

Danielle de Paula Moreira

Múltiplas abordagens para determinar os fatores
genéticos que contribuem para o ASD

Multiple approaches to determine ASD genetic
factors

São Paulo

2017

Danielle de Paula Moreira

Múltiplas abordagens para determinar os fatores
genéticos que contribuem para o ASD

Multiple approaches to determine ASD genetic
factors

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciências, na
Área de Biologia/ Genética.

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

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Danielle de Paula
Múltiplas abordagens para
determinar os fatores genéticos que
contribuem para o ASD.
130p.

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Genética do autismo 2. Células
neurais 3. *Drosophila melanogaster* I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biotecnologia. Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Maria Rita Passos-Bueno

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que tiveram paciência para me ensinar a viver, desde os meus pais, que me mostraram como dar os primeiros passos, passando pelos meus amigos, que, muitas vezes, me ensinaram a amar as diferenças, até a professora Maria Rita, que me ensinou sobre ser cientista.

AGRADECIMENTOS

De todas as pessoas que contribuíram para a criação desta tese, é inegável que três pessoas foram/ são indispensáveis: duas delas são Gilberto (papai) e Lidian (mamãe), que desde o início da vida sempre me disseram “Uai! Vai lá! Vai dar certo!”; a outra é a professora Maria Rita que, desde que cheguei em seu laboratório há 8 anos atrás, acreditou que poderia fazer mais sempre, teve paciência para lidar com todas as frustrações que, como qualquer pós-graduando, tive e, muitas vezes – talvez sem saber, me ajudou a me manter no doutorado. Agradeço-lhes por terem me permitido.

A todos as pessoas do laboratório da professora Maria Rita (Lab200), sou grata pelo companheirismo. A alguns, especialmente os que convivi por mais tempo (Atique, Gerson, Luquinhas, Belinha, Luciano, Mayzinha, Nailinha e Van), agradeço por terem se dedicado mais a mim, agradeço por terem me permitido ser amiga de vocês. Toda a convivência, dentro da academia e fora, foi enriquecedora e me deu muito suporte para continuar. Aos amigos mais recentes, Pontinho, Claudinha e Nicolli, saibam que convivência com vocês me alegra.

A execução de todo o projeto que permitiu chegar a essa tese de doutorado dependeu de muitas pessoas que ajudaram a realizar as diferentes etapas. Muito desse projeto dependeu do apoio de Gerson, que foi fundamental para pensar e realizar muitas etapas dos estudos funcionais, além de ter me levado ao hospital as duas vezes que torci o pé e de ter lido e corrigido quase toda a tese. Vanessa e Naila, os sequenciamentos não teriam ficado prontos se não tivessem feito grande parte deles. Nicolli e Giovanna, chegar aos resultados das drosófilas que temos hoje teria sido muito mais dispendioso sem a ajuda de vocês. Agradeço-lhes por todo apoio!

Agradeço ao professor John Ewer, que abriu as portas do seu laboratório, em Valpo, para que eu pudesse aprender a usar a drosófila no estudo que nos propusemos. Também sou imensamente grata ao professor Carlos Ribeiro Vilela, que nos deu espaço em seu laboratório para manter as drosófilas e me permitiu adquirir mais conhecimento sendo monitora da disciplina de genética. Sou grata a professora Lyria Mori (obrigada por todas as oportunidades...), Francisco e Carlos Lopes, pessoas com as quais convivi no laboratório do professor Vilela, por toda a estrutura que deram para continuar os trabalhos com drosófila.

Além das amizades feitas dentro do Lab200/ USP, fiz grandes amigos pelos lares onde morei. A todas essas pessoas, Bianca, Bete, Ju, Naila (novamente), May (de novo), Ana, Thalita, agradeço por brigarem comigo, me fazerem rir (normalmente gargalhar), por se preocuparem, por fazerem com que me desconstruísse e reconstruísse. Obrigada pela paciência! Vocês foram e são essenciais na minha vida.

Infelizmente, é difícil lembra de todas as pessoas que participaram da construção dessa tese. Contudo, sou muito grata a todos que passaram pela minha vida acadêmica, especialmente, nesses últimos cinco anos. Espero ter conseguido retribuir em algum momento!

Por fim, agradeço às agências de fomento (FAPESP, CAPES e CNPq) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO e OBJETIVOS	1
<i>Definição e característica</i>	1
<i>Epidemiologia e fatores ambientais</i>	2
<i>Arquitetura genética do ASD</i>	3
<i>A importância do estudo funcional usando modelos biológicos</i>	6
<i>Modelagem <u>in vitro</u> de neurônios derivados de iPSC para estudar o ASD</i>	6
<i><u>Drosophila melanogaster</u> um modelo versátil para o estudo do ASD</i>	8
<i>Objetivos Gerais</i>	11
CAPÍTULO 1: <i>Shared and unshared rare loss-of-function variants in ASD-multiplex families</i>	13
CAPÍTULO 2: <i>Disrupting variants in DPYSL4 and OPALIN in a family with DMD/ASD-affected individuals</i>	57
CAPÍTULO 3: <i>Biallelic loss-of-function mutations in TBCK lead to mTOR dysregulation in neuronal cells</i>	71
CAPÍTULO 4: <i>Dysregulation of autism spectrum disorder candidate genes in Drosophila melanogaster leads to abnormalities in neuronal morphology</i>	93
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	111
<i>Discussão Geral</i>	111
<i>Considerações gerais e conclusões</i>	113
RESUMO	115
ABSTRACT	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

INTRODUÇÃO

DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS

O transtorno do espectro autista (ASD, do inglês, *autism spectrum disorder*), descrito pela primeira vez por Leo Kanner em 1943, é uma doença de neurodesenvolvimento. Os critérios de diagnóstico desse distúrbio têm sido readequados desde sua descrição. Atualmente, o ASD é caracterizado por déficit persistente na comunicação e interação social, incluindo déficit na reciprocidade social, de comportamentos usados na comunicação não verbal para interação social e da habilidade para desenvolver, manter e entender os relacionamentos. Além disso, o diagnóstico do ASD também requer a presença de padrões de comportamentos, interesses e atividades, restritos e repetitivos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Em cerca de 70% dos casos de ASD outras condições médicas, de desenvolvimento e/ou psiquiátricas ocorrem concomitantemente, incluindo: deficiência intelectual (ID, do inglês, *intellectual disability*) (~45%), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (28-44%), epilepsia (~30%), problemas gastro-intestinais (9-70%) e transtorno obsessivo-compulsivo (7-24%) (LAI; LOMBARDO; BARON-COHEN, 2014).

O diagnóstico do ASD é basicamente clínico. Todavia, visto que este distúrbio envolve muitos aspectos clínicos e tem grande variabilidade fenotípica, é muito importante que a conclusão do diagnóstico seja realizada por uma equipe multidisciplinar, o que contribuirá para avaliar e definir se as características compõem, por exemplo, os quadros de síndromes genéticas ou metabólicas. Isto ajuda a evitar equívocos como a falta de diagnóstico nos casos de indivíduos com características clínicas mais brandas, ou o diagnóstico incorreto/inadequado nos casos dos indivíduos com características mais graves que não falam e têm ID (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

EPIDEMIOLOGIA E FATORES AMBIENTAIS

Desde que foi realizado o primeiro estudo epidemiológico do ASD, a prevalência desta condição aumentou em aproximadamente 25 vezes (LOTTER, 1966; HANSEN; SCHENDEL; PARNER, 2015; LUNDSTRÖM et al., 2015). Embora o primeiro estudo tenha sido bastante restrito em relação ao tamanho amostral e a população estudada, isso nos ajuda a vislumbrar o quanto expandiu o conhecimento sobre este transtorno. Atualmente, a estimativa média da prevalência mundial do ASD é de cerca de 1%, havendo grande variação nos cálculos entre as diferentes populações como, por exemplo, no Brasil a frequência estimada é de quase 0,3%, enquanto nos Estados Unidos da América e Coreia do Sul estudos realizados estimam uma frequência em torno de 2%. Esta variabilidade pode estar associada a uma série de fatores, como, a falta de acesso a profissionais bem treinados para diagnosticar os indivíduos em regiões subdesenvolvidas, a vigilância excessiva aos primeiros sinais sugestivos do diagnóstico e o tamanho amostral (KIM et al., 2011; MATSON; KOZLOWSKI, 2011; PAULA et al., 2011; ELSABBAGH et al., 2012).

Além das diferentes frequências populacionais, foi observado que o ASD afeta de 4 a 5 vezes mais indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino. Este viés tem sido atribuído ao 'efeito protetor específico dos indivíduos do sexo feminino', assim, as meninas precisam apresentar mais fatores etiológicos do que os meninos para atingir as características mínimas para serem diagnosticadas (LAI et al., 2011; DWORZYNSKI et al., 2012; SZATMARI et al., 2012; JACQUEMONT et al., 2014; LAI; LOMBARDO; BARON-COHEN, 2014).

Os fatores etiológicos do ASD envolvem aspectos genéticos, epigenéticos, ambientais e, até mesmo, a combinação de todos estes aspectos. Entre os fatores ambientais estão os poluentes ambientais (i.e. pesticidas, metais pesados, materiais particulados), os suplementos dietéticos (i.e. deficiência de ácidos graxos, vitamina D, ácido fólico e deficiência de minerais), fatores familiares e sociais, como o estresse psicológico e a ordem de nascimento (SOUTH; TEACHING, 2016) e, também, o microbioma (SHARON et al., 2016). Ainda não está muito claro como estes fatores contribuem para determinar o ASD, mas, por exemplo, já foi mostrado que o dióxido de nitrogênio, um poluente ambiental, em ratos pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica, levando ao aumento das concentrações de citocinas, que podem ultrapassar a barreira placentária e causar danos no cérebro

dos fetos (HEGAZY; ALI; MAHMOUD, 2015). Neste trabalho, ainda, foi observado que os ratos expostos ao aumento de citocinas, durante a gestação, apresentavam comportamentos que seriam compatíveis com os do ASD (HEGAZY; ALI; MAHMOUD, 2015). Em relação ao microbioma, os trabalhos ainda não mostram padrões claros, mas sim algumas poucas diferenças no microbioma, como o aumento do número e da diversidade de um determinado gênero de bactéria no intestino, além de sutis melhoras do quadro de ASD, como indicado pela diminuição da pontuação no CARS (Childhood Autism Rating Scale – escala que mede aspectos clínicos do ASD) e no SRS (Social Responsiveness Scale – escala que mede comportamentos sociais, hiperatividade, estereotípias e outros), nos casos de terapia de transferência do microbioma de indivíduos saudáveis para aqueles com ASD (FRYE et al., 2015; SHARON et al., 2016; KANG et al., 2017).

Outro fator ambiental que tem sido intensamente discutido é a idade parental, especialmente paterna, que pode conferir um risco, pelo menos, 2 vezes maior para pais com 40 anos ou mais do que pais com menos de 30 anos de idade de terem uma criança com ASD. Este fator pode estar relacionado com as modificações epigenéticas relacionadas com o envelhecimento das células germinativas paternas e com a possibilidade da linhagem de células germinativas de pais mais velhos acumularem mutações novas. (DURKIN et al., 2008; HULTMAN et al., 2010; O'ROAK et al., 2012; PULEO et al., 2012).

ARQUITETURA GENÉTICA DO ASD

A arquitetura genética do ASD é bastante complexa e, embora atualmente haja mais clareza sobre a contribuição de alguns fatores genéticos para esse transtorno, ainda é incerto quais e quantos fatores genéticos contribuem para o ASD.

A herdabilidade do ASD é considerada como moderada a alta. Os trabalhos realizados com irmãos gêmeos mostram que há maior concordância para o ASD entre os gêmeos monozigóticos (96-36%) do que entre os dizigóticos (30-0%). As estimativas de herdabilidade a partir destes dados são elevadas, variando entre 80-90% (MECCA et al., 2011; RONALD; HOEKSTRA, 2011). Contudo, outros trabalhos apresentam valores de herdabilidade menores, entre 38%-78%. Essa grande variabilidade na estimativa da herdabilidade pode estar relacionado aos critérios

clínicos utilizados, métodos de averiguação e tamanho amostral (LIU; ZERUBAVEL; BEARMAN, 2010; HALLMAYER; CLEVELAND; TORRES, 2011; TICK et al., 2016).

De forma geral, o ASD pode ser definido em sindrômico, quando associado a uma condição metabólica e/ou genética, e não sindrômico. O ASD sindrômico, que manifesta o autismo como uma característica secundária, corresponde a cerca de 10% dos casos. Entre as síndromes genéticas conhecidas por terem forte associação com o ASD estão a síndrome do X-frágil (~60% dos indivíduos têm ASD), a síndrome de Phelan-McDermid (>50%), a síndrome Smith-Magenis (~90%) e a síndrome de Williams (~50%) (BETANCUR, 2011). Em grande parte das síndromes a ocorrência do ASD é menos recorrente, como nos casos de Distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD) onde o ASD ocorre em cerca de 4-20% dos casos (HENDRIKSEN; VLES, 2008; ANAND et al., 2015; RICOTTI et al., 2016). Uma questão que surge a partir dos casos sindrômicos monogênicos, como em DMD/BMD, é se o ASD nestes casos é decorrente da mutação principal ou se dependem de outros fatores genéticos.

Nos casos não sindrômicos, onde o ASD é o diagnóstico primário, cerca de 10-30% dos casos estão relacionados a uma alteração genética principal, que podem ser variantes de nucleotídeo único (SNV, do inglês, single nucleotide variants), inserções e deleções pequenas (indels), variantes de número de cópia (CNV, do inglês, copy number variantion) e alterações cromossômicas microscopicamente visíveis (BOURGERON, 2015; SCHAEFER, 2016). A classificação clínica entre sindrômico e não sindrômico não é simples, particularmente com o número crescente de casos onde se descrevem formas sindrômicas e não sindrômicas na mesma família.

As CNVs, junto com as anormalidades cromossômicas microscopicamente visíveis, são identificadas em 10-15% dos indivíduos afetados e já foram observadas em todos os cromossomos. A maior parte destas alterações são raras ou 'privadas', ou seja, a alteração está presente apenas em uma família. Em mais do que 50% desses casos as CNVs são herdadas de pais saudáveis ou com características subclínicas do ASD ou com outras doenças neurológicas e/ ou psiquiátricas, (NORD et al., 2011; LUO et al., 2012; QIAO et al., 2013). As CNVs recorrentes são poucas e, em geral, cada uma tem uma frequência próxima a 1%. Estão entre as regiões cromossômicas com maior taxa de CNVs nos casos de ASD a 15q11-q13, onde ocorrem os diversos rearranjos estruturais, a 2p16, a 16p11.2, a 17p11.2 e a 17q12

(DEPIENNE et al., 2009; GRISWOLD et al., 2012; WIŚNIOWIECKA-KOWALNIK et al., 2013; MOREIRA et al., 2014, 2016).

Mais recentemente, o sequenciamento completo do exoma ou do genoma tem contribuído significativamente para identificar SNVs e indels potencialmente patogênicos ao ASD em um grande número de genes (mais de 800), como podemos ver listados no banco de dados do *Simons Foundation Autism Research Initiative* (SFARI; <https://sfari.org/resources/sfari-gene>). A maioria dessas mutações são raras e/ou 'privadas'. Em mais de um estudo foram identificadas mutações recorrentes em genes nunca antes correlacionados com o ASD, como por exemplo o *DYRK1A*, o *CHD8*, o *ANK2* e o *TBR1* (O'ROAK et al., 2011; CHAHROUR et al., 2012; IOSSIFOV et al., 2012; NEALE et al., 2012; SANDERS et al., 2012; YUEN et al., 2015). Entre os genes patogênicos também há alguns que já haviam sido associados ao ASD pelos estudos das CNVs, como o *NRXN1*, *SHANK2*, *NLGN1* e o *RELN*. Além disso, muitos dos novos candidatos para o ASD estão localizados dentro de regiões cromossômicas envolvidas por CNVs previamente descritas nos casos de ASD. Isto mostra que, embora haja regiões onde recorrentemente ocorrem alterações genéticas, é ampla a heterogeneidade genética do ASD.

Em muitos indivíduos com ASD são identificadas múltiplas alterações genéticas candidatas. Nestes casos, os modelos genéticos que melhor explicam o fenótipo são aqueles que consideram interações gene(s)-gene, modelos *two (multi)-hits* e oligogênico, ou gene(s)-ambiente, modelo multifatorial (GIRIRAJAN et al., 2010; POOT et al., 2011; LEBLOND et al., 2012).

A maior parte dos dados genômicos (CNVs, SNVs e indels) acima citados foram obtidos a partir dos estudos de casos de ASD esporádicos, isto é, casos únicos de ASD na família. Até o momento, há poucos trabalhos que estudam os padrões genéticos em famílias com múltiplos indivíduos com ASD. Nos casos familiares de ASD é estimado que exista uma contribuição maior dos fatores genéticos do que em casos esporádicos (KLEI et al., 2012; GAUGLER et al., 2014), nos quais, as variantes herdadas, que levam a perda de função do gene, têm um papel principal na etiologia do ASD (TOMA et al., 2013). Diante disso, estudar as variantes genéticas dos casos familiares pode ser uma estratégia interessante para identificação de genes com maior impacto no fenótipo do ASD.

A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO FUNCIONAL USANDO MODELOS BIOLÓGICOS

Apesar das análises *in silico* das variantes genéticas identificadas nos casos de ASD estarem predizendo que estas variantes nos genes candidatos para o ASD são danosas e, portanto, tem grande probabilidade de contribuírem para o fenótipo, há ainda pouca informação sobre como esses genes atuam nas vias biológicas e em processos celulares.

Como descrito acima, o número de alterações genéticas relacionadas com o ASD é enorme, porém ainda é questionável se todos os genes candidatos para o ASD realmente contribuem para o fenótipo. Além disso, dentre os genes que são sabidamente patogênicos, há pouco conhecimento sobre o mecanismo molecular e celular que leva aos fenótipos do ASD. Desta forma, é de grande valia adotar diferentes modelos biológicos como ferramenta para detalhar estes diversos mecanismos moleculares e celulares nos quais os genes candidatos para o ASD atuam.

Muitos modelos biológicos têm sido usados para estudar as alterações genéticas relacionadas com o ASD. No presente trabalho, optamos por usar as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, do inglês, *induced pluripotent stem cell*) e a mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*).

Modelagem in vitro de neurônios derivados de iPSC para estudar o ASD

As iPSCs têm características semelhantes às das células tronco embrionárias, incluindo, por exemplo, a morfologia, a capacidade proliferativa, o padrão de expressão gênica, os marcadores de membrana e a capacidade para se diferenciar em células dos três folhetos embrionários. Estas células são geradas a partir da reprogramação de células somáticas por fatores de reprogramação, que primordialmente são os fatores de transcrição *OCT4*, *SOX2*, *cMYC* e *KLF4*, porém outros fatores de reprogramação, atualmente, também são utilizados (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; LIN; LACHMAN; ZHENG, 2016).

Uma vez que as iPSCs geradas são indivíduo-específico, esta ferramenta permite que as células diferenciadas recapitem os aspectos genéticos e epigenéticos das células doadoras. A utilização desse modelo celular, que é passível de ser diferenciado em células de diferentes tecidos, se tornou de grande valia para

compreender a patofisiologia das mais diversas doenças, em particular, das doenças neurológicas, pois neurônios e outras células do sistema nervoso são de difícil acesso para estudos funcionais (PRILUTSKY et al., 2014).

Dentre os casos sindrômicos de ASD, importantes achados têm sido obtidos com neurônios derivados de iPSCs com mutações em *MECP2*, *SHANK3* e *FMR1*, responsáveis, respectivamente, pela síndrome de Rett, síndrome de Phelan-McDermid e síndrome do X-Frágil. Nas células neuronais com mutações em *MECP2* e *SHANK3* foram observadas deficiências dos processos sinápticos (por exemplo, transmissão sináptica), diminuição do número de espinhos dendríticos e alteração na sinalização por cálcio (MARCHETTO et al., 2010; SHCHEGLOVITOV et al., 2013). Além das alterações em neurônios, também foi observado que o *MECP2* é expresso em astrócitos, que influenciam nas anormalidades morfológicas (neuritos curtos, neurônios pequenos e outros) que ocorrem nos neurônios (WILLIAMS et al., 2014). Os pesquisadores também demonstraram que as alterações de sinalização e morfológicas observados nos neurônios derivados das iPSCs de pacientes com mutação em *MECP2* ou *SHANK3* foram resgatadas com tratamento com *IGF1* (*insulin growth factor 1*) (MARCHETTO et al., 2010; SHCHEGLOVITOV et al., 2013). Nas células com expansão trinucleotídica (CGG) na região 5'UTR do gene *FMR1*, ainda é um grande desafio determinar as alterações fenotípicas nos neurônios derivados de iPSC, devido ao mosaicismosomático, que faz com que não haja inativação completa do *FMR1* em todas as células e tenham nível de expressão do *FMR1* variável em diferentes clones celulares dos mesmos indivíduos (SHERIDAN et al., 2011; BRYKCZYNSKA et al., 2016; XIE et al., 2016). Estes pesquisadores verificaram que nos neurônios com 50 – 200 repetições CGG, onde há a expressão da FMRP com expansão incompleta, ocorre aumento do número de agregados de inclusão de ubiquitina, os quais são responsáveis pelo fenótipo neurodegenerativo causado pela alteração da expressão do *FMR1* com expansão.

Alguns pesquisadores também têm estudado neurônios derivados de iPSCs de casos de ASD não sindrômico. Wang e colaboradores (2015) demonstraram que haploinsuficiência de *CHD8*, um dos genes recorrentemente mutados no ASD, leva a diminuição da expressão dos *POU3F2* e *AUTS2*, também associados ao ASD, e a super expressão do gene *TCF4*, o qual está em uma via associada com esquizofrenia, mostrando, então, que há uma convergência das vias dos distúrbios de neurodesenvolvimento. Em outro estudo de ASD não sindrômico, realizado por

nosso grupo, foi demonstrado que os neurônios derivados de iPSCs com expressão reduzida do *TRPC6* apresentam defeitos semelhantes aos observados nas células de casos síndromicos citados acima, tais como, diminuição do influxo de cálcio, diminuição do número dos espinhos dendríticos e das sinapses glutamatérgicas (GRIESI-OLIVEIRA et al., 2015).

Este conjunto de dados, obtidos a partir do estudo das iPSCs, demonstra que adotar este modelo celular tem grande potencial para se avançar no conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares pelos quais mutações em diversos genes causam as deficiências neurocomportamentais.

***Drosophila melanogaster* um modelo versátil para o estudo do ASD**

A *D. melanogaster* é amplamente usada nos estudos genéticos e também tem sido usada como ferramenta para o estudo de doenças neurológicas. A adoção deste organismo na investigação dessas doenças é justificada pelo baixo custo para criação e manutenção dessa espécie, rápido tempo das gerações, o genoma já foi sequenciado, vasto arsenal genético e de transgênicos e a conservação no desenvolvimento e função do sistema nervoso (OKRAY; HASSAN, 2013). Mais de 70% dos genes humanos já associados com doenças genéticas tem um respectivo ortólogo nessa mosca, o que reforça a escolha desse organismo como modelo para trazer entendimento dos mecanismos envolvidos no ASD (GATTO; BROADIE, 2011; DOLL; BROADIE, 2014; LEE et al., 2014; NIKITINA; MEDVEDEVA; ZAKHAROV, 2014; YAMAMOTO et al., 2014).

Como uma ferramenta extremamente versátil, diversos métodos têm sido desenvolvidos com *D. melanogaster* e um deles é o sistema GAL4/UAS. O GAL4/UAS é um sistema bipartido, ou seja, composto por duas partes que são mantidas inativas em duas moscas separadas, que se baseia na via da galactosidade de leveduras (BRAND; PERRIMON, 1993; TRAVEN; JELICIC; SOPTA, 2006) e permite a regulação de genes em tecidos específicos. Uma das linhagens, conhecida como *driver*, contém um constructo com a sequência do gene GAL4, que é um ativador da transcrição que se liga a uma sequência específica, a *Upstream Activation Sequence* (UAS), e a montante é inserido o promotor de um gene "X" que tenha expressão forte tecido-específica, possibilitando, assim, a ativação desse constructo apenas no tecido em que esse promotor é ativado. Na

outra linhagem, a *responder*, a jusante a sequência UAS, insere-se um constructo com a sequência que será expressa. Ao cruzar essas duas linhagens de *D. melanogaster* toda a prole, F1, terá o gal4 e a UAS, assim sendo, a gal4 poderá se ligar a UAS, ativando, então, a expressão da sequência de interesse, que no caso do presente trabalho foram moléculas de double-strand RNA (Figura 1). Adicionalmente, na linhagem *driver*, há a proteína fluorescente verde (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) que permite a visualização, por microscopia de fluorescência, das células que expressem essa proteína.

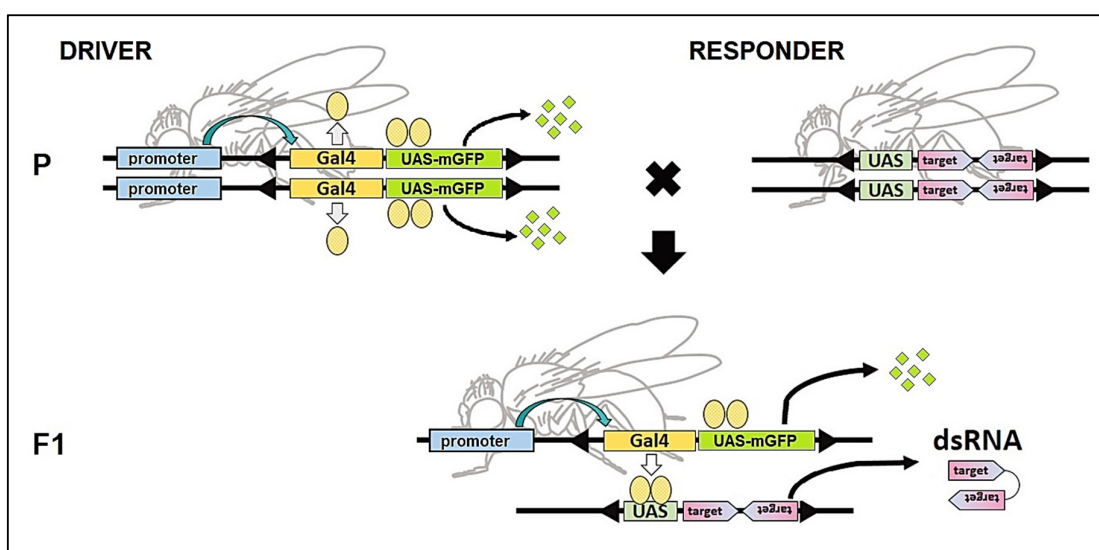


Figura 1: Representação do sistema Gal4/UAS. Nessa imagem estão representadas as linhagens parentais (P), driver e responder. A linhagem driver, com inserto contendo o promotor (promoter)/ enhancer, a sequência para a gal4, juntamente com a sequência do GFP, que tem a expressão controlada pelo ligação da gal4 a UAS. A linhagem responder, contém inserto com a UAS e o alvo (*target*) inativo. A linhagem F1, conterá ambos os insertos da driver e da responder e o sistema estará completo, havendo assim a expressão da sequência de interesse (sequência para o dsRNA) Imagem modificada de YAMAMOTO-HINO; GOTO (2013).

Utilizando esse sistema, um crescente número de pesquisas sobre as funções dos diferentes genes associados aos ASD tem sido realizado em *D. melanogaster*. Os trabalhos são diversos e incluem análises comportamentais, análises neuronais e da morfologia de diferentes estruturas. Em modelos para o *FMR1* humano foi mostrado que a desregulação do ortólogo de *D. melanogaster*, o *dfmr1*, pode levar a defeitos da extensão/projeção de neuritos (MORALES et al., 2002), alterações do ciclo celular e apoptose (WAN et al., 2000), anormalidades no ciclo circadiano

(DOCKENDORFF et al., 2002; MORALES et al., 2002) e deficiência na interação social, tais como falta de interesse em manter o comportamento de corte e falhas para realizar gestos motores que levam a interação social (DOCKENDORFF et al., 2002; BOLDUC et al., 2010). Também, usando *D. melanogaster* para estudar os genes das famílias das neurexinas (NRXNs) e neuroliginas (NLGNs), os quais estão relacionados com o ASD, foi mostrado que estes atuam de forma semelhante na reorganização das zonas ativas sinápticas, no crescimento do número dos botões pré e pós-sinápticos e densidade sináptica (ZWEIER et al., 2009; CHEN et al., 2012). Já para genes que são envolvidos por CNVs associadas com o ASD, GRICE e colaboradores (2015) mostraram que os ortólogos em *D. melanogaster* podem ter uma interação sinérgica, como visto com os transheterozigotos *dlg/pak*, *NrxIV/dlg* e *NrxIV/pak*, evidenciando que alguns genes relacionados com ASD podem participar de uma rede de interação.

Estes dados evidenciam versatilidade do modelo, o qual permite um amplo estudo de diversos aspectos relacionados com o ASD. Embora a transposição dos dados obtidos para os genes entre *D. melanogaster* e humanos possa não ser direta, este modelo mostra-se muito eficiente para conhecer os mecanismos moleculares e a forma como os genes atuam para determinar os fenótipos.

OBJETIVOS GERAIS

A) Identificar variantes novas nas regiões codificantes do genoma de casos de ASD;

B) Entender a patofisiologia da perda de função do *TBCK* em neurônios derivados de iPSC;

C) Padronizar o uso de *Drosophila melanogaster* para estudos funcionais de genes candidatos para ASD.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A.1) Identificar e analisar variantes de perda de função compartilhadas e não compartilhadas entre os indivíduos com ASD da mesma família;

A.2) Estabelecer critérios de priorização de genes candidatos para o ASD;

A.3) Identificar a variante patogênica no gene da distrofina nos casos de DMD com ASD;

A.4) Investigar se nos casos de DMD com ASD da mesma família há outras variantes em outros genes que não o da distrofina que possam contribuir para a manifestação do quadro de ASD;

B.1) Verificar se mutações de perda de função bialélicas no *TBCK* estão associadas a alterações do nível de expressão gênica deste gene e da via mTOR em células progenitoras neurais obtidas a partir de iPSC;

B.2) Verificar se variantes de perda de função bialélicas no *TBCK* causam alterações moleculares e celulares nas células neuronais induzidas a partir de células somáticas dos pacientes em relação a de controles.

C.1) Avaliar a morfologia do grupo de neurônios dorsais e dos grupos de neurônios PDF da medula de *Drosophila melanogaster* com diminuição da expressão dos genes ortólogos aos humanos candidatos para o ASD.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, os objetivos principais foram identificar os fatores genéticos causativos do ASD e investigar como estes podem contribuir para as características deste distúrbio. Para atingir os objetivos, nós analisamos as variantes raras de perda de função nas regiões codificadoras de genes expressos no sistema nervoso central (SNC) compartilhadas e não compartilhadas entre indivíduos com ASD aparentados. Outra abordagem escolhida foi a análise das células neuronais derivadas de iPSC de um indivíduo com mutação bialélica no *TBCK*, onde avaliamos se a expressão reduzida deste gene causa alterações de processos celulares e moleculares; e, por fim, investigamos as alterações morfológicas das estruturas neuronais de linhagens de *D. melanogaster* com diminuição da expressão do *trpy*, *mahjong*, *crmp* e *dys*.

A análise das variantes de perda de função raras em genes expressos no sistema nervoso central, realizada em 13 famílias sem suspeita clínica revelou 55 variantes em 54 genes, onde 12 destas variantes foram compartilhadas entre os afetados da mesma família e 44 não foram compartilhadas. Dentre os 54 genes mutados, 16 genes foram considerados de maior risco para o ASD, destes, o *AP1S2*, o *DYRK1A* e o *TBCK* se destacaram por determinarem padrões monogênicos de herança. Além disso, 13 dos 16 genes estão sendo sugeridos pela primeira vez como fortes candidatos para o ASD. Esta heterogeneidade dos padrões genéticos tem sido mostrada nos variados trabalhos do ASD (CASEY *et al.*, 2012; CHAHROUR *et al.*, 2012; CHAPMAN *et al.*, 2015; CHO *et al.*, 2009; CUKIER *et al.*, 2014; GLESSNER *et al.*, 2009; IOSSIFOV *et al.*, 2012; MICHAELSON *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2016; NEALE *et al.*, 2012; O'ROAK *et al.*, 2011, 2012; POULTNEY *et al.*, 2013; SANDERS *et al.*, 2012; TOMA *et al.*, 2013; WOODBURY-SMITH *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2013; YUEN *et al.*, 2015). Somado aos três genes acima citados, outros, como o *TTC12*, associado a transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, e o *APC2*, relacionado a síndrome de Sotos, têm sido identificados em outras doenças de neurodesenvolvimento (ALMURIEKHI *et al.*, 2015; MOTA *et al.*, 2015). Os dados da literatura corroboram os nossos achados, uma vez que mostram a

sobreposição de causas genéticas das condições neurológicas e evidenciam a heterogeneidade genética do ASD.

Ainda, observamos que dentre as variantes de risco herdadas e não compartilhadas, elas foram preferencialmente transmitidas pelas mães de indivíduos com ASD. Adicionalmente, por análise de enriquecimento de termos do Gene Ontology, mostramos que para os genes mutados nos casos familiares houve uma super-representação de termos relacionados com transporte celular de moléculas e desenvolvimento do sistema nervoso. O enriquecimento destes processos biológicos nos casos de ASD é frequentemente descrito (GAI *et al.*, 2011; KONOPKA *et al.*, 2012; NISHIMURA *et al.*, 2007; PARIKSHAK *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2014; VOINEAGU *et al.*, 2011), indicando, dessa maneira, que devem ser fundamentais para o ASD. Portanto a presente pesquisa, contribuiu para identificação de novos genes candidatos e confirma que, nos casos familiares, todos os indivíduos devem ser analisados de forma conjunta e também de forma independente.

A importância de estudos de casos familiares de ASD foi novamente ilustrada ao investigarmos a causa molecular do ASD em uma família composta por três irmãos gêmeos não idênticos com ASD, dos quais dois foram também diagnosticados com DMD. Nos dois indivíduos com ASD/DMD identificamos uma pequena deleção no gene da distrofina. Apesar da distrofina ter isoformas que se expressam no SNC, o ASD não é típico de todos casos de DMD. Visando esclarecer se outras variantes poderiam ser responsáveis por este fenótipo neuropsiquiátrico, buscamos por variantes raras de perda de função em genes expressos no SNC e detectamos duas variantes: uma no *DPYSL4* e *OPALIN*, os quais nunca foram anteriormente associados ao ASD. O *DPYSL4* atua na regulação do citoesqueleto, enquanto o *OPALIN* age na mielinização nos oligodendrócitos (QUACH, TAM T *et al.*, 2013; QUACH, T T *et al.*, 2011; SATO *et al.*, 2014; YOSHIKAWA *et al.*, 2008, 2016). Embora a investigação da contribuição de outros genes para o ASD nos casos de DMD seja um grande desafio, com esta família pudemos investigar a intrincada estrutura genética destes fenótipos e verificar que outros genes podem estar interferindo nas características cognitivas dos indivíduos com DMD.

O nosso estudo genômico de duas irmãs revelou mutações bialélicas no *TBCK*, que são certamente patogênicas considerando o tipo da mutação bem como os dados da literatura (ALAZAMI *et al.*, 2015; BHOJ *et al.*, 2016; CHONG *et al.*, 2016). Neste trabalho, utilizando células neuronais derivadas de iPSC, confirmamos

que o *TBCK* atua na via *mTOR*, e que apresenta importante papel na regulação do ciclo celular, na proliferação e crescimento celular e na autofagia de células neuronais.

Uma perspectiva futura é estabelecer tratamento dos indivíduos com ASD. Para isso, é importante entender como as moléculas atuam no resgate dos fenótipos moleculares e celulares. Assim, investigamos a capacidade da L-leucina no resgate dos fenótipos alterados das NPCs com deficiência do *TBCK* e, assim, verificamos o aumento do crescimento celular e da sinalização da via *mTOR*. A via *mTOR* é uma das centrais na regulação de diversos processos celulares e tem sido muito relacionada com distúrbios de neurodesenvolvimento (CECCONI *et al.*, 2007; LIPTON; SAHIN, 2014; SATO *et al.*, 2014; YOSHIKAWA *et al.*, 2008, 2016). Entretanto, a atuação do *TBCK* nessa via e em qualquer outra é ainda pouco compreendida. Apesar de termos contribuído para compreender a função deste gene em células neuronais, ainda faltam estudos para mostrar os outros mecanismos pelo qual o *TBCK* pode levar a alterações neurológicas.

Por fim, exploramos o uso de *D. melanogaster* como modelo para investigarmos a contribuição de alguns dos genes identificados como candidatos para o ASD a partir de nossos estudos, em particular os genes *DMD* e *DPYSL4* identificados na família com estes dois fenótipos e os genes *TRPC6* e *VPRBP*, detectados em um paciente com ASD em um estudo anterior (GRIESI-OLIVEIRA *et al.*, 2014). Os resultados mostraram-se promissores, pois observamos um número maior de alterações nas estruturas neuronais das linhagens de *D. melanogaster* com diminuição da expressão dos ortólogos de *DPYSL4*, *DMD*, *TRPC6* e *VPRBP* em relação aos controles. Diante disso, a nossa perspectiva futura é investigar se a diminuição da expressão dos *DPYSL4:DMD* e *TRPC6:VPRBP* conjuntamente poderiam ter um efeito sinérgico ou aditivo para, então, conseguirmos elucidar melhor a causa do ASD nestes indivíduos. Já os estudos comportamentais estão sendo realizados em colaboração com John Ewer, e, assim que possível, os dados serão cruzados obtermos as conclusões sobre as alterações nos genes citados.

CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÕES

A partir de abordagens complementares, análise genômica e estudo funcional utilizando diferentes modelos, o presente trabalho nos possibilitou chegar às seguintes conclusões:

Estudo genômico:

1. Em cerca de 23% dos casos familiares, o ASD foi devido a variantes genéticas em um gene principal e as variantes de risco podem ou não ser compartilhadas entre os afetados;
2. Cada família de ASD tende a ter variantes genéticas de risco únicas;
3. Entre as variantes não compartilhadas entre os indivíduos com ASD da mesma família, há um excesso de variantes de origem materna;
4. Dezesesseis dos 54 genes candidatos para o ASD compreendem os candidatos com maior probabilidade de serem causativos dos fenótipos neuropsiquiátricos;
5. Há uma redundância dos processos biológicos alterados nos casos de ASD;
6. Pelas análises *in silico* realizadas é possível prever que as variantes que rompem *DPYSL4* e *OPALIN* podem contribuir para o fenótipo de ASD.

Estudos funcionais:

1. A redução dos níveis de *TBCK* nas células neuronais causa alterações no ciclo, proliferação e crescimento celular e também leva ao aumento da autofagia;
2. O tratamento com L-leucina das células neuronais com reduzida expressão do *TBCK* tem melhoras dos fenótipos avaliados;
3. A diminuição da expressão de *mahjong*, *trpgamma*, *crmp* and *dys*, ortólogos dos genes humanos *VPRBP*, *TRPC6*, *DPYSL4* e *DMD*, respectivamente, levam a alterações na morfologia dos neurônios de *D. melanogaster*.

RESUMO

O transtorno do espectro autista (ASD, do inglês, autism spectrum disorder) é uma condição neuropsiquiátrica de início precoce, caracterizado por déficit do uso da comunicação para socialização e presença de padrões de comportamentos restritos e repetitivos. A herdabilidade do ASD tem sido estimada em 50-90%. O ASD pode se apresentar como uma condição sindrômica, considerando, nesses casos, síndromes genéticas, como a distrofia muscular de Duchenne (DMD), e como uma condição não sindrômica. Além disso, o ASD apresenta uma grande heterogeneidade genética e centenas de genes têm sido relatados como candidatos. As variantes com alta patogenicidade para o ASD são mais comumente raras, *de novo* e levam ao truncamento da proteína. A função da maioria dos genes candidatos para o ASD ainda é desconhecida e pode explorá-la pode trazer grande conhecimento sobre essa condição. O estudo genômico de casos familiares de ASD pode facilitar a identificação de fatores genéticos possivelmente patogênicos para o ASD, uma vez que esses casos podem estar enriquecidos de fatores genéticos e têm sido pouco explorados. Então, uma estratégia para identificar e validar genes candidatos para o ASD é investigar variantes que levam ao truncamento das proteínas nos casos familiares de ASD. Além disso, entender as alterações dos processos moleculares e celulares desregulados pelos genes candidatos para o ASD pode nos ajudar a compreender melhor a relevância desses genes na manutenção da homeostasia do sistema nervoso central e, também, como esses genes podem causar o fenótipo do ASD. Dessa forma, primeiramente, nós investigamos variantes exômicas raras de perda de função (rLoF, do inglês, rare loss-of-function) ($MAF < 0,01$) potencialmente patogênicas compartilhadas e não compartilhadas por indivíduos aparentados afetados pelo ASD em 13 famílias não relacionadas. Ademais, analisamos se outras variantes rLoF poderiam contribuir para o ASD em dois irmãos que também são afetados por DMD. A partir disso, identificamos 56 variantes rLoF em 54 genes, as quais foram compartilhadas (12 variantes em 11 genes) e não compartilhadas (44 variantes em 43 genes) entre os indivíduos afetados das famílias. Desse total de 54 genes, foi possível destacar 16 genes como principais causas do ASD, nos quais as mutações observadas foram tanto herdadas quanto *de novo*. Nos indivíduos com ASD/DMD, detectamos uma deleção no gene da distrofina, a qual explica o fenótipo de DMD, e outras duas variantes possivelmente patogênicas no *DPYSL4* e no *OPALIN* que podem contribuir para o ASD. Em uma das famílias estudadas, identificamos

mutações bialélicas de perda de função no *TBCK*, assim estudamos as células neuronais derivadas de iPSC de um indivíduo com rompimento do *TBCK*. A compreensão da função desse gene pode auxiliar no entendimento das vias de sinalização e assim na busca de tratamentos para os fenótipos neurológicos. No presente estudos, mostramos que a depleção do *TBCK* nas células neuronais causa alterações no ciclo e proliferação celular, além de desregulação da via *mTOR*. O tratamento com a L-leucina, um aminoácido que sinaliza na via *mTOR*, das células neuronais com diminuição de *TBCK* resgatou a sinalização da via *mTOR*, bem como, aumentou a proliferação celular. Assim, os nossos resultados sugerem que a L-leucina pode resgatar os fenótipos causados pela redução da expressão do *TBCK*, os quais abrem novas perspectivas de tratamento de crianças com mutações nesse gene. Somado a isso, nós exploramos o uso da *Drosophila melanogaster* para realizar estudos funcionais para outros genes candidatos para o ASD. Nós analisamos a morfologia neuronal nas larvas dessa mosca com expressão reduzida do *trpy*, *mahjong*, *dys* e *crmp*, os quais são, respectivamente, os ortólogos dos genes humanos candidatos para o ASD: *TRPC6*, *VPRBP*, *DMD* e *DPYSL4 (CRMP3)*. Nas linhagens com diminuição da expressão do *trpy*, *mahjong*, *dys* e *crmp*, nós observamos várias alterações morfológicas nas estruturas neuronais das larvas, tais como, defasciculação axonal e anormalidade no formato do ângulo nos neuritos ipsilaterais-contralaterais, em uma frequência maior do que nos controles. Assim sendo, este trabalho evidenciou a heterogeneidade genética do ASD em famílias brasileiras, permitiu a validação e identificação de genes candidatos adicionais para o ASD, contribuiu para a melhor compreensão do papel de alguns genes, em particular, o *TBCK*, e para o estabelecimento do uso da *D. melanogaster* para estudar os genes candidatos para o ASD no nosso laboratório.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neuropsychiatric condition of early onset, characterized by deficit in social communication and repetitive and restrict behavior. Its heritability has been estimated between 50-90%. The ASD cases can be related to both syndromic conditions, considering, in these cases, genetic syndromes like Duchenne muscular dystrophy (DMD), and non-syndromic conditions. Moreover, this disorder presents high genetic heterogeneity, and several hundreds of genes have reported as candidates. Variants associated with high pathogenicity in ASD are most usually rare, *de novo* and lead to protein truncation. The role of most of the ASD candidate genes is still under unclear and explore it could bring important knowledge about this condition. The genomic study of familial cases of ASD could aid the identification of likely pathogenic genetic factors, as it might be enriched by genetic factors and have not been largely explored. Therefore, a potential approach to validate and identify additional ASD candidate variants would be to investigate if truncating variants would explain the ASD phenotype in familial cases. Besides, understanding the molecular and cellular process altered by ASD candidate genes could clarify the relevance of these genes on keeping central nervous system homeostasis as well as how the deficiency of these genes would cause the ASD phenotype. Thus, firstly, we investigated rare loss-of function (rLoF) variants ($MAF < 0.01$) shared and unshared among ASD related individuals from 13 unrelated families with the aim of identifying those that contribute to the phenotype. Also, we tested if additional rLoF variants would contribute to the ASD phenotype in DMD brothers. We identified 56 rLoF variants in 54 genes, which were shared (12 variants in 11 genes) and unshared (44 variants in 43 genes) among affected individuals within a family. We pinpointed 16 genes out of 54 as major cause of ASD, which included both inherited and *de novo* mutations. In ASD/DMD individuals, we detected a deletion in dystrophin gene, which explains the DMD phenotype, and other two likely pathogenic variants in *DPYSL4* and *OPALIN* that can contribute to ASD. In one of the families, we identified biallelic loss-of-function mutations in *TBCK*. Thus, we studied the phenotypes of iPSC-derived neuronal cells of an individual with disruption of the *TBCK*. The comprehension of the gene function can lead us to look for treatments for the neurological phenotypes. In the present study, we show that the depletion of *TBCK* in neuronal cells cause cell cycle and proliferation abnormalities and *mTOR* dysregulation. The treatment of *TBCK*-depleted neuronal cells with L-leucine improved mTOR signaling, as well as increased cell proliferation. Thus, our results suggest that L-leucine could rescue the neuronal phenotypes caused by reduced expression of *TBCK*, which can open new perspectives on the treatment of children with mutations in this

gene. Additionally, we explored the use of *Drosophila melanogaster* to conduct functional studies of ASD candidate genes. We analyzed neuronal morphology in flies' larvae with reduced expression of *trpy*, *mahjong*, *dys* and *crmp*, which are, respectively, the orthologs of the ASD candidate human genes TRPC6, VPRBP, DMD and DPYSL4 (CRMP3). In lines with reduced expression of *trpy*, *mahjong*, *dys* and *crmp*, we observed several morphological alterations in the neuronal structure, like axonal defasciculation and aberrant form of ipsilateral-contralateral neurite angles, more frequently than in controls. Hence, this work pointed the genetic heterogeneity of ASD in Brazilian families, allowed the validation and identification of additional gene targets for ASD, contributed to a better understanding of the role of some ASD genes, most particularly of *TBCK*, and, we could set up the use of *D. melanogaster* to explore ASD candidate genes in our laboratory.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAZAMI, A. M.; PATEL, N.; SHAMSELDIN, H. E.; ANAZI, S.; AL-DOSARI, M. S.; ALZAHIRANI, F.; HIJAZI, H.; ALSHAMMARI, M.; ALDAHMEH, M. A.; SALIH, M. A.; FAQEIH, E.; ALHASHEM, A.; BASHIRI, F. A.; AL-OWAIN, M.; KENTAB, A. Y.; SOGATY, S.; et al. Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Reports*, v. 10, n. 2, p. 148–161, 2015.
- ALMURIEKHI, M.; SHINTANI, T.; FAHIMINIYA, S.; FUJIKAWA, A.; KUBOYAMA, K.; TAKEUCHI, Y.; NAWAZ, Z.; NADAF, J.; KAMEL, H.; KITAM, A.; SAMIHA, Z.; MAHMOUD, L.; BEN-OMRAN, T.; MAJEWSKI, J.; NODA, M. Loss-of-function mutation in APC2 causes sotos syndrome features. *Cell Reports*, v. 10, n. 9, p. 1585–1598, 2015.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Cautionary Statement for Forensic Use of DSM-5. In: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition*. [s.l.] American Psychiatric Publishing, Inc, 2013. p. 991.
- ANAND, A.; TYAGI, R.; MOHANTY, M.; GOYAL, M.; RANIL D DE SILVA, K.; WIJEKOON, N. Dystrophin induced cognitive impairment: Mechanisms, models and therapeutic strategies. *Annals of Neurosciences*, v. 22, n. 2, p. 108–118, 2015.
- 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.
- BHOJ, E. J.; LI, D.; HARR, M.; EDVARDSON, S.; ELPELEG, O.; CHISHOLM, E.; JUUSOLA, J.; DOUGLAS, G.; GUILLEN SACOTO, M. J.; SIQUIER-PERNET, K.; SAADI, A.; BOLE-FEYSOT, C.; NITSCHKE, P.; NARRAVULA, A.; WALKE, M.; HORNER, M. B.; DAY-SALVATORE, D.-L.; JAYAKAR, P.; VERGANO, S. A. S.; TARNOPOLSKY, M. A.; HEGDE, M.; COLLEAUX, L.; CRINO, P.; HAKONARSON, H. Mutations in TBCK, Encoding TBC1-Domain-Containing Kinase, Lead to a Recognizable Syndrome of Intellectual Disability and Hypotonia. *The American Journal of Human Genetics*, v. 98, n. 4, p. 782–788, 2016.
- BOLDUC, F. V.; VALENTE, D.; NGUYEN, A. T.; MITRA, P. P.; TULLY, T. An assay for social interaction in *Drosophila fragile X* mutants. *Fly*, v. 4, n. 3, p. 216–25, 2010.
- BOURGERON, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 16, n. 9, p. 551–563, 20 ago. 2015.
- BRAND, a H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, v. 118, n. 2, p. 401–15, jun. 1993.
- BRYKCZYNSKA, U.; PECHO-VRIESELING, E.; THIEMEYER, A.; KLEIN, J.; FRUH, I.; DOLL, T.; MANNEVILLE, C.; FUCHS, S.; IAZEOLLA, M.; BEIBEL, M.; ROMA, G.; NAUMANN, U.; KELLEY, N.; OAKELEY, E. J.; MUELLER, M.; GOMEZ-MANCILLA, B.; BÜHLER, M.; TABOLACCI, E.; CHIURAZZI, P.; NERI, G.; BOUWMEESTER, T.; DI GIORGIO, F. P.; FODOR, B. D.; AVITZOUR, M.; MOR-SHAKED, H.; et al. CGG Repeat-Induced FMR1 Silencing Depends on the Expansion Size in Human iPSCs and Neurons Carrying Unmethylated Full Mutations. *Stem cell reports*, v. 0, n. 0, p. 699–706, 2016.
- CASEY, J. P.; MAGALHAES, T.; CONROY, J. M.; REGAN, R.; SHAH, N.; ANNEY, R.; SHIELDS, D. C.; ABRAHAMS, B. S.; ALMEIDA, J.; BACCHELLI, E.; BAILEY, A. J.;

- BAIRD, G.; BATTAGLIA, A.; BERNEY, T.; BOLSHAKOVA, N.; BOLTON, P. F.; BOURGERON, T.; BRENNAN, S.; CALI, P.; CORREIA, C.; CORSELLO, C.; COUTANCHE, M.; DAWSON, G.; DE JONGE, M.; DELORME, R.; DUKETIS, E.; 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, abr. 2012.
- CECCONI, F.; DI BARTOLOMEO, S.; NARDACCI, R.; FUOCO, C.; CORAZZARI, M.; GIUNTA, L.; ROMAGNOLI, A.; STOYKOVA, A.; CHOWDHURY, K.; FIMIA, G. M.; PIACENTINI, M. A novel role for autophagy in neurodevelopment. *Autophagy*, v. 3, n. 5, p. 506–508, 2007.
- CHAHROUR, M. H.; YU, T. W.; LIM, E. T.; ATAMAN, B.; COULTER, M. E.; HILL, R. S.; STEVENS, C. R.; SCHUBERT, C. R.; GREENBERG, M. E.; GABRIEL, S. B.; WALSH, C. a. Whole-Exome Sequencing and Homozygosity Analysis Implicate Depolarization-Regulated Neuronal Genes in Autism. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 4, p. e1002635, 12 abr. 2012.
- CHAPMAN, N. H.; NATO, A. Q.; BERNIER, R.; ANKENMAN, K.; SOHI, H.; MUNSON, J.; PATOWARY, A.; ARCHER, M.; BLUE, E. M.; WEBB, S. J.; COON, H.; RASKIND, W. H.; BRKANAC, Z.; WIJSMAN, E. M. Whole exome sequencing in extended families with autism spectrum disorder implicates four candidate genes. *Human Genetics*, v. 134, n. 10, p. 1055–1068, 24 out. 2015.
- CHEN, Y. C.; LIN, Y. Q.; BANERJEE, S.; VENKEN, K.; LI, J.; ISMAT, a; CHEN, K.; DURAINÉ, L.; BELLEN, H. J.; BHAT, M. a. *Drosophila* Neuroligin 2 is Required Presynaptically and Postsynaptically for Proper Synaptic Differentiation and Synaptic Transmission. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 45, p. 16018–16030, 2012.
- CHO, S. C.; YIM, S.-H.; YOO, H. K.; KIM, M.-Y.; JUNG, G. Y.; SHIN, G. W.; KIM, B.-N.; HWANG, J. W.; KANG, J. J.; KIM, T.-M.; CHUNG, Y.-J. 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.
- CHONG, J. X.; CAPUTO, V.; PHELPS, I. G.; STELLA, L.; WORGAN, L.; DEMPSEY, J. C.; NGUYEN, A.; LEUZZI, V.; WEBSTER, R.; PIZZUTI, A.; MARVIN, C. T.; ISHAK, G. E.; ARDERN-HOLMES, S.; RICHMOND, Z.; BAMSHAD, M. J.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; TARTAGLIA, M.; CHOPRA, M.; DOHERTY, D. Recessive Inactivating Mutations in *TBCK*, Encoding a Rab GTPase-Activating Protein, Cause Severe Infantile Syndromic Encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*, v. 98, n. 4, p. 772–781, 2016.
- CUKIER, H. N.; DUEKER, N. D.; SLIFER, S. H.; LEE, J. M.; WHITEHEAD, P. L.; LALANNE, E.; LEYVA, N.; KONIDARI, I.; GENTRY, R. C.; HULME, W. F.; BOOVEN, D. Van; MAYO, V.; HOFMANN, N. K.; SCHMIDT, M. A.; MARTIN, E. R.; HAINES, J. L.; CUCCARO, M. L.; GILBERT, J. R.; PERICAK-VANCE, M. A. Exome sequencing of extended families with autism reveals genes shared across neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Molecular autism*, v. 5, n. 1, p. 1, 2014.
- DEPIENNE, C.; MORENO-DE-LUCA, D.; HERON, D.; BOUTEILLER, D.; GENNETIER, A.; DELORME, R.; CHASTE, P.; SIFFROI, J.; CHANTOT-BASTARAU, S.; BENYAHIA, B.; TROUILLARD, O.; NYGREN, G.; KOPP, S.; JOHANSSON, M.; RASTAM, M.; BURGLÉN, L.; LEGUERN, E.; VERLOES, A.; LEBOYER, M.; BRICE, A.; GILLBERG, C.; BETANCUR, C. 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, 15 ago. 2009.

- DOCKENDORFF, T. C.; SU, H. S.; MCBRIDE, S. M. J.; YANG, Z.; CHOI, C. H.; SIWICKI, K. K.; SEHGAL, A.; JONGENS, T. a. *Drosophila* lacking *dfmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. *Neuron*, v. 34, n. 6, p. 973–84, 13 jun. 2002.
- DOLL, C. a; BROADIE, K. Impaired activity-dependent neural circuit assembly and refinement in autism spectrum disorder genetic models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, n. February, p. 30, jan. 2014.
- DURKIN, M. S.; MAENNER, M. J.; NEWSCHAFFER, C. J.; LEE, L.-C.; CUNNIFF, C. M.; DANIELS, J. L.; KIRBY, R. S.; LEAVITT, L.; MILLER, L.; ZAHORODNY, W.; SCHIEVE, L. A. Advanced Parental Age and the Risk of Autism Spectrum Disorder. *American Journal of Epidemiology*, v. 168, n. 11, p. 1268–1276, 2008.
- DWORZYNSKI, K.; RONALD, A.; BOLTON, P.; HAPPÉ, F. How different are girls and boys above and below the diagnostic threshold for autism spectrum disorders? *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 51, n. 8, p. 788–797, 2012.
- ELSABBAGH, M.; DIVAN, G.; KOH, Y.-J.; KIM, Y. S.; KAUCHALI, S.; MARCÍN, C.; MONTIEL-NAVA, C.; PATEL, V.; PAULA, C. S.; WANG, C.; YASAMY, M. T.; FOMBONNE, E. Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research*, v. 5, n. 3, p. 160–179, 11 jun. 2012.
- FRYE, R. E.; ROSE, S.; SLATTERY, J.; MACFABE, D. F. Gastrointestinal dysfunction in autism spectrum disorder: the role of the mitochondria and the enteric microbiome. *Microbial ecology in health and disease*, v. 26, p. 27458, 2015.
- GAI, X.; XIE, H. M.; PERIN, J. C.; TAKAHASHI, N.; MURPHY, K.; WENOCUR, A S.; D'ARCY, M.; O'HARA, R. J.; GOLDMUNTZ, E.; GRICE, D. E.; SHAIKH, T. H.; HAKONARSON, H.; BUXBAUM, J. D.; ELIA, J.; WHITE, P. S. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Molecular psychiatry*, v. 17, n. 4, p. 402–411, 2011.
- GATTO, C. L.; BROADIE, K. *Drosophila* modeling of heritable neurodevelopmental disorders. *Current opinion in neurobiology*, v. 21, n. 6, p. 834–41, dez. 2011.
- GAUGLER, T.; KLEI, L.; SANDERS, S. J.; BODEA, C. a; GOLDBERG, A. P.; LEE, A. B.; MAHAJAN, M.; MANAA, D.; PAWITAN, Y.; REICHERT, J.; RIPKE, S.; SANDIN, S.; SKLAR, P.; SVANTESSON, O.; REICHENBERG, A.; HULTMAN, C. M.; DEVLIN, B.; ROEDER, K.; BUXBAUM, J. D. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, n. November 2013, 20 jul. 2014.
- GIRIRAJAN, S.; ROSENFELD, J. A.; COOPER, G. M.; ANTONACCI, F.; SISWARA, P.; ITSARA, A.; VIVES, L.; WALSH, T.; MCCARTHY, S. E.; BAKER, C.; MEFFORD, H. C.; KIDD, J. M.; BROWNING, S. R.; BROWNING, B. L.; DICKEL, D. E.; LEVY, D. L.; BALLIF, B. C.; 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.; KORVATSKA, O.; KIM, C. E.; WOOD, S.; ZHANG, H.; ESTES, A.; BRUNE, C. W.; BRADFIELD, J. P.; IMIELINSKI, M.; FRACKELTON, E. C.; REICHERT, J.; CRAWFORD, E. L.; MUNSON, J.; SLEIMAN, P. M. a; CHIAVACCI, R.; et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, v. 459, n. 7246, p. 569–73, 28 maio 2009.
- GRICE, S. J.; LIU, J.-L.; WEBBER, C. Synergistic Interactions between *Drosophila* Orthologues of Genes Spanned by De Novo Human CNVs Support Multiple-Hit Models of Autism. *PLOS Genetics*, v. 11, n. 3, p. e1004998, 2015.

- GRIESI-OLIVEIRA, K.; ACAB, A.; GUPTA, A. R.; SUNAGA, D. Y.; CHAILANGKARN, T.; NICOL, X.; NUNEZ, Y.; WALKER, M. F.; MURDOCH, J. D.; SANDERS, S. J.; FERNANDEZ, T. V.; JI, W.; LIFTON, R. P.; VADASZ, E.; DIETRICH, A.; PRADHAN, D.; SONG, H.; MING, G.; GU, X.; HADDAD, G.; MARCHETTO, M. C. N.; SPITZER, N.; PASSOS-BUENO, M. R.; STATE, M. W.; MUOTRI, a R. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Molecular Psychiatry*, v. 20, n. 11, p. 1350–65, 11 nov. 2015.
- GRIESI-OLIVEIRA, K.; ACAB, A.; GUPTA, a R.; SUNAGA, D. Y.; CHAILANGKARN, T.; NICOL, X.; NUNEZ, Y.; WALKER, M. F.; MURDOCH, J. D.; SANDERS, S. J.; FERNANDEZ, T. V.; JI, W.; LIFTON, R. P.; VADASZ, E.; DIETRICH, A.; PRADHAN, D.; SONG, H.; MING, G.; GU, X.; HADDAD, G.; MARCHETTO, M. C. N.; SPITZER, N.; PASSOS-BUENO, M. R.; STATE, M. W.; MUOTRI, a R. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Molecular psychiatry*, n. March, p. 1–16, 2014.
- GRISWOLD, A. J.; MA, D.; CUKIER, H. N.; NATIONS, L. D.; SCHMIDT, M. A.; CHUNG, R.-H.; JAWORSKI, J. M.; SALYAKINA, D.; KONIDARI, I.; WHITEHEAD, P. L.; WRIGHT, H. H.; ABRAMSON, R. K.; WILLIAMS, S. M.; MENON, R.; MARTIN, E. R.; HAINES, J. L.; GILBERT, J. R.; CUCCARO, M. L.; PERICAK-VANCE, M. A. Evaluation of Copy Number Variations Reveals Novel Candidate Genes in Autism Spectrum Disorder Associated Pathways. *Human Molecular Genetics*, v. 314, p. 1–35, 27 abr. 2012.
- 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, S. N.; SCHENDEL, D. E.; PARNER, E. T. Explaining the Increase in the Prevalence of Autism Spectrum Disorders. *JAMA Pediatrics*, v. 169, n. 1, p. 56, 2015.
- HEGAZY, H. G.; ALI, E. H. A.; MAHMOUD, A. H. Cytokine Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: Evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. *CYTOKINE*, v. 71, n. 2, p. 173–180, 2015.
- HENDRIKSEN, J. G. M.; VLES, J. S. H. Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder. *Journal of child neurology*, v. 23, n. 5, p. 477–481, 2008.
- HULTMAN, C. M.; SANDIN, S.; LEVINE, S. Z.; LICHTENSTEIN, P.; REICHENBERG, A. Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Molecular Psychiatry*, p. 1–10, 2010.
- IOSSIFOV, I.; RONEMUS, M.; LEVY, D.; WANG, Z.; HAKKER, I.; ROSENBAUM, J.; YAMROM, B.; LEE, Y. ha; NARZISI, G.; LEOTTA, A.; KENDALL, J.; GRABOWSKA, E.; MA, B.; MARKS, S.; RODGERS, L.; STEPANSKY, A.; TROGE, J.; ANDREWS, P.; BEKRITSKY, M.; PRADHAN, K.; GHIBAN, E.; KRAMER, M.; PARLA, J.; DEMETER, R.; FULTON, L. L.; FULTON, R. S.; MAGRINI, V. J.; YE, K.; DARNELL, J. C.; DARNELL, R. B.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; SCHATZ, M. C.; MCCOMBIE, R. W.; WIGLER, M. De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron*, v. 74, n. 2, p. 285–299, 2012.
- JACQUEMONT, S.; COE, B. P.; HERSCH, M.; DUYZEND, M. H.; KRUMM, N.; BERGMANN, S.; BECKMANN, J. S.; ROSENFELD, J. A.; EICHLER, E. E. A higher mutational

- burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. *American Journal of Human Genetics*, v. 94, n. 3, p. 415–425, 2014.
- KANG, D.-W.; ADAMS, J. B.; GREGORY, A. C.; BORODY, T.; CHITTICK, L.; FASANO, A.; KHORUTS, A.; GEIS, E.; MALDONADO, J.; MCDONOUGH-MEANS, S.; POLLARD, E. L.; ROUX, S.; SADOWSKY, M. J.; LIPSON, K. S.; SULLIVAN, M. B.; CAPORASO, J. G.; KRAJMALNIK-BROWN, R. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, v. 5, n. 1, p. 10, 2017.
- KIM, Y. S.; LEVENTHAL, B. L.; KOH, Y.-J.; FOMBONNE, E.; LASKA, E.; LIM, E.-C.; CHEON, K.-A.; KIM, S.-J.; KIM, Y.-K.; LEE, H.; SONG, D.-H.; GRINKER, R. R. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *The American journal of psychiatry*, v. 168, n. 9, p. 904–912, 2011.
- KLEI, L.; SANDERS, S. J.; MURTHA, M. T.; HUS, V.; LOWE, J. K.; WILLSEY, a J.; MORENO-DE-LUCA, D.; YU, T. W.; FOMBONNE, E.; GESCHWIND, D.; GRICE, D. E.; LEDBETTER, D. H.; LORD, C.; MANE, S. M.; MARTIN, C. L.; MARTIN, D. M.; MORROW, E. M.; WALSH, C. a; MELHEM, N. M.; CHASTE, P.; SUTCLIFFE, J. S.; STATE, M. W.; COOK, E. H.; ROEDER, K.; DEVLIN, B. Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Molecular autism*, v. 3, n. 1, p. 9, jan. 2012.
- KONOPKA, G.; WEXLER, E.; ROSEN, E.; MUKAMEL, Z.; OSBORN, G. E.; CHEN, L.; LU, D.; GAO, F.; GAO, K.; LOWE, J. K.; GESCHWIND, D. H. Modeling the functional genomics of autism using human neurons. *Molecular Psychiatry*, v. 17, n. 2, p. 202–14, fev. 2012.
- LAI, M.-C.; LOMBARDO, M. V; BARON-COHEN, S. Autism. *The Lancet*, v. 383, n. 9920, p. 896–910, 2014.
- LAI, M.; LOMBARDO, M. V; PASCO, G.; RUIGROK, A. N. V; WHEELWRIGHT, S. J.; SADEK, S. A.; CHAKRABARTI, B.; BARON-COHEN, S. A Behavioral Comparison of Male and Female Adults with High Functioning Autism Spectrum Conditions. *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, p. e20835, 13 jun. 2011.
- LEBLOND, C. S.; HEINRICH, J.; DELORME, R.; PROEPPER, C.; BETANCUR, C.; HUGUET, G.; KONYUKH, M.; CHASTE, P.; EY, E.; RASTAM, M.; ANCKARSÄTER, H.; NYGREN, G.; GILLBERG, I. C.; MELKE, J.; TORO, R.; REGNAULT, B.; FAUCHEREAU, F.; 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, fev. 2012.
- LEE, S. Y.; RAMIREZ, J.; FRANCO, M.; LECTEZ, B.; GONZALEZ, M.; BARRIO, R.; MAYOR, U. Ube3a, the E3 ubiquitin ligase causing Angelman syndrome and linked to autism, regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn10. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 71, n. 14, p. 2747–2758, 2014.
- LIN, M.; LACHMAN, H. M.; ZHENG, D. Transcriptomics analysis of iPSC-derived neurons and modeling of neuropsychiatric disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 73, p. 32–42, 2016.
- LIPTON, J. O.; SAHIN, M. The Neurology of mTOR. *Neuron*, v. 84, n. 2, p. 275–291, 2014.
- LIU, K.; ZERUBAVEL, N.; BEARMAN, P. Social demographic change and autism. *Demography*, v. 47, n. 2, p. 327–43, maio 2010.
- LOTTER, V. Epidemiology of Autistic Conditions in Young Children. *Social Psychiatry*, v. 1, n. 3, p. 124–135, 1966.

- LUNDSTRÖM, S.; REICHENBERG, A.; ANCKARSÄTER, H.; LICHTENSTEIN, P.; GILLBERG, C. Autism phenotype versus registered diagnosis in Swedish children: prevalence trends over 10 years in general population samples. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 350, n. 6, p. h1961, 2015.
- LUO, R.; SANDERS, S. J.; TIAN, Y.; VOINEAGU, I.; HUANG, N.; CHU, S. H.; KLEI, L.; CAI, C.; OU, J.; LOWE, J. K.; HURLES, M. E.; DEVLIN, B.; STATE, M. W.; GESCHWIND, D. H. Genome-wide transcriptome profiling reveals the functional impact of rare de novo and recurrent CNVs in autism spectrum disorders. *American Journal of Human Genetics*, v. 91, n. 1, p. 38–55, 13 jul. 2012.
- MARCHETTO, M. C. N.; CARROMEU, C.; ACAB, A.; YU, D.; YEO, G. W.; MU, Y.; CHEN, G.; GAGE, F. H.; MUOTRI, A. R. A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, v. 143, n. 4, p. 527–539, 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.
- MECCA, T. P.; BRAVO, R. B.; VELLOSO, R. D. L.; SCHWARTZMAN, J. S.; BRUNONI, D.; TEIXEIRA, M. C. T. V. Rastreamento de sinais e sintomas de transtornos do espectro do autismo em irmãos. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, v. 33, n. 2, p. 116–120, 2011.
- MICHAELSON, J. J.; SHI, Y.; GUJRAL, M.; ZHENG, H.; MALHOTRA, D.; JIN, X.; JIAN, M.; LIU, G.; GREER, D.; BHANDARI, A.; WU, W.; COROMINAS, R.; PEOPLES, Á.; KOREN, A.; GORE, A.; KANG, S.; LIN, G. N.; ESTABILLO, J.; GADOMSKI, T.; SINGH, B.; ZHANG, K.; AKSHOOMOFF, N.; CORSELLO, C.; MCCARROLL, S.; IAKOUCHEVA, L. M.; LI, Y.; WANG, J.; SEBAT, J. Whole-Genome Sequencing in Autism Identifies Hot Spots for De Novo Germline Mutation. *Cell*, v. 151, n. 7, p. 1431–1442, 21 dez. 2012.
- MORALES, J.; HIESINGER, P. R.; SCHROEDER, A. J.; KUME, K.; VERSTREKEN, P.; JACKSON, F. R.; NELSON, D. L.; HASSAN, B. a. *Drosophila fragile X* protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain. *Neuron*, v. 34, n. 6, p. 961–72, 13 jun. 2002.
- MOREIRA, D. P.; GRIESI-OLIVEIRA, K.; BOSSOLANI-MARTINS, A. L.; LOURENÇO, N. C. V.; TAKAHASHI, V. N. O.; DA ROCHA, K. M.; MOREIRA, E. S.; VADASZ, E.; MEIRA, J. G. C.; BERTOLA, D.; O'HALLORAN, E.; MAGALHÃES, T. R.; FETT-CONTE, A. C.; PASSOS-BUENO, M. R. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 9–16, 2014.
- MOREIRA, E. S.; SILVA, I. M. W.; LOURENCO, N.; MOREIRA, D. P.; RIBEIRO, C. M.; MARTINS, A. L. B.; GRIESI-OLIVEIRA, K.; LAZAR, M.; COSTA, S. S.; NASLAVSKY, M. S.; ROCHA, K. M.; AGUENA, M.; FETT-CONTE, A. C.; ZATZ, M.; ROSENBERG, C.; ZACHI, E. C.; BERTOLA, D. R.; VADASZ, E.; PASSOS-BUENO, M. R. Detection of small copy number variations (CNVs) in autism spectrum disorder (ASD) by custom array comparative genomic hybridization (aCGH). *Research in Autism Spectrum Disorders*, v. 23, p. 145–151, 2016.
- MOTA, N. R.; ROVARIS, D. L.; KAPPEL, D. B.; PICON, F. A.; VITOLA, E. S.; SALGADO, C. A. I.; KARAM, R. G.; ROHDE, L. A.; GREVET, E. H.; BAU, C. H. D. NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2 gene cluster and the clinical and genetic heterogeneity of adults with ADHD. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, v. 168, n. 6, p. 433–444, 2015.

- NEALE, B. M.; KOU, Y.; LIU, L.; MA'AYAN, A.; SAMOCHA, K. E.; SABO, A.; LIN, C.-F.; STEVENS, C.; WANG, L.-S.; MAKAROV, V.; POLAK, P.; YOON, S.; MAGUIRE, J.; CRAWFORD, E. L.; CAMPBELL, N. G.; GELLER, E. T.; VALLADARES, O.; SCHAFER, C.; LIU, H.; et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, v. 485, n. 7397, p. 242–5, 10 maio 2012.
- NIKITINA, E. A.; MEDVEDEVA, A. V.; ZAKHAROV, G. A. The *Drosophila* agnostic Locus: Involvement in the Formation of Cognitive Defects in Williams Syndrome. v. 6, n. 21, p. 53–61, 2014.
- NISHIMURA, Y.; MARTIN, C. L.; VAZQUEZ-LOPEZ, A.; SPENCE, S. J.; ALVAREZ-RETUERTO, A. I.; SIGMAN, M.; STEINDLER, C.; PELLEGRINI, S.; SCHANEN, N. C.; WARREN, S. T.; GESCHWIND, D. H. Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Human Molecular Genetics*, v. 16, n. 14, p. 1682–1698, 2007.
- NORD, A. S.; ROEB, W.; DICKEL, D. E.; WALSH, T.; KUSENDA, M.; O'CONNOR, K. L.; MALHOTRA, D.; MCCARTHY, S. E.; STRAY, S. M.; TAYLOR, S. M.; SEBAT, J.; KING, B.; KING, M.; MCCLELLAN, J. M. 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, jun. 2011.
- O'ROAK, B. J.; DERIZIOTIS, P.; LEE, C.; VIVES, L.; SCHWARTZ, J. J.; GIRIRAJAN, S.; KARAKOC, E.; MACKENZIE, A. P.; NG, S. B.; BAKER, C.; RIEDER, M. J.; NICKERSON, D. a; BERNIER, R.; FISHER, S. E.; SHENDURE, J.; EICHLER, E. E. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature Genetics*, v. 43, n. 6, p. 585–9, jun. 2011.
- O'ROAK, B. J.; VIVES, L.; GIRIRAJAN, S.; KARAKOC, E.; KRUMM, N.; COE, B. P.; LEVY, R.; KO, A.; LEE, C.; SMITH, J. D.; TURNER, E. H.; STANAWAY, I. B.; VERNOT, B.; MALIG, M.; BAKER, C.; REILLY, B.; AKEY, J. M.; BORENSTEIN, E.; RIEDER, M. J.; NICKERSON, D. A.; BERNIER, R.; SHENDURE, J.; EICHLER, E. E. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, v. 485, n. 7397, p. 246–250, 2012a.
- O'ROAK, B. J.; VIVES, L.; GIRIRAJAN, S.; KARAKOC, E.; KRUMM, N.; COE, B. P.; LEVY, R.; KO, A.; LEE, C.; SMITH, J. D.; TURNER, E. H.; STANAWAY, I. B.; VERNOT, B.; MALIG, M.; BAKER, C.; REILLY, B.; AKEY, J. M.; BORENSTEIN, E.; RIEDER, M. J.; NICKERSON, D. A.; BERNIER, R.; SHENDURE, J.; EICHLER, E. E. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, v. 485, n. 7397, p. 246–250, 2012b.
- OKRAY, Z.; HASSAN, B. A. Genetic approaches in *Drosophila* for the study neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, v. 68, p. 150–156, 2013.
- PARIKSHAK, N. N.; LUO, R.; ZHANG, A.; WON, H.; LOWE, J. K.; CHANDRAN, V.; HORVATH, S.; GESCHWIND, D. H. Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell*, v. 155, n. 5, p. 1008–21, 21 nov. 2013.
- PAULA, C.; RIBEIRO, S.; FOMBONNE, E.; 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.
- PINTO, D.; DELABY, E.; MERICCO, D.; BARBOSA, M.; MERIKANGAS, A.; KLEI, L.; THIRUVAHINDRAPURAM, B.; XU, X.; ZIMAN, R.; WANG, Z.; VORSTMAN, J. A. S.; THOMPSON, A.; REGAN, R.; PILORGE, M.; PELLECCIA, G.; PAGNAMENTA, A. T.; OLIVEIRA, B.; MARSHALL, C. R.; MAGALHAES, T. R.; LOWE, J. K.; HOWE, J.

- L.; GRISWOLD, A. J.; GILBERT, J.; DUKETIS, E.; DOMBROSKI, B. A.; DE JONGE, M. V.; et al. Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *The American Journal of Human Genetics*, p. 677–694, abr. 2014.
- POOT, M.; VAN DER SMAGT, J. J.; 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. 228–240, 2011.
- POULTNEY, C. S.; GOLDBERG, A. P.; DRAPEAU, E.; KOU, Y.; HARONY-NICOLAS, H.; KAJIWARA, Y.; DE RUBEIS, S.; DURAND, S.; STEVENS, C.; REHNSTRÖM, K.; PALOTIE, A.; DALY, M. J.; MA'AYAN, A.; FROMER, M.; BUXBAUM, J. D. Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, v. 93, n. 4, p. 607–619, 2013.
- PRILUTSKY, D.; PALMER, N. P.; SMEDEMARK-MARGULIES, N.; SCHLAEGER, T. M.; MARGULIES, D. M.; KOHANE, I. S. iPSC-derived neurons as a higher-throughput readout for autism: Promises and pitfalls. *Trends in Molecular Medicine*, v. 20, n. 2, p. 91–104, 2014.
- PULEO, C. M.; SCHMEIDLER, J.; REICHENBERG, a.; KOLEVZON, a.; SOORYA, L. V.; BUXBAUM, J. D.; SILVERMAN, J. M. Advancing paternal age and simplex autism. *Autism*, v. 16, n. 4, p. 367–380, 2012.
- QIAO, Y.; TYSON, C.; HRYNCHAK, M.; LOPEZ-RANGEL, E.; HILDEBRAND, J.; MARTELL, S.; FAWCETT, C.; KASMARA, L.; CALLI, K.; HARVARD, C.; LIU, X.; HOLDEN, J. J. A.; LEWIS, S. M. E.; RAJCAN-SEPAROVIC, E. Clinical application of 2.7M Cytogenetics array for CNV detection in subjects with idiopathic autism and/or intellectual disability. *Clinical Genetics*, v. 83, n. 2, p. 145–54, 27 fev. 2013.
- QUACH, T. T.; WANG, Y.; KHANNA, R.; CHOUNLAMOUNTRI, N.; AUVERGNON, N.; HONNORAT, J.; DUCHEMIN, A.-M. M. Effect of CRMP3 expression on dystrophic dendrites of hippocampal neurons. *TL - 16. Molecular psychiatry*, v. 16 VN-r, n. 7, p. 689–691, 2011.
- QUACH, T. T.; WILSON, S. M.; ROGEMOND, V.; CHOUNLAMOUNTRI, N.; KOLATTUKUDY, P. E.; MARTINEZ, S.; KHANNA, M.; BELIN, M.-F. F.; KHANNA, R.; HONNORAT, J.; DUCHEMIN, A.-M. M. Mapping CRMP3 domains involved in dendrite morphogenesis and voltage-gated calcium channel regulation. *TL - 126. Journal of cell science*, v. 126 VN-, n. Pt 18, p. 4262–4273, 2013.
- RICOTTI, V.; MANDY, W. P. L.; SCOTO, M.; PANE, M.; DECONINCK, N.; MESSINA, S.; MERCURI, E.; SKUSE, D. H.; MUNTONI, F. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Developmental Medicine and Child Neurology*, v. 58, n. 1, p. 77–84, 2016.
- RONALD, A.; HOEKSTRA, R. A. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, v. 156B, n. 3, p. 255–74, abr. 2011.
- SANDERS, S. J.; MURTHA, M. T.; GUPTA, A. R.; MURDOCH, J. D.; RAUBESON, M. J.; WILLSEY, A. J.; ERCAN-SENCICEK, A. G.; DILULLO, N. M.; PARIKSHAK, N. N.; STEIN, J. L.; WALKER, M. F.; OBER, G. T.; TERAN, N. A.; SONG, Y.; EL-FISHAWY, P.; MURTHA, R. C.; CHOI, M.; OVERTON, J. D.; BJORNSON, R. D.; CARRIERO, N. J.; MEYER, K. A.; BILGUVAR, K.; MANE, S. M.; ŠESTAN, N.; LIFTON, R. P.; GÜNEL, M.; ROEDER, K.; GESCHWIND, D. H.; DEVLIN, B.; STATE, M. W. De novo

- mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, v. 485, n. 7397, p. 237–241, 2012.
- SATO, Y.; YOSHIKAWA, F.; SADAKATA, T.; SHINODA, Y.; KOEBIS, M.; FURUICHI, T. Age-dependent redistribution and hypersialylation of the central myelin paranodal loop membrane protein Opalin in the mouse brain. *Neuroscience Letters*, v. 581, p. 14–19, 2014.
- SCHAEFER, G. B. Clinical genetic aspects of ASD spectrum disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 2, 2016.
- SHARON, G.; SAMPSON, T. R.; GESCHWIND, D. H.; MAZMANIAN, S. K. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell*, v. 167, n. 4, p. 915–932, 2016.
- SHCHEGLOVITOV, A.; SHCHEGLOVITOVA, O.; YAZAWA, M.; PORTMANN, T.; SHU, R.; SEBASTIANO, V.; KRAWISZ, A.; FROELICH, W.; BERNSTEIN, J. a; HALLMAYER, J. F.; DOLMETSCH, R. E. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature*, v. 503, n. 7475, p. 267–71, 14 nov. 2013.
- SHERIDAN, S. D.; THERIAULT, K. M.; REIS, S. a; ZHOU, F.; MADISON, J. M.; DAHERON, L.; LORING, J. F.; HAGGARTY, S. J. Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS One*, v. 6, n. 10, p. e26203, jan. 2011.
- SOUTH, C.; TEACHING, C. N. Environmental risk factors for autism spectrum disorders. 2016.
- SZATMARI, P.; LIU, X. Q.; GOLDBERG, J.; ZWAIGENBAUM, L.; PATERSON, A. D.; WOODBURY-SMITH, M.; GEORGIADES, S.; DUKU, E.; THOMPSON, A. Sex differences in repetitive stereotyped behaviors in autism: Implications for genetic liability. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, v. 159 B, n. 1, p. 5–12, 2012.
- TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, n. 5, p. 861–72, 30 nov. 2007.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663–76, 25 ago. 2006.
- TICK, B.; BOLTON, P.; HAPPÉ, F.; RUTTER, M.; RIJSDIJK, F. Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, v. 57, n. 5, p. 585–595, 2016.
- TOMA, C.; TORRICO, B.; HERVÁS, a; VALDÉS-MAS, R.; TRISTÁN-NOGUERO, a; PADILLO, V.; MARISTANY, M.; SALGADO, M.; ARENAS, C.; PUENTE, X. S.; BAYÉS, M.; CORMAND, B. Exome sequencing in multiplex autism families suggests a major role for heterozygous truncating mutations. *Molecular psychiatry*, n. February 2013, p. 784–790, 2013.
- TRAVEN, A.; JELICIC, B.; SOPTA, M. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO reports*, v. 7, n. 5, p. 496–9, maio 2006.
- VOINEAGU, I.; WANG, X.; JOHNSTON, P.; LOWE, J. K.; TIAN, Y.; HORVATH, S.; MILL, J.; CANTOR, R. M.; BLENCOWE, B. J.; GESCHWIND, D. H. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, v. 474, n. 7351, p. 380–4, 2011.

- WAN, L.; DOCKENDORFF, T. C.; JONGENS, T. A.; DREYFUSS, G. Characterization of dFMR1, a *Drosophila melanogaster* Homolog of the Fragile X Mental Retardation Protein. *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, n. 22, p. 8536–8547, 15 nov. 2000.
- WANG, P.; LIN, M.; PEDROSA, E.; HRABOVSKY, A.; ZHANG, Z.; GUO, W.; LACHMAN, H. M.; ZHENG, D. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in neurodevelopment. *Molecular autism*, v. 6, p. 55, 2015.
- WILLIAMS, E. C.; ZHONG, X.; MOHAMED, A.; LI, R.; LIU, Y.; DONG, Q.; ANANIEV, G. E.; CHOONGMOK, J. C.; LIN, B. R.; LU, J.; CHIAO, C.; CHERNEY, R.; LI, H.; ZHANG, S. C.; CHANG, Q. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wildtype neurons. *Human Molecular Genetics*, v. 23, n. 11, p. 2968–2980, 2014.
- WIŚNIEWIECKA-KOWALNIK, B.; KASTORY-BRONOWSKA, M.; BARTNIK, M.; DERWIŃSKA, K.; DYM CZAK-DOMINI, W.; SZUMBARSKA, D.; ZIEMKA, E.; SZCZAŁUBA, K.; SYKULSKI, M.; GAMBIN, T.; GAMBIN, A.; SHAW, C. a; MAZURCZAK, T.; OBERSZTYN, E.; BOCIAN, E.; STANKIEWICZ, P. Application of custom-designed oligonucleotide array CGH in 145 patients with autistic spectrum disorders. *European journal of human genetics : EJHG*, v. 21, n. 6, p. 620–5, 2013.
- WOODBURY-SMITH, M.; PATERSON, A. D.; THIRUVAHINDRAPDURAM, B.; LIONEL, A. C.; MARSHALL, C. R.; MERICCO, D.; FERNANDEZ, B. A.; DUKU, E.; SUTCLIFFE, J. S.; O'CONNOR, I.; CHRYSLER, C.; THOMPSON, A.; KELLAM, B.; TAMMIMIES, K.; WALKER, S.; YUEN, R. K. C.; UDDIN, M.; HOWE, J. L.; PARLIER, M.; WHITTEN, K.; SZATMARI, P.; VIELAND, V. J.; PIVEN, J.; SCHERER, S. W. Using extended pedigrees to identify novel autism spectrum disorder (ASD) candidate genes. *Human Genetics*, v. 134, n. 2, p. 191–201, fev. 2015.
- XIE, N.; GONG, H.; SUHL, J. A.; CHOPRA, P.; WANG, T.; WARREN, S. T. Reactivation of FMR1 by CRISPR/Cas9-mediated deletion of the expanded CGG-repeat of the fragile X chromosome. *PLoS ONE*, v. 11, n. 10, p. 1–12, 2016.
- YAMAMOTO-HINO, M.; GOTO, S. In Vivo RNAi-Based Screens: Studies in Model Organisms. *Genes*, v. 4, n. 4, p. 646–65, jan. 2013.
- YAMAMOTO, S.; JAISWAL, M.; CHARNG, W.-L.; GAMBIN, T.; KARACA, E.; MIRZAA, G.; WISZNIEWSKI, W.; SANDOVAL, H.; HAELTERMAN, N. A.; XIONG, B.; ZHANG, K.; BAYAT, V.; DAVID, G.; LI, T.; CHEN, K.; GALA, U.; HAREL, T.; PEHLIVAN, D.; PENNEY, S.; VISSERS, L. E. L. M.; DE LIGT, J.; JHANGIANI, S. N.; XIE, Y.; TSANG, S. H.; PARMAN, Y.; SIVACI, M.; BATTALOGU, E.; MUZNY, D.; WAN, Y.-W.; LIU, Z.; LIN-MOORE, A. T.; CLARK, R. D.; CURRY, C. J.; LINK, N.; SCHULZE, K. L.; BOERWINKLE, E.; DOBYNS, W. B.; ALLIKMETS, R.; GIBBS, R. A.; CHEN, R.; LUPSKI, J. R.; WANGLER, M. F.; BELLEN, H. J. A *Drosophila* Genetic Resource of Mutants to Study Mechanisms Underlying Human Genetic Diseases. *Cell*, v. 159, n. 1, p. 200–214, set. 2014.
- YOSHIKAWA, F.; SATO, Y.; TOHYAMA, K.; AKAGI, T.; FURUSE, T.; SADAKATA, T.; TANAKA, M.; SHINODA, Y.; HASHIKAWA, T.; ITOHARA, S.; SANO, Y.; GHANDOUR, M. S.; WAKANA, S.; FURUICHI, T. Mammalian-specific central myelin protein opalin is redundant for normal myelination: Structural and behavioral assessments. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. 1–18, 2016.
- YOSHIKAWA, F.; SATO, Y.; TOHYAMA, K.; AKAGI, T.; HASHIKAWA, T.; NAGAKURA-TAKAGI, Y.; SEKINE, Y.; MORITA, N.; BABA, H.; SUZUKI, Y.; SUGANO, S.; SATO, A.; FURUICHI, T. Opalin, a transmembrane sialoglycoprotein located in the central

- nervous system myelin paranodal loop membrane. *The Journal of biological chemistry*, v. 283, n. 30, p. 20830–40, 25 jul. 2008.
- YU, T. W.; CHAHROUR, M. H.; COULTER, M. E.; JIRALERSPONG, S.; OKAMURA-IKEDA, K.; ATAMAN, B.; SCHMITZ-ABE, K.; HARMIN, D. A.; ADLI, M.; MALIK, A. N.; D’GAMA, A. M.; LIM, E. T.; SANDERS, S. J.; MOCHIDA, G. H.; PARTLOW, J. N.; SUNU, C. M.; FELIE, J. M.; RODRIGUEZ, J.; NASIR, R. H.; WARE, J.; JOSEPH, R. M.; et al. Using Whole-Exome Sequencing to Identify Inherited Causes of Autism. *Neuron*, v. 77, n. 2, p. 259–273, 2013.
- YUEN, R. K. C.; THIRUVAHINDRAPURAM, B.; MERICO, D.; WALKER, S.; TAMMIMIES, K.; HOANG, N.; CHRYSLER, C.; NALPATHAMKALAM, T.; PELLECCIA, G.; LIU, Y.; GAZZELLONE, M. J.; D’ABATE, L.; DENEULT, E.; HOWE, J. L.; LIU, R. S. C.; THOMPSON, A.; ZARREI, M.; UDDIN, M.; MARSHALL, C. R.; RING, R. H.; ZWAIGENBAUM, L.; RAY, P. N.; WEKSBERG, R.; CARTER, M. T.; FERNANDEZ, B. a; ROBERTS, W.; SZATMARI, P.; SCHERER, S. W. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nature Medicine*, v. 21, n. 2, p. 185–191, 26 jan. 2015.
- ZWEIER, C.; DE JONG, E. K.; ZWEIER, M.; ORRICO, A.; OUSAGER, L. B.; COLLINS, A. L.; BIJLSMA, E. K.; OORTVELD, M. a W.; EKICI, A. B.; REIS, A.; SCHENCK, A.; RAUCH, A. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in *Drosophila*. *American Journal of Human Genetics*, v. 85, n. 5, p. 655–66, nov. 2009.