, A. L.; BARBARESI, W. J. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics*, v. 124, n. 2, p. 680-6, 2009.
- ISAKSEN, J.; DISETH, T. H.; SCHJØLBERG, S.; SKJELDAL, O. H. Observed prevalence of autism spectrum disorders in two Norwegian counties. *European Journal of Paediatric Neurology*, p. 1-7, 2012.
- JAMES, A. B.; CONWAY, A.-M.; MORRIS, B. J. Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor -- Zif268. *Journal of Neurochemistry*, v. 95, n. 3, p. 796-810, 2005.
- JOO, E.-J.; LEE, K. Y.; KIM, H. S. et al. Genetic Association Study of the Alpha 7 Nicotinic Receptor (CHRNA7) with the Development of Schizophrenia and Bipolar Disorder in Korean Population. *Psychiatry Investigation*, v. 7, n. 3, p. 196-201, 2010.
- JORDE, L.; HASSTEDT, S.; RITVO, E. et al. Complex segregation analysis of autism. *American Journal of Human Genetics*, v. 49, p. 932-938, 1991.
- KAGAN-KUSHNIR, T.; ROBERTS, S. W.; SNEAD, O. C. Screening electroencephalograms in autism spectrum disorders: evidence-based guideline. *Journal of Child Neurology*, v. 20, n. 3, p. 197-206, mar 2005.
- KELLER, J. J.; KELLER, A. B.; BOWERS, B. J.; WEHNER, J. M. Performance of alpha7 nicotinic receptor null mutants is impaired in appetitive learning measured in a signaled nose poke task. *Behavioural Brain Research*, v. 162, n. 1, p. 143-52, 2005.
- KENNEDY, G. C.; MATSUZAKI, H.; DONG, S. et al. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nature biotechnology*, v. 21, n. 10, p. 1233-7, 2003.
- KERR, M.; SCHEEPERS, M.; ARVIO, M. et al. Consensus guidelines into the management of epilepsy in adults with an intellectual disability. *Journal of Intellectual Disability Research*, v. 53, n. 8, p. 687-94, 2009.
- KIM, J. E.; LYOO, I. K.; ESTES, A. M. et al. Laterobasal amygdalar enlargement in 6-to 7-year-old children with autism spectrum disorder. *Archives of General Psychiatry*, v. 67, n. 11, p. 1187-97, 2010.
- KIM, Y. H.; CHUNG, J.-I.; WOO, H. G. et al. Differential regulation of proliferation and differentiation in neural precursor cells by the Jak pathway. *Stem Cells*, v. 28, n. 10, p. 1816-28, 2010.
- KIRIN, M.; MCQUILLAN, RUTH; FRANKLIN, C. S. et al. Genomic runs of homozygosity record population history and consanguinity. *PloS One*, v. 5, n. 11, p. e13996, 2010.

- KLEIN, R. C.; YAKEL, J. L. Paired-pulse potentiation of alpha7-containing nAChRs in rat hippocampal CA1 stratum radiatum interneurons. *The Journal of Physiology*, v. 568, n. Pt 3, p. 881-9, 2005.
- KLINTWALL, L.; HOLM, A.; ERIKSSON, M. et al. Sensory abnormalities in autism. A brief report. *Research in Developmental Disabilities*, v. 32, n. 2, p. 795-800, 2011.
- KOGAN, M. D.; BLUMBERG, S. J.; SCHIEVE, L. A. et al. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics*, v. 124, n. 5, p. 1395-403, 2009.
- KUMAR, R. A.; CHRISTIAN, S. L. Genetics of autism spectrum disorders. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 9, n. 3, p. 188-97, 2009.
- KUMAR, R. A.; MARSHALL, C. R.; BADNER, J. A. et al. Association and mutation analyses of 16p11.2 autism candidate genes. *PloS One*, v. 4, n. 2, p. e4582, jan 2009.
- KUMAR, R. A.; KARAMOHAMED, S.; SUDI, J. et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics*, v. 17, n. 4, p. 628-38, 2008.
- KURITA, H. Specificity and developmental consequences of speech loss in children with pervasive developmental disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 50, n. 4, p. 181-184, 1996.
- KUROKAWA, T.; YOKOMIZO, Y.; LEE, S.; KUSUDA, T. Clinical features of epilepsy with pervasive developmental disorder. *Brain & Development*, v. 32, n. 9, p. 764-8, 2010.
- KUSENDA, M.; SEBAT, J. The role of rare structural variants in the genetics of autism spectrum disorders. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 123, p. 36-43, 2008.
- LAZOFF, T.; ZHONG, L.; PEPERNI, T.; FOMBONNE, ERIC. Among Children at the English Montreal School Board. *Canadian Journal of Psychiatry*, v. 55, n. 11, p. 715-720, 2010.
- LAZOFF, T.; ZHONG, L.; PIPERNI, T.; FOMBONNE, E. Prevalence of pervasive developmental disorders among children at the English Montreal School Board. *The Canadian Journal of Psychiatry*, v. 55, n. 11, p. 715-20, 2010.
- LEBLOND, C. S.; HEINRICH, J.; DELORME, R. et al. Genetic and Functional Analyses of SHANK2 Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 2, p. e1002521, 2012.
- LEONARD, S.; BERTRAND, DANIEL. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine & Tobacco Research*, v. 3, n. 3, p. 203-23, 2001.
- LEVIN, E. D. Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *Journal of Neurobiology*, v. 53, n. 4, p. 633-40, 2002.
- LEVY, S. E.; GIARELLI, E.; LEE, L.-C. et al. Autism spectrum disorder and co-occurring developmental, psychiatric, and medical conditions among children in multiple populations of the United States. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 31, n. 4, p. 267-75, 2010.
- LEVY, S. E.; MANDELL, D. S.; SCHULTZ, R. T. Autism. *Lancet*, v. 374, p. 1627-1638, 2009.
- LEYFER, O. T.; FOLSTEIN, S. E.; BACALMAN, S. et al. Comorbid psychiatric disorders in children with autism: interview development and rates of disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, v. 36, n. 7, p. 849-61, 2006.
- LICHTENSTEIN, P.; CARLSTRÖM, E.; RÅSTAM, M.; GILLBERG, CHRISTOPHER; ANCKARSÄTER, H. The genetics of autism spectrum disorders and related

neuropsychiatric disorders in childhood. *The American Journal of Psychiatry*, v. 167, n. 11, p. 1357-63, 2010.

LIONEL, A. C.; CROSBIE, J.; BARBOSA, N. et al. Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Science Translational Medicine*, v. 3, n. 95, p. 95ra75, 2011.

LIPPE, C. VON DER; RUSTAD, C.; HEIMDAL, K.; RØDNINGEN, O. K. 15q11.2 microdeletion - seven new patients with delayed development and/or behavioural problems. *European Journal of Medical Genetics*, v. 54, n. 3, p. 357-60, 2011.

LO, Y.-CHUN; SOONG, W.-TSUEN; GAU, S. S.-FEN; et al. The loss of asymmetry and reduced interhemispheric connectivity in adolescents with autism: a study using diffusion spectrum imaging tractography. *Psychiatry Research*, v. 192, n. 1, p. 60-6, 2011.

LOESCH, DANUTA Z; GODLER, DAVID E; KHANIANI, M. et al. Linking the FMR1 alleles with small CGG expansions with neurodevelopmental disorders: preliminary data suggest an involvement of epigenetic mechanisms. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 149A, n. 10, p. 2306-10, 2009.

LORD C & SPENCE, S. Autism spectrum disorders: Phenotype and diagnosis. In S. Moldin and J. Rubenstein (Eds.), *Understanding autism: From basic neuroscience to treatment* (pp. 1-23). New York: cRc taylor and Francis, 2006.

LOSH, M.; ADOLPHS, R.; POE, M. D. et al. The Neuropsychological Profile of Autism and The Broad Autism Phenotype. *Archives of General Psychiatry*, v. 66, n. 5, p. 518-526, 2009.

MAGRI, C.; SACCHETTI, E.; TRAVERSA, M. et al. New copy number variations in schizophrenia. *PloS One*, v. 5, n. 10, p. e13422, 2010.

MARRERO, M. B.; BENCHERIF, M. Convergence of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-activated pathways for anti-apoptosis and anti-inflammation: central role for JAK2 activation of STAT3 and NF-kappaB. *Brain Research*, v. 1256, p. 1-7, 2009.

MARSHALL, C. R.; NOOR, A.; VINCENT, J. B. et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *The American Journal of Human Genetics*, v. 82, n. 2, p. 477-488, 2008.

MASUREL-PAULET, A.; ANDRIEUX, J.; CALLIER, P. et al. Delineation of 15q13.3 microdeletions. *Clinical Genetics*, v. 78, n. 2, p. 149-61, 2010.

MATSON, J. L.; KOZLOWSKI, A. M. The increasing prevalence of autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*, v. 5, n. 1, p. 418-425, 2011.

MATSON, J. L.; NEAL, D. Differentiating communication disorders and autism in children. *Research in Autism Spectrum Disorders*, v. 4, n. 4, p. 626-632, 2010.

MATSON, J. L.; SHOEMAKER, M. Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. *Research in Developmental Disabilities*, v. 30, n. 6, p. 1107-1114, 2009.

MATSON, M. L.; MATSON, J. L.; BEIGHLEY, J. S. Comorbidity of physical and motor problems in children with autism. *Research in Developmental Disabilities*, v. 32, n. 6, p. 2304-2308, 2011.

MATSUO, M.; MAEDA, T.; ISHII, K. et al. Characterization of childhood-onset complex partial seizures associated with autism spectrum disorder. *Epilepsy & Behavior*, v. 20, n. 3, p. 524-7, 2011.

- MATSUO, M.; MAEDA, T.; SASAKI, K.; ISHII, K.; HAMASAKI, Y. Frequent association of autism spectrum disorder in patients with childhood onset epilepsy. *Brain and Development*, v. 32, n. 9, p. 759-763, 2010.
- MCKEE, S. C.; THOMPSON, C. S.; SABOURIN, L. A.; HAKIM, A. M. Regulation of expression of early growth response transcription factors in rat primary cortical neurons by extracellular ATP. *Brain Research*, v. 1088, n. 1, p. 1-11, 2006.
- MCQUILLAN, R.; LEUTENEGGER, A. Runs of homozygosity in European populations. *The American Journal of Human Genetics*, v. 83, n. 3, p. 359-372, 2008.
- MEILLEUR, A.-A. S.; FOMBONNE, E. Regression of language and non-language skills in pervasive developmental disorders. *Journal of Intellectual Disability Research*, v. 53, n. 2, p. 115-24, 2009.
- MICHALK, A.; STRICKER, S.; BECKER, J. et al. Acetylcholine Receptor Pathway Mutations Explain Various Fetal Akinesia Deformation Sequence Disorders. *The American Journal of Human Genetics*, v. 82, p. 464-476, 2008.
- MIKHAIL, F. M.; LOSE, E. J.; ROBIN, N. H. et al. Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 155A, n. 10, p. 2386-96, 2011.
- MILLER, D T; SHEN, Y; WEISS, L A; et al. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *Journal of Medical Genetics*, v. 46, n. 4, p. 242-8, 2009.
- MILLER, DAVID T; NASIR, R.; SOBEIH, M. M. et al. 16p11. 2 Microdeletion. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews*TM [Internet]. [S.l.]: Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. p. 1-13, 2009.
- MING, X.; BRIMACOMBE, M.; CHAABAN, J.; ZIMMERMAN-BIER, B.; WAGNER, G. C. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *Journal of Child Neurology*, v. 23, n. 1, p. 6-13, 2008.
- MING, X.; BRIMACOMBE, M.; WAGNER, G. C. Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain & Development*, v. 29, n. 9, p. 565-70, 2007.
- MOESSNER, R.; MARSHALL, C. R.; SUTCLIFFE, J. S. et al. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, v. 81, n. 6, p. 1289-97, 2007.
- MONTIEL-NAVA, C.; PEÑA, J. A. Epidemiological findings of pervasive developmental disorders in a Venezuelan study. *Autism*, v. 12, n. 2, p. 191-202, 2008.
- MUKADDES, N. M.; HERGÜNER, S.; TANIDIR, C. Psychiatric disorders in individuals with high-functioning autism and Asperger's disorder: similarities and differences. *The World Journal of Biological Psychiatry*, v. 11, n. 8, p. 964-71, 2010.
- MULLIGAN, A.; ANNEY, R. J. L.; O'REGAN, M. et al. Autism symptoms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a familial trait which correlates with conduct, oppositional defiant, language and motor disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 39, n. 2, p. 197-209, 2009.
- MURPHY, S. M.; PREBLE, A M.; PATEL, U. K. et al. GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell*, v. 12, n. 11, p. 3340-52, 2001.
- NALLS, M. A; SIMON-SANCHEZ, J.; GIBBS, J. R. et al. Measures of autozygosity in decline: globalization, urbanization, and its implications for medical genetics. *PLoS Genetics*, v. 5, n. 3, p. e1000415, 2009.

- NESSLINGER, N. J.; GORSKI, J. L.; KURCZYNSKI, T. W. et al. Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of seven patients with deletions of chromosome 22q13.3. *American Journal of Human Genetics*, v. 54, n. 3, p. 464-72, 1994.
- NEWSCHAFER, C. J.; CROEN, L. A.; DANIELS, J. et al. The Epidemiology of Autism Spectrum. *Annual Review of Public Health*, v. 28, p. 235-58, 2007.
- NICOLAS, C. S.; PEINEAU, S.; AMICI, M. et al. The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron*, v. 73, n. 2, p. 374-90, 26 jan 2012.
- NORD, A. S.; ROEB, W.; DICKEL, D. E. et al. Reduced transcript expression of genes affected by inherited and de novo CNVs in autism. *European Journal of Human Genetics*, v. 19, n. 6, p. 727-31, 2011.
- NOTHNAGEL, M.; LU, T. T.; KAYSER, M.; KRAWCZAK, M. Genomic and geographic distribution of SNP-defined runs of homozygosity in Europeans. *Human Molecular Genetics*, v. 19, n. 15, p. 2927-35, 2010.
- NURMI, E.; AMIN, T.; OLSON, L. et al. Dense linkage disequilibrium mapping in the 15q11-q13 maternal expression domain yields evidence for association in autism. *Molecular Psychiatry*, v. 8, p. 624-34, 2003.
- NURMI, ERIKA L.; DOWD, M.; TADEVOSYAN-LEYFER, O. et al. Exploratory Subsetting of Autism Families Based on Savant Skills Improves Evidence of Genetic Linkage to 15q11-q13. *Journal of American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, v. 42, n. 7, p. 856-863, 2003.
- O'HEARN, K.; ASATO, M.; ORDAZ, S.; LUNA, B. Neurodevelopment and executive function in autism. *Development and Psychopathology*, v. 20, p. 1103-1132, 2008.
- OLIVEIRA KG, MOREIRA, DP, DAVIS N, SANDERS S, MASON CE, VADASZ E, BERTOLA D, PASSOS-BUENO, MR STATE MW. A complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 5 and X in autism spectrum disorder. *American Journal of Medical Genetics*. In Press 2012.
- OSLEJSKOVA, H.; DUSEK, L.; MAKOVSKA, Z.; REKTOR, I. Epilepsia, epileptiform abnormalities, non-right-handedness, hypotonia and severe decreased IQ are associated with language impairment in autism. *Epileptic Disorders*, v. 9, p. S9-18, 2007.
- OTI, M.; BRUNNER, H G. The modular nature of genetic diseases. *Clinical Genetics*, v. 71, n. 1, p. 1-11, 2007.
- OULDIM, K.; NATIQ, A.; JONVEAUX, P.; SEFIANI, A. Tetrasomy 15q11-q13 diagnosed by FISH in a patient with autistic disorder. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, v. 2007, n. 3, p. 1-4, 2007.
- OZONOFF, S.; YOUNG, G.; CARTER, A.; MESSINGER, D. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium Study. *Pediatrics*, v. 128, n. 3, p. e488-e495, 2011.
- PAGNAMENTA, A. T.; WING, K.; SADIGHI AKHA, E. et al. A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *European Journal of Human Genetics*, v. 17, n. 5, p. 687-92, maio 2009.
- PARKER-ATHILL, E.; LUO, D.; BAILEY, A. et al. Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism. *Journal of Neuroimmunology*, v. 217, n. 1-2, p. 20-7, 2009.
- PAULA, C.; RIBEIRO, S.; FOMBONNE, ERIC; MERCADANTE, M. Brief report: Prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: A pilot study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 41, n. 12, p. 1738-1742, 2011.

- PEDERSEN, A.; PETTYGROVE, S.; MEANEY, F. J. et al. Prevalence of autism spectrum disorders in Hispanic and non-Hispanic white children. *Pediatrics*, v. 129, n. 3, p. e629-35, mar 2012.
- PHELAN, K.; BETANCUR, C. Clinical utility gene card for: deletion 22q13 syndrome. *European Journal of Human Genetics*, v. 19, n. 4, p. 1-3, 2011.
- PHELAN, M. C. Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 3, p. 14, 2008.
- PIARD, J.; PHILIPPE, C.; MARVIER, M. et al. Clinical and Molecular Characterization of a Large Family With an Interstitial 15q11q13 Duplication. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 152A, p. 1933-1941, 2010.
- PICKLES, A.; SIMONOFF, E.; CONTI-RAMSDEN, G. et al. Loss of language in early development of autism and specific language impairment. *Journal Of Child Psychology And Psychiatry*, v. 50, n. 7, p. 843-52, 2009.
- PINTO, D.; PAGNAMENTA, A. T.; KLEI, L. et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, v. 466, n. 7304, p. 368-72, 2010.
- POOT, M.; SMAGT, J. J. VAN DER; BRILSTRA, E. H.; BOURGERON, T. Disentangling the myriad genomics of complex disorders, specifically focusing on autism, epilepsy, and schizophrenia. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 135, n. 3-4, p. 228-40, 2011.
- PRASAD, C.; PRASAD, A. N.; CHODIRKER, B. N. et al. Genetic evaluation of pervasive developmental disorders: the terminal 22q13 deletion syndrome may represent a recognizable phenotype. *Clinical Genetics*, v. 57, n. 2, p. 103-9, 2000.
- QIAO, Y.; TYSON, C.; HRYNCHAK, M. et al. Clinical application of 2.7M Cytogenetics array for CNV detection in subjects with idiopathic autism and/or intellectual disability. *Clinical Genetics*, 2012.
- RAPIN, I.; DUNN, M. Update on the language disorders of individuals on the autistic spectrum. *Brain and Development*, v. 25, n. 3, p. 166-172, abr 2003.
- ROBINSON, W. P.; DUTLY, F.; NICHOLLS, R. D. et al. The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *Journal of Medical Genetics*, v. 35, n. 2, p. 130-136, 1998.
- RONALD, A.; HOEKSTRA, R. A. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 3, p. 255-74, 2011.
- ROSENFELD, J. A.; BALLIF, B. C.; TORCHIA, B. S. et al. Copy number variations associated with autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders. *Genetics in Medicine*, v. 12, n. 11, p. 694-702, 2010.
- ROSENHALL, U.; NORDIN, V.; SANDSTRÖM, M.; AHLSEN, G.; GILLBERG, CHRISTOPHER. Autism and hearing loss. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 29, n. 5, p. 349-357, 1999.
- RÓZSA, B.; KATONA, G.; KASZÁS, A.; SZIPÖCS, R.; VIZI, E. S. Dendritic nicotinic receptors modulate backpropagating action potentials and long-term plasticity of interneurons. *The European Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 2, p. 364-77, 2008.
- SACCO, R.; MILITERNI, R.; FROLI, A. et al. Clinical, Morphological, and Biochemical Correlates of Head Circumference in Autism. *Biological Psychiatry*, v. 62, p. 1038-1047, 2007.

- SANCHEZ-VALLE, A.; PIERPONT, M. E.; POTOCKI, L. The severe end of the spectrum: Hypoplastic left heart in Potocki-Lupski syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 155A, n. 2, p. 363-6, 2011.
- SANDERS, S. J.; ERCAN-SENCICEK, A. G.; HUS, V. et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*, v. 70, n. 5, p. 863-85, 2011.
- SANTOS, N. P. C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human Mutation*, v. 31, n. 2, p. 184-90, 2010.
- SARASUA, S. M.; DWIVEDI, A.; BOCCUTO, L. et al. Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermid syndrome (22q13 deletion syndrome). *Journal of Medical Genetics*, v. 48, n. 11, p. 761-6, 2011.
- SCHAAF, C. P.; ZOGHBI, H. Y. Solving the autism puzzle a few pieces at a time. *Neuron*, v. 70, n. 5, p. 806-8, 2011.
- SCHENCK, A.; BARDONI, B.; LANGMANN, C. et al. CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron*, v. 38, n. 6, p. 887-98, 2003.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 233-4, 2000.
- SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; MALHOTRA, D. et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, v. 316, n. 5823, p. 445-9, 2007.
- SHEN, Y.; DIES, K. A.; HOLM, I. A. et al. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, v. 125, n. 4, p. e727-35, 2010.
- SHIH, P.; KEEHN, B.; ORAM, J. K. et al. Functional differentiation of posterior superior temporal sulcus in autism: a functional connectivity magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry*, v. 70, n. 3, p. 270-7, 2011.
- SHINAWI, M.; LIU, P.; KANG, S.-HAE L. et al. Recurrent reciprocal 16p11. 2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of Medical Genetics*, v. 47, p. 332-342, 2010.
- SHINAWI, M.; SCHAAF, C. P.; BHATT, S. S. et al. A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, v. 41, n. 12, p. 1269-71, 2009.
- SIMONOFF, E. Genetic Counseling in Autism and Pervasive Developmental Disorders. *Autism*, v. 28, n. 5, 1998.
- SIMONOFF, E.; PICKLES, A.; CHARMAN, T. et al. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 47, n. 8, p. 921-9, 2008.
- SIMS, R.; DWYER, S.; HAROLD, D. et al. No evidence that extended tracts of homozygosity are associated with Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 7, p. 764-71, 2011.
- SO, E. L. Interictal epileptiform discharges in persons without a history of seizures: what do they mean? *Journal of Clinical Neurophysiology*, v. 27, n. 4, p. 229-38, 2010.

- STAHLBERG, O.; SODERSTROM, H.; RASTAM, M.; GILLBERG, C. Bipolar disorder, schizophrenia, and other psychotic disorders in adults with childhood onset AD/HD and/or autism spectrum disorders. *Journal of Neural Transmission*, v. 111, n. 7, p. 891-902, 2004.
- STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. *Annual Review of Medicine*, v. 61, p. 437-51, 2010.
- STEFANSSON, H.; RUJESCU, D.; CICHON, S. et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, v. 455, n. 7210, p. 232-6, 2008.
- STEIN, B. L.; CRISPINO, J. D.; MOLITERNO, A. R. Janus kinase inhibitors: an update on the progress and promise of targeted therapy in the myeloproliferative neoplasms. *Current Opinion in Oncology*, v. 23, n. 6, p. 609-16, 2011.
- SUMI, S.; TANIAI, H.; MIYACHI, T.; TANEMURA, M. Sibling risk of pervasive developmental disorder estimated by means of an epidemiologic survey in Nagoya, Japan. *Journal of human genetics*, v. 51, n. 6, p. 518-22, 2006.
- SUTCLIFFE, J S. Insights into the pathogenesis of autism. *Science*, v. 321, n. 5886, p. 208-209, 2008.
- SUTCLIFFE, J. S.; NURMI, E.L. Genetics of childhood disorders: XLVII. Autism, part 6: duplication and inherited susceptibility of chromosome 15q11-q13 genes in autism. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, v. 42, n. 2, p. 253-256, 2003.
- SZABO, S. I.; ZELLES, T.; LENDVAI, B. Intracellular Ca²⁺ dynamics of hippocampal interneurons following nicotinic acetylcholine receptor activation. *Neurochemistry International*, v. 52, n. 1-2, p. 135-41, 2008.
- SZAFRANSKI, P.; SCHAAF, C. P.; PERSON, R. E. et al. Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving CHRNA7: benign or pathological? *Human Mutation*, v. 31, n. 7, p. 840-50, 2010.
- SZATMARI, P.; PATERSON, A.; ZWAIGENBAUM, L. et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, v. 39, n. 3, p. 319-329, 2007.
- TANIAI, H.; NISHIYAMA, T.; MIYACHI, T.; IMAEDA, M.; SUMI, S. Genetic Influences on the Broad Spectrum of Autism: Study of Proband-Ascertained Twins. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 147B, p. 844 -849, 2008.
- THE INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature*, v. 455, n. 7210, p. 237-41, 2008.
- TREVATHAN, E. Seizures and Epilepsy Among Children With Language Regression and Autistic Spectrum Disorders. *Journal of Child Neurology*, v. 19, p. S49-S57, 1 ago 2004.
- TUCHMAN, R. F.; RAPIN, I. Regression in Pervasive Developmental Disorders: Seizures and Epileptiform Electroencephalogram Correlates. *PEDIATRICS*, v. 99, n. 4, p. 560-566, 1997.
- TUCHMAN, R.; RAPIN, I. Review Epilepsy in autism. *The Lancet*, v. 1, p. 352-358, 2002.
- VALENTE, KDR & VALERIO, RM. Transtorno Invasivo do Desenvolvimento e Epilepsia. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, Brasil*, v.10, n. 4, p. 41-46, 2004.
- VALICENTI-MCDERMOTT, M.; MCVICAR, K.; RAPIN, I. et al. Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association

with family history of autoimmune disease. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 27, n. 2 Suppl, p. S128-36, 2006.

VALLÉS, A. S.; BARRANTES, F. J. Chaperoning $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1818, n. 3, p. 718-29, 2012.

VELTMAN, J. A.; BRUNNER, HAN G. Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes. *Nature Genetics*, v. 42, n. 3, p. 192-3, 2010.

VERVERI, A.; VARGIAMI, E.; PAPADOPOULOU, V.; TRYFONAS, D.; ZAFEIRIOU, D. I. Clinical and Laboratory Data in a Sample of Greek Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2011.

VOGT, J.; HARRISON, B. J.; SPEARMAN, H. et al. Mutation analysis of CHRNA1, CHRN1, CHRND, and RAPSN genes in multiple pterygium syndrome/fetal akinesia patients. *American Journal of Human Genetics*, v. 82, n. 1, p. 222-7, 2008.

VOGT, J.; MORGAN, N. V.; REHAL, P. et al. CHRNA1 genotype/phenotype correlations in the multiple pterygium syndromes. *Journal of Medical Genetics*, p. 21-27, 2012.

VORSTMAN, J.; STAAL, W.; DAALLEN, E. et al. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular Psychiatry*, v. 11, n. 1, p. 18-28, 2006.

VU, T. H.; COCCARO, E. F.; EICHLER, E. E.; GIRIRAJAN, S. Genomic architecture of aggression: rare copy number variants in intermittent explosive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B*, v. 156B, n. 7, p. 808-16, dez 2011.

WALL, D. P.; ESTEBAN, F. J.; DELUCA, T. F. et al. Comparative analysis of neurological disorders focuses genome-wide search for autism genes. *Genomics*, v. 93, n. 2, p. 120-9, 2009.

WANG K, CHEN Z, TADESSE MG, GLESSNER J, GRANT SFA, HAKONARSON H, BUCAN M, LI M. Modeling genetic inheritance of copy number variations. *Nucleic Acids Research*. 36:e138, 2008.

WASSINK, T. H.; PIVEN, J.; PATIL, S. R. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatric Genetics*, v. 11, n. 2, p. 57-63, 2001.

WEISS, LAUREN A; SHEN, YIPING; KORN, J. M. et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 7, p. 667-75, 2008.

WILLEMSSEN, R.; LEVENGA, J.; OOSTRA, B. A. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clinical Genetics*, v. 80, n. 3, p. 214-25, 2011.

WU, D. J.; WANG, N. J.; DRISCOLL, J. et al. Autistic disorder associated with a paternally derived unbalanced translocation leading to duplication of chromosome 15pter-q13.2: a case report. *Molecular Cytogenetics*, v. 2, n. 27, 2009.

WULFFAERT, J.; BERCKELAER-ONNES, I. VAN; SCHOLTE, E. M. Autistic disorder symptoms in Rett syndrome. *Autism*, v. 13, n. 6, p. 567-81, 2009.

YASUHARA, A. Correlation between EEG abnormalities and symptoms of autism spectrum disorder (ASD). *Brain & Development*, v. 32, n. 10, p. 791-8, 2010.

ZALLA, T.; LABRUYÈRE, N.; CLÉMENT, A.; GEORGIEFF, N. Predicting ensuing actions in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Experimental Brain Research*, v. 201, n. 4, p. 809-19, 2010.

ZHAO, X.; LEOTTA, A.; KUSTANOVICH, V. et al. A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. *PNAS*, v. 104, n. 31, p. 12831-6, 2007.