

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS GENES CODIFICADORES DO
TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (*SLC6A4*) E DA INTEGRINA BETA 3
(*ITGB3*) NO DIAGNÓSTICO E SINTOMATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DO
ESPECTRO AUTISTA**

Jaqueline Bohrer Schuch

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Prof. Dra. Tatiana Roman

Porto Alegre, maio de 2014.

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Departamento de Genética, Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Psicologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Unidade de Neuropediatria – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

FONTES FINANCIADORAS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA)

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu incrível pai, Sérgio e a minha irmã – que é o máximo – Leca, por todo amor, paciência e alegrias que compartilhamos.

A minha mãe, Eliana, por ser o melhor exemplo, sempre.

A minha família de coração, vó Fernandina, mãe Nádia e mana Ales, por ter me acolhido e me dado apoio mais uma vez.

Amo todos vocês!

Aos meus amigos maravilhosos por cada momento que compartilhamos. E foram tantos... Conversas, jantas, risadas, filmes, bebidinhas, viagens, tardes de sol no Parcão... E claro, também pelo estresse que só um doutorado é capaz de proporcionar.

Renata, Bruna, Nina, Diego, Fabi, Luciana, Flávia, Cheila, Vanessa, Naty, Leca, Maurício, Ales, Alexandre... impossível citar todos!

Aos colegas de laboratório pelo aprendizado e pelos momentos de descontração, sempre necessários.

A todos aqueles que me auxiliaram nas coletas e no andamento do projeto, em especial a Diana; ao Dr Rudimar Riesgo e a equipe da neuropediatria, ao setor UAMP, ao setor de coleta de materiais biológicos e a Dra Sandra Segal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; e ao Departamento de Psicologia da UFRGS.

A Dra Lavínia por ter me dado à oportunidade de continuar o projeto que ela iniciou. Pela chance de trabalhar em projetos paralelos a este estudo, que me fizeram crescer como pesquisadora.

A Dânae e a Bibiane por me ajudarem muito no início do projeto.

Aos funcionários e professores do PPGBM por todo o auxílio quando necessário. Principalmente ao Elmo, sempre disponível para ajudar.

Agradeço a todas as famílias que aceitaram participar deste estudo e que compartilharam histórias e informações para que ele fosse possível.

A minha orientadora, Dra. Tatiana Roman, por me dar a oportunidade de trabalhar em um assunto novo para ambas. Por topar estudar muito para que este projeto fosse possível.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	08
Lista de Tabelas e Figuras.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	15
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	17
I. 1. Transtornos do espectro autista: diagnóstico e caracterização clínica.....	18
I. 1. 1. Particularidades das manifestações clínicas frequentes nos TEA.....	24
I. 2. Epidemiologia.....	27
I. 3. Síndromes e anomalias associadas.....	28
I. 4. Neurobiologia.....	30
I. 5. Etiologia dos TEA.....	33
I. 5. 1. A influência dos genes de suscetibilidade e outros fatores genéticos na etiologia dos TEA.....	37
I. 5. 2. A influência dos fatores ambientais e outros agentes na etiologia dos TEA.....	44
I. 6. O neurotransmissor serotonina.....	47
I. 6. 1. O gene do transportador de serotonina e sua associação com TEA.....	50
I. 7. Moléculas de adesão celular – integrinas.....	54
I. 7. 1. O gene da integrina $\beta 3$ e sua associação com TEA.....	57
CAPÍTULO II – JUSTIFICATIVA.....	62
II. 1. Justificativa.....	63
CAPÍTULO III – OBJETIVOS.....	65
III. 1. Objetivo geral.....	66
III. 2. Objetivos específicos.....	66
CAPÍTULO IV – ARTIGO 1.....	67
CAPÍTULO V – ARTIGO 2.....	93
CAPÍTULO VI – RESULTADOS ADICIONAIS.....	115
VI. 1. Interação entre os genes <i>SCL6A4</i> e <i>ITGB3</i>	116

CAPÍTULO VII – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	124
CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
CAPÍTULO IX – ANEXOS	147
IX. 1. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	148
IX. 2. Protocolo de pesquisa.....	154
IX. 3. ASQ (<i>Autism Screnning Questionnaire</i>).....	161
IX. 4. CARS (<i>Childhood Autism Rating</i>).....	163
IX. 5. Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders.....	171

LISTA DE ABREVIATURAS

1. GERAL

5-HT	5-hidroxitriptamina
5HTT	transportador do neurotransmissor serotonina
5HTTLPR	<i>serotonin transporter linked polymorphic region</i>
A	adenina
ADI	<i>Autism Diagnostic Interview</i>
ADOS	<i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i>
ASQ	<i>Autism Screening Questionnaire</i>
C	citossina
CARS	<i>Childhood Autism Rating Scale</i>
CDC	<i>Center for Disease Control e Prevention</i>
CNVs	<i>copy number variations</i>
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, quinta edição
DSM-IV-TR	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, quarta edição, texto revisado
G	guanina
GP	glicoproteína
GWAS	<i>genome-wide association studies</i>
IC	intervalo de confiança
Kb	quilobases
La	<i>long</i> (alelo longo com adenina no rs25531)
Lg	<i>long</i> (alelo longo com guanina no rs25531)
Leu	leucina
Mb	megabases
MDR	<i>multifactor dimensionality reduction</i>
miRNA	microRNA
OR	odds ratio
Pro	prolina

QI	quociente de inteligência
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RGD	tripeptídeo Arginina-Glicina-Aspartato
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
S	<i>short</i> (alelo curto)
SNC	sistema nervoso central
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	timina
TEA	transtornos do espectro autista
TGD	transtornos globais do desenvolvimento
TGD-NE	transtorno global do desenvolvimento – não especificado
UTR	<i>untranslated region</i>
Val	valina
VNTR	<i>variable number tandem repeat</i>

2. GENES

<i>AMT</i>	<i>aminomethyltransferase</i>
<i>ANK3</i>	<i>ankyrin 3</i>
<i>CBLN1</i>	<i>cerebellin 1 precursor</i>
<i>CDH10</i>	<i>cadherin 10, type 2</i>
<i>CDH9</i>	<i>cadherin 9, type 2</i>
<i>CHD8</i>	<i>chromodomain helicase DNA binding protein 8</i>
<i>CLCN6</i>	<i>chloride channel, voltage-sensitive 6</i>
<i>CLTCL1</i>	<i>clathrin, heavy chain-like 1</i>
<i>CNTNAP2</i>	<i>contactin associated protein-like 2</i>
<i>DRP2</i>	<i>dystrophin related protein 2</i>
<i>DYRK1A</i>	<i>dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A</i>
<i>EN2</i>	<i>engrailed homeobox 2</i>
<i>FMR1</i>	<i>fragile X mental retardation 1</i>
<i>FOXP1</i>	<i>forkhead box P1</i>
<i>GABRB3</i>	<i>gamma-aminobutyric acid (gamma) A receptor, beta 3</i>
<i>GLUR5</i>	<i>glutamate receptor, ionotropic, kainate 1</i>
<i>GRIN2B</i>	<i>glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B</i>
<i>HTR1B</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B</i>
<i>HTR2C</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C</i>
<i>HTR3A</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A</i>
<i>ITGB3</i>	<i>integrin, beta 3</i>
<i>KIAA0564</i>	<i>von Willebrand factor A domain containing 8</i>
<i>LAMC3</i>	<i>laminin, gamma 3</i>
<i>MACROD2</i>	<i>MACRO domain containing 2</i>
<i>MECP2</i>	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
<i>MET</i>	<i>met proto-oncogene</i>
<i>MTHFR</i>	<i>methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)</i>
<i>MYH9</i>	<i>myosin, heavy chain 9, non-muscle</i>
<i>NCKAP5L</i>	<i>NCK-associated protein 5-like</i>

<i>NLGN3</i>	<i>neuroligin 3</i>
<i>NLGN4X</i>	<i>neuroligin 4, X-linked</i>
<i>NTNG1</i>	<i>netrin G1</i>
<i>OXTR</i>	<i>oxytocin receptor</i>
<i>PAH</i>	<i>phenylalanine hydroxylase</i>
<i>PEX7</i>	<i>peroxisomal biogenesis factor 7</i>
<i>PLD5</i>	<i>phospholipase D family, member 5</i>
<i>POMGNT1</i>	<i>protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 1</i>
<i>POU6F2</i>	<i>POU class 6 homeobox 2</i>
<i>PRKCB1</i>	<i>protein kinase C, beta 1</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>RELN</i>	<i>Reelin</i>
<i>RIPK2</i>	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>
<i>SCN1A</i>	<i>sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit</i>
<i>SCN2A</i>	<i>sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit</i>
<i>SHANK3</i>	<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3</i>
<i>SLC6A4</i>	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 4</i>
<i>SLIT3</i>	<i>slit homolog 3</i>
<i>ST8SIA2</i>	<i>ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2</i>
<i>SYNE1</i>	<i>spectrin repeat containing, nuclear envelope 1</i>
<i>TAF1C</i>	<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, C</i>
<i>TBL1XR1</i>	<i>transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1</i>
<i>TBR1</i>	<i>T-box, brain, 1</i>
<i>TPH</i>	<i>tryptophan hydroxylase</i>
<i>UBE3A</i>	<i>ubiquitin protein ligase E3A</i>
<i>UNC13B</i>	<i>unc-13 homolog B</i>
<i>VPS13B</i>	<i>vacuolar protein sorting 13 homolog B</i>
<i>YWHAZ</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
<i>ZNF18</i>	<i>zinc finger protein 18</i>

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DA INTRODUÇÃO

Tabela 1. Diagnóstico do transtorno autista, de acordo com o DSM-IV-TR

Tabela 2. Diagnóstico do transtorno de Asperger, de acordo com o DSM-IV-TR

Tabela 3. Diagnóstico do transtorno global do desenvolvimento não especificado, de acordo com o DSM-IV-TR

Tabela 4. Anomalias genéticas mais comuns associadas aos TEA

Tabela 5. Os principais genes candidatos associados com TEA

Tabela 6. Principais resultados das análises de exoma e GWAS em estudos com amostras de TEA ou associados a traços ligados ao autismo

Figura 1. Desenho esquemático do gene *SLC6A4* e localização dos polimorfismos estudados

Figura 2. A família das integrinas humanas e suas ligações formando heterodímeros

Figura 3. Desenho esquemático do gene *ITGB3* e localização dos polimorfismos estudados

RESUMO

Os transtornos do espectro autista (TEA) são condições de início precoce, que afetam o neurodesenvolvimento e incluem déficit de interação social e de comunicação, e presença de comportamentos repetitivos e estereotipados. Os indivíduos apresentam ainda diversos sintomas e comorbidades, caracterizando uma grande heterogeneidade clínica. Alterações no sistema serotoninérgico têm sido associadas com os TEA. As modificações nos níveis de serotonina durante o desenvolvimento têm implicações na maturação e formação do sistema nervoso central, principalmente na neurotransmissão e sinaptogênese. O transportador de serotonina (5HTT) parece ser fundamental nesses processos, uma vez que é o principal regulador da função serotoninérgica, através da recaptação da serotonina na fenda sináptica. As moléculas de adesão celular, incluindo as integrinas, também parecem ter um papel importante no neurodesenvolvimento. Entre estas, destaca-se a integrina β_3 , cuja função no desenvolvimento cerebral e no funcionamento e maturação das sinapses já foi observada em vários estudos. Diferentes tipos de evidências mostraram também uma associação desta integrina com o metabolismo da serotonina, principalmente através do 5HTT. Visto que ambos já foram associados aos TEA em alguns estudos, o objetivo do presente trabalho é investigar a influência dos genes do transportador de serotonina (*SLC6A4*) e da integrina β_3 (*ITGB3*) na etiologia, sintomatologia e gravidade dos TEA. A amostra consiste em 209 probandos com TEA idiopático (critérios do DSM-IV) e seus pais biológicos, avaliados no Hospital Clínicas de Porto Alegre e no Departamento de Psicologia da UFRGS. Foram analisados 9 polimorfismos distintos, 4 no gene *SLC6A4* (5HTTLPR, rs2066713, Stin2, rs1042173) e 5 no gene *ITGB3* (rs2317385, rs5918, rs15908, rs12603582, rs3809865). A influência destes polimorfismos em cada gene individualmente foi analisada através de diferentes abordagens: estudo de associação baseado em famílias, análise de sintomas clínicos apresentados comumente por indivíduos com TEA, e em relação à gravidade da doença. Um efeito de interação gene-gene sobre as manifestações clínicas também foi investigado. Nas análises de famílias foram observados resultados positivos para haplótipos de ambos os genes. Contudo, após correção para múltiplos testes, somente a associação do gene *ITGB3* com a doença permaneceu significativa; o haplótipo G- T- C- G- A (polimorfismos na mesma ordem citada acima) foi preferencialmente não transmitido ($p=0.036$), sugerindo um efeito de proteção. Nas

análises dos sintomas, novamente foram encontrados resultados positivos em ambos os genes. Para o *ITGB3*, foram observados efeitos de diferentes SNPs e haplótipos sobre epilepsia e/ou convulsões, agressividade, problemas para dormir e ecolalia. Entretanto, após correção para múltiplos testes, somente o resultado entre ecolalia e o haplótipo rs15908-rs12603582 continuou significativo ($p=0,015$). Investigando o gene *SLC6A4* foram observadas associações nominais entre o rs1042173 e agitação psicomotora, tanto na amostra total como no subgrupo de meninos; já o 5HTTLPR mostrou uma tendência à associação com labilidade do humor, também em meninos. Análises de gravidade considerando os dados obtidos através dos instrumentos ASQ (*Autism Screening Questionnaire*) e CARS (*Childhood Autism Rating Scale*) não detectaram nenhum resultado significativo para o *SLC6A4*, enquanto que para o *ITGB3* a associação observada entre o rs2317385 e o ASQ não se manteve após a correção. Associações nominais também foram observadas nas análises de interação gene-gene, considerando os sintomas de problemas para dormir, ecolalia e agressividade. Ambos os genes parecem influenciar a etiologia e as manifestações clínicas dos TEA na nossa amostra, embora outros estudos sejam necessários para corroborar nossos achados e melhor entender a variabilidade genética dos locos analisados. Acreditamos que a abordagem de estudar subgrupos de pacientes de acordo com a sintomatologia seja válida, e deva ser considerada nas investigações futuras.

ABSTRACT

The autism spectrum disorders (ASD) are early-onset conditions that affect neurodevelopment, include deficit of social interaction and communication, and the presence of repetitive and stereotyped behaviors. Individuals also exhibit several symptoms and comorbidities, featuring a large clinical heterogeneity. Changes in the serotonergic system have been associated with ASD. Modifications in serotonin levels during development have implications in both formation and maturation of the central nervous system, particularly affecting neurotransmission and synaptogenesis. The serotonin transporter (5HTT) seems to be essential in these processes, since it is the major control mechanism of serotonergic function by the reuptake of serotonin in the synaptic cleft. The cell adhesion molecules, including integrins, also appear to play an important role in neurodevelopment. Among these, there is the integrin $\beta 3$, whose role in brain development and function and maturation of synapses has been observed in several studies. Different types of evidence also showed an association between this integrin and serotonin metabolism, mainly through the 5HTT. Since both have already been associated to TEA in some reports, the aim of this study is to investigate the influence of the serotonin transporter gene (*SLC6A4*) and the integrin $\beta 3$ (*ITGB3*) in the etiology, symptomatology and severity of ASD. The sample consists of 209 probands with idiopathic ASD (DSM-IV criteria) and their biological parents, evaluated in the Clinics Hospital of Porto Alegre and the Department of Psychology at UFRGS. We analyzed 9 different polymorphisms, 4 in *SLC6A4* gene (5HTTLPR, rs2066713, Stin2, rs1042173) and 5 in *ITGB3* gene (rs2317385, rs5918, rs15908, rs12603582, rs3809865). The influence of these polymorphisms in each gene was examined using different approaches: family-based association study, analysis of clinical symptoms commonly presented in individuals with ASD, and in relation to disease severity. An effect of gene-gene interaction on clinical manifestations was also investigated. In the families analyses positive results for haplotypes in both genes were observed. However, after correction for multiple testing, only the association of *ITGB3* gene with the disease remained significant; haplotype G-T-C-G-A (polymorphisms in the same order mentioned above) was preferentially not transmitted ($p = 0.036$), suggesting a protective effect. In the symptoms analyses, positive results were found also for both genes. For *ITGB3*, effects of different SNPs and haplotypes on epilepsy and/or seizures,

aggression, sleep problems and echolalia were observed. However, after correction for multiple testing, only the result between echolalia and the haplotype rs15908-rs12603582 remained significant ($p = 0.015$). The investigation of *SLC6A4* gene showed nominal associations between the rs1042173 and psychomotor agitation, in both total sample and male patients subgroup; the 5HTTLPR showed a trend for association with mood instability, also in boys. Analysis of disease severity using data obtained from ASQ (Screening Autism Questionnaire) and CARS (Childhood Autism Rating Scale) did not detect any significant result for *SLC6A4*, although for *ITGB3* a nominal association between rs2317385 and ASQ could be observed. Nominal associations were also verified in gene-gene interaction analyses, with the symptoms of sleep problems, echolalia and aggression. Both genes seem to influence the etiology and clinical features of ASD in our sample, although further studies are needed to corroborate our findings and to better understand the genetic variability of the analyzed loci. We believe that the approach of studying patients' subgroups defined according to symptomatology is valid, and should be considered in future investigations.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

I. 1. TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA: DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

O autismo, ou transtorno autista, é caracterizado como uma desordem do neurodesenvolvimento humano, que se inicia na infância. Apesar de ser mencionado pela primeira vez em 1911 por Bleuler, somente algumas décadas mais tarde Leo Kanner definiu o termo autismo, após a observação de um grupo de crianças com comportamento estereotipado (Kanner and Eisenberg 1957). Atualmente o termo autismo é empregado para caracterizar indivíduos que apresentam comprometimento importante em algumas áreas do comportamento e funcionamento. Dentre as manifestações típicas encontram-se déficit de interação social e da comunicação verbal e não verbal, presença de comportamento repetitivo e estereotipado, e interesses e atividades restritas. A manifestação deste quadro clínico ocorre antes dos três anos de idade (O'Hare 2009).

Os critérios diagnósticos mais observados no campo da pesquisa clínica são identificados através do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 4ª edição revisada (DSM-IV-TR). Segundo este manual, o transtorno autista está incluído no grupo transtornos globais do desenvolvimento (TGD), juntamente com outras 4 categorias diagnósticas: transtorno de Asperger, transtorno global do desenvolvimento não especificado (TGD-NE), transtorno desintegrativo da infância e transtorno de Rett (APA 2000). Devido à heterogeneidade destas patologias, e conseqüente dificuldade de diagnóstico, o termo Transtornos do Espectro Autista (TEA.) tem sido amplamente utilizado, abrangendo o transtorno autista, o transtorno de Asperger e o TGD-NE (O'Hare 2009). Especificamente, o diagnóstico do transtorno autista requer pelos menos seis itens, que estão divididos em três domínios comportamentais. No grupo associado à interação social, pelo menos dois itens devem estar presentes, e nos grupos linguagem e comunicação, e comportamentos e interesses restritos, um item de cada grupo deve estar presente (tabela 1) (APA 2000).

Além desses critérios, mais dois se aplicam e completam o diagnóstico:

- Atrasos ou funcionamento anormal em pelo menos uma das seguintes áreas, com início antes dos três anos de idade: (1.) interação social, (2.) linguagem para fins de comunicação social, ou (3.) jogos imaginativos ou símbolos.

- A perturbação não é melhor explicada por Transtorno de Rett ou Transtorno Desintegrativo da Infância.

Aproximadamente 10% dos autistas apresentam habilidades *Savant*, em diferentes áreas, podendo apresentar múltiplas aptidões (Howlin et al. 2009; Rimland 1978). As habilidades *Savant* estão presentes em indivíduos que possuem déficit intelectual, contudo notável capacidade em certas áreas, como música, memória, cálculo/matemática e arte. Entre os indivíduos com habilidades *Savant*, 50% são autistas, chegando a uma prevalência 200 vezes maior nestes indivíduos, do que em outras patologias em que pode ocorrer retardo mental (Treffert 2009).

Tabela 1. Diagnóstico do transtorno autista, de acordo com o DSM-IV-TR

Critérios para diagnóstico de transtorno autista	
Prejuízo qualitativo na interação social, manifestado por pelo menos dois dos seguintes aspectos:	Prejuízo acentuado no uso de múltiplos comportamentos não-verbais tais como contato visual direto, expressão fácil, posturas corporais e gestos para regular a interação social. Fracasso em desenvolver relacionamentos com seus pares apropriados ao nível do desenvolvimento. Ausência de tentativa espontânea de compartilhar prazer, interesses ou realizações com outras pessoas (por ex., não mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse). Ausência de reciprocidade social ou emocional.
Prejuízos qualitativos da comunicação, manifestados por pelo menos um dos seguintes aspectos:	Atraso ou ausência total de desenvolvimento da linguagem falada (não acompanhado por uma tentativa de compensar através de modos alternativos de comunicação, tais como gestos ou mímica). Em indivíduos com fala adequada, acentuado prejuízo na capacidade de iniciar ou desenvolver uma conversação. Uso estereotipado e repetitivo da linguagem ou linguagem idiossincrática. Ausência de jogos ou brincadeiras de imitação social variados e espontâneos, apropriados ao nível do desenvolvimento.
Padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes aspectos:	Preocupação insistente com um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse, anormais em intensidade ou foco. Adesão aparentemente inflexível a rotinas ou rituais específicos e não-funcionais. Maneirismos motores estereotipados e repetitivos (por ex., agitar ou torcer mãos ou dedos, ou movimentos complexos de todo o corpo). Preocupação persistente com partes de objetos.

O transtorno de Asperger e o TGD-NE apresentam pequenas variações no diagnóstico do transtorno autista, relacionadas à comunicação e ao início da sintomatologia, respectivamente (tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Diagnóstico do transtorno de Asperger, de acordo com o DSM-IV-TR

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

Tabela 3. Diagnóstico do transtorno global do desenvolvimento não especificado, de acordo com o DSM-IV-TR

Critérios diagnósticos para o transtorno global do desenvolvimento não especificado

Prejuízo severo e invasivo no desenvolvimento da interação social recíproca ou de habilidades de comunicação verbal ou não-verbal, ou quando comportamento, interesses e atividades estereotipados estão presentes, mas não são satisfeitos os critérios para um Transtorno Global do Desenvolvimento, Esquizofrenia, Transtorno da Personalidade Esquizotípica ou Transtorno da Personalidade Esquiva. Esta categoria inclui o "Autismo Atípico" — apresentações que não satisfazem os critérios para Transtorno Autista em vista da idade tardia de seu início, apresentações com sintomatologia atípica, sintomatologia subliminar ou todas acima.

Os TEA são considerados heterogêneos, com grande variabilidade de apresentações clínicas, diferindo, entre indivíduos acometidos por esses fenótipos, quanto à gravidade, ao tipo e à frequência de sintomas apresentados, entre outros (Levy et al. 2009). Além das características clínicas necessárias ao diagnóstico propriamente dito, outras manifestações podem estar presentes, como é o caso da ausência de brincadeiras imaginativas ou sua escassez, e interesse por rotinas, mostrando resistência ou sofrimento frente a mudanças ou alterações da mesma. Anormalidades nas habilidades cognitivas frequentemente podem estar associadas ao quadro clínico, e uma capacidade intelectual reduzida pode ou não estar presente (APA 2000; APA 2013; Spence and Schneider 2009). Outras comorbidades incluem desatenção, impulsividade ou outros sintomas do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, dificuldades afetivas (como depressão e ansiedade), agressividade auto e hetero dirigida, problemas gastrointestinais (como refluxo e alimentação seletiva), alterações no sistema imune, apreensão e perturbações do sono (Levy et al. 2009; Newschaffer et al. 2007).

Como há uma notável variação na expressão do fenótipo nos TEA, é essencial diferenciar esta patologia de outros TGD, como o transtorno de Rett ou o transtorno desintegrativo da infância, ambos com precedência diagnóstica sobre o transtorno autista. A distinção entre estas doenças se dá principalmente pela avaliação e percepção dos sintomas do indivíduo. No transtorno de Rett há um padrão característico de desaceleração do crescimento craniano, além de perda das habilidades manuais voluntárias adquiridas

anteriormente e o aparecimento de marcha pouco coordenada. O transtorno desintegrativo da infância apresenta um padrão distinto de regressão, com pelo menos dois anos de desenvolvimento normal anterior (APA 2000).

Apesar da busca por marcadores biológicos e genéticos, capazes de diagnosticar e diferenciar os TEA, ainda não há evidências conclusivas a este respeito, tornando o diagnóstico do transtorno autista e dos demais transtornos que compõem os TEA essencialmente clínico e bastante difícil. O diagnóstico é realizado com base na sintomatologia do paciente. A avaliação geralmente é multidisciplinar, incluindo uma revisão das preocupações do cuidador, descrição de comportamentos, história médica, exames laboratoriais e de neuroimagem e questionários. Normalmente são solicitados exames para investigar condições mais comumente associadas ao transtorno autista, como a pesquisa de X-frágil e de esclerose tuberosa. Embora possam surgir indícios da ocorrência da patologia aos dezoito meses de idade, raramente o diagnóstico é conclusivo antes dos vinte e quatro meses (Levy et al. 2009).

A atualização do DSM para sua 5ª versão, publicada recentemente (APA 2013), parece contornar em parte essa dificuldade, por facilitar o diagnóstico precoce, e assim intervenções em crianças mais novas (Barton et al. 2013; Mazefsky et al. 2013). O DSM-5 modificou a abordagem no diagnóstico dos transtornos associados ao neurodesenvolvimento, reorganizando os critérios em dois principais domínios ao invés de três: A) déficit na comunicação e interação social e interesses; B) atividades e comportamentos repetitivos e restritos. Para o diagnóstico é necessário à presença de três sintomas relacionados ao domínio A, que compreendem: 1) déficit na interação social ou emocional, incluindo a dificuldade de estabelecer e manter conversas, incapacidade de começar uma interação, e problemas de atenção e em partilhar as emoções e interesses com outros; 2) problemas graves em manter relações, desde a falta de interesse para com outras pessoas até dificuldades com brincadeiras e atividades sociais apropriadas à idade; 3) déficit de comunicação não verbal, tais como contato visual, postura, expressões faciais, tom de voz e gestos anormais, bem como a incapacidade de compreender estas manifestações. Além disso, dos sintomas relacionados ao comportamento repetitivo e restrito, pelo menos dois de quatro sintomas devem estar presentes. Estão incluídos nesta categoria: 1) comunicação repetitiva ou estereotipada; 2) adesão às rotinas e a comportamentos ritualísticos, com excessiva resistência a mudanças; 3) interesses

altamente restritos que são anormais em intensidade ou foco; 4) hipo ou hiper-reação a estímulos sensoriais, ou interesse incomum em aspectos sensoriais do ambiente. Os TEA passam a compreender quatro transtornos, sendo adicionado o transtorno desintegrativo da infância àqueles já mencionados anteriormente. Todos estes transtornos possuem similaridades associadas às manifestações clínicas e tratamento, permitindo no DSM-5 a sua inclusão na mesma categoria, com o intuito de facilitar o diagnóstico (APA 2013; Hyman 2013).

Há certa preocupação em relação às mudanças oriundas da atualização do DSM. Alguns estudos têm sugerido uma vantagem dos novos critérios diagnósticos dos TEA, embora pareçam mais rígidos (Barton et al. 2013; Mazefsky et al. 2013). Porém, apesar das reformulações e mudanças do DSM-5 em relação ao DSM-IV, os indivíduos com diagnóstico de TEA irão continuar preenchendo os critérios diagnósticos para estes transtornos. Desta forma, não será necessária uma reavaliação do paciente ou a definição de um novo diagnóstico nas amostras já avaliadas seguindo critérios do DSM-IV (Hyman 2013).

I. 1. 1. Particularidades das manifestações clínicas frequentes nos TEA

Devido à heterogeneidade dos TEA, é importante considerar em mais detalhes as principais manifestações clínicas que comumente ocorrem nessas patologias, que podem ou não estar relacionadas ao seu diagnóstico, ou à presença de comorbidades. Entre estas se destacam a ecolalia, a epilepsia e a ansiedade. Já entre os sintomas são bastante comuns a ocorrência de convulsões isoladas, hiperatividade, agressividade, instabilidade de humor e problemas para dormir. Embora outras doenças neuropsiquiátricas possam apresentar algumas dessas manifestações clínicas, sugere-se que as possíveis rotas neurobiológicas relacionadas às mesmas sejam semelhantes àquelas envolvidas na etiologia dos TEA. A seguir serão abordadas em mais detalhes algumas dessas manifestações clínicas, que serão sempre referidas ao longo do texto pelas palavras “sintoma” ou “sintomas”, independente de serem ou não categorias diagnósticas.

A ecolalia é um transtorno de comunicação, caracterizado por repetição verbal persistente e sistemática, geralmente não adequada ao contexto social na ocasião em que ocorre, mesmo quando há falta de entendimento do que é pronunciado (APA 2000; Schuler 1979). É um comportamento de imitação, descrito em transtornos psiquiátricos, neurológicos e do desenvolvimento. Recentemente, ao comparar diversos grupos de crianças, observaram-se diferenças significativas na presença de ecolalia, mais comum em indivíduos com diagnóstico de TEA do que naqueles com desenvolvimento típico, independente da presença de atraso de linguagem (van Santen et al. 2013). Embora possa variar de acordo com os estudos, a frequência de ecolalia também é mais comum nos TEA comparado a outras patologias; aproximadamente 75% das crianças verbais com esse diagnóstico apresentam ecolalia em algum momento do seu desenvolvimento (revisado por van Santen et al. 2013).

A associação clínica entre TEA e epilepsia é marcante. Em crianças da população em geral a prevalência deste sintoma é de 2-3%, mas nas crianças com TEA é de aproximadamente 25%, embora em ambos os grupos o início seja em geral precoce (Kanemura et al. 2013; Tuchman and Rapin 2002). Uma meta-análise de 2008 indica que a ocorrência de epilepsia nas crianças com TEA pode variar conforme a presença de deficiência intelectual, sendo cerca de 8% nos pacientes sem esse déficit, e de 20% nos pacientes com a presença do mesmo (Amiet et al. 2008). Outros fatores como definição do diagnóstico, idade, sexo e regressão no desenvolvimento podem influenciar na prevalência (Cuccaro et al. 2012; Tuchman and Cuccaro 2011). A epilepsia é caracterizada pela presença de dois ou mais episódios convulsivos, sem motivo aparente, como ocorre em casos de infecções e traumatismos, por exemplo. Esses episódios estão relacionados a uma descarga elétrica anormal dos neurônios, e podem estar associados a comportamentos sociais e adaptativos. Avaliações de neuroimagem podem auxiliar; no entanto, a presença ou ausência de anormalidades não inclui ou exclui definitivamente o diagnóstico de epilepsia (Tuchman and Cuccaro 2011). Convulsões isoladas também são comuns em indivíduos com TEA. A hipótese de que tais manifestações em estágios iniciais da vida (anterior aos 2 anos de idade) estejam associadas a um maior risco de autismo com deficiência intelectual já foi sugerido; no entanto, este assunto ainda carece de investigações (Tuchman and Cuccaro 2011). O conhecimento acerca da epilepsia e das convulsões não permite ainda uma clara relação com a etiologia dos TEA. Entretanto, a

associação entre estas condições é uma das questões mais intrigantes nos TEA, do ponto de vista clínico, refletindo a importância de melhor compreender a mesma através de diferentes abordagens de estudo.

A hiperatividade juntamente com a agressão são alguns dos principais focos no tratamento dos TEA. A hiperatividade pode ser definida como uma agitação psicomotora, caracterizada por excesso de atividade nem sempre relacionada à ocasião (revisado por Douglas et al. 2013), podendo manifestar-se devido a alterações no ambiente ou na rotina do indivíduo. A frequência da agitação psicomotora não é bem estabelecida, principalmente por estar associada a outras manifestações e comorbidades presentes nos TEA. Já a agressividade é frequente em indivíduos com transtornos mentais, do neurodesenvolvimento e psiquiátricos, tratando-se de um sintoma complexo associado com fatores genéticos, neurobiológicos e psicossociais. Existem poucos estudos em indivíduos com TEA, e a frequência estimada de agressividade varia de 35% a mais de 50% (Carroll et al. 2014; Kanne and Mazurek 2011; Mazurek et al. 2013). Esse sintoma pode ser diferenciado em dois tipos: auto e heteroagressão. A autoagressão é caracterizada por comportamentos que produzem danos físicos direcionados a si mesmo, que incluem bater a cabeça, cortes e escoriações; a heteroagressão envolve atos violentos contra outro indivíduo, que podem ocorrer de diferentes formas e com gravidade variada (Tate and Baroff 1966).

Instabilidades emocionais e alterações no humor também estão entre as manifestações clínicas mais comuns dos TEA. Tais condições envolvem a modulação de características temporais e da intensidade das emoções associadas a comportamentos alvos-dirigidos ou adaptativos, isto é, relacionados a mudanças na rotina dos indivíduos. Além disso, podem estar associadas à presença de outras comorbidades. Indivíduos com TEA parecem predispostos a desenvolver perturbações emocionais devido a alterações na estimulação do circuito neural, apresentando reações incomuns em relação à informação sensorial e maior sensibilidade a mudanças (Mazefsky and White 2014). Alterações emocionais são também vinculadas ao funcionamento social nos TEA, mas poucos estudos têm tentado compreender as bases neurais e o processo de regulação destes comportamentos (Mazefsky et al. 2012).

Outras manifestações clínicas podem ainda estar incluídas na apresentação fenotípica dos indivíduos com TEA, com variação na gravidade e quantidade de sintomas.

Além disso, sua presença pode ser temporal, ocorrendo apenas em alguns períodos da vida, e de acordo com o suporte médico e multidisciplinar que o indivíduo recebe. Embora se tenha conhecimento da relevância de todos esses sintomas nos TEA, a avaliação de casos onde há a presença de cada um deles permanece necessária. O aumento do número de estudos considerando este aspecto, com uso de diferentes abordagens, tem como objetivo compreender melhor não só a associação clínica com os TEA, mas também sua possível relação neurobiológica e etiológica, auxiliando, portanto, no entendimento da etiologia dos TEA em si.

I. 2. EPIDEMIOLOGIA

Estudos epidemiológicos sobre o autismo iniciaram-se em 1966, com Victor Lotter. A prevalência, neste período, era de 4,5 para cada 10.000 crianças. A partir de então vários trabalhos buscaram estabelecer a ocorrência dos TEA em diferentes regiões do mundo. Fombonne (2003) e Rutter (2005), entre outros, apontaram uma prevalência entre 20-60 afetados para cada 10.000 indivíduos. Estimativas recentes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Center for Disease Control and Prevention – CDC) indicaram cerca de 1 caso de TEA para cada 68 crianças (ou 14,7 para cada 1.000). Estes dados são baseados em crianças com até 8 anos de idade que vivem nos Estados Unidos (CDC 2014). Nos últimos anos a prevalência de TEA tem aumentado; estima-se um aumento de 23% entre 2006-2008, chegando a 78% se considerarmos um espaço de tempo maior, entre 2002-2008. Esse aumento importante possivelmente está relacionado com a expansão do conhecimento e com a facilidade em identificar indivíduos afetados, e não propriamente com o aumento efetivo do número de casos (CDC 2014). O risco relativo entre sexos é maior em meninos, em cerca de 4:1, e este dado tem se mantido constante. Semelhante aos dados anteriores, levantamentos recentes da população americana apontam 1 menino afetado em 42, e 1 menina afetada em 189 (CDC 2014). Na população brasileira ainda não há dados epidemiológicos sobre a prevalência do transtorno autista ou dos TEA.

Um fator a ser considerado em termos de epidemiologia é a frequência de traços associados ao autismo em indivíduos da população em geral. Estes traços são

caracterizados pela presença de déficits na socialização, comunicação e interesses restritos, mas sem preencher os critérios diagnósticos para os TEA. Alguns autores sugerem a possibilidade de uma distribuição normal destas características na população sem a doença, em cujos extremos estariam os casos com TEA, manifestando intensamente a sintomatologia (Constantino and Todd 2003). Por outro lado, dados de diversos estudos com famílias têm sugerido a presença de um fenótipo ampliado do autismo, que se caracteriza por uma suscetibilidade genética aumentada para o aparecimento dos TEA. Esta ocorreria nos parentes mais próximos de indivíduos com essa doença, manifestando-se principalmente como perfeccionismo, padrões de organização rígidos, dificuldade de linguagem e tendência à introversão, em níveis subclínicos em relação às categorias diagnósticas (Bailey et al. 1998; Dawson et al. 2002; Ingersoll 2010). Provavelmente, o fenótipo ampliado do autismo é herdado de maneira similar aos TEA em si (St Pourcain et al. 2013). Não se sabe ao certo o quanto as ocorrências destes traços influenciam a epidemiologia, contudo, o crescimento de informações sobre os TEA contribui para que os dados de prevalência persistam, dentro do possível, apropriados e autênticos.

I. 3. SÍNDROMES E ANOMALIAS ASSOCIADAS

Múltiplas condições, síndromes e anomalias podem estar associadas ao transtorno autista. Entre as mais comuns observam-se transtornos de desenvolvimento e de comportamento não autistas, condições psiquiátricas e médicas. A deficiência intelectual, determinada através da avaliação dos escores do quociente de inteligência (Q.I.), tem sido diagnosticada aproximadamente em 30-80% dos casos de TEA (Chakrabarti and Fombonne 2001; Chakrabarti and Fombonne 2005; Yeargin-Allsopp et al. 2003). Um levantamento recente do CDC demonstrou que 31% das crianças com TEA apresentaram deficiência intelectual (CDC 2014). Síndromes e anomalias de origem genética também estão entre as condições mais comuns, tanto no transtorno autista como nos TEA. Elas podem estar diretamente associadas à causa da doença ou somente atuar modulando ou intensificando o fenótipo (tabela 4) (Geschwind 2009; Hogart et al. 2010; Levy et al. 2009; Miles 2011). De qualquer maneira, a sua investigação é recomendada para identificar

corretamente casos idiopáticos, e também para um diagnóstico diferencial apurado. O teste para X frágil e a análise de cariótipo convencional são usualmente realizados, com o intuito de afastar as condições de origem genética mais comuns.

Tabela 4. Anomalias genéticas mais comuns associadas aos TEA

Anomalias	%
Anormalidades citogenéticas	2 – 5%
Síndrome Prader-Willi/Angelman	1 – 4%
Síndrome de Down	Até 7%
Deleções nas regiões 2q37, 7q31, 18q, Xp22.3	(?)
Síndrome Smith-Magenis	< 1
Deleções ou duplicações na região 22q13	(?)
Síndrome de Klinefelter (XXY)	(?)
Duplicações da região 7q11.23 (Síndrome Williams-Beuren)	(?)
Deleções da região 22q11 (Síndrome Velo-cardio-facial)	(?)
Duplicação materna na região 15q11-13	~ 2%
Doenças monogênicas	~ 5%
Síndrome do X-frágil	3 – 5%
Esclerose tuberosa	1 – 2%
Síndrome PTEN (macrocefalia)	1 – 17%
Síndrome de Rett/ Mutações no gene <i>MECP2</i>	1%
Neurofibromatose tipo 1	(?)
Síndrome Timothy (autossômica dominante)	(?)
Síndrome Joubert (autossômica recessiva)	(?)
Fenilcetonúria	< 1%
Síndrome Smith-Lemli-Opitz	< 1%
Outras condições metabólicas	(?)

Carter and Scherer (2013); Freitag et al. (2010); Levy et al. (2011); Levy et al. (2009); Miles (2011)

I. 4. NEUROBIOLOGIA

Anormalidades cerebrais, tanto em termos anatômicos como funcionais, podem estar presentes nos diferentes transtornos que compõem os TEA. Especificamente em relação ao autismo, dados dos últimos anos apontam que 40% das crianças com essa patologia apresentam alguma anormalidade cerebral, sendo mais comuns as anomalias da substância branca e do lobo temporal (Boddaert et al. 2009), principalmente relacionadas a alterações funcionais e não estruturais (Zilbovicius et al. 2006). Análises patológicas relatam ainda três tipos de alterações: diminuição do desenvolvimento normal dos neurônios no prosencéfalo do sistema límbico, aparente redução na população de células de Purkinje cerebelares, e mudanças no tamanho e número de neurônios em diferentes regiões cerebrais. Essas observações sugerem atrasos ou desorganizações na maturação neuronal como importante patogênese no autismo (revisado por Pardo and Eberhart 2007). Wegiel et al. (2010) avaliaram o cérebro de indivíduos com transtorno autista e um grupo controle, através de autópsia, fazendo uso de imagens de ressonância magnética e de ferramentas de neuropatologia. Foram observadas displasias no hipocampo, cerebelo e no neocortex, além de indícios da presença de desorganização da massa cinzenta e branca.

Devido à heterogeneidade dos TEA, as tentativas de identificar mecanismos de ação ou rotas metabólicas envolvidas na etiologia e desenvolvimento destas doenças de modo geral não têm tido muito sucesso; sendo assim, atualmente nenhuma característica se sobressai na neurobiologia dos TEA. Estudos indicam que estes transtornos estão relacionados a possíveis alterações neuronais que ocorrem no período pré-natal e pós-natal do desenvolvimento cerebral (DiCicco-Bloom et al. 2006). Para melhor elucidar as hipóteses a respeito do neurodesenvolvimento, as pesquisas têm avaliado o crescimento cerebral, bem como as redes de funcionamento neural, a neuropatologia, a eletrofisiologia e a neuroquímica (Levy et al. 2009). As hipóteses também podem ser avaliadas quanto ao nível da disfunção, sejam celulares, regionais ou sistêmicas (Abrahams and Geschwind 2008).

Recentemente, foi observada uma possível associação inversa entre o crescimento excessivo do cérebro em crianças com TEA e a eficiência da organização deste órgão em adultos (Lewis et al. 2013). Entre os achados das pesquisas que englobam a análise de imagens encontram-se alterações no crescimento do lobo frontal, temporal, cerebelo e das

estruturas límbicas, como a amígdala. É importante salientar que estas regiões estão diretamente envolvidas no desenvolvimento social, na comunicação e nas habilidades motoras. A presença de macrocefalia é notada em cerca de 20-30% das crianças com diagnóstico de TEA, entre os dois e três anos de idade. O aumento do volume cerebral total pode ser notado entre crianças afetadas a partir dos dois aos quatro anos de idade, persistindo na infância, mas não na adolescência. Outras anormalidades dismórficas, como microcefalias, redução do tamanho do corpo caloso, anormalidades na citoarquitetura cerebelar e malformações estruturais cerebrais também podem ser encontradas. A massa cinzenta cortical pode apresentar anormalidade, sugerindo diminuição da celularidade ou da densidade no córtex de crianças com TEA, e não naquelas sem a doença, mesmo apresentando atraso no desenvolvimento normal (revisado por Levy et al. 2009; Miles et al. 2005; Minshew and Williams 2007; Parellada et al. 2013).

Hipóteses acerca de diferentes áreas cerebrais envolvem alterações na histopatologia da região do cerebelo (embora os achados não sejam consistentes), redução na assimetria hemisférica, e conectividade anormal entre regiões cerebrais. Até o momento, nenhuma anormalidade histopatológica foi relatada na região do córtex (Geschwind and Levitt 2007; revisado por Pardo and Eberhart 2007). Porém, em pacientes com TEA são observadas tanto alterações na estrutura como no número de minicolunas nessa região. As minicolunas são estruturas formadas por minúsculos fios de tecido cerebral, têm a capacidade de se desenvolver e de se conectar, processando informações entre elas. Cada minicoluna faz conexões com suas vizinhas, formando colunas, as quais constituem as unidades básicas de integração das informações. Em pacientes com TEA elas são mais numerosas, menores, e mais compactas na sua configuração celular na região frontal e temporal comparados com indivíduos sem a doença (revisado por Pardo and Eberhart 2007).

Em nível celular, o principal foco de estudo está relacionado às sinapses. A presença de disfunção sináptica parece levar a deficiências comportamentais, sendo uma das principais vias envolvidas a da neurotransmissão glutamatérgica. Essa hipótese é apoiada na observação de que a redução da dosagem da proteína codificada pelo gene *GLUR5* (*glutamate receptor, ionotropic, kainate 1*) pode melhorar características relacionadas aos TEA e a síndrome do X frágil, em estudos com ratos (Abrahams and Geschwind 2008; Dolen et al. 2007). Algumas evidências empíricas apontam para a

influência de diferentes sistemas de neurotransmissores além do glutamato, tais como a serotonina e a dopamina (Levy et al. 2009; Miles et al. 2005). Alterações de sinalização, em nível intracelular, também têm sido sugeridas como um possível mecanismo de ação para o desenvolvimento destas patologias. Mutações em canais iônicos que regulam a excitabilidade neuronal e a sinalização de cálcio são associadas aos TEA. Em conjunto, as proteínas envolvidas nestes processos, inclusive na formação de sinapses e de crescimento dendrítico, estão associadas ao aparecimento desse grupo de doenças (Krey and Dolmetsch 2007).

Em relação ao metabolismo e neuroquímica cerebral, pesquisas apontam para um possível processamento anormal da proteína precursora amiloide. Existem ainda trabalhos com modelos animais e estudos com medicamentos, porém os resultados até o momento são inconclusivos. Os fármacos utilizados comumente na prática clínica são efetivos no tratamento de alguns sintomas e comorbidades, contudo não são específicos para os TEA. Alguns destes fármacos, como os inibidores da recaptção da serotonina e os anticonvulsivantes, são empregados com base na sua eficácia em outras patologias ou sintomas normalmente presentes nos TEA, como ansiedade, agressão e epilepsia. Já outros, como o antipsicótico risperidona, são utilizados principalmente devido ao efeito observado na prática, mesmo que a ação primária não esteja relacionada à comorbidade ou sintoma apresentado (Levy et al. 2009; Miles et al. 2005). O avanço nas pesquisas sobre farmacoterapia dos TEA certamente será importante para um maior entendimento dos mecanismos neuroquímicos que atuam nesse grupo de doenças.

Dentre as anormalidades sistêmicas, estudos sugerem o envolvimento da exposição pré-natal à testosterona, a hipocolesterolemia e a hiperativação do sistema imune como fatores que poderiam explicar estas patologias do neurodesenvolvimento (Abrahams and Geschwind 2008). A hipótese de que o colesterol e sua biossíntese possam estar relacionados aos TEA parte da associação observada entre estes transtornos e a síndrome de Smith-Lemli-Opitz, que trata de uma condição genética onde a biossíntese do colesterol é prejudicada (Tierney et al. 2006).

Novas técnicas de neuroimagem têm focado no estudo de redes neuronais específicas, em alterações funcionais de regiões anatomicamente intactas, mas com ativação e conectividade funcional anormais. Os resultados destas pesquisas mostram ausência de integração eficaz das regiões do cérebro e uma ruptura na modulação da

função cerebral em relação a mudanças. O padrão de desconectividade observado em indivíduos com TEA não deve ser relacionado necessariamente com a gravidade da doença, e a influência exata das redes neuronais permanece incerta (Parellada et al. 2013).

A neurobiologia dos TEA, como se percebe pelos dados apresentados, abrange uma grande variedade de regiões e processos cerebrais, com múltiplas alterações já descritas. Essa complexidade aumenta quando se considera os sintomas e comorbidades comuns à doença. Várias destas manifestações clínicas apresentam bases neuronais semelhantes, como é o caso da hiperatividade, agressividade e instabilidade do humor. Suas rotas biológicas envolvem mais de uma via, contudo a influência de neurotransmissores como a serotonina, dopamina, noradrenalina e glutamato parece ser de grande importância para a sua manifestação clínica (revisado por Douglas et al. 2013). Embora não se tenha conhecimento de todas as regiões cerebrais envolvidas nestes casos, esses sintomas parecem estar relacionados a circuitos límbicos e corticais no cérebro, além de regiões do córtex anterior, amígdala, hipocampo, entre outras. Outro sintoma marcante, a ecolalia, é associado a alterações neurológicas no lobo frontal, uma região cerebral significativamente relacionada a graves déficits sociais, emocionais e/ou cognitivos (Courchesne and Pierce 2005; Grossi et al. 2012). A análise de sintomas e comorbidades, assim como endofenótipos (que serão discutidos a seguir) parece ser uma forma interessante de abordar doenças heterogêneas como os TEA. Outras abordagens, possivelmente envolvendo múltiplas rotas biológicas, serão cruciais para o entendimento de como diversos caminhos moleculares agem em conjunto, em nível de sistemas. Assim, no futuro, será importante tentar conciliar as alterações moleculares observadas (envolvendo transmissão sináptica, interação célula-célula, e vias de sinalização intracelular) com os achados histológicos e anatômicos, a fim de elucidar os mecanismos neurobiológicos que embasam o aparecimento dos TEA.

I. 5. ETIOLOGIA DOS TEA

Muitos fatores diferentes podem contribuir para a origem e apresentação fenotípica dos TEA. Embora as síndromes e anomalias genéticas sejam bastante

frequentes, poucos casos podem ser associados a causas genéticas conhecidas. A mais comum destas é a síndrome do X-frágil, sendo responsável pelo fenótipo em 3-5% dos pacientes com TEA. Como é a causa isolada mais frequentemente associada a estes transtornos, tornou-se rotina a pesquisa de mutações no gene *FMRI* (*fragile X mental retardation 1*), fator etiológico da síndrome do X-frágil. A alteração nesse gene ocorre devido a uma expansão de repetição de trinucleotídeos (CGG), sendo que o alelo com a presença da mutação completa, que manifesta a síndrome, apresenta mais de 200 repetições (Goodlin-Jones et al. 2004; Reddy 2005). Expansões menores, caracterizadas por pré-mutações de 55 a 200 repetições de CGG, resultam no excesso de atividade do gene *FMRI*, o que é tóxico para células neurais, mecanismo provavelmente envolvido na neuropatologia dos TEA. Além disso, uma hipermetilação aberrante geralmente ocorre nos alelos que apresentam um número excessivo de repetições CGG, o que leva ao silenciamento do gene (Loesch et al. 2004).

Além da pesquisa para X-frágil, uma das abordagens iniciais para analisar a causa dos TEA envolve a avaliação citogenética convencional. Esta análise pode indicar a presença de síndromes conhecidas, de transposições, deleções, inserções ou outro rearranjo cromossômico. Revisões recentes estimam a frequência destas anormalidades nos pacientes entre 3-5% (Betancur 2011; Reddy 2005). Entre os achados relativamente frequentes estão as deleções nas regiões cromossômicas 2q37 e 7q31, e deleções ou duplicações nas regiões 16p11 e 22q13 (Freitag et al. 2010; Levy et al. 2009). Algumas alterações, como a duplicação materna na região 15q11-13, apesar de não ser tão frequente, tem alta penetrância nos indivíduos com TEA (Hogart et al. 2010).

Na grande maioria dos casos, entretanto, a etiologia multifatorial da doença continua não esclarecida. Vários estudos têm buscado associação com outros fatores genéticos ou agentes ambientais na evolução da doença (Betancur 2011; Miles 2011). Porém, algumas revisões afirmam que somente em cerca de 10-15% dos casos os fatores etiológicos do TEA são identificados, sejam eles os fatores genéticos já mencionados, ou alterações neurológicas ou metabólicas que possam ser corretamente identificadas (Newschaffer et al. 2007; Pinto et al. 2010).

Embora o risco de recorrência entre irmãos seja baixo, entre 2 e 6%, o risco relativo entre irmãos é 20 a 75 vezes maior que a prevalência da doença na população em geral (Levy et al. 2009; Newschaffer et al. 2007; Zilbovicius et al. 2006), o que indica o

envolvimento de fatores genéticos. A maioria dos estudos sugere uma alta herdabilidade, em torno de 80-90%, evidenciando uma influência genética marcante na etiologia da doença (Anderson 2012; Bailey et al. 1995; Ronald and Hoekstra 2011). Os índices de concordância para os TEA variam de 60% a 92%, entre gêmeos monozigóticos e de 0% a 10% entre gêmeos dizigóticos (Bailey et al. 1995; Levy et al. 2009). Entretanto, Hallmayer et al. (2011) concluíram com suas pesquisas que a herdabilidade dos TEA é somente moderada, em torno de 38%, e que fatores ambientais teriam uma influência considerável na etiologia da doença. Foram avaliados gêmeos com transtorno autista e com TEA, de acordo com o gênero. Em geral, comparando com dados previamente publicados, a razão de concordância entre gêmeos monozigóticos foi considerada baixa (50 – 77%), enquanto que entre gêmeos dizigóticos foi considerada alta (21 – 36%).

Essas diferenças sugerem que vários fatores de risco podem interagir, levando ao desenvolvimento dessas patologias. O modelo poligênico multifatorial, onde um grande número de genes e fatores ambientais com efeitos pequenos contribui para a manifestação da doença, é amplamente aceito na literatura (Abrahams and Geschwind 2008). Entretanto, um modelo oligogênico baseado em um estudo de coorte de uma comunidade do Reino Unido, já foi proposto para explicar a origem dos TEA; um pequeno número de genes de efeito moderado atuaria em conjunto, confirmando uma alta herdabilidade para estes transtornos. Porém, ao avaliar os domínios associados aos TEA (social, comunicação, atividades restritas e repetitivas), os autores observaram somente uma covariação modesta entre eles: indivíduos com escores extremos para um dos domínios não necessariamente apresentaram escores semelhantes nos outros domínios. Tal resultado sugere que, de fato, a contribuição genética tanto para o risco de manifestação da doença como para sua apresentação fenotípica resulta de uma suscetibilidade genética conferida pela interação de vários genes, sobre a qual atuam ainda os fatores ambientais (Ronald et al. 2006).

O modelo poligênico multifatorial pressupõe que o efeito dos genes de suscetibilidade se deva a uma série de variantes genéticas comuns. No entanto, alguns aspectos fundamentais dos TEA podem não ser corretamente analisados em modelos deste tipo. Os estudos familiares podem contribuir na identificação de um único fator de efeito maior relacionado a vários aspectos da doença. Análises de alguns dados de famílias com TEA indicam que uma proporção significativa de casos pode ser resultado da atuação dominante de mutações *de novo* (Abrahams and Geschwind 2008). Sugere-se ainda que

estas mutações teriam alta penetrância em meninos e baixa penetrância em meninas, e atuariam principalmente em casos de TEA esporádicos ou sem histórico familiar (Zhao et al. 2007). A alteração funcional individual em genes de grande penetrância poderia ser suficiente para causar a doença, sugerindo que a identificação de variantes raras e de forte impacto também é relevante para o entendimento dos TEA. Contudo, é possível que o efeito fenotípico de uma mutação única dependa do *background* genético em que ela ocorre, o que justifica o estudo deste também (McClellan and King 2010).

A elucidação dos fatores etiológicos em doenças com grande variabilidade clínica como os TEA pode envolver a identificação de endofenótipos (Abrahams and Geschwind 2008). Os endofenótipos são caracterizados como fenótipos “internos” ou “intermediários”, que estão diretamente relacionados a domínios biológicos específicos, representando constructos mais simples para fundamentos genéticos do que a própria doença ou síndrome. Eles não necessariamente refletem efeitos exclusivamente genéticos, podendo também relacionar-se a marcadores ambientais, epigenéticos e multifatoriais. O endofenótipo é associado com a doença na população, contudo é independente da manifestação da doença; é herdável e encontrado em famílias, tanto em membros afetados como não afetados, em escala mais frequente do que na população em geral (Gottesman and Gould 2003). O conceito de endofenótipo, embora sugerido inicialmente em estudos populacionais com insetos (John and Lewis 1966), é geralmente aplicado na genética psiquiátrica, a partir da análise de quadros clínicos da patologia estudada. Os constructos definidos como endofenótipos representariam, então, fenômenos ou traços mais elementares, com base genética mais simples tanto em número de genes envolvidos como em termos de efeitos, e mais fácil de ser identificada quando comparado ao estudo da entidade diagnóstica (Gottesman and Gould 2003). Especificamente para os TEA, os endofenótipos ainda não estão definidos, sendo objeto de discussão na literatura (Viding and Blakemore 2007). Desta forma, a definição de subgrupos de pacientes definidos por algum aspecto clínico, como algum dos sintomas frequentes nos pacientes, pode ser útil para reduzir a heterogeneidade da doença, facilitando a identificação de fatores genéticos.

Com a heterogeneidade genética e sintomatológica presente nos TEA é plausível inferir que tanto as variantes genéticas comuns quanto raras, tem influência sobre a etiologia e desenvolvimento da doença, e que o efeito apresentado pelas mesmas pode variar conforme o *background* genético individual e os fatores ambientais presentes. Com

o conhecimento atual, a definição do modelo que melhor se aplique, e que melhor possa explicar a etiologia dos TEA deve envolver a análise de endofenótipos ou mesmo de subgrupos que apresentam maior homogeneidade clínica. Porém, a hereditariedade independente dos domínios centrais dos TEA também é importante na análise das variantes genéticas, e não deve ser deixada em segundo plano (Anney et al. 2012). A arquitetura genética complexa, assim como sua grande importância tanto na origem da doença como na sua manifestação fenotípica, tem justificado um grande número de estudos na tentativa de identificar os genes relacionados aos TEA, baseados em diferentes tipos de abordagens, os quais são discutidos a seguir.

I. 5. 1. A influência dos genes de suscetibilidade e outros fatores genéticos na etiologia dos TEA

Um dos primeiros tipos de estudo realizados na busca por genes implicados na etiologia dos TEA foram os estudos de ligação. Esses estudos avaliam famílias compostas por vários indivíduos de diversas gerações, verificando a transmissão de um segmento cromossômico de uma geração para outra, e procurando vincular a segregação deste loco com a do fenótipo de interesse. A vantagem destas metodologias é que são capazes de identificar regiões cromossômicas mais amplas, que podem compreender mais de um loco específico, e assim sugerir a influência de diferentes genes. Através deste tipo de estudo, pesquisadores identificaram regiões nos cromossomos 2 e 7, que apresentaram ligação genética sugestiva ou significativa com o transtorno autista. Outras regiões nos cromossomos 1, 5, 16 e 17 demonstraram algumas evidências de ligação genética (Gupta and State 2006). Estudos de revisão posteriores, que incluíram outras pesquisas e resultados novos, listaram as principais regiões cromossômicas identificadas, tais como: 2q37, 7q11.23, 7q31, 15q11-13, 22q11, 22q13 (Freitag et al. 2010). A região 7q é uma área de interesse particular, visto que, além dos dados de ligação genética, foram identificados nesta região vários rearranjos cromossômicos, e genes relacionados à expressão cerebral e com outras funções fisiológicas conhecidas, possivelmente envolvidas na patologia dos TEA (Gupta and State 2006). Estudos de ligação que avaliam em larga escala diferentes

tipos de marcadores ao longo de todo o genoma (varreduras genômicas) também já foram realizados com os TEA, evidenciando resultados positivos nos cromossomos 4, 5, 6, 11, 15 e 20 (Fradin et al. 2010; Liu et al. 2008; Weiss et al. 2009). Embora com alguns resultados interessantes, os estudos de ligação são mais indicados para modelos de herança que pressupõem efeitos genéticos maiores. Desta forma, essas metodologias não têm sido utilizadas nos últimos anos na pesquisa molecular dos TEA.

Grande parte dos estudos descritos na literatura utiliza a abordagem de genes candidatos. Estes estudos envolvem principalmente a investigação de variantes genéticas comuns localizadas em genes associados a rotas metabólicas e processos biológicos possivelmente relacionados aos fenótipos dos TEA. Existem duas metodologias principais nas investigações com genes candidatos, os estudos caso-controle e os estudos baseados em família. Nos estudos caso-controle são comparadas as frequências alélicas e genotípicas em 2 grupos de indivíduos: afetados por determinada doença e não afetados. Especificamente, os estudos em famílias observam a transmissão de alelos dos pais à descendência afetada, comparando os dados observados na amostra com os esperados ao acaso. Este tipo de estudo apresenta vantagem em relação ao estudo caso-controle por evitar a necessidade de pareamento entre as amostras, e o resultado não é afetado pela estratificação populacional (Eley and Rijdsdijk 2005).

Nos TEA, os estudos baseados em famílias são amplamente utilizados devido à influência marcante de aspectos genéticos na doença, indicada pela alta heterogeneidade e pelos dados de recorrência entre irmãos. Mais de 100 genes já foram avaliados em relação a estes transtornos, havendo uma série de resultados positivos. Genes candidatos investigados nos TEA envolvem aqueles que codificam componentes do metabolismo de neurotransmissores, em particular a serotonina e o glutamato; genes do sistema de regulação da migração e das funções neurais; genes que controlam o desenvolvimento de regiões do cérebro e do sistema nervoso central; genes envolvidos na adesão celular neuronal; genes localizados em pontos de quebra cromossômica identificados em pacientes com TEA; genes envolvidos em transtornos da fala e da linguagem; e genes relacionados à cognição e interação social e ao comportamento de modo geral. Na tabela 5 estão descritos os principais genes sugeridos como de suscetibilidade até o momento (Carter and Scherer 2013; Freitag et al. 2010; Miles 2011; Parellada et al. 2013; Persico and Napolioni 2013).

No entanto, a maioria das associações não é conclusiva, e a análise dos dados em conjunto mostra achados conflitantes e inconsistentes entre os estudos. Nenhum resultado se sobressai indicando uma associação mais forte com dado gene, capaz de ser consistentemente replicada. As variantes comuns abordadas por este tipo de estudo geralmente apresentam pequeno efeito, na etiologia ou caracterização da doença. Em populações e patologias heterogêneas e de maior complexidade a detecção de resultados positivos tem relação direta com o tamanho de efeito das variáveis analisadas e com o tamanho da amostra investigada, por vezes dificultando as conclusões do estudo. Por outro lado, a falta de evidências de efeitos funcionais para grande parte das variantes analisadas também pode estar contribuindo para este panorama. O uso de outras metodologias pode, então, complementar os achados de investigações com genes candidatos.

Tabela 5. Os principais genes candidatos associados com TEA

Sistema	Gene	Cromossomo
Desenvolvimento neuronal	<i>EN2</i>	7q36
Adesão celular	<i>CNTNAP2</i>	7q35
	<i>ITGB3</i>	17q21.32
Interação célula-célula	<i>RELN</i>	7q22
	<i>NLGN3</i>	Xq13.1
	<i>NLGN4X</i>	Xp22.33
Maturação neuronal e sinalização celular	<i>SHANK3</i>	22q13.3
Sistema glutamatérgico	<i>GABRB3</i>	15q12
Sistema serotoninérgico	<i>SLC6A4</i>	17q11.2
Metabolismo de ocitocina	<i>OXTR</i>	3p25
Sinalização celular	<i>SCN2A</i>	2q24.3
Crescimento celular	<i>MET</i>	7q31
Controle de ciclo celular	<i>PTEN</i>	10q23.3

* Ver lista de abreviaturas para nomes dos genes por extenso

Neste sentido, os estudos do tipo GWAS (*genome-wide association studies*), que avaliam em larga escala diferentes tipos de marcadores em escala genômica, têm recebido bastante ênfase. Um aspecto muito interessante desses estudos é que eles têm sugerido novos genes e rotas metabólicas para a pesquisa nos TEA, distintos daqueles vinculados às investigações com genes candidatos. Isso ocorre porque não há a necessidade de se definir uma hipótese biológica *a priori*. Porém, o modelo genético doença comum-variante comum, que embasa este tipo de estudo, pode dificultar a replicação dos resultados em patologias muito heterogêneas como os TEA. Poucos achados positivos foram replicados de maneira independente entre os estudos, sempre mostrando um pequeno efeito associado ao risco de desenvolver a doença. Considerando os últimos trabalhos publicados, somente a região 5p14.1 foi associada com TEA em mais de uma investigação. Diferentes SNPs localizados nesta região mostraram resultados positivos de acordo com o nível de significância estabelecido ($p=3,24 \times 10^{-4}$ a $p=3,4 \times 10^{-6}$); a associação mais forte ($p=3,4 \times 10^{-8}$, OR 1,19) foi vista para os genes *CDH10* (*cadherin 10, type 2*) e *CDH9* (*cadherin 10, type 2*), que codificam caderinas responsáveis pela adesão célula-célula (Ma et al. 2009; Wang et al. 2009b). Os demais GWAS realizados até o momento verificaram apenas resultados significativos ou sugestivos que não se repetiram. Na tabela 6 é apresentado um resumo dos principais achados desses estudos, que envolvem genes relacionados a moléculas de adesão celular, sinaptogênese, apoptose, proliferação celular, coagulação, câncer, e ao neurotransmissor glutamato, indicando também algumas regiões intergênicas (Anney et al. 2010; Jones et al. 2013; Ronald et al. 2010; Shi et al. 2013).

O grande número de marcadores analisados nos estudos de GWAS, que pode passar de 500.000, eleva demasiadamente o número de testes, exigindo uma correção bastante rígida dos dados. Os pontos de corte utilizados para a significância estatística são baixos (por exemplo: $P < 5 \times 10^{-8}$) (Wang et al. 2009b), e muito difíceis de serem alcançados em se tratando de genes de pequeno efeito. Isso se reflete na dificuldade de replicação dos dados, também exigindo amostras cada vez maiores para se obter resultados positivos. Por esta razão muitos pesquisadores criticam a grande ênfase dada nos últimos anos ao uso destas metodologias no estudo de doenças complexas. Entretanto, a contribuição das mesmas para a elucidação da base genética dessas doenças, que ocorre principalmente com a sugestão de novas rotas biológicas, confirma a validade desse tipo de estudo.

Análises de exoma, em que se sequenciam todos os exons do genoma em amostras específicas, também têm sido amplamente empregadas nos TEA, tendo como objetivo principal a pesquisa de variantes raras. Alguns achados destes estudos também são apresentados na tabela 6. Várias mutações descritas são associadas com estrutura da cromatina, desenvolvimento do sistema nervoso, sistemas de neurotransmissão glutamatérgico e serotoninérgico, organização e migração celular, regulação de canais de sódio, ubiquitinação e linguagem, entre outros (Bi et al. 2012; Chahrour et al. 2012; Iossifov et al. 2012; Liu et al. 2013; Marchani et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2011; O'Roak et al. 2012a; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012; Toma et al. 2013; Yu et al. 2013). Através da identificação de variantes raras, as análises de exoma também têm colaborado para sugerir o envolvimento de novos genes e novas rotas biológicas na etiologia dos TEA. Os resultados têm permitido ainda, com auxílio de ferramentas de bioinformática, a elaboração de rotas biológicas complexas, integrando os achados inéditos com os genes “clássicos” analisados nos estudos com genes candidatos, o que ressalta a importância desses estudos.

Tabela 6. Principais resultados das análises de exoma e GWAS em estudos com amostras de TEA ou associados a traços ligados ao autismo

Tipo de estudo	Referência
- Variante identificada ^a	
GWAS	
5p14.1	Ma et al. (2009)
5p14.1	Wang et al. (2009a)
<i>MACROD2, KIAA0564, PLD5, POU6F2, ST8SIA2, TAF1C</i>	Anney et al. (2010)
<i>PRKCB1, CBLN1</i> ^b	Jones et al. (2013)
<i>rs11894053, rs17622673, rs12578517</i> ^b	Ronald et al. (2010)
Exomas	
<i>FMRP</i>	Iossifov et al. (2012)
<i>UBE3A, CLTCL1, NCKAP5L, ZNF18</i>	Chahrour et al. (2012)
<i>ANK3, CLCN6, HTR3A, RIPK2, SLIT3, UNC13B</i>	Bi et al. (2012)
<i>MYH9</i>	Marchani et al. (2012)
<i>FOXP1, GRIN2B, SCN1A, LAMC3</i>	O'Roak et al. (2011)
<i>CHD8, DYRK1A, GRIN2B, TBR1, PTEN, TBL1XR1</i>	O'Roak et al. (2012b)
<i>YWHAZ, DRP2</i>	Toma et al. (2013)
<i>AMT, PEX7, SYNE1, VPS13B, PAH, POMGNT1</i>	Yu et al. (2013)
<i>CHD8, KATNAL2</i>	Neale et al. (2012)
<i>CHD8, NTNG1</i>	O'Roak et al. (2012a)
<i>SCN2A</i>	Sanders et al. (2012)
<i>ANK3</i>	Shi et al. (2013)

^a Região cromossômica, gene ou rs; ^b Resultados nominais, sem correção para múltiplos testes; * Ver lista de abreviaturas para nomes dos genes por extenso

A pesquisa de CNVs (*copy number variantions*), outra abordagem que vem sendo bastante utilizada em genética psiquiátrica, envolve a descoberta de variações estruturais raras no número de cópias de segmentos no genoma. Estas podem ser duplicações, inserções ou deleções, herdadas ou não, que variam em tamanho de 1 quilobase (kb) a

vários megabases (Mb). Estudos com diferentes amostras sugerem que as variantes originadas pelas CNVs fazem parte da variabilidade normal do genoma humano (Abecasis et al. 2012). Porém, as mesmas são consideradas um fator de risco para algumas doenças complexas, incluindo os TEA, e sugere-se que os genes envolvidos no comportamento possuam um efeito dose-dependente, de acordo com o número de cópias em que estiverem presentes (Shishido et al. 2013; State and Levitt 2011). Além disso, geralmente possuem forte associação com comprometimento intelectual e dismorfologias. A distribuição de CNVs específicos na população em geral ainda é desconhecida (Abecasis et al. 2012; Levy et al. 2009). Porém, algumas CNVs são observadas mais frequentemente em pacientes com TEA comparado com indivíduos de grupos controle (Freitag et al. 2010). Embora estejam localizadas ao longo de todo genoma, em diferentes cromossomos, alguns exemplos podem ser destacados (Freitag et al. 2010). A duplicação na região do cromossomo 15q11-13 tem sido associada aos TEA, déficit mental, convulsões, alterações comportamentais e de desenvolvimento. Outra alteração frequentemente observada envolve a região 16p11.2, envolvendo tanto duplicações quanto deleções em cerca de 1% dos indivíduos com TEA. Contudo, em ambos os casos, estas alterações não são exclusivas a esses transtornos e podem ser observadas em indivíduos com outro perfil diagnóstico. A frequência das CNVs em indivíduos com TEA, nos diversos estudos já realizados tem se mantido estável, variando entre 5-10%, enquanto que em controles a prevalência fica em torno de 1-2%. Porém, os dados podem variar. Levy et al. (2011) analisaram 28 crianças com TEA (casos) e 62 adultos sem a doença (controles); foram observadas 38 CNVs, sendo que em 100% dos casos com TEA pelo menos uma CNV foi encontrada, enquanto que somente em 11,3% dos controles tais variantes foram descritas. Contudo, 14 CNVs foram comuns a ambos os grupos, 19 observadas somente no grupo de casos, e 5 somente no grupo controle.

Mesmo com essa diferença marcante, é importante salientar que há CNVs comuns entre os dois grupos geralmente avaliados. Recentemente, a mesma CNV relacionada ao risco de autismo e esquizofrenia, foi associada a déficits cognitivos em uma população controle (Stefansson et al. 2013). Por outro lado, estes estudos também são importantes em sugerir ou confirmar novas rotas metabólicas associadas aos TEA, como é o caso da adesão celular neuronal e da ubiquitina (Glessner et al. 2009). As variações descritas usualmente não são transmitidas pelos pais, e podem estar previamente associadas a

síndromes genéticas, como Prader-Wili e DiGeorge, e a outras doenças psiquiátricas, como esquizofrenia (Cook Jr and Scherer 2008; Glessner et al. 2009; Marshall et al. 2008; Pinto et al. 2010; Sanders et al. 2011; Sebat et al. 2007; Shen et al. 2010; Shishido et al. 2013). Acredita-se ainda que, de modo geral, as CNVs não possuam penetrância completa e que seu efeito patogênico possa variar de acordo com a presença ou ausência de outras variações genéticas e mesmo ambientais (Stefansson et al. 2013).

O desenvolvimento de novas técnicas e metodologias na pesquisa em genética molecular tem possibilitado o crescimento de informações e de conhecimento sobre os TEA, permitindo que novas abordagens possam ser utilizadas na tentativa de elucidar sua etiologia. Um estudo interessante, realizado por Poelmans et al. (2013), reuniu os dados obtidos pelas investigações que utilizaram essas diferentes abordagens, na tentativa de fazer uma interpretação mais completa, global e apurada dos mesmos. Os autores avaliaram os resultados de GWAS, CNVs, exomas e outros dados genéticos em análises conjuntas de bioinformática. Através do enriquecimento de redes, foram descritos resultados importantes envolvendo a regulação de esteroides, crescimento de neuritos e sinapses glutamatérgicas. Análises como essa serão de grande valia, já que, congregando e reavaliando resultados de diferentes estudos, conseguem ressaltar as informações mais relevantes.

I. 5. 2. A influência dos fatores ambientais e outros agentes na etiologia dos TEA

Condições médicas não genéticas, relacionadas à etiologia dos TEA, também são conhecidas. Durante a gestação, o uso de drogas ou medicamentos pela mãe está relacionado à ocorrência de prejuízos do neurodesenvolvimento em crianças. O valproato, uma droga antiepilética, está associado ao aumento do risco de ocorrência de crianças com TEA, comparando com crianças não expostas a esta droga durante a gravidez (Bromley et al. 2008). O uso de outras substâncias como a talidomida e o misoprostol (usado no tratamento e prevenção de úlcera gástrica) também foram associados a casos de TEA (Landrigan 2010). O abuso de álcool é considerado um dos fatores associados à presença

de várias alterações e sintomas no recém-nascido. Na gestação, o efeito do álcool pode ser direto, como um teratogênico, ou indireto, associado com a predisposição genética aos TEA e ao alcoolismo. No entanto, nenhum dado epidemiológico encontrou associação entre este fator e o aparecimento destas patologias, somente há relatos de caso, com baixo número de indivíduos avaliados. Efeitos semelhantes são observados quando se avalia o tabagismo e o uso de drogas ilícitas na gravidez (Newschaffer et al. 2007). Fatores obstétricos gerais também parecem estar correlacionados com autismo e TEA, como algumas características da gestação e possíveis complicações do parto e fatores neonatais. Dentre estes fatores pode-se citar idade materna avançada, paridade, presença de sangramento uterino, infecções, cesarianas, incompatibilidade de Rh, baixo peso ao nascer da criança, tempo de gestação (parto prematuro), e baixo índice na escala de Apgar (Newschaffer et al. 2007).

Sabe-se que, através de redes de comunicação que incluem o sistema imune e o endócrino, neurotransmissores, neuropeptídeos e neurotrofinas estão envolvidos no neurodesenvolvimento e na função neural. Alguns estudos já foram realizados, porém a maioria dos resultados não é replicada. A via metabólica que relaciona os TEA com o sistema imune ainda é não é clara, devido às limitações em avaliar os dados obtidos, e a incerteza acerca da natureza dos processos de neurodesenvolvimento acometidos na doença. No entanto, a exposição pré-natal a agentes virais, como a rubéola e o citomegalovírus, tem sido associada com os TEA (Libbey et al. 2008). A análise do fluido cérebro espinhal e do sangue periférico de crianças com transtorno autista tem revelado níveis atípicos de autoanticorpos para antígenos neurais, de imunoglobulinas, de citocinas inflamatórias e de outros marcadores que podem indicar desregulação ou imaturação do sistema imune inato e adaptativo. Fatores endócrinos são avaliados no transtorno autista e em TEA devido a maior incidência de casos em meninos e da associação com outras doenças neuropsiquiátricas. Níveis anormais de hormônios sexuais durante a gestação, principalmente de testosterona, e seus efeitos na estrutura cerebral e no comportamento também chamam a atenção. Desregulação dos hormônios reprodutivos maternos, uso de tratamento para a infertilidade, hormônios do hipotálamo, da pituitária, da adrenal, da tireoide, e hormônios relacionados ao estresse também são considerados relevantes para investigação dos TEA (Newschaffer et al. 2007).

Estudos em animais demonstram que o efeito do contato com metais durante a gestação pode levar a alterações sutis de comportamento e hiperatividade (Newschaffer et al. 2007). Em crianças, alguns metais relacionados a alterações do neurodesenvolvimento também são considerados potenciais desreguladores endócrinos. Estudos têm mostrado efeitos adversos no crescimento e no desenvolvimento infantil na presença de metais como o mercúrio. No entanto, há poucas investigações incluindo pacientes com TEA, e os que existem são inconsistentes. O metabolismo de alguns metais em crianças com TEA revelam um padrão de anormalidade, indicando a presença de estresse oxidativo e de comprometimento na atividade de metilação. Ambas as anormalidades, quando ocorrem, são associadas ao atraso do desenvolvimento e sincronização neuronal e a déficit de atenção (Deth et al. 2008). Um estudo avaliando poluentes do ar encontrou associação moderada de TEA com níveis estimados de metais transportados pelo ar, principalmente de mercúrio, cádmio e níquel, no período do nascimento (Windham et al. 2006). Este mesmo trabalho observou que a exposição materna a solventes, pode contribuir para a ocorrência de TEA, estando ainda relacionada ao surgimento de defeitos de tubo neural, e baixos escores de funcionamento neurocomportamental (Laslo-Baker et al. 2004; McMartin et al. 1998).

Como pode ser visto, diferentes tipos de fatores já foram sugeridos na etiologia dos TEA. Entretanto, na maior parte dos casos fatores genéticos e ambientais parecem atuar em conjunto para produzir o fenótipo. Sabe-se que a interação entre estes fatores é complexa, sendo que a heterogeneidade clínica importante dos TEA só contribui para a complexidade de sua natureza multifatorial. Interações gene-gene (que considerem o efeito de múltiplos loci, efeitos de epistasia entre eles, e também heterogeneidade genética entre os casos) ou gene-ambiente, e ainda fatores epigenéticos que alteram a função do gene estão entre as possíveis áreas de estudos futuros (Levy et al. 2009).

I. 6. O NEUROTRANSMISSOR SEROTONINA

A serotonina foi inicialmente descrita em meados da década de 40 e desde então é relacionada a diferentes funções fisiológicas. Este neurotransmissor é essencial em algumas funções cerebrais, como processamento sensorial, cognitivo, emocional, regulação das respostas autônomas e atividade motora, estando ainda envolvido no controle hormonal da glândula pituitária e hipotalâmica. Desta forma, a serotonina já foi associada à modulação do humor e aumento do estresse, atuando ainda no músculo liso, na regulação gastrointestinal, na agregação plaquetária, no sistema de inibição da dor e no controle motor somático (Lesch et al. 2012; Meneses 1999). A serotonina é uma monoamina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), derivada do aminoácido triptofano a partir de um processo de hidroxilação e subsequente decarboxilação. Sua síntese no cérebro pode ser controlada pela quantidade de triptofano, proveniente da dieta, disponível no fluxo extracelular e que banha os neurônios serotoninérgicos. A regulação da serotonina e das funções serotoninérgicas dependem não somente da quantidade do seu precursor, como também da influência do seu transportador e de seus receptores, distribuídos pelo sistema nervoso central (SNC), bem como de moduladores da transcrição gênica, peptídeos neurotróficos, esteroides e psicotrópicos, e enzimas de metabolização (Hoyer et al. 1994; Lesch and Waider 2012; Smidt and van Hooft 2013).

A influência da serotonina no SNC, especialmente no cérebro, é frequentemente estudada. Os núcleos de rafe são os principais locais nos quais se encontram os neurônios serotoninérgicos, onde ocorre a síntese da serotonina. A partir destes núcleos são enviadas fibras que abrangem várias áreas do cérebro, como o hipotálamo, as estruturas límbicas e o córtex cerebral (Jorgensen 2007; Roth et al. 2004; Ruggiero et al. 1999). O surgimento de neurônios serotoninérgicos é precedido por vários eventos padronizados e induzidos precocemente durante o desenvolvimento, estabelecendo áreas neurais distintas no cérebro posterior, nos eixos antero-posterior e dorso-ventral. Cada área gera tipos específicos de neurônios, e a influência da expressão de diferentes proteínas resulta em grandes mudanças na localização e tamanho de populações neuronais serotoninérgicas, localizadas próximas ao limite mesencéfalo-metencéfalo e no tubo neural. Os genes envolvidos especificamente no desenvolvimento destes neurônios ainda são pouco estudados, principalmente devido ao

fato de que o funcionamento das proteínas implicadas é insuficientemente entendido (Scott and Deneris 2005).

Em geral, a plasticidade é modulada por sinais sinápticos, que incluem estímulos sensoriais, atividades neurais e experiências relacionadas a um evento. Essa plasticidade está associada a alterações em nível celular e molecular, que permitem a modulação de importantes atividades cerebrais. A plasticidade neuronal pode ser exemplificada pela ação da serotonina. Este neurotransmissor está envolvido em atividades morfogenéticas básicas durante o desenvolvimento cerebral e na capacidade adaptativa durante a vida. Diferentes processos ocorrem durante a realização dessas funções, tais como o controle da proliferação, migração e diferenciação de células neurais, crescimento de neuritos, distribuição de axônios, sinaptogênese e sinalização trans-sináptica (Daubert and Condrón 2010; Gaspar et al. 2003). A serotonina está ainda relacionada ao “cérebro social”, que compreende vários processos e atividades em redes neuronais comprometidas na imitação, comunicação e cognição (Amodio and Frith 2006; Carr et al. 2003). As evidências que apontam sua associação com as funções acima descritas acrescentam mais um papel da serotonina no desenvolvimento cerebral, intimamente relacionado à regulação das moléculas de adesão celular. Estas moléculas são componentes da maquinaria celular que auxiliam na conexão de neurônios pré e pós-sinápticos, facilitando a transmissão, a plasticidade sináptica e capacitando a intersecção de circuitos neurais que processam as informações (Dalva et al. 2007; Lesch and Waider 2012; Yamagata et al. 2003).

Alterações intra e interneural no sistema de transmissão da serotonina podem ocasionar pior funcionamento cognitivo e de aprendizagem, e parecem estar relacionados a transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão (Lesch et al. 2012; Meneses 1999). A influência deste neurotransmissor nos TEA é investigada há alguns anos, através de diferentes abordagens. O interesse em avaliar a serotonina nesses transtornos se deve ao menos há três fatores principais, que incluem: sua importância no neurodesenvolvimento, seu papel no tratamento de sintomas, e a presença de alterações dos seus níveis no sangue de pacientes (Cook and Leventhal 1996; Hollander et al. 2005; Mulder et al. 2004; Whitaker-Azmitia 2005).

Estudos de neuroimagem revelaram que o pico da capacidade de síntese de serotonina cerebral ocorre em torno dos dois anos de idade em crianças com desenvolvimento típico, contudo este pico não é observado em crianças com autismo

(Chandana et al. 2005). Considerando o início precoce da sintomatologia, estas alterações podem sugerir uma participação fundamental da serotonina no desenvolvimento e nos processos neuronais anormais que possivelmente contribuem para a etiologia dos TEA. Alterações nos níveis de serotonina, na formação e maturação do SNC podem afetar a neurotransmissão, resultando em possível sinaptogênese e desenvolvimento cerebral anormais (Whitaker-Azmitia 2005).

A hiperserotonemia, ou aumento dos níveis plasmáticos de serotonina, é encontrada em cerca de 30% dos casos com diagnóstico de TEA, e, apesar da grande heterogeneidade da doença, tem sido um dos achados mais consistentes nos estudos (Mulder et al. 2004). Embora a relação não seja bem conhecida, é possível que a concentração desse neurotransmissor nas plaquetas seja proporcional aos níveis encontrados em neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos, pelo menos em algum grau, tanto durante o desenvolvimento como no SNC maduro (Whitaker-Azmitia 2005). Por outro lado, um dos principais sintomas presentes nos TEA foi associado com diminuição de triptofano plasmático: McDougle et al. (1996) demonstraram uma influência da redução deste precursor em vários comportamentos estereotipados em uma amostra de adultos com autismo. A sugestão de que uma diminuição da serotonina possa estar implicada nos sintomas de TEA é corroborada por dados de estudos sobre farmacoterapia. O uso de inibidores seletivos de recaptção da serotonina é frequente no tratamento de sintomas secundários comuns da doença, com melhora significativa nos sintomas de ansiedade, agressão e na presença de rituais obsessivos-compulsivos (Hollander et al. 2005).

Vários estudos genéticos têm buscado definir o papel de polimorfismos associados a genes do sistema serotoninérgico nos TEA, incluindo os codificadores do transportador e dos receptores de serotonina, além daqueles relacionados à síntese e aos processos de neurodesenvolvimento cerebral, como os genes das moléculas de adesão celular. Apesar de alguns resultados contraditórios, estas evidências sugerem uma interessante e valiosa hipótese de que estes genes possam estar envolvidos na etiologia e na progressão dos comportamentos apresentados pelos indivíduos com estes transtornos. No entanto, ainda é necessário um melhor entendimento das proteínas e dos genes relacionados à serotonina, sobretudo sua função durante o período pré e pós-natal, especialmente no início do desenvolvimento do cérebro e do SNC em geral.

I. 6. 1. O gene do transportador de serotonina e sua associação com TEA

O transportador do neurotransmissor serotonina (5HTT) tem sido associado, através de vários estudos, inclusive genéticos, a diferentes condições psicológicas, psiquiátricas e comportamentais. É considerado um dos principais reguladores da função serotoninérgica, através do controle dos níveis sinápticos de serotonina. Após se ligar aos seus receptores na fenda sináptica, a ação do neurotransmissor deve ser finalizada, seja por metabolização, seja por recaptação para o neurônio pré-sináptico. O 5HTT é a molécula transmembrana que faz esta recaptação nos neurônios serotoninérgicos, regulando assim a magnitude e duração da ação sináptica da serotonina (Lesch and Mossner 1998).

O gene codificador do 5HTT (*SLC6A4*) está localizado no cromossomo 17q11.1-q12, tem 14 exons distribuídos em 41,684 pb e codifica uma proteína de 630 aminoácidos. Entre os polimorfismos já identificados neste gene, quatro foram avaliados no presente trabalho, tendo sido selecionados com base nos resultados dos estudos já publicados, nas frequências dos alelos na população e na provável influência sobre a expressão do gene. A distribuição destes polimorfismos ao longo do gene *SLC6A4* é mostrada na figura 1.

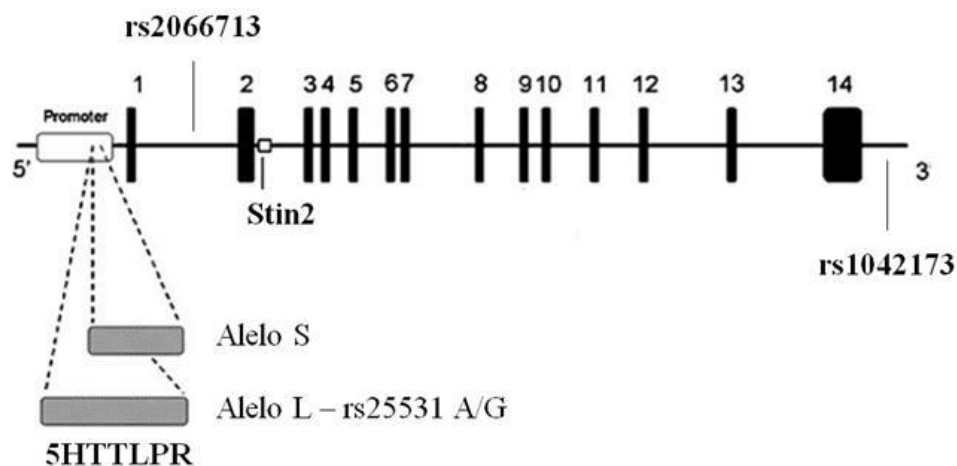


Figura 1: Desenho esquemático do gene *SLC6A4* e localização dos polimorfismos estudados. Os retângulos verticais representam os 14 exons (a espessura indica o tamanho relativo de cada exon); os traços horizontais entre os exons representam os introns; a região promotora é mostrada como um retângulo branco. 5HTTLPR: região promotora; rs2066713: intron 1; Stin2: intron 2; rs1042173: região 3'UTR (adaptado de Watanabe et al. 2011).

O 5HTTLPR (*serotonin transporter linked polymorphic region*), localizado na região promotora, é o polimorfismo mais investigado entre todos os já descritos no gene *SLC6A4*. Ele é caracterizado por uma inserção/deleção de 44 pares de base, com duas variantes comuns denominadas *S* (alelo curto) e *L* (alelo longo) (Heils et al. 1996; Lesch et al. 1994). A variante *L* apresenta ainda uma substituição de A para G (rs25531), sendo em decorrência subdividida em *La* e *Lg*. Em descendentes de europeus o alelo *Lg* tem frequência menor, aproximadamente 10%, em relação aos alelos *S* e *La* (40% e 50%, respectivamente) (Wendland et al. 2008). A forma trialélica deste polimorfismo é frequentemente considerada nos estudos devido a diferenças na transcrição do gene. O alelo *La*, comparado às variantes *S* e *Lg*, é associado com aumento da expressão de RNAm e, conseqüentemente, da captação de serotonina pelo 5HTT ($S < Lg < La$). Em relação aos genótipos, a maior expressão de RNAm do transportador é observada com o genótipo *LaLa*, seguida por *LaLg*, *SLa* (nível intermediário) e *LgLg*, *SLg*, *SS* (nível baixo). Hipoteticamente, o alelo *S* estaria associado com aumento extracelular dos níveis de serotonina (Greenberg et al. 1999; Hu et al. 2006; Nakamura et al. 2010).

Nos TEA, a abordagem mais utilizada é a avaliação deste polimorfismo em estudos de associação, especialmente através dos estudos baseados em famílias. Incluindo amostras de tamanho bastante variado, entre 30 e 130 trios (pai, mãe e probando), os achados têm sido inconsistentes, havendo resultados positivos para diferentes alelos, assim como dados negativos. O alelo *S* foi associado com TEA em 4 estudos, e o alelo *L* em 3 estudos. Já outras investigações, inclusive uma meta-análise recente, não detectaram associação entre o 5HTTLPR e os TEA (Gadow et al. 2013; Huang and Santangelo 2008; Kistner-Griffin et al. 2011; Nijmeijer et al. 2010). Associações com sintomas e endofenótipos foram descritas, ainda que raramente. O alelo *S* foi associado com déficit de comunicação e interação social, e o alelo *L* com presença de movimentos repetitivos e agressividade (Brune et al. 2006). Porém, é importante salientar que a maioria destes trabalhos avaliou a forma bialélica do polimorfismo, o que, de acordo com os dados de estudos de expressão, não seria a forma de análise mais adequada. *S*, *La* e *Lg*. No Brasil, apenas um estudo avaliou 5HTTLPR, já na sua forma trialélica (alelos *S*, *La* e *Lg*), em indivíduos com TEA. Na análise de famílias e no estudo caso-controle não foram detectados resultados positivos. Entretanto, nos indivíduos com TEA, o genótipo *LaLa* foi

associado com presença de labilidade do humor (Longo et al. 2009). O mesmo genótipo foi associado com gravidade da doença e déficit social por Gadow et al. (2013).

A importância do 5HTTLPR nos TEA pode ser observada em outros aspectos, como em relação à neuroanatomia. O volume do córtex cerebral parece ser influenciado pelo genótipo do 5HTTLPR. A presença do alelo *S* foi associada com aumento de volume de massa cinzenta em uma amostra de crianças com TEA, principalmente na região cortical frontal (Wassink et al. 2007). Outras investigações demonstraram a associação deste alelo com menor densidade serotoninérgica no cérebro (Praschak-Rieder et al. 2007) e aumento da amígdala (Hariri et al. 2005). Estudos com modelos animais de TEA, caracterizados por alterações na inervação serotoninérgica e diminuição dos níveis de serotonina, durante o desenvolvimento do córtex observaram aumento da espessura cortical pós-natal, mudanças estas que não se mantiveram no decorrer da vida (Boylan et al. 2007). Raznahan et al. (2009) avaliaram a anatomia cerebral, através da análise do volume da massa cinzenta e branca, de indivíduos adultos com TEA; contudo, não observaram associação entre o polimorfismo 5HTTLPR e alterações cerebrais. Os autores sugerem que esta relação entre o gene *SLC6A4* e a anatomia cerebral possa variar de acordo com a idade, dado os resultados encontrados em outros estudos.

O polimorfismo localizado no intron 2, conhecido como *Stin2*, também é frequentemente avaliado em estudos com TEA. Esse polimorfismo é caracterizado por um número variável de repetições em tandem (VNTR – *variable number tandem repeat*) de uma sequência de 17 pb. Três alelos são possíveis, nomeados de acordo com o número de repetições presentes: alelo 9, alelo 10 e alelo 12, contendo 9, 10 e 12 repetições da sequência de 17 pb, respectivamente (Lesch et al. 1994). O alelo 9 possui uma frequência menor, comparado com os outros dois alelos. Em modelos animais, foi observado que o alelo 12 atua como *enhancer* (acentuador da transcrição), e estaria relacionado ao risco para o aparecimento de TEA (MacKenzie and Quinn 1999). Contudo, os achados dos estudos de associação são inconsistentes. Os poucos resultados positivos observados com as metodologias baseadas em famílias indicaram associação com o alelo 12 individualmente, e com diferentes haplótipos, incluindo tanto o alelo 10 quanto o alelo 12. Já a meta-análise realizada não encontrou associação do *Stin2* com TEA (Brune et al. 2006; Coutinho et al. 2007; Huang and Santangelo 2008).

Os dois polimorfismos de nucleotídeo único, ou SNPs (*single nucleotide polymorphism*) mostrados na figura 1, o rs1042173 e o rs2066713 também já foram avaliados nos TEA. O SNP rs1042173 está localizado na região 3'UTR, e trata da troca de uma timina por uma guanina (g.42944T>G). Análises de bioinformática indicaram esta região como um potencial sítio de ligação para miRNAs (Chen and Rajewsky 2006). Além disso, experimentos com cultura de células demonstraram associação deste polimorfismo com alterações na expressão gênica do *SLC6A4*. Células transfectadas na presença do alelo G apresentaram um aumento nos níveis de RNAm e da proteína transportadora quando comparadas à presença do alelo T (Seneviratne et al. 2009). Entretanto, outro estudo, publicado no ano anterior, relatou resultado antagônico a este; a partir haplótipos contendo este SNP, o alelo T mostrou estar associado ao aumento da expressão de RNAm (Vallender et al. 2008). Até o momento, apenas um estudo de associação em amostras de TEA foi realizado, que não detectou nenhuma influência do rs1042173 sobre a doença (Ma et al. 2010). Porém, a associação deste SNP com dependência de álcool e nicotina, e com comportamento suicida (Enoch et al. 2013; Seneviratne et al. 2013; Seneviratne et al. 2009; Yang et al. 2013), além do seu possível impacto funcional, indica que ele pode ser importante em diferentes fenótipos psiquiátricos, incluindo sintomas presentes nos pacientes com TEA.

Por fim, o SNP rs2066713 (g.16290G>A), localizado no intron 1, já foi associado com TEA e com variação nos níveis de serotonina, apesar de não possuir efeitos funcionais descritos, indicando uma possível influência na etiologia do autismo. Em análises de famílias, ambos os alelos G e A foram associados com TEA, inclusive dependendo da presença ou ausência do histórico familiar destes transtornos. O alelo G foi associado aos TEA na ausência, e o alelo A na presença de histórico familiar (Ma et al. 2010; Valencia et al. 2012; Weiss et al. 2005a).

Os resultados dos estudos genéticos corroboram a influência do sistema serotoninérgico nos TEA, e mais especificamente do 5HTT, sugerindo que as manifestações vistas nestes transtornos possam ser moduladas via este neurotransmissor e seu transportador.

I. 7. MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR - INTEGRINAS

As moléculas de adesão celular são glicoproteínas da superfície celular que medeiam a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. Possuem importante papel no desenvolvimento neural, principalmente na formação e funcionamento de sinapses, exibindo padrões específicos de expressão, que são ativados em certas regiões do cérebro, em certos estágios do neurodesenvolvimento (Luo and Springer 2006).

Entre os diferentes grupos dessas moléculas destacam-se as integrinas, que são receptores de membrana heterodiméricos. A descoberta do receptor de fibronectina caracterizado como uma glicoproteína de superfície celular deu início aos estudos dessas moléculas (Tarone et al. 1982). A fibronectina tem a capacidade de ligar-se a várias substâncias diferentes, desempenhando diversas funções fisiológicas. Especialmente na embriogênese, é responsável pela orientação da migração celular (Duband et al. 1990).

As integrinas consistem de duas subunidades transmembrana que formam um heterodímero não covalente, α e β . Estas subunidades são organizadas em duas famílias distintas que não compartilham homologia, famílias α e β , e que juntas formam a superfamília das integrinas. Em humanos, existem pelo menos 18 subunidades α e oito β (figura 2). Cada integrina liga-se a uma ou várias subunidades específicas, sempre através da ligação $\alpha\beta$. Por exemplo, a subunidade $\beta 1$ tem a maior capacidade de interação, podendo ligar-se a 11 subunidades α diferentes. Já a integrina $\beta 3$ pode formar heterodímeros com a subunidade αV e αIIb (Takada et al. 2007). Embora a distribuição celular e tecidual seja particular para cada uma delas, várias integrinas são expressas, entre outros, em células neuronais, nas sinapses do SNC e são associadas ao seu funcionamento (Chavis and Westbrook 2001; Einheber et al. 1996). Os genes que codificam as subunidades de integrinas estão distribuídos em diferentes cromossomos, de acordo com sua expressão. Por exemplo, os genes das subunidades expressas em leucócitos estão agrupados em 16p11, enquanto que os genes codificadores de integrinas em plaquetas e células endoteliais ocorrem em 17q21.32 (Takada et al. 2007). A análise de astrócitos de tecidos cerebrais em adultos tem demonstrado a presença de várias moléculas, inclusive fibronectina, laminina e integrinas, como a $\alpha IIb\beta 3$ (Archelos et al. 1999).

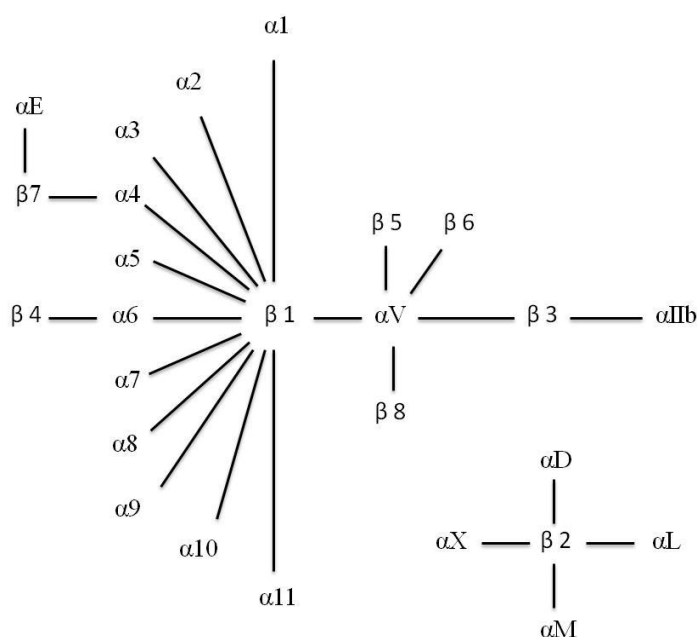


Figura 2. A família das integrinas humanas e suas ligações formando heterodímeros. São conhecidos 24 heterodímeros diferentes em humanos. Cada linha representa uma possível ligação (Takada et al. 2007).

A superfamília das integrinas é o principal mediador das interações entre célula-célula e célula-matriz extracelular. Traduzem de maneira eficiente sinais de, e para, o ambiente extracelular, e deste para a sinalização intracelular e citoesqueleto, ao mesmo tempo em que modulam cascatas de sinalização iniciadas por outros receptores celulares (Schmid and Anton 2003). Essas moléculas reconhecem ligantes da matriz extracelular e da superfície da célula, inclusive motivos de aminoácidos. De acordo com a especificidade dos ligantes, as integrinas podem ser agrupadas em: ligadas a laminina, colágeno, leucócitos e aquelas que reconhecem RGD (tripeptídeo Arginina-Glicina-Aspartato) (Chavis and Westbrook 2001; Einheber et al. 1996). Algumas integrinas ligam-se somente a um tipo de ligante, enquanto que outras se ligam a vários tipos específicos. Através de vários estímulos, regulam a afinidade de ligação dos motivos e entre os ligantes, permitindo condicionar a intensidade de adesão durante interações e migrações celulares (Barczyk et al. 2010; Hynes 1992; Milner and Campbell 2002). Além disso, sua estrutura heterodimérica possibilita alterações conformacionais, o que auxilia as ligações. As análises da estrutura proteica das integrinas, especialmente $\alpha V\beta 3$ e $\alpha IIb\beta 3$, mostram

múltiplos domínios, e mudanças nas suas conformações podem afetar a ligação dos ligantes, na porção extracelular destas moléculas (Takada et al. 2007).

As integrinas não agem apenas como receptores na adesão celular; elas são capazes de transmitir informações sobre a identidade química e o estado físico de seus ligantes nas células (Giancotti and Ruoslahti 1999). Possuem ainda várias funções, relacionadas a organização do citoesqueleto; modulação nas transduções de sinal que controlam funções celulares como migração, proliferação, diferenciação, controle da sobrevivência e motilidade celular; e influência na morfogênese durante o desenvolvimento (Schwartz et al. 1995; Tarone et al. 2000).

Mutações nos genes das subunidades são correlacionadas a várias alterações clínicas em humanos e camundongos, afetando geralmente os mesmos mecanismos. Estudos com camundongos *knockout* para diferentes integrinas revelam que essas moléculas desempenham um papel importante no desenvolvimento, na angiogênese sanguínea e linfática, na formação de trombos, na integridade da pele e nas respostas imunes (Takada et al. 2007). Particularmente, camundongos *null* $\beta 3$ apresentam perdas embrionárias, defeitos na placenta, funcionamento anormal de osteoclastos, aumento na formação de vasos e tumores, e déficits na aprendizagem e formação da memória (Hodivala-Dilke et al. 1999; McHugh et al. 2000; Milner and Campbell 2002; Taverna et al. 2005; Taverna et al. 2004). Mutações nas integrinas α I**IIb** e $\beta 3$ são associadas com a trombastenia de Glanzmann, doença caracterizada por disfunção plaquetária e hemorragia (Hogg and Bates 2000).

Devido à gama de funções e processos vinculados às integrinas, as interações entre estas e seus ligantes têm sido analisadas com o intuito de desenvolver novos medicamentos. Um exemplo destes estudos é a utilização do anticorpo anti- $\beta 3$, que dificulta a ligação entre a integrina α I**IIb** $\beta 3$ das plaquetas com o fibrinogênio, ativador desta integrina, atuando, então, na prevenção de trombose (Gabriel and Oliveira 2006).

I. 7. 1. O gene da integrina $\beta 3$ e sua associação com TEA

Estudos genéticos, principalmente GWAS e de exomas, têm demonstrado a influência desta classe de moléculas em amostras de TEA, com a ocorrência de um número expressivo de genes envolvidos (Anney et al. 2010; Ye et al. 2010b).

A integrina $\beta 3$ (ITGB3) pertence à classe das integrinas ligadas ao tripeptídeo RGD e é descrita como uma glicoproteína IIIa (GP IIIa), que consiste na subunidade beta do complexo GP IIb/IIIa (α IIb β 3). Este complexo funciona como receptor de proteínas de adesão na membrana de plaquetas. Outro complexo formado pela GP IIIa é a integrina α V β 3, que é expressa na superfície de neurônios. A atividade da ITGB3 está, então, implicada principalmente com a agregação plaquetária e com o desenvolvimento e funcionamento cerebral (Chavis and Westbrook 2001). Esta molécula parece estar associada também ao funcionamento das sinapses. Chavis and Westbrook (2001) analisaram a sinalização na fenda sináptica, entre os terminais pré e pós-sinápticos, essencial para o desenvolvimento e funcionamento das sinapses, sugerindo que as interações bidirecionais poderiam envolver moléculas de adesão celular. Análises *in vitro* demonstraram que as integrinas, em especial a ITGB3, são essenciais para a maturação das sinapses no hipocampo, participando da formação de neuritos e da plasticidade sináptica.

Através de diferentes abordagens foi possível inferir que a ITGB3 está associada com a neurotransmissão serotoninérgica, inclusive por meio de interação com o 5HTT. Estudos *in vivo* e *in vitro* relacionam variantes da ITGB3 com o aumento da expressão do transportador e da recaptção de serotonina, sugerindo que esta molécula possa estar envolvida na atividade dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (Carneiro et al. 2008; Whyte et al. 2013; Ye et al. 2010a). Um estudo com camundongos mostrou que a deficiência para o 5HTT estava associada com alterações na agregação plaquetária. Observou-se que o fibrinogênio, ativador da α IIb β 3, aumenta a atividade de 5HTT nas plaquetas através de uma interação desta integrina com a porção C terminal do transportador. Estes dados foram corroborados na análise de camundongos *knockout* para a ITGB3, em que foi verificada uma diminuição da atividade do 5HTT nas plaquetas, e por análises de cultivo celular em que, na presença de uma integrina $\beta 3$ ativada, foi verificada um aumento na atividade de 5HTT (Carneiro et al. 2008). A partir destes resultados em plaquetas, sugere-se a ocorrência de mecanismo semelhante em neurônios, implicando em

efeitos na atividade sináptica devido à influência da ITGB3 e da sua interação com o sistema serotoninérgico. Whyte et al. (2013) sugerem que a ITGB3 modula o sistema serotoninérgico em nível sináptico através do heterodímero $\alpha V\beta 3$, que é expresso em membranas pós-sinápticas.

Em um importante estudo de associação e ligação em larga escala genômica, o gene da ITGB3 (*ITGB3*) foi identificado como um loco de característica quantitativa (QTL – *quantitative trait locus*) para os níveis de serotonina no sangue (Weiss et al. 2004). Estudos subsequentes, do mesmo grupo de pesquisa, revelaram que esta associação observada é sexo específico, sendo mais fortemente correlacionada em meninos do que na amostra em geral (Weiss et al. 2005a; Weiss et al. 2005b) e com autismo (Weiss et al. 2006a). Estudos genéticos também mostram uma interação específica entre o 5HTT e a ITGB3. Dados de expressão, de humanos e ratos, revelaram correlação positiva entre os genes *ITGB3* e *SLC6A4*. Do mesmo modo, a variação genética do *ITGB3* foi associada com a expressão tanto de *ITGB3* como de *SLC6A4*. Evidências deste estudo apontam ainda uma interação entre polimorfismos de ambos os genes na suscetibilidade ao autismo (Weiss et al. 2006b). Alterações no comportamento social e repetitivo em camundongos *knockout* para o *ITGB3* também foram observadas (Carter et al. 2011), assim como diferenças no volume de áreas cerebrais associadas com autismo e com sistema serotoninérgico, como corpo caloso, hipocampo, amígdala e lobos frontal e parietal-temporal (Ellegood et al. 2012).

Com base nessas evidências alguns estudos genéticos têm procurado detectar a influência de variantes do gene *ITGB3* nos níveis de serotonina e nos TEA. Este gene está localizado no cromossomo 17q21.3, aproximadamente a 20cM do gene *SLC6A4*, possuindo 15 exons distribuídos em 90,451 pb. Vários polimorfismos em diferentes regiões ao longo do gene têm sido associados com TEA, tanto através da análise de famílias como de análises caso-controle (Coutinho et al. 2007; Ma et al. 2010; Singh et al. 2013; Weiss et al. 2006b). No presente trabalho, foram avaliados cinco polimorfismos. A seleção das variantes foi estabelecida com base nos resultados positivos de estudos prévios, na possível influência sobre a expressão do gene, na frequência dos alelos descritos em populações de descendentes de europeus e na localização, de modo que ficassem distribuídos em diferentes regiões do gene. Essa distribuição é apresentada na figura 3.

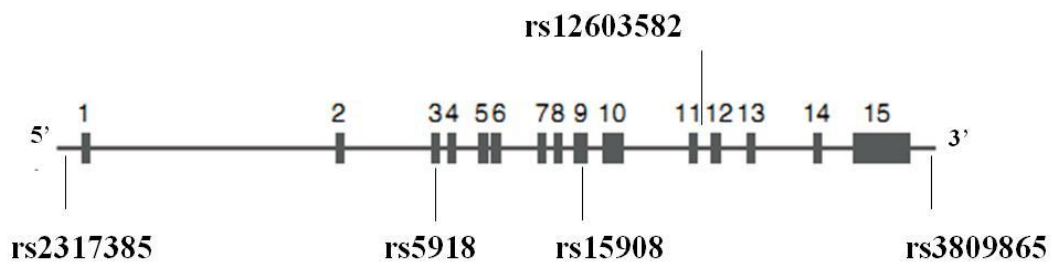


Figura 3: Desenho esquemático do gene *ITGB3* e localização dos polimorfismos estudados. Os retângulos verticais representam os 15 exons (a espessura indica o tamanho relativo de cada exon); os traços horizontais entre os exons representam os introns; a região 5' UTR é representada no traço anterior ao exon 1. rs2317385: região 5'UTR; rs5918: exon 3; rs15908: exon 9; rs12603582: intron 11; rs3809865: região 3'UTR. Adaptado de Weiss et al. (2006a).

A variante mais abordada pelos estudos com TEA é o rs5918 (posição 34523T>C), localizado no exon 3. Trata-se da troca de uma leucina por uma prolina na posição 33 da proteína (Leu33Pro). Até o momento sua influência funcional é apenas sugerida, devido à troca de aminoácidos. O mesmo ocorre com o SNP rs3809865, localizado na região 3'UTR. Análises de bioinformática indicam a presença de dois miRNAs (hsa-mir-124 e hsa-mir-506) próximos ao local deste polimorfismo, sugerindo que um efeito deste SNP na expressão do *ITGB3* através da interação com estes elementos (Ma et al. 2010; Zhang et al. 2013). As outras variantes comuns analisadas em diferentes estudos com TEA, inclusive as selecionadas para esta investigação, não apresentam dados marcantes acerca da possível influência na expressão do gene *ITGB3*. Estudos funcionais que envolvam estes SNPs, seja com modelos animais ou cultura de células, não foram ainda realizados. Entretanto, os estudos de associação mostram resultados interessantes.

O SNP rs5918 foi associado com diferentes fenótipos, incluindo níveis de serotonina, autismo, trombose, fraturas e doenças coronarianas. Particularmente, o alelo 33Pro tem sido associado com o aumento dos níveis plasmáticos de serotonina, em controles e em indivíduos com TEA. Contudo, em análises de família, o alelo Leu foi associado com autismo e com TEA, por Weiss et al. (2006a) e Singh et al. (2013). Um efeito de interação com o gene *SLC6A4* tanto nos níveis de serotonina como nos TEA foi sugerido por Ma et al. (2010) e Coutinho et al. (2007). Outros estudos semelhantes, contudo, falharam em detectar tais associações (Coutinho et al. 2007; Goldschmidt-

Clermont et al. 1999; Pastinen et al. 1998; Tofteng et al. 2007; Weiss et al. 1996; Weiss et al. 2005b; Weiss et al. 2006a).

O polimorfismo localizado no exon 9, rs15908 (42130A>C, Val381Val) tem sido associado, assim como o SNP anterior, aos níveis de serotonina e com autismo. O alelo C está relacionado ao aumento dos níveis de serotonina em controles e em casos com TEA. Estudos de famílias não observaram a influência isolada deste SNP sobre a etiologia da doença, contudo, uma interação significativa com o gene *SLC6A4* foi observada. Em indivíduos com TEA heterozigotos para o polimorfismo 5HTTLPR (genótipo *SL*), o alelo A do rs15908 foi mais transmitido do que seria esperado ao acaso. Outro gene do sistema serotoninérgico (*TPH – tryptophan hydroxylase*) também foi associado aos TEA a partir de uma análise de interação de diferentes polimorfismos com o rs15908 do gene *ITGB3*. O alelo sugerido como de risco para a etiologia da doença é diferente conforme a interação testada (Coutinho et al. 2007; Ma et al. 2010; Singh et al. 2013; Weiss et al. 2006a; Weiss et al. 2006b). A trombastenia de Glanzmann, um transtorno relacionado a hemorragias, também já foi associado a este SNP (Jin et al. 1996). Entretanto ainda não foi possível determinar claramente de que maneira ocorre a influência desta variante na expressão do gene.

Outros três SNPs, rs2317385 (3475G>A, na região 5'UTR), rs12603582 (51370G>T, no intron 11) e rs3809865 (62379T>A, na região 3'UTR) também já foram investigados em relação aos TEA e/ou metabolismo de serotonina. O alelo G do rs2317385 foi correlacionado com diminuição dos níveis de serotonina em indivíduos com e sem diagnóstico de TEA. Entretanto, outro estudo em pacientes com TEA demonstrou níveis elevados deste neurotransmissor em heterozigotos, e níveis intermediários em homozigotos GG. Análises de famílias com TEA não detectaram nenhum resultado positivo com este SNP (Napolioni et al. 2011; Weiss et al. 2006a). O rs3809865 foi associado com TEA em um dos primeiros trabalhos que avaliou ambos os genes *SLC6A4* e *ITGB3*, encontrando uma interação entre o rs1042173 do *SLC6A4* e o rs3809865 do *ITGB3* em uma amostra de indivíduos com autismo (Mei et al. 2007). Além de um efeito isolado do rs3809865, uma interação entre o *SLC6A4* e este SNP foi novamente observada por Ma et al. (2010), usando como covariável nas análises gênero e história familiar. Somente o rs12603582 não apresenta resultados positivos prévios com serotonina e/ou TEA. Porém, Napolioni et al. (2011) sugerem uma influência deste SNP sobre os TEA devido aos resultados *borderline*

obtidos em análises de famílias. Este estudo verificou também o efeito de outros polimorfismos presentes no *ITGB3*, tanto sobre o autismo em si como sobre endofenótipos sugeridos. A análise de haplótipos encontrou uma associação com autismo no estudo de famílias, e marcadores individuais foram associados com parto pré-termo e com níveis de serotonina em TEA.

Considerando todos os estudos realizados até o momento, somente dois trabalhos não detectaram nenhuma influência de variantes genéticas do gene *ITGB3* sobre a suscetibilidade aos TEA (Cochrane et al. 2010; Valencia et al. 2012), reforçando a hipótese de que a integrina *ITGB3* tem influência sobre esses transtornos. Como a maioria desses estudos envolve a interação entre os genes *ITGB3* e *SLC6A4*, sugere-se que tal influência seja modulada pela serotonina, mais precisamente pela interação com o gene *SLC6A4*. Porém, um efeito individual do gene *ITGB3* também é plausível. Todas essas questões precisam ser investigadas, de modo a compreender melhor o envolvimento desta integrina na etiologia dos TEA.

CAPÍTULO II – JUSTIFICATIVA

II. 1. JUSTIFICATIVA

Como descrito anteriormente, a etiologia dos TEA ainda não está clara, e os resultados dos estudos têm sido, em sua maioria, inconsistentes e não replicados. Mesmo em relação ao gene *SLC6A4*, um dos principais genes investigados nos TEA, os estudos ainda são poucos, limitados a alguns polimorfismos e com resultados inconclusivos. Isso contrasta com as evidências que sugerem o envolvimento do metabolismo serotoninérgico na neurobiologia desses transtornos, indicando a necessidade de novas investigações com o gene *SLC6A4*, levando em conta diferentes variantes individualmente e em conjunto, assim como aspectos da sintomatologia dos TEA.

Os últimos estudos em larga escala do genoma sugerem influência de variantes relacionadas ao desenvolvimento do SNC nos TEA, como as moléculas de adesão celular. Embora os resultados obtidos por estes estudos geralmente não sejam replicados, as hipóteses levantadas são importantes para o entendimento dos transtornos. Isso pode ser visto pelos resultados interessantes, embora reduzidos, que já foram obtidos nos estudos de associação com moléculas de integrinas, especificamente a integrina $\beta 3$. A maior parte destes estudos avaliou um possível efeito do gene *ITGB3* em interação com o *SLC6A4*; os resultados, entretanto, são bastante controversos e precisam ser confirmados. Além disso, embora a análise de interação de diferentes sistemas e genes seja fundamental em doenças complexas, existe uma lacuna que deve ser preenchida no que diz respeito ao possível efeito individual do gene *ITGB3*.

No Brasil, praticamente não há estudos sobre os possíveis fatores que influenciam a etiologia dos TEA. Especificamente em relação a estudos genéticos, há poucas publicações sobre a susceptibilidade a estas patologias, com foco principal no metabolismo do neurotransmissor serotonina (Longo et al. 2009; Orabona et al. 2009) e do folato (dos Santos et al. 2010), e com resultados diversos. Longo et al. (2009) não encontraram associação entre TEA e o polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* através de uma abordagem baseada em famílias. Contudo, este polimorfismo parece influenciar a expressão fenotípica dos TEA, já que um dos genótipos foi mais frequente entre os pacientes que apresentavam instabilidade do humor. Orabona et al. (2009) avaliaram a influência de diferentes polimorfismos em genes codificadores dos receptores 1B e 2C de serotonina (*HTR1B* e *HTR2C*, respectivamente) sobre os TEA. Através de uma análise de

famílias, foi verificada uma transmissão diminuída de um dos haplótipos no loco *HTR1B*, sugerindo associação com este gene. Em relação ao metabolismo do folato, dos Santos et al. (2010), estudando o polimorfismo funcional C677T do gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), não encontraram qualquer associação, seja na comparação entre casos e controles, seja na comparação de diferentes comportamentos autistas entre os pacientes com TEA.

Dada a escassez de pesquisas sobre o tema no Brasil, o número reduzido de estudos com ambos *SLC6A4* e *ITGB3* na literatura e a inconsistência dos achados relatados até o momento, percebe-se a necessidade da realização de novos estudos de associação com TEA. Estes devem considerar a heterogeneidade clínica, (neuro)biológica e etiológica da doença, e utilizar diferentes abordagens que contemplem esses aspectos, tais como o estudo de subgrupos de pacientes, de endofenótipos, e análises de efeito gênico individual x efeitos de interação. Todos esses esforços são necessários para se tentar elucidar a complexa arquitetura genética que embasa a origem e manifestação fenotípica dos TEA. Um maior entendimento desses mecanismos certamente contribuirá para um atendimento mais diferenciado dos pacientes e suas famílias, o que certamente se refletirá na sua qualidade de vida.

CAPÍTULO III – OBJETIVOS

III. 1. OBJETIVO GERAL:

- Investigar a influência de diferentes variantes genéticas na origem dos transtornos do espectro autista e em diferentes manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos com este diagnóstico

III. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar a possível influência de diferentes polimorfismos dos genes *SLC6A4* e *ITGB3*, individualmente e em haplótipos, no diagnóstico de TEA, a partir de um estudo de famílias de probandos com esses transtornos;
- Investigar a possível influência destas variantes genéticas, individualmente e em haplótipos, nas manifestações clínicas mais comuns em probandos com TEA;
- Investigar a possível influência dos polimorfismos testados sobre os escores de gravidade dos TEA;
- Verificar a possibilidade de um efeito de interação entre os genes *SLC6A4* e *ITGB3* sobre as manifestações clínicas mais comuns em probandos com esses transtornos.

CAPÍTULO IV – ARTIGO 1

Manuscrito finalizado a ser submetido em periódico científico

Association of *ITGB3* gene variants with ASD diagnosis and symptomatology

Jaqueline Bohrer Schuch¹, Diana Muller¹, Renata Giuliani Endres², Cleonice Alves Bosa²,
Dânae Longo¹, Lavinia Schuler-Faccini¹, Josiane Ranzan³, Michele Michelin Becker³,
Rudimar dos Santos Riesgo³, Tatiana Roman^{1*}

¹Department of Genetics, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul,
Brazil

²Department of Psychology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

³Child Neurology Unit, Clinics Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande
do Sul, Brazil

***Corresponding author:**

Prof Tatiana Roman
Department of Genetics, Caixa Postal 15053
Federal University of Rio Grande do Sul
91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil
tatiana.roman@ufrgs.br
troman29@yahoo.com.br
Phone: +55 51 3308 9795

Abstract:

Autism spectrum disorders (ASD) represent a group of very complex early-onset neurodevelopmental diseases. In this study, we analyzed 5 SNPs (rs2317385, rs5918, rs15908, rs12603582, rs3809865) at the β 3 integrin locus (*ITGB3*), which has been suggested as a possible susceptibility gene, both as single markers and as part of haplotypes in 209 ASD children and their biological parents. We tested for association with the following: a) DSM-IV ASD diagnosis; b) clinical symptoms common in ASD patients (repetitive behaviors, echolalia, seizures and epilepsy, mood instability, aggression, psychomotor agitation, sleep disorders); and c) dimensional scores obtained with the Autism Screening Questionnaire and the Childhood Autism Rating Scale. These hypotheses were investigated using family-based tests, logistic regression models and analysis of covariance. The family-based tests showed a trend for an association with rs15908 ($p=0.067$; $p_{\text{corr}}=0.335$) and an association with the H5 haplotype, which was transmitted less often than expected by chance ($p=0.006$; $p_{\text{corr}}=0.036$). The analyses of the clinical symptoms showed a trend for an association with rs12603582 ($p=0.008$; $p_{\text{corr}}=0.064$) and positive results for the haplotype composed of rs15908 and rs12603582 ($p_{\text{glcorr}}=0.048$; $p_{\text{indcorr}}=0.015$), both for symptoms of echolalia. Other nominal associations with different variants were found and involved epilepsy/seizures, aggression symptoms and higher ASQ scores. Although our positive results await replication before any conclusions can be drawn, they suggest small effect associations of the *ITGB3* gene with both ASD diagnosis and symptoms of echolalia. Other studies are nonetheless needed to fully understand the involvement of this locus on ASD and its different clinical aspects.

Key-words: autism, ASD, *ITGB3* gene, symptomatology, echolalia, association

Introduction:

Autism spectrum disorders (ASD) are early-onset neurodevelopmental conditions characterized by impairments in communication and social interaction as well as repetitive and stereotyped behaviors. ASDs are comprised of autism disorder, Asperger disorder and pervasive development disorder-not otherwise specified (PDD-NOS) (O'Hare 2009). Although the core symptoms are the same, they these are very complex and heterogeneous diseases with a wide variety and severity of clinical manifestations. Among these, mood instability, aggression (self-directed and/or toward others), repetitive and restrictive behaviors, seizure episodes, and comorbidity with echolalia, epilepsy, sleep disorders and attention deficit/hyperactivity disorder are markedly common in probands with ASD (Grossi et al. 2012; Mazefsky et al. 2013; Kanemura et al. 2013; Levy et al. 2009; Rutter 2013; Bishop et al. 2013).

In the last few years, data on the prevalence of ASDs in the population has changed across studies, but recently published data by the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network estimated that 1 out of 88 children are affected with ASDs (CDC 2012). Only approximately 15% of ASD cases could be associated with known genetics causes, such as fragile X syndrome and maternal duplication in the region 15q11-13. Most cases have a multifactorial origin, with the involvement of both genetic and environmental factors in their etiology (Betancur 2011). Although Hallmayer et al. (2011) suggest that environmental factors could explain approximately 55% of autism, the majority of twin studies indicate that ASDs are among the most strongly genetic behavioral conditions, with an estimated heritability of up to 80% (Ronald and Hoekstra 2011).

Changes in the concentration of plasma serotonin are one of the most consistent results in ASD pathophysiology, with patients usually showing higher levels of platelet serotonin (Cook and Leventhal 1996; Mulder et al. 2004). Although the relationship is not well known, the concentration of this neurotransmitter in platelets can be somewhat proportional to the levels in presynaptic serotonin neurons, both in the mature central nervous system and during its development; thus, changes in serotonin levels could affect neurotransmitter function and consequently result in abnormal synaptogenesis and brain development (Whitaker-Azmitia 2005).

New approaches, such as genome-wide association studies (GWAS), have revealed novel biological pathways in addition to serotonergic neurotransmission. For

example, protein-protein interactions, signaling and cellular communication have been shown to be associated with ASD (Anney et al. 2010). Among neural cell adhesion molecules, $\beta 3$ integrin (ITGB3), which mediates cell-cell and cell-matrix adhesion, appears to be interesting because several studies demonstrated the interaction of this molecule with serotonin, leading to changes in its plasma levels (Weiss et al. 2004; Weiss et al. 2005). Furthermore, subsequent studies *in vivo* and *in vitro* have shown that variants of ITGB3 are associated with an increase in both the expression of the serotonin transporter and the uptake of serotonin, suggesting that $\beta 3$ integrin might be involved in selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) activity (Carneiro et al. 2008; Ye et al. 2010; Whyte et al. 2013). This group of drugs has been successfully used to treat symptoms, such as aggression and anxiety, commonly observed in ASD patients, (Hollander et al. 2005). ITGB3 is likewise involved in platelet aggregation, brain development and functioning, which are also associated with autism (Chavis and Westbrook 2001; Weiss et al. 2006b; Coutinho et al. 2007; Napolioni et al. 2011; Singh et al. 2013; Weiss et al. 2006a; Mei et al. 2007; Ellegood et al. 2012). This association can be further corroborated by studies with animal models. Work from Carter et al. (2011) observed changes in social and repetitive behavior, phenotypes that are relevant to autism, in $\beta 3$ integrin knockout mice. The same animal model was investigated by Ellegood et al. (2012), who showed differences in relative volumes of several brain areas related to both autism and the serotonin system. The association of ITBG3 with serotonergic function was also observed by Whyte et al. (2013) in different mouse models, either individually or in interaction with a serotonin transporter. The gene that encodes ITGB3 is therefore a suitable candidate for association studies in ASD samples.

The *ITGB3* gene encodes glycoprotein IIIa (GP IIIa), which is the beta subunit of the platelet membrane adhesive protein receptor complex GPIIb/IIIa and is also expressed on neuron surfaces. *ITGB3* is located on chromosome 17q21.3, approximately 20 cM distal to the serotonin transporter gene (*SLC6A4*). Various polymorphisms in different regions of the gene have been described and associated with ASDs. In studies with these samples, the functional variant Leu33Pro (rs5918) was the major polymorphism related both to the disorder and to serotonin levels (Coutinho et al. 2007; Ma et al. 2010; Singh et al. 2013; Weiss et al. 2006a), although other positive results showing associations with serotonin levels and/or an ASD diagnosis have been found for different *ITGB3* single markers or

haplotypes. The role of this locus in the disease has also been demonstrated by positive results obtained from interaction models with other genes, including the *SLC6A4* gene (Coutinho et al. 2007; Napolioni et al. 2011; Singh et al. 2013; Weiss et al. 2006a; Weiss et al. 2006b).

All of this evidence suggests that the *ITGB3* locus is related to ASD susceptibility either directly or indirectly through an interaction with serotonin. However, it is still not clear to what level this gene affects ASD etiology. Most of the published studies did not evaluate its possible individual role in these disorders. Furthermore, few reports analyzed its influence in common symptoms and other suggestive ASD endophenotypes. The aim of the present work is therefore to investigate the possibility of an association between the *ITGB3* gene and ASDs, both considering the disorders as a nosologic definition according to DSM-IV criteria (APA 2000) and exploring the possible influence of this gene on specific clinical symptoms commonly observed in the probands, which is a very interesting and promising approach in ASD molecular research.

Methods:

Sample:

The sample consisted of 209 ASD children and their biological parents. Part of the sample (149 families) was previously obtained and described by Longo et al. (2009). The other part was collected for the present study and includes 53 families obtained from the Clinics Hospital of Porto Alegre (HCPA), the teaching hospital of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), and 7 families from the Psychology Department of UFRGS.

The research protocol and exclusion criteria also followed Longo et al. (2009), resulting in a sample of idiopathic ASD cases. Briefly, all probands were diagnosed according to DSM-IV, fulfilling the criteria for autistic disorder, Asperger disorder or PDD-NOS. This diagnosis was based on clinical examinations performed by medical professionals in regular appointments (an average of 3-4 appointments) at the Neuropediatric Outpatient Unit from HCPA. This process was always conducted by one neuropediatrician, with a second neuropediatrician participating in the clinical observations and confirming the diagnosis. For all probands, data on the presence or absence of clinical symptoms commonly observed in ASD patients were also collected. These symptoms included repetitive behaviors, echolalia, seizures and epilepsy (at least 2 unprovoked

seizures), mood instability, aggression (including unprovoked and recurrent aggressive behavior towards self and/or others), psychomotor agitation and sleep disorders. These data were obtained during the regular appointments inquiring the parents and/or caregivers whether the patient exhibited each type of symptom; the answer were considered positive if the symptom was present before the beginning of the treatment with prescribed drugs. Further information was acquired through clinical observations made by the neuropsychiatrists and queries into patients' hospital medical records made by the P.I. (J.B. Schuch). These files were also used to obtain information on the age of onset of ASDs and other symptoms and on the age of onset of medication use, when it applies. The Brazilian versions of the ASQ - Autism Screening Questionnaire (Sato et al. 2009) and the CARS - Childhood Autism Rating Scale (Pereira et al. 2008) were also completed for some of the probands (n = 117 and n = 178, respectively), this evaluation being made by both neuropsychiatrists and the P.I. The ASQ and CARS scores were used to measure the severity of autistic behavioral symptoms; the CARS is also effective in distinguishing cases of mild, moderate and severe autism and discriminating children with autism from those with mental retardation. Socio-demographic data for all families were obtained from the patient's clinical files.

The study was approved by the Ethics Committee of HCPA and the Psychology Department (protocol numbers 05-451, 06-237 and 06632012.4.0000.5334, respectively) and was in accordance with the ethical standards established in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All participants or legal representatives signed an informed consent form prior to their inclusion in the study. The identity of all subjects was omitted.

Genotyping:

Whole blood samples from the patients and their parents were collected for DNA extraction, which was performed by a salting out procedure (Lahiri and Nurnberger 1991). Five SNPs in the *ITGB3* gene were evaluated: rs2317385 (3475G>A, in the 5'UTR), rs5918 (34523T>C Leu59Pro, in exon 3), rs15908 (42130A>C, Val381Val, in exon 9), rs12603582 (51370G>T, in intron 11) and rs3809865 (62379T>A, in the 3'UTR). The polymorphisms were selected according to different criteria, such as previously reported associations in ASD samples, allele frequencies and availability of molecular assays. The

gene is comprised of several variants along 90.451 bp, including the 15 exons that constitute its coding region (Rebhan et al. 1997). We tried to cover most of this variability by choosing SNPs located in different regions, namely the 5' and 3'UTRs, two exons and one intron. We also observed the probable functional role of each polymorphism in our selection. No such studies have been conducted for any of the SNPs. However, it is hypothesized that rs5918 has a functional role based on amino acid changes. We address this issue in the Discussion section. Genotyping was performed by the TaqMan allelic discrimination method (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System) according to the manufacturer's suggested protocol.

Statistical analyses:

Allele frequencies were estimated by counting. Chi-square analysis was used to assess the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The analyses of linkage disequilibrium (LD) and the estimate of haplotypes were performed with Haploview software (Barrett et al. 2005). The transmission disequilibrium test (TDT) to evaluate the association hypothesis through the family-based approach was performed with all SNPs (by both single marker and haplotype approaches) using FBAT (*family based association test*) software. The positive results observed were submitted to Bonferroni correction, for 5 in single marker analyses and 6 in haplotype analyses.

The hypothesis of association was further tested for the same 8 specific symptoms evaluated in ASD patients (see *Sample*) using logistic regression models for both single markers and haplotypes.

For single markers analyses, except for rs15908, the subjects were grouped into carriers and non-carriers of the minor frequency allele. Due to the similarity of the frequencies for both homozygotes, rs15908 was evaluated as 3 groups defined by the possible genotypes. Chi-square tests were performed for all symptoms and SNPs; only when positive results were found were logistic regression tests conducted. For the latter, 8 models were used, according to the number of clinical symptoms. The same statistical model was applied for each symptom, including the presence of the symptom as the dependent variable and all 5 SNPs as the study factors. Nominally significant results obtained were submitted to Bonferroni correction, using the number of models tested. Both chi-square and logistic regression tests were performed with SPSS version 20 software.

Logistic regression analyses for the haplotypes regarding each of the 8 symptoms were conducted with the PLINK program (Purcell et al. 2007) using sliding windows that included haplotypes composed of 2, 3, 4 and 5 SNPs. This approach allowed for the analysis of all possible combinations within a given window size (the number of SNPs in the haplotype), changing one SNP at a time and following their order in the gene sequence from the 5' end to the 3' end; for example, considering the 5 different SNPs under study herein, 4 different sliding windows with a size up to 2 SNPs are possible. Global association P-values (P_{gl}) estimating the joint effects of all possible haplotypes at a given sliding window were assessed by the Omnibus test. The global P-values corrected for multiple comparisons (P_{glcorr}) were generated by the 10,000 permutation procedure, due to the multiple tests. When a nominally significant global window was obtained after the permutations, an analysis for individual haplotype effects was performed for that specific window, submitting the result to Bonferroni correction afterwards, according to the number of haplotypes.

The association of the 5 single markers with the ASQ and CARS scores was investigated using the generalized linear model (or ANCOVA) after previously testing the normality of the scores through the Kolmogorov-Smirnov test. Every significant result was submitted to Bonferroni correction for the 5 SNPs tested. SPSS version 20 software was used for these analyses.

Ethnicity and gender were included as covariates in every logistic regression and ANCOVA analysis. The significance level accepted for all tests was 0.05.

Results:

A total of 209 families were obtained, with 126 consisting of an ASD patient and both parents and 55 consisting of an ASD patient and only one parent. Clinical and demographic characteristics of the patients are presented in table 1. Most of our sample consisted of boys (81.3%) of European descent (76.4%), with a mean age of 9.86 ± 5.17 years. Autistic disorder was the most frequent diagnosis (49.3%), followed by PDD-NOS (43.5%). The most common clinical symptoms in the affected individuals were the following: repetitive behaviors (75.4%), aggression (61.8%), psychomotor agitation (60.9%) and echolalia (60.4%). Overall, 178 probands had completed the CARS, whereas

117 subjects had completed the ASQ; the mean scores \pm standard deviation were 35.7 ± 5.42 and 22.04 ± 5.45 , respectively.

All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. The allele and genotype frequencies were calculated for patients of European descent only, with the more frequent alleles and genotypes being the following: G (79%) and GG (63.9%) for rs2317385, T (86%) and TT (72.9%) for rs5918, A (57%) and AC (54.9%) for rs15908, G (80%) and GG (63.6%) for 12603582 and A (72%) and AA (53.5%) for rs3809865.

The family-based analyses of individual SNPs did not detect any association, even though the nominal P value indicated a non-significant increased transmission of the rs15908 A allele ($p=0.067$, $p_{\text{corr}}=0.335$) (table 2). Findings regarding FBAT analyses with the other 4 *ITGB3* variants are not described but can be made available if requested.

The LD pattern across the *ITGB3* SNPs is presented in figure 1. Although only one LD block (encompassing rs5918 and rs15908) was identified according to the program's criteria, we considered all SNPs to predict haplotypes due to the sizable D' values (mostly between 0.7-1.0). The D' estimates did not change with ethnicity, thus, the whole sample was included in these analyses. Considering a 10% minimum frequency, 6 different haplotypes were obtained and analyzed. The FBAT global haplotype analyses showed an association with ASD (global $p=0.049$); the H5 haplotype was transmitted less often than expected by chance from parents to children ($p=0.006$, $p_{\text{corr}}=0.036$) (table 2). No association was found for the other haplotypes except the H1 haplotype (composed of the rs2317385 G allele, rs5918 T allele, rs15908 A allele, rs12603582 G allele and rs3809865 A allele); a trend for a preferential transmission was observed before correction, with a nominal $p=0.09$ ($p_{\text{corr}}=0.54$; data not shown, but available upon request).

The hypothesis of association between single markers and the 8 common symptoms of ASD tested through logistic regression showed significant results for 3 different polymorphisms and 3 types of symptoms. Regarding rs12603582, the odds ratio (OR) for echolalia was 2.737 in the GG homozygous genotype compared with the other genotypes ($p=0.008$). Similarly, rs5918 was associated with aggression, with the TT individuals having an OR of 2.931 compared with the C carriers ($p=0.026$). In addition, the OR in the presence of the GG genotype at rs2317385 was 2.656 for epilepsy and/or seizures ($p=0.031$). Nevertheless, these nominally significant findings were not sustained after Bonferroni correction, although a trend was seen for echolalia ($p_{\text{corr}}=0.064$ for

echolalia, $p_{\text{corr}}=0.208$ for aggression and $p_{\text{corr}}=0.248$ for epilepsy and/or seizures). All these results are presented in table 3.

The logistic regression data for the haplotypes analyses regarding ASD symptoms are shown in table 4. Significant results were obtained for 5 global haplotype windows of different sizes and 3 types of symptoms: a) one window comprising rs15908-rs12603582, suggesting an effect of A/G haplotype in echolalia ($P_{\text{gl}}=0.016$); b) one comprising rs5918-rs15908-rs12603582, also featuring suggestive results for echolalia, with the T/A/G alleles, respectively, composing the haplotype ($p_{\text{gl}}=0.041$); c) the rs2317385-rs5918 window (with 2 different haplotypes, A/C and G/C; $P_{\text{gl}}=0.039$) associated with epilepsy; d) the rs12603582-rs3809865 window (also with 2 haplotypes, T/A and G/A; $P_{\text{gl}}=0.039$) also showed an effect with epilepsy; and e) one window including rs15908-rs12603582-rs3809865, with the haplotype A/G/T, marginally associated with sleep disorders ($P_{\text{gl}}=0.054$). However, after correction by 10,000 permutations, the result remained significant for only one global haplotype window, i.e., the rs15908-rs12603582 that was associated with echolalia ($p_{\text{glcorr}}=0.048$; table 4). The analysis for individual haplotype effects indicates an OR of 2.02 for this symptom in the presence of the A/G haplotype ($P_{\text{ind}}=0.005$), an association sustained after Bonferroni correction ($P_{\text{indcorr}}=0.015$).

The ANCOVA analyses revealed an association of rs2317385 with the ASQ scores. Individuals carrying an A allele had lower scores (20.676 ± 1.005) of this assessment tool compared with homozygous GG (23.372 ± 0.726) ($p=0.031$). However, this result did not remain significant after Bonferroni correction ($p_{\text{corr}}=0.155$). No positive results were found for other polymorphisms with respect to both the ASQ scores and the CARS analyses (data not shown, but available upon request).

Discussion:

This study reports some interesting results between ASDs and different polymorphisms located at the *ITGB3* locus. Although the 5 SNPs did not show any association when analyzed individually, the haplotype approaches yielded significant findings. Using a family-based method, a positive result with ASDs as a nosologic category was detected, while the logistic regression analyses of clinical symptoms suggested an effect of the *ITGB3* gene in echolalia.

The FBAT analyses indicated a nominal trend for an association with the rs15908 A allele. Weiss et al. describes an association of this allele with both autism susceptibility, when interacting with the *SCL6A4* gene (2006b), and lower platelet serotonin levels (2006a). Singh et al. (2013) also found that this SNP influenced ASDs through interactions with the tryptophan hydroxylase gene (*THP2*). Although the results from previous studies suggest that this is an important variant, the possible effect on serotonin blood and/or platelet levels and autism neurobiology and etiology needs to be better investigated (Weiss et al. 2006a; Weiss et al. 2006b). The functional impact of rs15908, which involves a synonymous change in exon 9, has not been addressed yet, and functional studies using animal models and cell culture need to be performed. A meta-analysis can also reinforce positive results. To date, there are few published reports on this polymorphism, but meta-analysis will be valuable in future research.

The putative effect of rs15908 on serotonin, if it really exists, is most likely not unique within the locus. Different SNPs, including the others evaluated in this study, are associated with the expression of the *SLC6A4* gene and changes in the serotonin levels in healthy and autistic samples (Weiss et al. 2006b; Weiss et al. 2006a; Napolioni et al. 2011; Coutinho et al. 2007). Additionally, different studies have proposed the possibility that the effect of each analyzed SNP in the *ITGB3* gene depends on several polymorphisms acting together or that the effect of one particular SNP could be influenced by another due to the LD pattern of this gene (Weiss et al. 2006b).

The positive results obtained through the FBAT haplotypes analyzes can support the above-mentioned hypothesis. The H5 haplotype (composed of the rs2317385 G allele, rs5918 T allele, rs15908 C allele, rs12603582 G allele and rs3809865 A allele) was transmitted significantly less often, whereas the H1 haplotype (composed of the rs2317385 G allele, rs5918 T allele, rs15908 A allele, rs12603582 G allele and rs3809865 A allele) showed a nominal trend for being preferentially transmitted. Interestingly, both haplotypes differed only in the rs15908 polymorphism; in H5, the C allele was present, but in H1, the A allele occurred at this position. In addition to indicating a possible role for the *ITGB3* gene, the haplotype approach can reinforce the suggestion of the individual involvement of rs15908 in the disease. However, it is possible that this SNP does not have any effect on gene function but instead is in LD with the truly causative variant. Because the lack of functional studies encompasses not only rs15908 but also the other polymorphisms

investigated herein, analyses of these SNPs and haplotypes are important to confirm or identify the real causative variant. Sequencing analyses will also be important. These novel studies will be necessary to clarify those plausible associations.

A possible effect of the *ITGB3* gene in autism *per se* and directly related to serotonin can be further addressed when we consider the analyses performed for specific symptoms of the disorder. This methodology has the objective of achieving more phenotypically homogeneous sub-samples, as the disorders comprising ASDs are characterized by a range of symptoms that can change noticeably in both severity and quantity. This might not be the best approach to address endophenotypes because other behaviors and clinical measures can better address the constructs linking genetic architecture and the disease itself. However, we believe creating subcategories of the probands that group individuals with more similar clinical profiles can facilitate the identification of the etiologies underlying ASD (Bishop et al. 2013), and the results obtained by such analysis provide a good contribution to this issue.

Among these data, a very interesting finding is the association of one haplotype with symptoms of echolalia. This possible risk haplotype is a 2 SNP sliding window that includes the rs15908 A allele and the rs12603582 G allele. Notably, our results from FBAT analyses, both for individual SNPs and haplotypes, suggest a possible risk effect of the A allele at rs15908 in ASD susceptibility and also presents in the association with echolalia. Moreover, in logistic regression analyses of single markers and clinical symptoms, a trend for an association between the rs12603582 G allele and echolalia was detected. Regarding this polymorphism, few other studies have investigated a possible association with ASDs. Napolioni et al. (2011) observed positive results, detecting a preferential transmission of a haplotype containing the G allele in families with ASD probands. Nevertheless, none of the published studies with these SNPs considered clinical symptoms in the analyses, making comparison with our findings difficult. We believe that the significant effect observed in the haplotype analysis is not spurious because no other factors that might be interfering with this, such as age, social class, diagnosis and neuropsychomotor development, differed between probands with and without echolalia (data not shown, but available upon request). Echolalia is associated with neurological alterations in the frontal lobe, a region significantly related to the severe impairments that are commonly observed in ASD (Grossi et al. 2012; Courchesne and Pierce 2005). Given the lack of studies

analyzing the functional role of both polymorphisms, there are still no clear accounts regarding their possible influence in autism risk and symptomatology. Future research on other ASD samples should be conducted to clarify this relationship and to corroborate our results regarding echolalia.

Other positive findings concerning our analyses of ASD symptoms for single markers and haplotypes were observed, but they did not remain significant after Bonferroni correction. Even so, we believe that this methodology may be reducing the clinical and thus the genetic heterogeneity of the disease and should be considered in new investigations. Similar reasoning can be made for our ASQ and CARS analyses. By assessing the symptoms dimensionally, these questionnaires can help to measure the severity of the disorder. We were not able to find any positive result that survived correction. However, this approach may be useful for detecting more severe cases, which would demand more attention and perhaps special care.

All evaluated SNPs have at least one previous report indicating association with ASD and/or serotonin levels. In spite of our positive or nominal findings, the different analytical approaches used here engendered also some negative results. In accordance with our negative FBAT results, the work from Cochrane et al. (2010) failed to detect any significant effect for *ITGB3* through this methodology, even studying several polymorphisms in this gene. Cochrane et al. (2010) Similarly, no GWAS performed thus far has been able to find associations with the genomic region harboring *ITGB3* (17q21), although these studies do suggest the involvement of neural cell adhesion molecules and the *SLC6A4* gene. However, linkage genome scans were successful in detecting an effect due to this chromosomal region (Yonan et al. 2003; Duvall et al. 2007). The putative role of *ITGB3* in ASD diagnosis and symptomatology can thus be concluded to be complex, justifying further investigations based on different approaches.

The present study has some limitations. Our sample size can be considered small for genetic association analyses. Although some ASD reports have a similar sample size, the ability to detect small effect genes requires even larger samples. Investigations assessing neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders usually identify significant associations with OR values near 1.25. This seems to also apply to ASDs: in the majority of studies that obtained positive findings for the *SLC6A4* gene, the ORs were similar to that value (Huang and Santangelo 2008). The power of our study was estimated to be

approximately 40% in detecting an association of such magnitude, considering both ASDs and the symptom analyses. Although similar to other investigations (Cochrane et al. 2010), this modest power may have contributed to obtaining both false positive and false negative results. These findings are nonetheless relevant for the representativeness of samples from different continents and cultures in meta-analyses that may use these data. Another possible limitation is related to the polymorphisms investigated. Despite the cautions on their selection, as previously described, we may not have had a proper understanding of the gene functionality, omitting one or more functionally relevant SNPs from our study and thus omitting the true SNP(s) involved in ASD susceptibility. The definition of autistic phenotypes could have also influenced the results. Nosologic definitions are not necessarily the best definitions to capture genetic effects (Bishop et al. 2013). We tried to address this using ASQ/CARS analyses and some clinical symptoms commonly observed in ASD patients. However, these approaches cannot be the best choice. Specifically, the establishment of symptom categories occurred through direct questioning of the parents or research into the patients' medical records, and no specific instruments were used to obtain these data. Questionnaires such as ADI (Autism Diagnostic Interview) or ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule) would be appropriate in this case. However, the implementation of ADI is not yet used on a large scale in Brazil, hampering its application, and we are not aware of a Brazilian version of ADOS. The attempt to address ASD endophenotypes through analyses of clinical symptoms is also limited, as already noted. However, such constructs are still being defined in ASDs, and there is no agreement on their use yet. The presence of echolalia in our ASD patients is remarkable; given the results, we believe this classification truly represents a more homogeneous subgroup of patients, both clinically and etiologically. Nevertheless, future studies using this methodology are important to corroborate its validity as well as to strengthen the association observed here.

Through family-based association analyses of different variants of the *ITGB3* gene, we were able to suggest a possible use for this locus in ASD diagnosis, a result that is in agreement with the literature in the field. Using a strategy that may be promising in future studies, we were also able to demonstrate some specific associations with symptoms of echolalia. These findings are interesting and address one of the more exciting puzzles in ASD from the clinical standpoint. With respect to this heterogeneous disorder, all of these

approaches have been employed in an attempt to clarify its etiology. Although our results require replication before any conclusions can be drawn, we believe these methodologies are effective in showing some small effect associations of the *ITGB3* gene with ASDs. Other studies are nonetheless needed to fully understand the involvement of genetic variability at the *ITGB3* locus and the integrin system on ASDs and their different clinical aspects.

Acknowledgments

This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos - Clinics Hospital de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and CNPq-Institutos do Milênio. We would like to thank both the clinical staff at the Child Neurology Unit and technicians at the Laboratory of Biological Samples Collection from Clinics Hospital of Porto Alegre for their assistance with the clinical data and blood sample collections, respectively. We also thank Dr. Sandra Leistner-Segal at Medical Genetics Service from the Clinics Hospital of Porto Alegre for the fragile X syndrome genotyping, Prof. Sidia Maria Callegari-Jacques of the Department of Statistics from UFRGS and Prof. Claiton H. D. Bau of the Department of Genetics from UFRGS for helping with the statistical analyses. We lastly would like to thank to the families who kindly participated in this research.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Sykes N, Pagnamenta AT, Almeida J, Bacchelli E, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bolte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chu SH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizzi R, Kim C, Klauck SM, Klevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ, McGrath J, McMahan WM, Melhem NM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Piven J, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapduram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Wing K, Wittemeyer K, Wood S, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Betancur C, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI, Jr., Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Scherer SW, Sutcliffe JS, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Devlin B, Ennis S, Hallmayer J (2010) A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Human molecular genetics* 19 (20):4072-4082. doi:10.1093/hmg/ddq307
- APA (2000) Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR®. American Psychiatric Pub,
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21 (2):263-265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457
- Betancur C (2011) Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain research* 1380:42-77. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.078
- Bishop SL, Hus V, Duncan A, Huerta M, Gotham K, Pickles A, Kreiger A, Buja A, Lund S, Lord C (2013) Subcategories of restricted and repetitive behaviors in children with autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders* 43 (6):1287-1297. doi:10.1007/s10803-012-1671-0
- Carneiro AM, Cook EH, Murphy DL, Blakely RD (2008) Interactions between integrin α IIb β 3 and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest* 118 (4):1544-1552. doi:10.1172/JCI33374
- Carter MD, Shah CR, Muller CL, Crawley JN, Carneiro AM, Veenstra-VanderWeele J (2011) Absence of preference for social novelty and increased grooming in integrin β 3 knockout mice: initial studies and future directions. *Autism research : official*

- journal of the International Society for Autism Research 4 (1):57-67. doi:10.1002/aur.180
- CDC (2012) Prevalence of Autism Spectrum Disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. In: (MMWR) MaMWR (ed)
- Chavis P, Westbrook G (2001) Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411 (6835):317-321. doi:10.1038/35077101
- Cochrane LE, Tansey KE, Gill M, Gallagher L, Anney RJ (2010) Lack of association between markers in the ITGA3, ITGAV, ITGA6 and ITGB3 and autism in an Irish sample. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 3 (6):342-344. doi:10.1002/aur.157
- Cook EH, Leventhal BL (1996) The serotonin system in autism. *Current opinion in pediatrics* 8 (4):348-354
- Courchesne E, Pierce K (2005) Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Current opinion in neurobiology* 15 (2):225-230. doi:10.1016/j.conb.2005.03.001
- Coutinho AM, Sousa I, Martins M, Correia C, Morgadinho T, Bento C, Marques C, Ataíde A, Miguel TS, Moore JH, Oliveira G, Vicente AM (2007) Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels. *Human genetics* 121 (2):243-256. doi:10.1007/s00439-006-0301-3
- Duvall JA, Lu A, Cantor RM, Todd RD, Constantino JN, Geschwind DH (2007) A quantitative trait locus analysis of social responsiveness in multiplex autism families. *The American journal of psychiatry* 164 (4):656-662. doi:10.1176/appi.ajp.164.4.656
- Ellegood J, Henkelman RM, Lerch JP (2012) Neuroanatomical Assessment of the Integrin beta3 Mouse Model Related to Autism and the Serotonin System Using High Resolution MRI. *Frontiers in psychiatry* 3:37. doi:10.3389/fpsy.2012.00037
- Grossi D, Marcone R, Cinquegrana T, Gallucci M (2012) On the differential nature of induced and incidental echolalia in autism. *Journal of intellectual disability research : JIDR*. doi:10.1111/j.1365-2788.2012.01579.x
- Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L, Croen LA, Ozonoff S, Lajonchere C, Grether JK, Risch N (2011) Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry* 68 (11):1095-1102. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.76
- Hollander E, Kaplan A, Schmeidler J, Yang H, Li D, Koran LM, Barbato LM (2005) Neurological soft signs as predictors of treatment response to selective serotonin reuptake inhibitors in obsessive-compulsive disorder. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 17 (4):472-477. doi:10.1176/appi.neuropsych.17.4.472
- Huang CH, Santangelo SL (2008) Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B (6):903-913. doi:10.1002/ajmg.b.30720
- Kanemura H, Sano F, Tando T, Sugita K, Aihara M (2013) Can EEG characteristics predict development of epilepsy in autistic children? *European journal of paediatric*

- neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society 17 (3):232-237. doi:10.1016/j.ejpn.2012.10.002
- Lahiri DK, Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19:5444
- Levy SE, Mandell DS, Schultz RT (2009) Autism. *Lancet* 374 (9701):1627-1638. doi:10.1016/S0140-6736(09)61376-3
- Longo D, Schuler-Faccini L, Brandalize AP, dos Santos Riesgo R, Bau CH (2009) Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain research* 1267:9-17. doi:10.1016/j.brainres.2009.02.072
- Ma DQ, Rabionet R, Konidari I, Jaworski J, Cukier HN, Wright HH, Abramson RK, Gilbert JR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, Martin ER (2010) Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B (2):477-483. doi:10.1002/ajmg.b.31003
- Mazefsky CA, McPartland JC, Gastgeb HZ, Minshew NJ (2013) Brief report: comparability of DSM-IV and DSM-5 ASD research samples. *Journal of autism and developmental disorders* 43 (5):1236-1242. doi:10.1007/s10803-012-1665-y
- Mei H, Cuccaro ML, Martin ER (2007) Multifactor dimensionality reduction-phenomics: a novel method to capture genetic heterogeneity with use of phenotypic variables. *American journal of human genetics* 81 (6):1251-1261. doi:10.1086/522307
- Mulder EJ, Anderson GM, Kema IP, de Bildt A, van Lang ND, den Boer JA, Minderaa RB (2004) Platelet serotonin levels in pervasive developmental disorders and mental retardation: diagnostic group differences, within-group distribution, and behavioral correlates. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 43 (4):491-499. doi:10.1097/00004583-200404000-00016
- Napolioni V, Lombardi F, Sacco R, Curatolo P, Manzi B, Alessandrelli R, Militerni R, Bravaccio C, Lenti C, Saccani M, Schneider C, Melmed R, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Reichelt KL, Rousseau F, Lewin P, Persico AM (2011) Family-based association study of ITGB3 in autism spectrum disorder and its endophenotypes. *European journal of human genetics : EJHG* 19 (3):353-359. doi:10.1038/ejhg.2010.180
- O'Hare A (2009) Autism spectrum disorder: diagnosis and management. *Archives of disease in childhood Education and practice edition* 94 (6):161-168. doi:10.1136/adc.2008.150490
- Pereira A, Riesgo RS, Wagner MB (2008) Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *Jornal de pediatria* 84 (6):487-494. doi:doi:10.2223/JPED.1828
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 81 (3):559-575. doi:10.1086/519795
- Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D (1997) GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases. *Trends in Genetics* 13 (4):163
- Ronald A, Hoekstra RA (2011) Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156 (3):255-274

- Rutter M (2013) Changing concepts and findings on autism. *Journal of autism and developmental disorders* 43 (8):1749-1757. doi:10.1007/s10803-012-1713-7
- Sato FP, Paula CS, Lowenthal R, Nakano EY, Brunoni D, Schwartzman JS, Mercadante MT (2009) Instrument to screen cases of pervasive developmental disorder: a preliminary indication of validity. *Rev Bras Psiquiatr* 31 (1):30-33
- Singh AS, Chandra R, Guhathakurta S, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, Ghosh S, Rajamma U (2013) Genetic association and gene-gene interaction analyses suggest likely involvement of ITGB3 and TPH2 with autism spectrum disorder (ASD) in the Indian population. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 45:131-143. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.015
- Weiss LA, Abney M, Parry R, Scanu AM, Cook EH, Jr., Ober C (2005) Variation in ITGB3 has sex-specific associations with plasma lipoprotein(a) and whole blood serotonin levels in a population-based sample. *Human genetics* 117 (1):81-87. doi:10.1007/s00439-004-1250-3
- Weiss LA, Kosova G, Delahanty RJ, Jiang L, Cook EH, Ober C, Sutcliffe JS (2006a) Variation in ITGB3 is associated with whole-blood serotonin level and autism susceptibility. *European journal of human genetics : EJHG* 14 (8):923-931. doi:10.1038/sj.ejhg.5201644
- Weiss LA, Ober C, Cook EH, Jr. (2006b) ITGB3 shows genetic and expression interaction with SLC6A4. *Human genetics* 120 (1):93-100. doi:10.1007/s00439-006-0196-z
- Weiss LA, Veenstra-Vanderweele J, Newman DL, Kim SJ, Dytch H, McPeck MS, Cheng S, Ober C, Cook EH, Jr., Abney M (2004) Genome-wide association study identifies ITGB3 as a QTL for whole blood serotonin. *European journal of human genetics : EJHG* 12 (11):949-954. doi:10.1038/sj.ejhg.5201239
- Whitaker-Azmitia PM (2005) Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23 (1):75-83. doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.07.022
- Whyte A, Jessen T, Varney S, Carneiro AM (2013) Serotonin transporter and integrin beta 3 genes interact to modulate serotonin uptake in mouse brain. *Neurochemistry international*. doi:10.1016/j.neuint.2013.09.014
- Ye H, Liu J, Wu JY (2010) Cell adhesion molecules and their involvement in autism spectrum disorder. *Neuro-Signals* 18 (2):62-71. doi:10.1159/000322543
- Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J, Cantor RM, Geschwind DH, Gilliam TC (2003) A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *American journal of human genetics* 73 (4):886-897

Fig 1 Linkage disequilibrium pattern considering the five studied SNPs, according to Haploview. D' values are given in the cell intersecting for each pair of SNPs. The darker the cell, the greater the linkage disequilibrium between the polymorphisms. A blank cell indicates $D'=1.0$

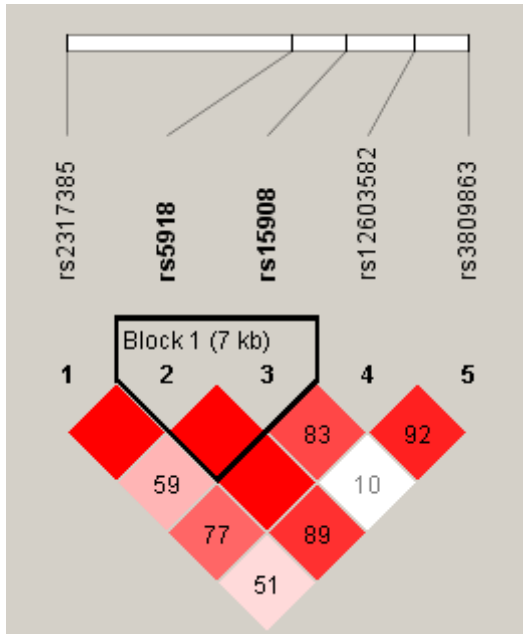


Table 1. Clinical and demographic characteristics in ASD patients (n=209)

Gender (male)^a		81.3% (170)
Age^b		9.86 ± 5.17
Ethnicity^a	European	76.4% (159)
	Afro-American	7.2% (15)
	Others ^c	16.3% (35)
ASD diagnosis^a	Autistic disorder	49.3% (103)
	Asperger disorder	7.2% (15)
	PDD-NOS	43.5% (91)
Symptoms^{a,d}	Aggression	61.8% (128)
	Echolalia	60.4% (125)
	Epilepsy (only)	11.1 % (23)
	Epilepsy and/or seizures	28.0% (58)
	Mood Instability	49.5 % (102)
	Psychomotor agitation	60.9 % (126)
	Repetitive behaviors	75.4% (156)
	Sleep disorders	55.8% (115)
ASQ^b		22.04 ± 5.45
CARS^b		35.70 ± 5.42

^a % (n); ^b Mean ± DP; ^c Amerindian and Asian ethnicities were also present in the sample. ^d The informed percentages and numbers refer to patients presenting each symptom. The different symptoms are not mutually exclusive. ASD: Autism spectrum disorders. PDD-NOS: Pervasive development disorder-not otherwise specified; ASQ: Autism Screening Questionnaire; CARS: Childhood Autism Rating Scale

Table 2. Association analyses of both single polymorphisms and haplotypes using the family-based association test (only nominal and positive results presented).

		Observed transmission^a	Expected transmission^b	Z	P	P*
SNP						
rs15908^c	A	108	98	1.826	0.067	0.335
	C	74	84	-1.826	0.067	0.335
Haplotype^d						
H5 – G T C G A^{e, f}		21	30	-2.747	0.006	0.036

^aObserved number of transmissions; ^bExpected number of transmissions; ^cInformative families included in the test = 91; ^dSNPs in haplotypes follow the order according to the 5'→3' gene sequence: rs2317385, rs5918, rs15908, rs12603582 and rs3809865; ^eInformative families included in the H5 haplotype = 37; ^fHaplotype frequency: 12.6%; *P value after Bonferroni correction.

Table 3. Logistic regression analyses to assess the influence of single *ITGB3* polymorphisms in autism symptoms (only nominal and positive results presented).

Symptoms	Polymorphism	B (SE)	Odds Ratio (CI 95%)	P	P*
Echolalia	rs12603582 T carriers (ref)	0	1		
	GG	1.007 (0.377)	2.737 (1.307-5.728)	0.008	0.064
Aggression	rs5918 C carriers (ref)	0	1		
	TT	1.075 (0.483)	2.931 (1.138-7.546)	0.026	0.208
Epilepsy and/or seizures	rs2317385 A carriers (ref)	0	1		
	GG	0.977 (0.453)	2.656 (1.093-6.453)	0.031	0.248

Each symptom represents one logistic regression model, including the presence of the symptom as a dependent variable and all five SNPs as study factors; the covariates included in all models are gender and ethnicity. SE: standard error; CI: confidence interval. *P value after Bonferroni correction.

Table 4. Logistic regression analyses to assess the influence of the *ITGB3* haplotypes on autism symptoms (only nominal and positive results presented).

Symptoms	Haplotype					OR	STAT	P _{gl} *	P _{glcorr} **
	rs2317385	rs5918	rs15908	rs12603582	rs3809865				
Echolalia		A	G			2.02	8.04	0.016	0.048
		T	A	G		2.02	8.04	0.041	0.114
Epilepsy	A	C				0.22	5.64	0.039	0.092
	G	C				2.77	5.86	0.039	0.092
			T	A		2.46	5.10	0.039	0.091
			G	A		0.49	4.18	0.039	0.091
Sleep Disorders			A	G	T	0.49	4.38	0.054	0.155

Covariates included in all analyses: gender and ethnicity. OR = odds ratio; STAT = t-statistic coefficient.

*Significant global p values for each window. **Significant global p values after 10.000 permutations. After Bonferroni correction, the p value for the A/G haplotype in the rs15908-rs12603582 window remained significant (P_{ind} = 0.005; P_{indcorr} = 0.015; see text for details).

CAPÍTULO V – ARTIGO 2

Manuscrito em preparação

Influence of *SLC6A4* gene on psychomotor agitation in male patients with autism spectrum disorders

Jaqueline Bohrer Schuch¹, Diana Muller¹, Renata Giuliani Endres², Cleonice Alves Bosa²,
Dânae Longo¹, Lavinia Schuler-Faccini¹, Josiane Ranzan³, Michele Michelin Becker³,
Rudimar dos Santos Riesgo³, Tatiana Roman^{1*}

¹Department of Genetics, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul,
Brazil

²Department of Psychology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

³Child Neurology Unit, Clinics Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande
do Sul, Brazil

*Corresponding author:

Prof Tatiana Roman

Department of Genetics, Caixa Postal 15053

Federal University of Rio Grande do Sul

91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

tatiana.roman@ufrgs.br

troman29@yahoo.com.br

Phone: +55 51 3308 9795

Abstract:

Autism spectrum disorders (ASD) are a group of psychiatric conditions, characterized by impairments in communication and social interaction, as well as repetitive and stereotyped behaviors. The serotonin system is involved in the regulation of central nervous system development, thus is possibly involved in ASD etiology. In this study, we analyzed 4 polymorphisms (5HTTLPR, rs2066713, Stin2, rs1042173) at the serotonin transporter gene (*SLC6A4*) in a sample of 209 ASD children and their biological parents. Both single markers and haplotypes were tested for association with ASD diagnosis and common clinical symptoms (repetitive behaviors, echolalia, seizures and epilepsy, mood instability, aggression, psychomotor agitation, sleep disorders). These hypotheses were investigated using family-based tests and logistic regression models. The family-based analyses did not detect any significant results for single and haplotype markers ($p_{\text{global}} > 0.05$). The analyses of the clinical symptoms showed a nominal association between the rs1042173 and psychomotor agitation in males ($p = 0.009$, $p_{\text{corr}} = 0.072$). We also observed a trend for an association with LaLa genotype and mood instability ($p = 0.056$). The haplotype analyses did not detect associations with any symptom. Others studies are needed to confirm the data found, however, we believe in their relevance in understanding the disorder and contributing to upcoming clinical and pharmacological interventions.

Key-words: autism, ASD, serotonin transporter, *SLC6A4* polymorphisms, clinical symptoms.

Introduction:

Autism is a neurodevelopmental disorder of childhood onset, included in a group of psychiatric conditions denominated autism spectrum disorders (ASD) (O'Hare 2009). The ASD are characterized by impairments in communication and social interaction, as well as repetitive and stereotyped behaviors. Other clinical manifestations are included in a wide variety and severity of symptoms, such as mood instability, aggression (self-directed and/or toward others), seizure episodes and comorbidity with echolalia, epilepsy, sleep disorders and attention deficit/hyperactivity disorder (Bishop et al. 2013; Grossi et al. 2012; Kanemura et al. 2013; Levy et al. 2009; Mazefsky et al. 2013; Rutter 2013). The current investigations on the prevalence for this disease, as recently published by the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, estimated that 1 out of 88 children are affected with ASD (CDC 2012). There are clinical differences according to gender, which can be relevant to the epidemiology of this disorder; the ASD is more common in males than in females, with a male:female ratio of 4.3:1 (Fombonne 2003). Some studies have reported females to present more social problems and advanced receptive language skills than boys, nonetheless, repetitive and stereotyped behaviors is more common in males (Bolte et al. 2011; Holtmann et al. 2007).

Multiple syndromes and cytogenetic alterations are associated with these disorders. However, only in approximately 15% of the cases these genetic factors can be identified. Most cases have a multifactorial origin, with the involvement of both genetic and environmental factors in their etiology (Pagon et al. 2003). The ASD findings suggest different brain areas and processes involved. Although no feature seems to stand out of disease's neurobiology, the serotonin transmission has been suggested as an important neuronal pathway associated with autism. It is involved in the regulation of central nervous system development, thus, changes in neurotransmitter levels could result in abnormal synaptogenesis and brain development, possibly present in ASD origin (Whitaker-Azmitia 2005). Some studies have found increased serotonin blood levels in ASD patients (Cook and Leventhal 1996; Hranilovic et al. 2008). Moreover, some symptoms commonly seen in these patients (e.g. aggression and anxiety) has been effectively treated with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) (Hollander et al. 2005). In line with the considerable influence of serotonin system in ASD etiology is the serotonin transporter (5-HTT); through the reuptake of serotonin to pre-synaptic neurons, 5-HTT represents the major

control mechanism of serotonergic function, suggesting its coding gene (*SLC6A4*) is a good candidate for molecular studies in ASD.

The *SLC6A4* gene is located on chromosome 17q11.1-q12, has 14 exons spanning 41,684 base pair and codifies a protein composed by 630 amino acids. The main polymorphism described in this gene is the 5HTTLPR, located at the proximal 5' promoter region. It is defined by a 44 base pair insertion/deletion, which gives rise to two common variants according to the absence or presence of this 44 base pair sequence, respectively the short allele (S) and the long allele (L) (Heils et al. 1996; Lesch et al. 1994). An A to G substitution within the L allele (rs25531) generates the La and Lg alleles, making the 5HTTLPR a triallelic system. This polymorphism seems to modify the *SLC6A4* transcriptional level, being that the La allele associated with the largest 5-HTT mRNA expression and highest rate of serotonin uptake by the transporter compared with Lg and the S alleles (intermediate and lowest expression rates, respectively) (Greenberg et al. 1999; Hu et al. 2006; Nakamura et al. 2010). The LaLa genotype is thus related to the highest expression in genetic studies, with other genotypes showing a successive decrease down to the lowest expression rate, as follows: LaLa > SLa > LaLg > SLg > LgLg > SS. These functional evidence can be corroborated by other investigations reporting an association of the S allele with less 5-HTT density in the brain (Praschak-Rieder et al. 2007) and greater amygdale reactivity (Hariri et al. 2005). Several studies have evaluated the role of this polymorphism in ASD; these results have been inconsistent, with positive findings for both S and L alleles and negative findings, including the data from meta-analyses (Gadow et al. 2013; Huang and Santangelo 2008; Kistner-Griffin et al. 2011; Nijmeijer et al. 2010), remaining uncertain its influence in the disorder. It is important to note that the triallelic system of 5HTTLPR has been evaluated in a minority of studies, being the results also not clear.

Another studied polymorphism in ASD is a variable number of tandem repeats (VNTR) of a 17 base pair sequence, located in the second intron of *SLC6A4* gene and known as STin2 (Lesch et al. 1994), This variant comprises three alleles, named 9R, 10R and 12R according to the number of repeats. The functional significance of STin2 is not well investigated, but the 12R allele seems to act as a transcriptional enhancer in embryonic mouse (MacKenzie and Quinn 1999). The number of reports that studied Stin2 and ASD is reduced and showed conflicting results; however, the 12R allele appears to be

associated with risk of presenting the disorder (Brune et al. 2006; Coutinho et al. 2007; Huang and Santangelo 2008).

Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) have also been studied in ASD samples. The rs2066713 is located in intron 1, and, despite the lack of evidence showing functional effects, it has been associated in some studies with ASD and with changes in serotonin levels (Ma et al. 2010; Valencia et al. 2012; Weiss et al. 2005). The other SNP, rs1042173, is located in the 3'UTR and was related to differential 5-HTT expression levels. Cell culture experiments showed that cells transfected with G allele have higher mRNA and protein levels than cells with T allele (Seneviratne et al. 2009), but another study found the opposite effect on the 5-HTT mRNA expression when analyzing haplotypes containing this SNP (Vallender et al. 2008). Although the results from expression studies are discordant, bioinformatics analyses reinforce a possible functional role for this SNP, since it is located near a potential binding site for microRNAs (Chen and Rajewsky 2006). Until now only one study has investigated its influence on ASD, with negative results (Ma et al. 2010). However, observed associations with alcohol and nicotine dependence and suicidal behavior (Enoch et al. 2013; Seneviratne et al. 2013; Seneviratne et al. 2009; Yang et al. 2013), along with its possible functional effect, suggest that rs1042173 can be important for different psychiatric phenotypes, including ASD and its clinical manifestations.

Different polymorphisms at *SLC6A4* gene, including those mentioned above, are associated with a variety of neuropsychiatric disorders and personality characteristics, including mood, obsessive-compulsive symptoms, cognition, pain perception, sleep and social interaction and affiliation (Murphy et al. 2004). The ASD, as well as other pathologies, are considered a complex disease and a lot is still needed to comprehend its genetic architecture. Findings from meta-analyses have shown conflicting results for *SLC6A4* gene (Betancur et al. 2002; Devlin et al. 2005; Guhathakurta et al. 2006; Huang and Santangelo 2008), but considering its putative importance in disease's neurobiology new investigations comprising several variants and diverse methodological strategies are worthy. In line with this, the aim of the present study is to investigate the possibility of association between different polymorphisms at *SLC6A4* gene and ASD diagnosis, through a family-based approach. In order to improve the power to detect small genetic effects,

analyses of subsets of patients defined according to specific clinical symptoms of this disorder will also be performed.

Methods:

Sample:

The sample consists of 209 ASD children and their biological parents. Part of the sample (n=149) was previously obtained and described by Longo et al. (2009). The other part includes 53 families obtained from the Clinics Hospital of Porto Alegre (HCPA), the teaching hospital of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and 7 from the Psychology Department of UFRGS.

The research protocol and exclusions also followed the criteria described in Longo et al. (2009), in order to obtain a sample of idiopathic ASD cases. Briefly, all probands were diagnosed according to DSM-IV, fulfilling the criteria for autistic disorder, Asperger disorder or PDD-NOS (APA 2000). This diagnosis was based on clinical examinations performed by medical professionals in regular appointments that took place at the Neuropediatric Outpatient Unit from HCPA. This process was always conducted by one neuropediatrician, with a second one participating in the clinical observations and confirming the diagnosis. These clinical appointments were also used to collect data on specific symptoms common to the disorder, including repetitive behaviors, echolalia, seizures and epilepsy (at least two unprovoked seizures), mood instability, aggression (including unprovoked and recurrent aggressive behavior toward self and/or others), psychomotor agitation and sleep disorders. These symptoms were present before the beginning of the treatment with prescribed drugs. Further information, as age of onset of ASDs and clinical symptoms, was acquired through queries into patients' hospital medical records made by the P.I. (J.B. Schuch). The Brazilian versions of the ASQ - Autism Screening Questionnaire (Sato et al. 2009) and the CARS - Childhood Autism Rating Scale (Pereira et al. 2008) were also completed for some of the probands (n = 117 and n = 178, respectively), this evaluation being made by both neuropediatricians and the P.I.

The study was approved by the Ethics Committee of HCPA or Psychology Department (protocol number 05-451, 06-237 and 06632012.4.0000.5334, respectively) and was in accordance with the ethical standards established in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All participants or legal representatives signed an

informed consent form prior to their inclusion in the study. The identity of all subjects was omitted.

Genotyping:

Whole blood samples from the patients and their parents were collected for DNA extraction, which was performed by a salting out procedure (Lahiri and Nurnberger 1991). The 5-HTTLPR polymorphism was analyzed through PCR as previously described by Kaiser et al. (2001) and RFLP with *MspI* endonuclease according to Stein et al. (2006), resulting in three possible alleles (S, La, Lg) composing the genotypes. The *Stin2* was evaluated by PCR according to Ito et al. (2002), also giving rise to three alleles (9R, 10R and 12R). Genotyping of rs2066713 and rs1042173 was performed by the TaqMan allelic discrimination method (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System), according to the manufacturer's suggested protocol.

Statistical analyses:

Allele frequencies were estimated by counting. Chi-square analysis was used to assess deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The analyses of linkage disequilibrium (LD) and the estimate of haplotypes were performed with MLocus software (Long 1999). The transmission disequilibrium test (TDT) to evaluate the association hypothesis through family-based approach was performed for all polymorphisms (both single markers and haplotypes) using FBAT (family based association test) software.

The hypothesis of association was further tested for the same eight specific symptoms evaluated by clinical professionals (that is: repetitive behaviors, echolalia, seizures and epilepsy, mood instability, aggression, psychomotor agitation and sleep disorders) using logistic regression models for both single markers and haplotypes.

For single markers, the polymorphisms were evaluated defining the genotypes groups according to different criteria: for 5HTTLPR, in accordance with the effect on gene expression (low and medium X high; see Introduction for details); for rs2066713, according to carriers and non-carriers of the minor frequency allele; for *STin2*, according to the presence of 10R and 12R (the frequency of 9R allele was less than 1% and not considered in the analyzes); and for rs1042173, 3 groups, defined by the possible genotypes. Eight models for logistic regression tests were performed, according to the

number of clinical symptoms. The same statistical model was used for each symptom, including the presence of the symptom as the dependent variable, all polymorphisms as the study factors, and ethnicity as covariate. Nominally significant results obtained were submitted to Bonferroni correction, using the number of models tested. These analyses were preceded by chi-square test, and only when chi-square results were positive, the logistic regression models were performed.

Logistic regression analyses for the haplotypes regarding each of the eight symptoms were conducted with PLINK program (Purcell et al. 2007) using sliding windows that included haplotypes composed of 2, 3 and 4 polymorphisms. This approach allowed for the analysis of all possible combinations within a given window size (the number of polymorphisms in the haplotype), going forward one polymorphism at a time and following their order in the gene sequence from the 5' end to the 3' end; for example, considering the 4 variants under study herein, 3 different sliding windows with a size up to 2 variants are possible: 5HTTLPR- rs2066713; rs2066713- STin2; STin2- rs1042173. Global association P-values (P_{gl}) estimating the joint effects of all possible haplotypes at a given sliding window were accessed by the Omnibus test. The global P-values corrected for multiple comparisons (P_{glcorr}) were generated by the 10,000 permutation procedure, due to the multiple tests. When a nominally significant global window was obtained after the permutations, an analysis for individual haplotype effects was performed for that specific window, submitting the result to Bonferroni correction afterwards, according to the number of haplotypes.

All analyses were performed in the total sample and in male subgroup of patients, including ethnicity as covariate in logistic regression analyses. The significance level accepted for all tests was 0.05.

Results:

The total sample is composed by 529 individuals, distributed in 209 families. Most of the sample consisted of males (81.3%), from European descent (76.4%), with a mean age of 9.86 ± 6.17 years. Autistic disorder was the most frequent diagnosis (49.3%), followed by PDD-NOS (43.5%). The frequencies of the most common symptoms among affected individuals were the following: repetitive behaviors (75.4%), aggression (61.8%),

psychomotor agitation (60.9%), echolalia (60.4%), sleep disorders (55.8%) and mood instability (49.5%).

All the investigated polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium, and the genotype frequencies are showed for European descent patients (Table 1). The frequencies of the most common alleles were: 5HTTLPR La allele = 48%; rs2066713 A allele = 35%; STin2 12R allele = 67%; and rs1042173 T allele = 50%. Table 2 shows the LD patterns among polymorphisms of the *SLC6A4* gene. The D' values ranged from moderate to high (0.5-1.0) among the four polymorphisms, with most significant values encompassing the rs2066713, Stin2 and rs1042173, suggesting an important LD block comprising these 3 variants. However, we considered all polymorphisms to predict haplotypes due to the sizable D' values. All ASD patients were included in these analyses, since the D' estimates did not change with ethnicity.

The family-based analyses for single markers did not detect any significant result (data not shown, but available upon request). The FBAT haplotype analyses included four haplotypes, only those with estimated frequency $\geq 10\%$. The H4 haplotype is less transmitted from parents to children, than would be expected by chance ($p=0.047$); however the global p -value observed in this analyses did not indicate an association with ASD ($p_{\text{global}}=0.266$) (Table 3). The analyses in the male subgroup of patients revealed no significant results, either for single markers or haplotypes (data not shown).

The logistic regression analyses of total sample regarding single polymorphisms and common clinical symptoms of ASD showed one significant result, for the SNP rs1042173 and psychomotor agitation. The odds ratio (OR) for this symptom was 0.322 in GG homozygous, compared with the TT homozygous (95% CI=0.115–0.903, $p=0.031$; data not shown). The same result was observed in the analyses performed only in male probands (OR=0.194 for GG genotype; 95% CI=0.057-0.659; $p=0.009$) (Table 4). In this group of patients a trend for an effect of TG genotype was also seen, with an OR of 0.408 for this condition (95% CI=0.159-1.049, $p=0.063$). A biased result only in males was also observed between the 5HTTLPR polymorphism and mood instability, where the presence of LaLa genotype had an OR of 2.182 compared to others genotypes ($p=0.056$) (Table 4). Nevertheless, no nominally significant result remained after corrections, although a trend for association between rs1042173 and psychomotor agitation in males was verified ($p_{\text{corr}}=0.072$). Logistic regression analyses of haplotypes and clinical ASD symptoms did

not detect any association, for both total sample and male probands only (data not shown, but available upon request).

Discussion:

In the present study we used two main approaches to investigate a possible genetic effect of 4 polymorphisms located in the *SLC6A4* gene: the first considered ASD per se, the second evaluated common clinical symptoms. The polymorphisms were analyzed both as single markers and in haplotypes, and all analyses were performed considering the whole sample and only male probands.

The main finding observed in this study was a nominal association occurring between rs1042173 and psychomotor agitation. The positive result was found in the whole sample and in the subsample composed by male patients; no one hold significance after correction, only a trend could be seen in the last group. In both findings, nevertheless, GG homozygosis seemed to be associated with protection to psychomotor agitation when compared to TT homozygosis. Furthermore, the biased result in males heterozygous suggests a dose effect, since TG heterozygosis appears to have a non-significant protective effect. These results are in accordance with the studies of Chen and Rajewsky (2006), Vallender et al. (2008) and Seneviratne et al. (2009), showing a functional effect for rs1042173. However, given the contradictory results, the implicated allele and the direction of functional effect are not clear, preventing the establishment of a putative relation between our findings and 5-HTT expression and function. Considering also that the neurobiology of psychomotor agitation is not fully understood, the evaluation of this symptom in other ASD samples will be very relevant.

A suggestive result of association between LaLa genotype at 5HTTLPR polymorphism and mood instability was also seen in males. Previously, Longo et al. (2009) showed a significant result regarding this association in our sample, though in a smaller number of families collected. This discrepancy in results may be related to differences in sample size and statistical analyses, since in the current study ethnicity was considered a covariate. To our knowledge, there are no other studies that assess this association in ASD children. The serotonin metabolism is involved in many behaviors (Murphy et al. 2004). Among other regions, serotonergic neurons afferents from the brainstem raphe nuclei innervate limbic areas, which control various symptoms present in ASD and other

pathologies, including mood (Lucki 1998). Despite the results obtained for our sample, an involvement of 5HTTLPR variant is thus plausible in ASD mood instability, and should be further investigated.

Other analyses related to symptoms and both single markers and haplotypes did not reveal any significant association in our study. Although *SLC6A4* gene has already been studied in families with ASD probands, the analysis of its variants regarding a possible influence on common symptoms and/or characteristic of the disorder are still considered unusual. The evaluation of specific symptoms has the objective of deal with more homogenous sub-samples, especially in disorders characterized by a range of symptoms. The definition of subcategories grouping individuals with more similar clinical manifestations is suggested as an attempt to facilitate the understanding of the disease (Bishop et al. 2013). However, other criteria, as the use of endophenotypes, can be valuable in future research.

There is some evidence about differences on clinical manifestations between genders. The prevalence of ASD is higher in males than in females, but few molecular studies have considered gender differences (Van Wijngaarden-Cremers et al. 2013). In males, repetitive and stereotyped behaviors seem to be more frequent, while in females social and language problems are more common (Bolte et al. 2011; Holtmann et al. 2007). Other symptoms present in the disorder require further characterization and epidemiological data related to gender. This will be important to properly interpret the results obtained here specifically for male ASD patients.

The results for TDT analyses are controversial in ASD literature. Considering the biallelic form of 5HTTLPR polymorphism Cook et al. (1997) indicated that the S allele was associated with autism, whereas Klauck et al. (1997) found evidence of association with the L allele. The unique meta-analysis investigating more than one variant in *SCL6A4* gene did not found any significant results for both 5HTTLPR and Stin2 polymorphisms and ASD (OR=1.032–1.129) (Huang and Santangelo 2008). More recent studies continue to find contradictory results (Coutinho et al. 2007; Gadow et al. 2013; Kistner-Griffin et al. 2011; Nijmeijer et al. 2010; Valencia et al. 2012). Our family-based analyses also did not show any positive results for single polymorphisms approach, even considering 5HTTLPR in the triallelic form, which was suggested to contribute to inconsistent findings. However, the haplotype analyses indicated that the H4 haplotype was less transmitted than would be

expected by chance, nonetheless the global p-value was not significant. This haplotype is composed by some alleles already associated with *SLC6A4* expression: 5HTTLPR S allele (lower expression of this gene) (Hu et al. 2006; Nakamura et al. 2010), rs2066713 G allele (without functionality described) (Ma et al. 2010), Stin2 12R allele (transcriptional enhancer) (MacKenzie and Quinn 1999) and rs1042173 T allele (contradictory results) (Seneviratne et al. 2009; Vallender et al. 2008). A few other studies performed haplotype approach, including only two *SLC6A4* polymorphisms (5HTTLPR and Stin2). Similarly to single markers, the results persist contentious and the meta-analysis failed to find associations (Huang and Santangelo 2008). We believe the haplotype suggested here can have a functional effect on 5-HTT function, thus in ASD etiology. Nevertheless, several studies are needed to properly assess the complex effect of these variants, and then explain the results found herein.

We have selected the main polymorphisms in the *SLC6A4* gene, most with a possible functional role and adequate allele frequencies. Nonetheless, our moderate sample size could have prevented the detection of probable small effects exert by this gene. The results in the haplotype FBAT analyses and for psychomotor agitation and mood instability well illustrate this limitation. On the other hand, the use of clinical phenotypes to evaluate the role of genes in ASD is an approach not very common in the genetic studies, and seems to be very promising. Future studies are needed to confirm the data found, and we believe in their relevance in understanding the disorder and contributing to upcoming clinical and pharmacological interventions.

Acknowledgments

This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos - Clinics Hospital de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and CNPq-Institutos do Milênio. We would like to thank both the clinical staff at the Child Neurology Unit and technicians at the Laboratory of Biological Samples Collection from Clinics Hospital of Porto Alegre for their assistance with the clinical data and blood sample collections, respectively. We also thank Dr. Sandra Leistner-Segal at Medical Genetics Service from the Clinics Hospital of Porto Alegre for the fragile X syndrome genotyping, Prof. Sidia Maria Callegari-Jacques of the Department of Statistics from UFRGS for helping with the statistical analyses. We lastly would like to thank to the families who kindly participated in this research.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- APA (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR®, American Psychiatric Pub.
- Betancur, C., et al. (2002). Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. *Molecular psychiatry* 7, 67-71 doi:10.1038/sj/mp/4000923
- Bishop, S.L., et al. (2013). Subcategories of restricted and repetitive behaviors in children with autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders* 43, 1287-97 doi:10.1007/s10803-012-1671-0
- Bolte, S., E. Duketis, F. Poustka, M. Holtmann (2011). Sex differences in cognitive domains and their clinical correlates in higher-functioning autism spectrum disorders. *Autism : the international journal of research and practice* 15, 497-511 doi:10.1177/1362361310391116
- Brune, C.W., S.J. Kim, J. Salt, B.L. Leventhal, C. Lord, E.H. Cook, Jr. (2006). 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. *The American journal of psychiatry* 163, 2148-56 doi:10.1176/appi.ajp.163.12.2148
- CDC (2012). Prevalence of Autism Spectrum Disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. In: (MMWR), M.a.M.W.R. (ed)
- Chen, K., N. Rajewsky (2006). Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nature genetics* 38, 1452-6 doi:10.1038/ng1910
- Cook, E.H., Jr., et al. (1997). Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Molecular psychiatry* 2, 247-50
- Cook, E.H., B.L. Leventhal (1996). The serotonin system in autism. *Current opinion in pediatrics* 8, 348-54
- Coutinho, A.M., et al. (2007). Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels. *Human genetics* 121, 243-56 doi:10.1007/s00439-006-0301-3
- Devlin, B., et al. (2005). Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. *Molecular psychiatry* 10, 1110-6 doi:10.1038/sj.mp.4001724
- Enoch, M.A., C.A. Hodgkinson, E. Gorodetsky, D. Goldman, A. Roy (2013). Independent effects of 5' and 3' functional variants in the serotonin transporter gene on suicidal behavior in the context of childhood trauma. *Journal of psychiatric research* 47, 900-7 doi:10.1016/j.jpsychires.2013.03.007
- Fombonne, E. (2003). Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *Journal of autism and developmental disorders* 33, 365-82
- Gadow, K.D., et al. (2013). Allele-specific associations of 5-HTTLPR/rs25531 with ADHD and autism spectrum disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 40, 292-7 doi:10.1016/j.pnpbp.2012.10.019
- Greenberg, B.D., T.J. Tolliver, S.J. Huang, Q. Li, D. Bengel, D.L. Murphy (1999). Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *American journal of medical genetics* 88, 83-7
- Grossi, D., R. Marcone, T. Cinquegrana, M. Gallucci (2012). On the differential nature of induced and incidental echolalia in autism. *Journal of intellectual disability research : JIDR*, doi:10.1111/j.1365-2788.2012.01579.x

- Guhathakurta, S., et al. (2006). Serotonin transporter promoter variants: Analysis in Indian autistic and control population. *Brain research* 1092, 28-35 doi:10.1016/j.brainres.2006.03.078
- Hariri, A.R., et al. (2005). A susceptibility gene for affective disorders and the response of the human amygdala. *Archives of general psychiatry* 62, 146-52 doi:10.1001/archpsyc.62.2.146
- Heils, A., et al. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of neurochemistry* 66, 2621-4
- Hollander, E., et al. (2005). Neurological soft signs as predictors of treatment response to selective serotonin reuptake inhibitors in obsessive-compulsive disorder. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 17, 472-7 doi:10.1176/appi.neuropsych.17.4.472
- Holtmann, M., S. Bolte, F. Poustka (2007). Autism spectrum disorders: sex differences in autistic behaviour domains and coexisting psychopathology. *Developmental medicine and child neurology* 49, 361-6 doi:10.1111/j.1469-8749.2007.00361.x
- Hranilovic, D., R. Novak, M. Babic, M. Novokmet, Z. Bujas-Petkovic, B. Jernej (2008). Hyperserotonemia in autism: the potential role of 5HT-related gene variants. *Collegium antropologicum* 32 Suppl 1, 75-80
- Hu, X.Z., et al. (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *American journal of human genetics* 78, 815-26 doi:10.1086/503850
- Huang, C.H., S.L. Santangelo (2008). Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B, 903-13 doi:10.1002/ajmg.b.30720
- Ito, K., et al. (2002). A variable number of tandem repeats in the serotonin transporter gene does not affect the antidepressant response to fluvoxamine. *Psychiatry research* 111, 235-9
- Kaiser, R., et al. (2001). Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparoid and residual subtypes of schizophrenia. *Molecular psychiatry* 6, 179-85 doi:10.1038/sj.mp.4000821
- Kanemura, H., F. Sano, T. Tando, K. Sugita, M. Aihara (2013). Can EEG characteristics predict development of epilepsy in autistic children? *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 17, 232-7 doi:10.1016/j.ejpn.2012.10.002
- Kistner-Griffin, E., C.W. Brune, L.K. Davis, J.S. Sutcliffe, N.J. Cox, E.H. Cook, Jr. (2011). Parent-of-origin effects of the serotonin transporter gene associated with autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 156, 139-44 doi:10.1002/ajmg.b.31146
- Klauck, S.M., F. Poustka, A. Benner, K.P. Lesch, A. Poustka (1997). Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Human molecular genetics* 6, 2233-8
- Lahiri, D.K., J.I. Nurnberger (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19, 5444

- Lesch, K.P., et al. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of neural transmission General section* 95, 157-62
- Levy, S.E., D.S. Mandell, R.T. Schultz (2009). Autism. *Lancet* 374, 1627-38 doi:10.1016/S0140-6736(09)61376-3
- Long, J. (1999). Multiple Locus Haplotype Analysis. 3.0 edn. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, 4909 Buhl Bldg., Ann Arbor, MI 4819-0618: Software and documentation distributed by the author.
- Longo, D., L. Schuler-Faccini, A.P. Brandalize, R. dos Santos Riesgo, C.H. Bau (2009). Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain research* 1267, 9-17 doi:10.1016/j.brainres.2009.02.072
- Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological psychiatry* 44, 151-62
- Ma, D.Q., et al. (2010). Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B, 477-83 doi:10.1002/ajmg.b.31003
- MacKenzie, A., J. Quinn (1999). A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15251-5
- Mazefsky, C.A., J.C. McPartland, H.Z. Gastgeb, N.J. Minshew (2013). Brief report: comparability of DSM-IV and DSM-5 ASD research samples. *Journal of autism and developmental disorders* 43, 1236-42 doi:10.1007/s10803-012-1665-y
- Murphy, D.L., A. Lerner, G. Rudnick, K.P. Lesch (2004). Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular interventions* 4, 109-23 doi:10.1124/mi.4.2.8
- Nakamura, K., et al. (2010). Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Archives of general psychiatry* 67, 59-68 doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.137
- Nijmeijer, J.S., et al. (2010). Perinatal risk factors interacting with catechol O-methyltransferase and the serotonin transporter gene predict ASD symptoms in children with ADHD. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 51, 1242-50 doi:10.1111/j.1469-7610.2010.02277.x
- O'Hare, A. (2009). Autism spectrum disorder: diagnosis and management. *Archives of disease in childhood Education and practice* edition 94, 161-8 doi:10.1136/adc.2008.150490
- Pagon, R.A., et al. (2003). *Autism Spectrum Disorders*.
- Pereira, A., R.S. Riesgo, M.B. Wagner (2008). Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *Jornal de pediatria* 84, 487-94 doi:doi:10.2223/JPED.1828
- Praschak-Rieder, N., et al. (2007). Novel 5-HTTLPR allele associates with higher serotonin transporter binding in putamen: a [(11)C] DASB positron emission tomography study. *Biological psychiatry* 62, 327-31 doi:10.1016/j.biopsych.2006.09.022
- Purcell, S., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 81, 559-75 doi:10.1086/519795

- Rutter, M. (2013). Changing concepts and findings on autism. *Journal of autism and developmental disorders* 43, 1749-57 doi:10.1007/s10803-012-1713-7
- Sato, F.P., et al. (2009). Instrument to screen cases of pervasive developmental disorder: a preliminary indication of validity. *Rev Bras Psiquiatr* 31, 30-3
- Seneviratne, C., et al. (2013). Association, interaction, and replication analysis of genes encoding serotonin transporter and 5-HT receptor subunits A and B in alcohol dependence. *Human genetics*, doi:10.1007/s00439-013-1319-y
- Seneviratne, C., W. Huang, N. Ait-Daoud, M.D. Li, B.A. Johnson (2009). Characterization of a functional polymorphism in the 3' UTR of SLC6A4 and its association with drinking intensity. *Alcoholism, clinical and experimental research* 33, 332-9 doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00837.x
- Stein, M.B., S. Seedat, J. Gelernter (2006). Serotonin transporter gene promoter polymorphism predicts SSRI response in generalized social anxiety disorder. *Psychopharmacology* 187, 68-72 doi:10.1007/s00213-006-0349-8
- Valencia, A.V., et al. (2012). [Evidence for association and epistasis between the genetic markers SLC6A4 and HTR2A in autism etiology]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud* 32, 585-601 doi:10.1590/S0120-41572012000400014
- Vallender, E.J., C.M. Priddy, S. Hakim, H. Yang, G.L. Chen, G.M. Miller (2008). Functional variation in the 3' untranslated region of the serotonin transporter in human and rhesus macaque. *Genes, brain, and behavior* 7, 690-7 doi:10.1111/j.1601-183X.2008.00407.x
- Van Wijngaarden-Cremers, P.J., E. van Eeten, W.B. Groen, P.A. Van Deurzen, I.J. Oosterling, R.J. Van der Gaag (2013). Gender and Age Differences in the Core Triad of Impairments in Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of autism and developmental disorders*, doi:10.1007/s10803-013-1913-9
- Weiss, L.A., M. Abney, E.H. Cook, Jr., C. Ober (2005). Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *American journal of human genetics* 76, 33-41 doi:10.1086/426697
- Whitaker-Azmitia, P.M. (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23, 75-83 doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.07.022
- Yang, Z., et al. (2013). Serotonin transporter and receptor genes significantly impact nicotine dependence through genetic interactions in both European American and African American smokers. *Drug and alcohol dependence* 129, 217-25 doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.12.007

Table 1. Genotype frequencies in ASD probands.

Variant	Genotype	Frequency (%)			
		All (n=209)	European (n=160)	African (n=15)	Others ^b (n=34)
5HTTLPR	SS	23.7	21.5	26.7	32.4
	SLa	35.6	41.0	20.0	17.6
	SLg	6.2	6.2	13.3	2.9
	LaLa	23.7	23.6	26.7	23.5
	LaLg	10.8	7.6	13.3	23.5
rs2066713	AA	10.3	11.1	6.7	8.8
	AG	49.0	48.6	46.7	50.0
	GG	40.7	40.3	46.7	41.2
Stin2^a	10/10	9.3	9.0	13.3	8.8
	10/12	44.8	47.2	26.7	41.2
	12/12	44.8	42.4	60.0	50.0
rs1042173	TT	24.2	22.9	26.7	29.4
	TG	54.1	54.2	53.3	52.9
	GG	21.6	22.9	20.0	17.6

^a genotype 9/12 = 1.4% (not considered in analyses); ^b Amerindian, mixed European-African-Amerindian.

Table 2. Linkage disequilibrium pattern for polymorphisms at *SLC6A4* gene, considering all ASD sample.

LD parameters		5HTTLPR	rs2066713	Stin2	rs1042173
		5HTTLPR			
D'	rs2066713	0.614			
r-squared		0.158			
p-value		0.000			
D'	Stin2	0.564	0.971		
r-squared		0.139	0.923		
p-value		0.000	0.000		
D'	rs1042173	0.327	0.753	0.748	
r-squared		0.078	0.246	0.248	
p-value		0.000	0.000	0.000	

LD = linkage disequilibrium. D' = LD coefficient between two loci; higher the D', bigger the dependence between allele frequencies of one locus in relation to other. r² = correlation coefficient between two loci.

Table 3. Haplotype analyses using transmission disequilibrium test (HBAT).

Haplotype^{a, b}	Frequency (%)	Observed transmission^c	Expected transmission^d	Z	P
H1 – S G 12 G	29.8	80	76	0.796	0.426
H2 – La A 10 T	22.9	53	55	-0.580	0.562
H3 – La G 12 G	11.6	33	30	0.910	0.362
H4 – S G 12 T	10.4	20	25	-1.984	0.047

^aOnly haplotypes with estimated frequencies ≥ 0.10 are listed; ^bSNPs in haplotypes follows the order, according 5' \rightarrow 3' gene sequence: 5HTTLPR, rs2066713, Stin2, rs1042173; ^cObserved number of transmissions; ^dExpected number of transmissions. $P_{\text{global}}=0.266$

Table 4. Logistic regression models to assess influence of *SLC6A4* polymorphisms in ASD symptoms in male subgroup of probands.

Symptoms	Polymorphism	B (SE)	Odds Ratio (IC 95%)	P
Psychomotor Agitation				
	rs1042173			
	TT (refer)	0	1	
	TG	-0.897 (0.482)	0.408 (0.159-1.049)	0.063
	GG	-1.641 (0.625)	0.194 (0.057-0.659)	0.009^b
Mood Instability				
	5HTTLPR			
	Others ^a	0	1	
	LaLa	0.780 (0.408)	2.182 (0.981-4.855)	0.056

^aIncluded genotypes: SS, SLa, SLg, LaLg. Covariates included in all models: 5HTTLPR, rs2066713, STin2, rs1042173, ethnicity. Only models with significant results are presented. Each symptom represents a logistic regression model. ^bp_{corr}=0.072.

CAPÍTULO VI – RESULTADOS ADICIONAIS

A serem incluídos no Artigo 3

VI. 1. INTERAÇÃO ENTRE OS GENES *SLC6A4* E *ITGB3*

Ao longo dos capítulos anteriores foram apresentadas várias evidências apoiando o envolvimento do sistema serotoninérgico e das moléculas de adesão celular, em especial as integrinas, na etiologia dos TEA. Dados sugerindo interação entre ambas rotas biológicas também foram descritos. Grande parte desses achados sobre efeitos de interação se refere ao transportador de serotonina, ou 5-HTT, e à integrina $\beta 3$, ou *ITGB3*, e aos genes codificadores destes componentes (respectivamente, *SLC6A4* e *ITGB3*). Considerando o entendimento restrito que se tem atualmente acerca das bases genéticas que influenciam a origem e variabilidade clínica dos TEA, e que o estudo de interações gene-gene é indicado como uma abordagem fundamental para se elucidar a mecanismos em doenças complexas, justifica-se uma análise de interação entre os genes *SLC6A4* e *ITGB3* no presente estudo, incluindo os diferentes polimorfismos analisados.

A amostra avaliada neste estudo de interação consiste de 209 crianças com diagnóstico de TEA. Informações sobre o diagnóstico e avaliação clínica, dados coletados, instrumentos utilizados e termos de consentimento para participação no estudo estão descritos nos Artigos 1 e 2 da presente tese. Para as análises de interação, os TEA não foram considerados como entidade diagnóstica; apenas os sintomas clínicos comumente presentes nestes pacientes é que foram analisados. Após verificar a frequência dos sintomas mais comuns, foram selecionados para estas análises aqueles cuja frequência nos probandos encontra-se próxima aos 40 e 60%. Os sintomas incluídos foram: agressividade (61,8%), hiperatividade (60,9%), ecolalia (60,4%), problemas para dormir (55,8%) e labilidade do humor (49,5%). Os polimorfismos avaliados nesta abordagem estão descritos nos artigos 1 e 2, da mesma forma que os protocolos de genotipagem.

Para as análises, os sintomas foram definidos como variáveis categóricas binárias, de acordo com a presença ou ausência do sintoma avaliado. Todos os SNPs foram definidos de acordo com a presença do alelo de menor frequência e homocigotos para o alelo comum. O polimorfismo 5HTTLPR foi dividido de acordo com o provável efeito na expressão do gene *SLC6A4*, sendo homocigotos LaLa (alta expressão) *versus* demais genótipos (média e baixa expressão). O polimorfismo Stin2 foi analisado de acordo com a frequência dos genótipos, em 2 grupos: portadores do alelo de 10R *versus* homocigotos para o alelo de 12R. O alelo de 9R, embora tenha sido observado, teve frequência menor

que 1% e não foi considerado na análise. Estes dados podem ser observados em maiores detalhes na tabela 1.

A hipótese de interação entre os genes *SLC6A4* e *ITGB3* foi testada através de análises de χ^2 e regressão logística binária.

O teste de χ^2 foi realizado inserindo 3 variáveis categóricas: sintoma avaliado, um polimorfismo do gene *ITGB3* e um polimorfismos do gene *SLC6A4*. Para cada sintoma foram testadas 20 possíveis interações entre os polimorfismos de ambos os genes. Através do teste de homogeneidade de odds ratio (OR) foram determinados os termos de interação genética a serem incluídos na análise posterior de regressão logística binária. Apenas interações com valores de $p < 0,10$ no teste de homogeneidade foram considerados na análise de regressão logística. Todos os dados referentes às análises de χ^2 são apresentados na tabela 2. Além do ponto de corte estatístico, o tamanho amostral em cada casela também foi considerado; subgrupos com $N < 20$ em cada casela das interações 1x1 não foram analisados.

De acordo com estes critérios foram realizados 5 modelos de regressão logística binária: 1 para problemas para dormir, 1 para ecolalia e 3 para agressividade. Os resultados significantes ($p \leq 0,05$) foram submetidos à correção de Bonferroni para múltiplos testes. Etnia e gênero foram incluídos como covariáveis em todos os modelos. O software SPSS versão 20 foi utilizado para todas as análises. O nível de significância aceito foi de 0,05.

Os resultados da regressão logística encontram-se nas tabelas 3, 4 e 5. Em cada tabela são apresentados os efeitos principais de cada um dos polimorfismos inseridos nos modelos e o termo de interação, de acordo com o sintoma analisado. Não foram observadas influências dos efeitos principais dos SNPs ou da interação avaliada para problemas para dormir (tabela 3). Em relação à ecolalia, uma interação significativa entre o alelo T-rs12603582 e o alelo A-rs1042173 foi observada; a presença de ambos os alelos foi associada a um maior risco para este sintoma (OR=4,965, IC 95%=1,003-24,575, $p=0,05$) (tabela 4). A análise do sintoma de agressividade revelou 3 interações significantes, todas elas com o rs15908, em 3 modelos de regressão logística distintos. Foi observado um efeito de risco na interação entre o alelo C-rs15908 com diferentes polimorfismos do gene *SCL6A4*, compreendendo: o alelo A-rs2066713 (OR=4,799, IC 95%=1,289-17,872, $p=0,019$), o alelo 10R-Stin2 (OR=5,128, IC 95%=1,378-19,082, $p=0,015$) e o alelo A-

rs1042173 (OR=5,194, IC 95%=1,001-26,951, p=0,05) (tabela 5). Entretanto, nenhuma das interações nos 5 modelos avaliados sobreviveu às correções para múltiplos testes.

Tanto o tamanho amostral moderado como a estratégia de análise utilizada podem ter contribuído para os resultados obtidos nas análises de interação realizadas neste estudo. Porém, embora fortemente recomendadas, não há consenso sobre a melhor metodologia para testar possíveis interações gene-gene. Outro grau de dificuldade é adicionado pela necessidade de incluir diferentes polimorfismos e vários genes nos modelos testados, para que se investiguem essas hipóteses da maneira mais fidedigna possível em relação à arquitetura genética de doenças complexas como os TEA. A replicação de achados através de diferentes estratégias, assim como o desenvolvimento de novas metodologias para análises de interação, são fundamentais para o avanço no entendimento de tais mecanismos etiológicos.

Tabela 1. Distribuição dos grupos genéticos para cada polimorfismo, de acordo com os critérios de frequência genotípica ou de expressão do gene.

Polimorfismo		N (%)*
Gene <i>ITGB3</i>		
rs2317385	GG	122 (62,9%)
	AA/ AG	72 (37,1%)
rs5918	TT	141 (72,7%)
	CC/ CT	53 (27,3%)
rs15908	AA	61 (31,6%)
	CC/ CA	132 (68,4%)
rs12603582	GG	126 (65,3%)
	TT/ TG	67 (34,7%)
rs3809865	AA	96 (49,5%)
	TT/ TA	98 (50,5%)
Gene <i>SLC6A4</i>		
5HTTLPR	LaLa	46 (23,7%)
	Outros genótipos ^a	148 (76,3%)
rs2066713	GG	79 (40,7%)
	AA/ AG	115 (59,3%)
Stin2	12R12R	87 (45,3%)
	10R10R/ 10R12R	105 (54,7%)
rs1042173	CC	42 (21,6%)
	AA/ AC	152 (78,4%)

*frequência obtida da amostra total. ^a demais genótipos: SS, SLa, SLg, LaLg.

Tabela 2. Valores de p obtidos a partir do teste de homogeneidade de odds ratio (OR) para os termos de interação genética para cada sintoma avaliado.

Sintoma	Hiperatividade	Labilidade do humor	Problemas para dormir	Agressividade	Ecolalia
Interação					
rs2317385 X 5HTTLPR	0.888	0.952	0.526	0.099	0.309
rs2317385 X rs2066713	0.753	0.686	0.816	0.791	0.127
rs2317385 X Stin2	0.709	0.386	0.990	0.834	0.386
rs2317385 X rs1042173	0.516	0.625	0.238	0.999	0.524
rs5918 X 5HTTLPR	0.836	0.008	0.434	0.464	0.149
rs5918 X rs2066713	0.897	0.335	0.111	0.015	0.165
rs5918 X Stin2	0.880	0.137	0.018	0.007	0.050
rs5918 X rs1042173	0.186	0.411	0.492	0.324	0.852
rs15908 X 5HTTLPR	0.439	0.648	0.167	0.171	0.821
rs15908 X rs2066713	0.515	0.718	0.333	0.012	0.679
rs15908 X Stin2	0.315	0.980	0.253	0.008	0.212
rs15908 X rs1042173	0.189	0.717	0.261	0.033	0.300
rs12603582 X 5HTTLPR	0.885	0.283	0.236	0.181	0.122
rs12603582 X rs2066713	0.076	0.701	0.229	0.193	0.258
rs12603582 X Stin2	0.084	0.671	0.067	0.235	0.781
rs12603582 X rs1042173	0.371	0.298	0.457	0.140	0.050
rs3809865 X 5HTTLPR	0.234	0.959	0.249	0.857	0.175
rs3809865 X rs2066713	0.810	0.825	0.049	0.112	0.513
rs3809865 X Stin2	0.554	0.334	0.027	0.123	0.601
rs3809865 X rs1042173	0.166	0.901	0.124	0.343	0.465

Em negrito estão as interações com valor de $p < 0,10$ no teste de homogeneidade.

Tabela 3: Análise da influência de polimorfismos nos genes *SLC6A4* e *ITGB3* sobre problemas para dormir

		B	EP	OR (IC 95%)	P
Efeito principal na amostra total					
rs3809865	AA	0	-	1	-
	TT/TA	-0,155	0,297	0,856 (0,478-1,533)	0,601
rs2066713	GG	0	-	1	-
	AA/AG	-0,278	0,301	0,757 (0,420-1,367)	0,356
Interação rs3809865-rs2066713					
Presença do alelo T-rs3809865 em não portadores do alelo A-rs2066713		-0,847	0,484	0,429 (0,166-1,107)	0,080
Presença do alelo A-rs2066713 em não portadores do alelo T-rs3809865		-0,869	0,449	0,419 (0,174-1,011)	0,053
Presença do alelo T-rs3809865 em portadores do alelo A-rs2066713		1,115	0,616	3,049 (0,912-10,189)	0,070

Teste Hosmer and Lemeshow $p=0,883$. EP: erro padrão, OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança, P*: valor após correção de Bonferroni. Modelo ajustado por etnia e gênero.

Tabela 4: Análise da influência de polimorfismos nos genes *SLC6A4* e *ITGB3* sobre ecolalia

		B	EP	OR (IC 95%)	P	P*
Efeito principal na amostra total						
rs12603582	GG	0	-	1	-	-
	TT/TG	-0,560	0,314	0,571 (0,309-1,056)	0,074	
rs1042173	CC	0	-	1	-	-
	AA/AC	-0,397	0,374	0,672 (0,323-1,399)	0,289	
Interação rs12603582-rs1042173						
Presença do alelo T-rs12603582 em não portadores do alelo A-rs1042173		-1,839	0,734	0,159 (0,038-0,670)	0,012	0,060
Presença do alelo A-rs1042173 em não portadores do alelo T-rs12603582		-1,055	0,538	0,348 (0,121-0,999)	0,050	0,250
Presença do alelo T-rs12603582 em portadores do alelo A-rs1042173		1,602	0,816	4,965 (1,003-24,575)	0,050	0,250

Teste Hosmer and Lemeshow $p=0,978$. EP: erro padrão, OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança, P*: valor após correção de Bonferroni. Modelo ajustado por etnia e gênero.

Tabela 5: Análise da influência de polimorfismos nos genes *SLC6A4* e *ITGB3* sobre agressividade

		B	EP	OR (IC 95%)	P	P*
Efeito principal na amostra total						
rs15908	AA	0	-	1	-	-
	CC/CA	-0,103	0,321	0,902 (0,481-1,690)	0,747	
rs2066713	GG	0	-	1	-	-
	AA/AG	0,135	0,301	1,144 (0,634-2,066)	0,655	
Stin2	12R12R	0	-	1	-	-
	10R10R/10R12R	0,280	0,302	1,323 (0,733-2,390)	0,353	
rs1042173	CC	0	-	1	-	-
	AA/AC	-0,105	0,360	0,900 (0,444-1,824)	0,770	
Interação rs15908-rs2066713						
Presença do alelo C-rs15908 em não portadores do alelo A-rs2066713		-1,007	0,511	0,365 (0,134-0,994)	0,049	0,245
Presença do alelo A-rs2066713 em não portadores do alelo C-rs15908		-0,913	0,552	0,401 (0,136-1,184)	0,098	
Presença do alelo C-rs15908 em portadores do alelo A-rs2066713		1,569	0,671	4,799 (1,289-17,872)	0,019	0,095
Interação rs15908-Stin2						
Presença do alelo C-rs15908 em não portadores do alelo 10R-Stin2		-1,009	0,488	0,365 (0,140-0,949)	0,039	0,195
Presença do alelo 10R-Stin2 em não portadores do alelo C-rs15908		-0,823	0,553	0,439 (0,149-1,297)	0,137	
Presença do alelo C-rs15908 em portadores do alelo 10R-Stin2		1,635	0,670	5,128 (1,378-19,082)	0,015	0,075
Interação rs15908-rs1042173						
Presença do alelo C-rs15908 em não portadores do alelo A-rs1042173		-1,397	0,759	0,247 (0,056-1,094)	0,066	
Presença do alelo A-rs1042173 em não portadores do alelo C-rs15908		-1,212	0,709	0,297 (0,074-1,195)	0,087	
Presença do alelo C-rs15908 em portadores do alelo A-rs1042173		1,647	0,840	5,194 (1,001-26,951)	0,050	0,250

Teste Hosmer and Lemeshow para cada um dos 3 modelos p=0,908; p=0,994; p=0,957, respectivamente. EP: erro padrão, OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança, P*: valor após correção de Bonferroni. Modelo ajustado por etnia e gênero.

CAPÍTULO VII – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os transtornos do espectro autista são caracterizados por uma grande variedade de manifestações clínicas, que estão relacionadas à gravidade da doença. A heterogeneidade fenotípica contribui para a dificuldade em estabelecer rotas biológicas e mecanismos neuronais que estejam envolvidos na sua etiologia, permanecendo limitado o nosso conhecimento sobre a doença. Com isso, a procura por marcadores biológicos, incluindo variantes genéticas, tem se mostrado uma tarefa complexa.

Baseando-se nas hipóteses biológicas que sugerem o envolvimento do sistema serotoninérgico e da superfamília das integrinas, e nos recentes resultados de estudos de associação, nós investigamos diferentes polimorfismos ao longo dos genes *SLC6A4* e *ITGB3*. De acordo com os estudos anteriores, nosso objetivo principal consistia na identificação de marcadores individuais e de haplótipos, de ambos os genes, que pudessem estar associados aos TEA como entidade diagnóstica, às manifestações clínicas mais comuns e à gravidade dos mesmos.

No gene *SLC6A4*, 4 polimorfismos foram avaliados: a repetição 5HTTLPR, que inclui o SNP rs25531, na região promotora; o SNP rs2066713 no intron 1; o Stin2, VNTR localizado no intron 2; e o SNP rs1042173, na região 3' UTR. Nossa análise baseada em famílias não mostrou resultados positivos para os marcadores individuais, mas uma associação nominal com TEA foi detectada para o haplótipo H4 -S-G-12-T (polimorfismos na mesma ordem citada acima), que foi menos transmitido do que o esperado. Três destes polimorfismos possuem alguma evidência de impacto funcional, o 5HTTLPR, o Stin2 e o rs1042173. Considerando o número de estudos funcionais realizados e a consistência desses resultados, é possível fazer algumas inferências sobre o possível efeito deste haplótipo nos TEA com base no 5HTTLPR. O alelo *S*, presente no H4, é relacionado à menor expressão do gene, consequentemente uma menor recaptação de serotonina e aumento dos níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica (Hu et al. 2006; Nakamura et al. 2010). Como já mencionado no Capítulo I, algumas evidências neurobiológicas sugerem que níveis reduzidos de serotonina estariam presentes em pacientes com TEA (Hollander et al. 2005; McDougle et al. 1996). Biologicamente, a direção esperada de associação em um estudo de famílias é este alelo ser menos transmitido ao probando afetado, precisamente o que é observado neste resultado nominal; o alelo *S* atuaria, então, como um fator de proteção. Porém, achados sugerindo esse alelo como de risco existem na literatura quase em igual número, assim como evidências neurobiológicas que apoiam tal

hipótese. Mesmo entre diferentes meta-análises dos estudos de associação os resultados permanecem ainda inconclusivos (Huang and Santangelo 2008). É possível que os diferentes alelos do 5HTTLPR, através de seus efeitos funcionais bem documentados, possam tanto conferir risco como proteção aos TEA de acordo com os alelos presentes nos demais polimorfismos do gene *SLC6A4*. Considerando evidências de estudos funcionais para os polimorfismos que compõem o haplótipo H4, tanto o alelo 12 do *Stin2* como o alelo T do rs1042173 possuem supostamente efeito antagônico ao alelo S do 5HTTLPR, ou seja, aumento da atividade do 5HTT e redução da serotonina sináptica (MacKenzie and Quinn 1999; Seneviratne et al. 2009; Vallender et al. 2008). Então, mesmo com efeito funcional importante, a possível influência de proteção conferida pelo alelo S poderia ser “mascarada” pelos outros 2 alelos funcionais presentes no haplótipo, explicando nosso achado não significativo. O esclarecimento do impacto que cada polimorfismo e alelo têm na função do gene, assim como as relações das diferentes variantes entre si e com a origem dos TEA, será importante para a resolução das inconsistências vistas nos estudos de associação, tanto com polimorfismos isolados como com haplótipos.

Em relação às manifestações clínicas avaliadas, associações nominais foram observadas entre o rs1042173 e agitação psicomotora na amostra total e em meninos, e entre o 5HTTLPR com a instabilidade do humor apenas nos meninos. Embora a significância não tenha se mantido após correção, essas associações são plausíveis. O efeito do metabolismo serotoninérgico sobre o humor é fortemente evidenciado por diferentes tipos de investigações. Além disso, sugere-se que a influência do transportador de serotonina possa estar mais relacionada ao comportamento, do que propriamente à etiologia da doença. Os nossos achados concordam ainda com a influência marcante que o gênero apresenta nos TEA. Além da maior frequência de casos masculinos, evidências de diferenças em nível cerebral e na manifestação de sintomas têm sido recorrentes nestes transtornos (Gabriele et al. 2014). Outros estudos não abordaram esta perspectiva de análise, dificultando uma discussão mais ampla dos nossos achados. Contudo, acreditamos na validade desta metodologia para o estudo do gene *SLC6A4* e na plausibilidade dos nossos resultados. O aprofundamento destas pesquisas em grupos de pacientes definidos pelo sexo contribuirá também para entender melhor as razões da alta prevalência de meninos em relação a meninas nos TEA.

De modo semelhante, nossos objetivos foram satisfeitos com os resultados encontrados para o gene *ITGB3*. Cinco SNPs foram por nós avaliados, rs2317385 na região 5'UTR; rs5918 no exon 3; rs15908 no exon 9; rs12603582 no intron 11; e rs3809865 na região 3' UTR. Embora nenhum desses polimorfismos, juntamente com as demais variantes bastante exploradas neste gene, possua dados acerca da sua funcionalidade, os resultados positivos de estudos anteriores obtidos através de diferentes abordagens sugerem a relevância do *ITGB3* nos TEA. Nós verificamos esta influência na análise baseada em famílias, onde o haplótipo H5 G- T- C- G- A (polimorfismos na mesma ordem citada acima) foi significativamente não transmitido aos probandos, sugerindo um efeito de proteção ao aparecimento dos TEA. A análise de famílias mostrou ainda tendência à transmissão preferencial do alelo A do rs15908 e do haplótipo H1 G- T- A- G- A, resultado não mantido após correção. Considerando essas associações nominais, um papel importante do rs15908 é apontado: a única diferença entre os haplótipos H1 e H5 é justamente esse SNP (alelo C no H5 e alelo A no H1); a associação poderia, então, definida pelo rs15908, sendo o C um alelo de proteção e o A um alelo de risco, concordando com o resultado visto para esse polimorfismo isoladamente.

Algumas das investigações com enfoque neste gene avaliaram o polimorfismo rs15908 nos TEA através de diferentes abordagens: estudos baseados em famílias, como um marcador individual ou incluído em haplótipos; avaliando um possível efeito sobre os níveis de serotonina; ou investigando a possibilidade de interação com distintos polimorfismos em outros genes, principalmente o *SLC6A4*. Os resultados são, em geral, bastante estimulantes, uma vez que várias associações foram detectadas nessas investigações. Então, poderíamos afirmar que o rs15908 contribui para a etiologia dos TEA, e que os resultados marginais e não significativos que observamos são devidos em grande parte ao poder reduzido do nosso estudo. Para melhor investigar essa hipótese, realizamos uma meta-análise com os resultados disponíveis para o rs15908 individualmente. Após uma revisão detalhada, 4 estudos diferentes foram encontrados, além do nosso, todos com análises baseadas em famílias. Não foi verificada associação, (OR=1,11, IC 95%=0,67-1,86); porém, a alta heterogeneidade detectada sugere diferenças importantes entre as amostras estudadas ($\chi^2=24,03$, gl=4, estatística I²=83,4%, $p<0,001$) e dificulta a interpretação desse achado. Novos estudos de associação com enfoque neste polimorfismo devem ser realizados para corroborar seu possível envolvimento nos TEA.

Isso é importante também para aumentar o número de publicações, permitindo a obtenção de amostras mais homogêneas e um viés menor em meta-análises futuras. Por outro lado, estudos funcionais com esta e outras variantes em diferentes cenários são altamente recomendados. O rs15908 envolve uma troca sinônima no exon 9 (42130A>C, Val381Val), sugerindo que tanto o contexto genético como mecanismos regulatórios sejam fundamentais para o possível efeito deste polimorfismo na função gênica e, conseqüentemente, na doença.

Outros resultados por nós observados para o *ITGB3* também podem ser comentados. Estes se referem às análises das manifestações clínicas, tanto em relação aos SNPs individuais como aos haplótipos. Embora apenas um resultado positivo tenha sido obtido após a correção para múltiplos testes (associação entre ecolalia e o haplótipo contendo alelo A no rs15908 e alelo G no rs12603582), vários outros efeitos poderiam ser sugeridos através das associações nominais observadas. Essas incluem efeitos individuais do rs5918 sobre agressividade, do rs2317385 sobre epilepsia ou convulsões, e do rs12603582 novamente sobre ecolalia. Ainda, 4 diferentes haplótipos em janelas de tamanho 2 e 3, que, em conjunto, incluem todos os polimorfismos estudados, poderiam estar associados com epilepsia e problemas para dormir. Mais que reforçar a importância do *ITGB3* na etiologia dos TEA, estes resultados sugerem que a influência deste gene seja bastante complexa, e altamente vinculada à heterogeneidade clínica da doença. Nenhum dos estudos anteriores com o gene *ITGB3* utilizou essa abordagem; assim, a análise de subgrupos de pacientes parece ser realmente promissora e necessária no esclarecimento de tal influência.

Os instrumentos ASQ e CARS foram aplicados na amostra com o intuito de examinar a gravidade das diversas manifestações clínicas, comuns aos TEA. Mesmo sendo duas ferramentas importantes na prática clínica, nosso estudo falhou em detectar associações destes instrumentos com os polimorfismos avaliados. Em relação ao *ITGB3*, encontramos uma associação entre o alelo A do rs2317385 e escores mais baixos no ASQ, que não se manteve após correção. Já para o *SLC6A4* nenhum resultado positivo ou tendência à associação foi verificado, o que nos fez optar por não descrever tais análises no respectivo manuscrito. Apesar da importância do ASQ e do CARS, nem todos os probandos completaram esta avaliação. Isto diminuiu consideravelmente o N da amostra para estas análises, podendo ter contribuído para os resultados observados. O CARS

também é empregado nos casos em que alguma intervenção clínica é efetuada, com o propósito de verificar sua eficácia, comparando os escores antes e após a intervenção. Esta possibilidade de análise não foi considerada no presente trabalho, mas pode ser importante em estudos futuros, juntamente com a avaliação da gravidade dos TEA que pode ser feita com esses instrumentos.

Por ter um início precoce, a etiologia genética dos TEA é frequentemente investigada a partir de estudos baseados em famílias, que têm também a vantagem de diminuir o risco de resultados espúrios causados por possível estratificação de amostras populacionais. Porém, os relatos destas pesquisas na literatura mostram que esta metodologia não tem sido suficiente para esclarecer a contribuição genética, incluindo os genes *ITGB3* e *SLC6A4*, nos TEA. Por outro lado, estratégias como o uso de instrumentos para avaliação da doença de uma forma quantitativa, e a análise de subgrupos mais homogêneos de pacientes ainda é escassa. As doenças multifatoriais têm como característica o envolvimento de múltiplas rotas biológicas implicadas na etiologia e desenvolvimento da patologia em si. A presença de sintomatologia variada e de diferentes comorbidades possivelmente está relacionada a alterações em diferentes rotas biológicas, e a diferentes regiões do genoma. Resultados positivos nas análises de sintomas carecem de replicação em diferentes amostras com TEA. Mas, estes sintomas também podem ser examinados em outras patologias, com o intuito de verificar se o sentido da associação descrita é similar. Patologias ou sintomas semelhantes provavelmente envolvem as mesmas rotas biológicas e os mesmos genes, ou rotas e genes bastante relacionados; a comparação entre os achados pode ajudar a elucidar as relações etiológicas mais específicas. Avanços neste sentido também podem contribuir para a identificação de endofenótipos nos TEA, que talvez tenham mais poder do que as manifestações clínicas para definir subamostras mais homogêneas clínica e geneticamente.

Devido à associação de ambos os genes *ITGB3* e *SLC6A4* com o metabolismo da serotonina e com os TEA, análises de interação gene-gene foram realizadas. A importância desta abordagem é evidenciada pelos resultados positivos nas análises dos genes individuais, pelo conhecimento neurobiológico que sugere a influência da serotonina na etiologia e sintomatologia dos transtornos, e pelos estudos prévios de interação entre os genes analisados. A regressão logística, frequentemente usada em estudos deste tipo, foi a ferramenta empregada nas nossas análises de interação gene-gene. Alguns critérios

estatísticos foram estabelecidos para melhor compreender e descrever os resultados obtidos. Foram observados alguns resultados nominais que não permaneceram após correção. Entre estes, uma interação entre o alelo T-rs12603582 no gene *ITGB3* e o alelo A-rs1042173 no gene *SLC6A4* foi vista para ecolalia. Diferentes polimorfismos do gene *ITGB3* foram associados com ecolalia (Capítulo III), incluindo o rs12603582, presente também neste resultado da interação. Curiosamente, os alelos de risco na análise individual e na interação são opostos (alelo G e alelo T, respectivamente), demonstrando uma grande complexidade genética envolvida. Nas análises com o sintoma de agressividade foram observadas 3 interações nominais, todas envolvendo o mesmo polimorfismo e alelo do gene *ITGB3*, o C-rs15908. Em relação ao *SLC6A4*, contribuíram para essas interações os alelos A-rs2066713, 10R-Stin2 e A-rs1042173. Observando todas as análises realizadas com o gene *ITGB3* (Capítulos III e V), é difícil não sugerir que este gene tenha um papel importante na etiologia e sintomatologia do transtorno. A complexidade deste possível efeito pode ser vista não só nos diferentes sintomas com que o rs15908 estaria associado, mas também na participação de ambos os alelos nestas associações; nas análises do *ITGB3* individualmente, o alelo A seria o alelo de risco, enquanto que o alelo C conferiria risco na interação. Os achados de interação para o rs15908 se somam aos resultados obtidos nesta análise para o rs12603582, no sentido de corroborar uma influência elaborada do *ITGB3* na etiologia dos TEA, dependente das demais variantes genéticas presentes neste gene, do *background* genético conferido por outros genes, tais como o *SLC6A4*, e das características clínicas da amostra avaliada.

Outros estudos já realizaram análises de interações entre estes dois genes, na sua maioria investigando a etiologia da doença em estudos de caso-controle (Coutinho et al. 2007; Ma et al. 2010; Mei et al. 2007; Singh et al. 2013; Valencia et al. 2012; Weiss et al. 2006b). Temos a perspectiva de realizar análises semelhantes, utilizando a metodologia destas investigações. O MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*) é uma ferramenta especialmente desenvolvida para identificar interações entre variáveis genéticas de pequeno efeito que influenciam uma resposta binária (Hahn et al. 2003). Assim, seria uma metodologia mais adequada para estudos de interação, em comparação à regressão logística. Entretanto, o MDR não é utilizado comumente no Brasil, e a falta de conhecimento impediu que executássemos as análises com esta ferramenta. Nossa intenção

é buscar mais informações técnicas, para compreender corretamente esta abordagem e utilizá-la no futuro, complementando nossas análises de interação gene-gene.

De encontro aos instrumentos utilizados na prática clínica no Brasil, o uso do ADI (*Autism Diagnostic Interview*) ou do ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*) ainda não é amplo. Ambos são considerados instrumentos importantes no diagnóstico e na avaliação de probandos com TEA, e empregados corriqueiramente nos estudos de diversos países. A impossibilidade de usá-los no presente trabalho pode ter dificultado a comprovação de nossas hipóteses de estudo. O ADOS, especialmente na avaliação dos sintomas, seria de grande auxílio para determinação de endofenótipos válidos, gerando categorias sintomatológicas mais fidedignas, o que provavelmente facilitaria a detecção de associações legítimas e também a replicação dos resultados. Esta limitação foi contornada ao comparar os dados dos questionários e dos prontuários médicos disponíveis, visando aferir as informações obtidas. Ainda assim, a aplicação desses instrumentos em estudos futuros deve ser considerada.

Além desta limitação, nosso tamanho amostral é considerado baixo para estudos de associação. Embora novas coletas tenham sido realizadas desde o estudo inicial com a presente amostra (Longo et al., 2009) e mais de 60 novas famílias tenham sido incluídas, ele ainda pode ser considerado pequeno. O tamanho amostral também está relacionado ao poder das análises estatísticas. As variantes genéticas geralmente investigadas em estudos de associação com doenças psiquiátricas apresentam pequeno efeito e demandam amostras cada vez maiores. O poder do nosso estudo em detectar associações foi estimado em aproximadamente 40-50%, para as análises de famílias e de sintomas. Isto pode ter contribuído nos resultados obtidos, inclusive nas associações nominais. Apesar disso, nossos resultados permanecem importantes e podem contribuir para futuras meta-análises, ampliando o tamanho amostral e o poder destes estudos.

Algumas perspectivas para este estudo podem ser comentadas, além da nova análise de interação entre os genes *SLC6A4* e *ITGB3*. Um projeto em conjunto com o Depto de Psicologia da UFRGS foi iniciado, com o objetivo de avaliar o fenótipo amplo do autismo. Até o presente momento, em torno de 10 famílias foram avaliadas e características de personalidade, como sociabilidade e flexibilidade, foram investigadas nos pais dos probandos. Nosso intuito é aumentar o tamanho da amostra e analisar o exoma dessas famílias, buscando associação com variantes comuns e/ou raras, tanto com os TEA

em si como com os diferentes constructos biológicos avaliados. Outra perspectiva envolve a análise conjunta de CNVs e de pequenas distorções em algumas crianças da amostra. Foram selecionados 30 probandos, que completaram todo o protocolo de avaliação clínica. A avaliação de pequenas distorções será realizada por médicos geneticistas com experiência em tais exames, do Serviço de Genética Médica do HCPA. Os resultados das análises genéticas encontram-se disponíveis e diversas análises de bioinformática estão sendo realizadas. Nosso objetivo é sintetizar estes dados e buscar identificar se algum CNV está associado à presença de distorções no probando, comparando com os dados da literatura nos casos em que a alteração genética já foi descrita.

Os resultados apresentados nesta Tese, embora necessitem de replicação, indicam a importância dos genes *SLC6A4* e *ITGB3* na etiologia e caracterização clínica dos TEA. As associações sugeridas são interessantes, especialmente em relação aos sintomas, e representam uma abordagem promissora nos estudos com doenças complexas e bastante heterogêneas clinicamente. O avanço no entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na origem e manifestações clínicas dos TEA é fundamental para um melhor entendimento deste grupo de doenças como um todo, e não somente em relação à sua etiologia, tendo-se sempre em foco o uso deste conhecimento para melhorar a vida dos indivíduos com TEA e suas famílias.

CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecasis, G.R., et al. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56-65 doi:10.1038/nature11632
- Abrahams, B.S., D.H. Geschwind (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9, 341-55 doi:10.1038/nrg2346
- Amiet, C., et al. (2008). Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis. *Biological psychiatry* 64, 577-82 doi:10.1016/j.biopsych.2008.04.030
- Amodio, D.M., C.D. Frith (2006). Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nature reviews Neuroscience* 7, 268-77 doi:10.1038/nrn1884
- Anderson, G.M. (2012). Twin studies in autism: what might they say about genetic and environmental influences. *Journal of autism and developmental disorders* 42, 1526-7 doi:10.1007/s10803-012-1552-6
- Anney, R., et al. (2012). Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Human molecular genetics* 21, 4781-92 doi:10.1093/hmg/ddc301
- Anney, R., et al. (2010). A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Human molecular genetics* 19, 4072-82 doi:10.1093/hmg/ddq307
- APA (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR®*, American Psychiatric Pub.
- APA (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-V*. Washington, D.C., American Psychiatric Pub.
- Archelos, J.J., S.C. Prevaliti, H.P. Hartung (1999). The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends in neurosciences* 22, 30-8
- Bailey, A., et al. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25, 63-77
- Bailey, A., S. Palferman, L. Heavey, A. Le Couteur (1998). Autism: the phenotype in relatives. *Journal of autism and developmental disorders* 28, 369-92
- Barczyk, M., S. Carracedo, D. Gullberg (2010). Integrins. *Cell and tissue research* 339, 269-80 doi:10.1007/s00441-009-0834-6
- Barton, M.L., D.L. Robins, D. Jashar, L. Brennan, D. Fein (2013). Sensitivity and specificity of proposed dsm-5 criteria for autism spectrum disorder in toddlers. *Journal of autism and developmental disorders* 43, 1184-95 doi:10.1007/s10803-013-1817-8
- Betancur, C. (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain research* 1380, 42-77 doi:10.1016/j.brainres.2010.11.078
- Bi, C., et al. (2012). Mutations of ANK3 identified by exome sequencing are associated with autism susceptibility. *Human mutation* 33, 1635-8 doi:10.1002/humu.22174
- Boddaert, N., et al. (2009). MRI findings in 77 children with non-syndromic autistic disorder. *PloS one* 4, e4415 doi:10.1371/journal.pone.0004415
- Boylan, C.B., M.E. Blue, C.F. Hohmann (2007). Modeling early cortical serotonergic deficits in autism. *Behavioural brain research* 176, 94-108 doi:10.1016/j.bbr.2006.08.026
- Bromley, R.L., G. Mawer, J. Clayton-Smith, G.A. Baker (2008). Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology* 71, 1923-4 doi:10.1212/01.wnl.0000339399.64213.1a

- Brune, C.W., S.J. Kim, J. Salt, B.L. Leventhal, C. Lord, E.H. Cook, Jr. (2006). 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. *The American journal of psychiatry* 163, 2148-56 doi:10.1176/appi.ajp.163.12.2148
- Carneiro, A.M., E.H. Cook, D.L. Murphy, R.D. Blakely (2008). Interactions between integrin alphaIIb beta3 and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest* 118, 1544-52 doi:10.1172/JCI33374
- Carr, L., M. Iacoboni, M.C. Dubeau, J.C. Mazziotta, G.L. Lenzi (2003). Neural mechanisms of empathy in humans: a relay from neural systems for imitation to limbic areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5497-502 doi:10.1073/pnas.0935845100
- Carroll, D., et al. (2014). Examination of aggression and self-injury in children with autism spectrum disorders and serious behavioral problems. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America* 23, 57-72
- Carter, M.D., C.R. Shah, C.L. Muller, J.N. Crawley, A.M. Carneiro, J. Veenstra-VanderWeele (2011). Absence of preference for social novelty and increased grooming in integrin beta3 knockout mice: initial studies and future directions. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 4, 57-67 doi:10.1002/aur.180
- Carter, M.T., S.W. Scherer (2013). Autism spectrum disorder in the genetics clinic: a review. *Clinical genetics* 83, 399-407 doi:10.1111/cge.12101
- CDC (2014). Prevalence of Autism Spectrum Disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. In: (MMWR), M.A.M.W.R. (ed)
- Chahrour, M.H., et al. (2012). Whole-exome sequencing and homozygosity analysis implicate depolarization-regulated neuronal genes in autism. *PLoS genetics* 8, e1002635 doi:10.1371/journal.pgen.1002635
- Chakrabarti, S., E. Fombonne (2001). Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 285, 3093-3099
- Chakrabarti, S., E. Fombonne (2005). Pervasive developmental disorders in preschool children. *Annual progress in child psychiatry and child development* 2002, 273
- Chandana, S.R., et al. (2005). Significance of abnormalities in developmental trajectory and asymmetry of cortical serotonin synthesis in autism. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23, 171-82 doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.08.002
- Chavis, P., G. Westbrook (2001). Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411, 317-21 doi:10.1038/35077101
- Chen, K., N. Rajewsky (2006). Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nature genetics* 38, 1452-6 doi:10.1038/ng1910
- Cochrane, L.E., K.E. Tansey, M. Gill, L. Gallagher, R.J. Anney (2010). Lack of association between markers in the ITGA3, ITGAV, ITGA6 and ITGB3 and autism in an Irish sample. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 3, 342-4 doi:10.1002/aur.157
- Constantino, J.N., R.D. Todd (2003). Autistic traits in the general population: a twin study. *Archives of general psychiatry* 60, 524-30 doi:10.1001/archpsyc.60.5.524
- Cook, E.H., B.L. Leventhal (1996). The serotonin system in autism. *Current opinion in pediatrics* 8, 348-54
- Cook Jr, E.H., S.W. Scherer (2008). Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 455, 919-923

- Courchesne, E., K. Pierce (2005). Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Current opinion in neurobiology* 15, 225-30 doi:10.1016/j.conb.2005.03.001
- Coutinho, A.M., et al. (2007). Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels. *Human genetics* 121, 243-56 doi:10.1007/s00439-006-0301-3
- Cuccaro, M.L., et al. (2012). Exploring the relationship between autism spectrum disorder and epilepsy using latent class cluster analysis. *Journal of autism and developmental disorders* 42, 1630-41 doi:10.1007/s10803-011-1402-y
- Dalva, M.B., A.C. McClelland, M.S. Kayser (2007). Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature reviews Neuroscience* 8, 206-20 doi:10.1038/nrn2075
- Daubert, E.A., B.G. Condron (2010). Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends in neurosciences* 33, 424-34 doi:10.1016/j.tins.2010.05.005
- Dawson, G., et al. (2002). Defining the broader phenotype of autism: genetic, brain, and behavioral perspectives. *Development and psychopathology* 14, 581-611
- Deth, R., C. Muratore, J. Benzecry, V.A. Power-Charnitsky, M. Waly (2008). How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. *Neurotoxicology* 29, 190-201 doi:10.1016/j.neuro.2007.09.010
- DiCicco-Bloom, E., et al. (2006). The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 6897-906 doi:10.1523/JNEUROSCI.1712-06.2006
- Dolen, G., et al. (2007). Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron* 56, 955-62 doi:10.1016/j.neuron.2007.12.001
- dos Santos, P.A., D. Longo, A.P. Brandalize, L. Schuler-Faccini (2010). MTHFR C677T is not a risk factor for autism spectrum disorders in South Brazil. *Psychiatr Genet* 20, 187-9 doi:10.1097/YPG.0b013e32833a2220
- Douglas, J.F., et al. (2013). Brief report: retrospective case series of oxcarbazepine for irritability/agitation symptoms in autism spectrum disorder. *Journal of autism and developmental disorders* 43, 1243-7 doi:10.1007/s10803-012-1661-2
- Duband, J.L., S. Dufour, J.P. Thiery (1990). The instructive role of fibronectins in cell migrations during embryonic development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 588, 273-80
- Einheber, S., L.M. Schnapp, J.L. Salzer, Z.B. Capiello, T.A. Milner (1996). Regional and ultrastructural distribution of the alpha 8 integrin subunit in developing and adult rat brain suggests a role in synaptic function. *The Journal of comparative neurology* 370, 105-34 doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960617)370:1<105::AID-CNE10>3.0.CO;2-R
- Eley, T.C., F. Rijdsdijk (2005). Introductory guide to the statistics of molecular genetics. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 46, 1042-4 doi:10.1111/j.1469-7610.2005.01523.x
- Ellegood, J., R.M. Henkelman, J.P. Lerch (2012). Neuroanatomical Assessment of the Integrin beta3 Mouse Model Related to Autism and the Serotonin System Using High Resolution MRI. *Frontiers in psychiatry* 3, 37 doi:10.3389/fpsy.2012.00037
- Enoch, M.A., C.A. Hodgkinson, E. Gorodetsky, D. Goldman, A. Roy (2013). Independent effects of 5' and 3' functional variants in the serotonin transporter gene on suicidal behavior in the context of childhood trauma. *Journal of psychiatric research* 47, 900-7 doi:10.1016/j.jpsychires.2013.03.007

- Fombonne, E. (2003). The prevalence of autism. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 289, 87-9
- Fradin, D., et al. (2010). Parent-of-origin effects in autism identified through genome-wide linkage analysis of 16,000 SNPs. *PloS one* 5, doi:10.1371/journal.pone.0012513
- Freitag, C.M., W. Staal, S.M. Klauck, E. Duketis, R. Waltes (2010). Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *European child & adolescent psychiatry* 19, 169-78 doi:10.1007/s00787-009-0076-x
- Gabriel, H.M., E.I. Oliveira (2006). Role of abciximab in the treatment of coronary artery disease. *Expert opinion on biological therapy* 6, 935-42
doi:10.1517/14712598.6.9.935
- Gabriele, S., R. Sacco, A.M. Persico (2014). Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, doi:10.1016/j.euroneuro.2014.02.004
- Gadow, K.D., et al. (2013). Allele-specific associations of 5-HTTLPR/rs25531 with ADHD and autism spectrum disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 40, 292-7 doi:10.1016/j.pnpbp.2012.10.019
- Gaspar, P., O. Cases, L. Maroteaux (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature reviews Neuroscience* 4, 1002-12
doi:10.1038/nrn1256
- Geschwind, D.H. (2009). Advances in autism. *Annual review of medicine* 60, 367
- Geschwind, D.H., P. Levitt (2007). Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Current opinion in neurobiology* 17, 103-11
doi:10.1016/j.conb.2007.01.009
- Giancotti, F.G., E. Ruoslahti (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-32
- Glessner, J.T., et al. (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 459, 569-73 doi:10.1038/nature07953
- Goldschmidt-Clermont, P.J., et al. (1999). Higher prevalence of GPIIIa PLA2 polymorphism in siblings of patients with premature coronary heart disease. *Archives of pathology & laboratory medicine* 123, 1223-9 doi:10.1043/0003-9985(1999)123<1223:HPOGPA>2.0.CO;2
- Goodlin-Jones, B.L., F. Tassone, L.W. Gane, R.J. Hagerman (2004). Autistic spectrum disorder and the fragile X premutation. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP* 25, 392-8
- Gottesman, II, T.D. Gould (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American journal of psychiatry* 160, 636-45
- Greenberg, B.D., T.J. Tolliver, S.J. Huang, Q. Li, D. Bengel, D.L. Murphy (1999). Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *American journal of medical genetics* 88, 83-7
- Grossi, D., R. Marcone, T. Cinquegrana, M. Gallucci (2012). On the differential nature of induced and incidental echolalia in autism. *Journal of intellectual disability research : JIDR*, doi:10.1111/j.1365-2788.2012.01579.x
- Gupta, A.R., M.W. State (2006). [Autism: genetics]. *Rev Bras Psiquiatr* 28 Suppl 1, S29-38 doi:/S1516-44462006000500005
- Hahn, L.W., M.D. Ritchie, J.H. Moore (2003). Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 19, 376-82

- Hallmayer, J., et al. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry* 68, 1095-102
doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.76
- Hariri, A.R., et al. (2005). A susceptibility gene for affective disorders and the response of the human amygdala. *Archives of general psychiatry* 62, 146-52
doi:10.1001/archpsyc.62.2.146
- Heils, A., et al. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of neurochemistry* 66, 2621-4
- Hodivala-Dilke, K.M., et al. (1999). Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* 103, 229-38 doi:10.1172/JCI5487
- Hogart, A., D. Wu, J.M. LaSalle, N.C. Schanen (2010). The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiology of disease* 38, 181-91 doi:10.1016/j.nbd.2008.08.011
- Hogg, N., P.A. Bates (2000). Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19, 211-22
- Hollander, E., et al. (2005). Neurological soft signs as predictors of treatment response to selective serotonin reuptake inhibitors in obsessive-compulsive disorder. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 17, 472-7
doi:10.1176/appi.neuropsych.17.4.472
- Howlin, P., S. Goode, J. Hutton, M. Rutter (2009). Savant skills in autism: psychometric approaches and parental reports. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1359-1367
- Hoyer, D., et al. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews* 46, 157-203
- Hu, X.Z., et al. (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *American journal of human genetics* 78, 815-26 doi:10.1086/503850
- Huang, C.H., S.L. Santangelo (2008). Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B, 903-13
doi:10.1002/ajmg.b.30720
- Hyman, S. (2013). New DSM-5 includes changes to autism criteria. *American Academy of Pediatrics News*.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25
- Ingersoll, B. (2010). Broader autism phenotype and nonverbal sensitivity: evidence for an association in the general population. *Journal of autism and developmental disorders* 40, 590-8 doi:10.1007/s10803-009-0907-0
- Iossifov, I., et al. (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285-99 doi:10.1016/j.neuron.2012.04.009
- Jin, Y., et al. (1996). Glanzmann thrombasthenia. Cooperation between sequence variants in cis during splice site selection. *J Clin Invest* 98, 1745-54 doi:10.1172/JCI118973
- John, B., K.R. Lewis (1966). Chromosome variability and geographic distribution in insects. *Science* 152, 711-21 doi:10.1126/science.152.3723.711

- Jones, R.M., G. Cadby, P.E. Melton, L.J. Abraham, A.J. Whitehouse, E.K. Moses (2013). Genome-wide association study of autistic-like traits in a general population study of young adults. *Frontiers in human neuroscience* 7, 658
doi:10.3389/fnhum.2013.00658
- Jorgensen, H.S. (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Danish medical bulletin* 54, 266-88
- Kanemura, H., F. Sano, T. Tando, K. Sugita, M. Aihara (2013). Can EEG characteristics predict development of epilepsy in autistic children? *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 17, 232-7 doi:10.1016/j.ejpn.2012.10.002
- Kanne, S.M., M.O. Mazurek (2011). Aggression in children and adolescents with ASD: Prevalence and risk factors. *Journal of autism and developmental disorders* 41, 926-937
- Kanner, L., L. Eisenberg (1957). Early infantile autism, 1943-1955. *Psychiatric research reports*, 55-65
- Kistner-Griffin, E., C.W. Brune, L.K. Davis, J.S. Sutcliffe, N.J. Cox, E.H. Cook, Jr. (2011). Parent-of-origin effects of the serotonin transporter gene associated with autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 156, 139-44 doi:10.1002/ajmg.b.31146
- Krey, J.F., R.E. Dolmetsch (2007). Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca²⁺ signaling. *Current opinion in neurobiology* 17, 112-9
doi:10.1016/j.conb.2007.01.010
- Landrigan, P.J. (2010). What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Current opinion in pediatrics* 22, 219-25 doi:10.1097/MOP.0b013e328336eb9a
- Laslo-Baker, D., et al. (2004). Child neurodevelopmental outcome and maternal occupational exposure to solvents. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 158, 956-61 doi:10.1001/archpedi.158.10.956
- Lesch, K.P., N. Araragi, J. Waider, D. van den Hove, L. Gutknecht (2012). Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367, 2426-43 doi:10.1098/rstb.2012.0039
- Lesch, K.P., et al. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of neural transmission General section* 95, 157-62
- Lesch, K.P., R. Mossner (1998). Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biological psychiatry* 44, 179-92
- Lesch, K.P., J. Waider (2012). Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 76, 175-91
doi:10.1016/j.neuron.2012.09.013
- Levy, D., et al. (2011). Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron* 70, 886-97 doi:10.1016/j.neuron.2011.05.015
- Levy, S.E., D.S. Mandell, R.T. Schultz (2009). Autism. *Lancet* 374, 1627-38
doi:10.1016/S0140-6736(09)61376-3
- Lewis, J.D., R.J. Theilmann, J. Townsend, A.C. Evans (2013). Network efficiency in autism spectrum disorder and its relation to brain overgrowth. *Frontiers in human neuroscience* 7, 845 doi:10.3389/fnhum.2013.00845

- Libbey, J.E., et al. (2008). Are there enhanced MBP autoantibodies in autism? *Journal of autism and developmental disorders* 38, 324-32 doi:10.1007/s10803-007-0400-6
- Liu, L., et al. (2013). Analysis of rare, exonic variation amongst subjects with autism spectrum disorders and population controls. *PLoS genetics* 9, e1003443 doi:10.1371/journal.pgen.1003443
- Liu, X.Q., A.D. Paterson, P. Szatmari (2008). Genome-wide linkage analyses of quantitative and categorical autism subphenotypes. *Biological psychiatry* 64, 561-70 doi:10.1016/j.biopsych.2008.05.023
- Loesch, D.Z., R.M. Huggins, R.J. Hagerman (2004). Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 10, 31-41 doi:10.1002/mrdd.20006
- Longo, D., L. Schuler-Faccini, A.P. Brandalize, R. dos Santos Riesgo, C.H. Bau (2009). Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain research* 1267, 9-17 doi:10.1016/j.brainres.2009.02.072
- Luo, B.H., T.A. Springer (2006). Integrin structures and conformational signaling. *Current opinion in cell biology* 18, 579-86 doi:10.1016/j.ceb.2006.08.005
- Ma, D., et al. (2009). A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1. *Annals of human genetics* 73, 263-73 doi:10.1111/j.1469-1809.2009.00523.x
- Ma, D.Q., et al. (2010). Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B, 477-83 doi:10.1002/ajmg.b.31003
- MacKenzie, A., J. Quinn (1999). A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15251-5
- Marchani, E.E., et al. (2012). Identification of rare variants from exome sequence in a large pedigree with autism. *Human heredity* 74, 153-64 doi:10.1159/000346560
- Marshall, C.R., et al. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *American journal of human genetics* 82, 477-88 doi:10.1016/j.ajhg.2007.12.009
- Mazefsky, C.A., J.C. McPartland, H.Z. Gastgeb, N.J. Minshew (2013). Brief report: comparability of DSM-IV and DSM-5 ASD research samples. *Journal of autism and developmental disorders* 43, 1236-42 doi:10.1007/s10803-012-1665-y
- Mazefsky, C.A., K.A. Pelphrey, R.E. Dahl (2012). The Need for a Broader Approach to Emotion Regulation Research in Autism. *Child development perspectives* 6, 92-97 doi:10.1111/j.1750-8606.2011.00229.x
- Mazefsky, C.A., S.W. White (2014). Emotion regulation: concepts & practice in autism spectrum disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 23, 15-24 doi:10.1016/j.chc.2013.07.002
- Mazurek, M.O., S.M. Kanne, E.L. Wodka (2013). Physical aggression in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders* 7, 455-465
- McClellan, J., M.C. King (2010). Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 141, 210-7 doi:10.1016/j.cell.2010.03.032

- McDougle, C.J., S.T. Naylor, D.J. Cohen, G.K. Aghajanian, G.R. Heninger, L.H. Price (1996). Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder. *Archives of general psychiatry* 53, 993-1000
- McHugh, K.P., et al. (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* 105, 433-40 doi:10.1172/JCI8905
- McMartin, K.I., M. Chu, E. Kopecky, T.R. Einarson, G. Koren (1998). Pregnancy outcome following maternal organic solvent exposure: a meta-analysis of epidemiologic studies. *American journal of industrial medicine* 34, 288-92
- Mei, H., M.L. Cuccaro, E.R. Martin (2007). Multifactor dimensionality reduction-phenomics: a novel method to capture genetic heterogeneity with use of phenotypic variables. *American journal of human genetics* 81, 1251-61 doi:10.1086/522307
- Meneses, A. (1999). 5-HT system and cognition. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23, 1111-25
- Miles, J.H. (2011). Autism spectrum disorders—a genetics review. *Genetics in Medicine* 13, 278-294
- Miles, J.H., et al. (2005). Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *American journal of medical genetics Part A* 135, 171-80 doi:10.1002/ajmg.a.30590
- Milner, R., I.L. Campbell (2002). The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *Journal of neuroscience research* 69, 286-91 doi:10.1002/jnr.10321
- Minshew, N.J., D.L. Williams (2007). The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol* 64, 945-50 doi:10.1001/archneur.64.7.945
- Mulder, E.J., et al. (2004). Platelet serotonin levels in pervasive developmental disorders and mental retardation: diagnostic group differences, within-group distribution, and behavioral correlates. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 43, 491-9 doi:10.1097/00004583-200404000-00016
- Nakamura, K., et al. (2010). Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Archives of general psychiatry* 67, 59-68 doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.137
- Napolioni, V., et al. (2011). Family-based association study of ITGB3 in autism spectrum disorder and its endophenotypes. *European journal of human genetics : EJHG* 19, 353-9 doi:10.1038/ejhg.2010.180
- Neale, B.M., et al. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485, 242-5 doi:10.1038/nature11011
- Newschaffer, C.J., et al. (2007). The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annual review of public health* 28, 235-58 doi:10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144007
- Nijmeijer, J.S., et al. (2010). Perinatal risk factors interacting with catechol O-methyltransferase and the serotonin transporter gene predict ASD symptoms in children with ADHD. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 51, 1242-50 doi:10.1111/j.1469-7610.2010.02277.x
- O'Hare, A. (2009). Autism spectrum disorder: diagnosis and management. *Archives of disease in childhood Education and practice edition* 94, 161-8 doi:10.1136/adc.2008.150490
- O'Roak, B.J., et al. (2011). Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature genetics* 43, 585-9 doi:10.1038/ng.835

- O'Roak, B.J., et al. (2012a). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338, 1619-22
doi:10.1126/science.1227764
- O'Roak, B.J., et al. (2012b). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485, 246-50
doi:10.1038/nature10989
- Orabona, G.M., et al. (2009). HTR1B and HTR2C in autism spectrum disorders in Brazilian families. *Brain research* 1250, 14-9 doi:10.1016/j.brainres.2008.11.007
- Pardo, C.A., C.G. Eberhart (2007). The neurobiology of autism. *Brain Pathol* 17, 434-47
doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00102.x
- Parellada, M., et al. (2013). The neurobiology of autism spectrum disorders. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*,
doi:10.1016/j.eurpsy.2013.02.005
- Pastinen, T., et al. (1998). Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. *Human molecular genetics* 7, 1453-62
- Persico, A.M., V. Napolioni (2013). Autism genetics. *Behavioural brain research* 251, 95-112 doi:10.1016/j.bbr.2013.06.012
- Pinto, D., et al. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466, 368-72 doi:10.1038/nature09146
- Praschak-Rieder, N., et al. (2007). Novel 5-HTTLPR allele associates with higher serotonin transporter binding in putamen: a [(11)C] DASB positron emission tomography study. *Biological psychiatry* 62, 327-31
doi:10.1016/j.biopsych.2006.09.022
- Raznahan, A., et al. (2009). Serotonin transporter genotype and neuroanatomy in autism spectrum disorders. *Psychiatr Genet* 19, 147-50
doi:10.1097/YPG.0b013e32832a505a
- Reddy, K.S. (2005). Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC medical genetics* 6, 3 doi:10.1186/1471-2350-6-3
- Rimland, B. (1978). Savant capabilities of autistic children and their cognitive implications.
- Ronald, A., et al. (2010). A genome-wide association study of social and non-social autistic-like traits in the general population using pooled DNA, 500 K SNP microarrays and both community and diagnosed autism replication samples. *Behavior genetics* 40, 31-45 doi:10.1007/s10519-009-9308-6
- Ronald, A., et al. (2006). Genetic heterogeneity between the three components of the autism spectrum: a twin study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 45, 691-9 doi:10.1097/01.chi.0000215325.13058.9d
- Ronald, A., R.A. Hoekstra (2011). Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156, 255-274
- Roth, B.L., S.M. Hanizavareh, A.E. Blum (2004). Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. *Psychopharmacology* 174, 17-24 doi:10.1007/s00213-003-1683-8
- Ruggiero, D.A., M.D. Underwood, P.M. Rice, J.J. Mann, V. Arango (1999). Corticotropin-releasing hormone and serotonin interact in the human brainstem: behavioral implications. *Neuroscience* 91, 1343-54

- Rutter, M. (2005). Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning. *Acta Paediatr* 94, 2-15
- Sanders, S.J., et al. (2011). Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* 70, 863-85 doi:10.1016/j.neuron.2011.05.002
- Sanders, S.J., et al. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 485, 237-41 doi:10.1038/nature10945
- Schmid, R.S., E.S. Anton (2003). Role of integrins in the development of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 13, 219-24
- Schuler, A.L. (1979). Echolalia: issues and clinical applications. *The Journal of speech and hearing disorders* 44, 411-34
- Schwartz, M.A., M.D. Schaller, M.H. Ginsberg (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annual review of cell and developmental biology* 11, 549-99 doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.003001
- Scott, M.M., E.S. Deneris (2005). Making and breaking serotonin neurons and autism. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23, 277-85 doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.05.012
- Sebat, J., et al. (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445-9 doi:10.1126/science.1138659
- Seneviratne, C., et al. (2013). Association, interaction, and replication analysis of genes encoding serotonin transporter and 5-HT receptor subunits A and B in alcohol dependence. *Human genetics*, doi:10.1007/s00439-013-1319-y
- Seneviratne, C., W. Huang, N. Ait-Daoud, M.D. Li, B.A. Johnson (2009). Characterization of a functional polymorphism in the 3' UTR of SLC6A4 and its association with drinking intensity. *Alcoholism, clinical and experimental research* 33, 332-9 doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00837.x
- Shen, Y., et al. (2010). Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 125, e727-35 doi:10.1542/peds.2009-1684
- Shi, L., et al. (2013). Whole-genome sequencing in an autism multiplex family. *Molecular autism* 4, 8 doi:10.1186/2040-2392-4-8
- Shishido, E., B. Aleksic, N. Ozaki (2013). Copy-number variation in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Psychiatry and clinical neurosciences*, doi:10.1111/pcn.12128
- Singh, A.S., et al. (2013). Genetic association and gene-gene interaction analyses suggest likely involvement of ITGB3 and TPH2 with autism spectrum disorder (ASD) in the Indian population. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 45, 131-43 doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.015
- Smidt, M.P., J.A. van Hooft (2013). Subset specification of central serotonergic neurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 200 doi:10.3389/fncel.2013.00200
- Spence, S.J., M.T. Schneider (2009). The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders. *Pediatric research* 65, 599-606 doi:10.1203/PDR.0b013e31819e7168
- St Pourcain, B., et al. (2013). Common variation contributes to the genetic architecture of social communication traits. *Molecular autism* 4, 34
- State, M.W., P. Levitt (2011). The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders. *Nature neuroscience* 14, 1499-506 doi:10.1038/nn.2924

- Stefansson, H., et al. (2013). CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature*, doi:10.1038/nature12818
- Takada, Y., X. Ye, S. Simon (2007). The integrins. *Genome biology* 8, 215 doi:10.1186/gb-2007-8-5-215
- Tarone, G., G. Galetto, M. Prat, P.M. Comoglio (1982). Cell surface molecules and fibronectin-mediated cell adhesion: effect of proteolytic digestion of membrane proteins. *The Journal of cell biology* 94, 179-86
- Tarone, G., et al. (2000). Integrin function and regulation in development. *The International journal of developmental biology* 44, 725-31
- Tate, B.G., G.S. Baroff (1966). Aversive control of self-injurious behavior in a psychotic boy. *Behaviour research and therapy* 4, 281-7
- Taverna, D., D. Crowley, M. Connolly, R.T. Bronson, R.O. Hynes (2005). A direct test of potential roles for beta3 and beta5 integrins in growth and metastasis of murine mammary carcinomas. *Cancer research* 65, 10324-9 doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4098
- Taverna, D., H. Moher, D. Crowley, L. Borsig, A. Varki, R.O. Hynes (2004). Increased primary tumor growth in mice null for beta3- or beta3/beta5-integrins or selectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 763-8 doi:10.1073/pnas.0307289101
- Tierney, E., et al. (2006). Abnormalities of cholesterol metabolism in autism spectrum disorders. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 141B, 666-8 doi:10.1002/ajmg.b.30368
- Tofteng, C.L., P. Bach-Mortensen, S.E. Bojesen, A. Tybjaerg-Hansen, L. Hyldstrup, B.G. Nordestgaard (2007). Integrin beta3 Leu33Pro polymorphism and risk of hip fracture: 25 years follow-up of 9233 adults from the general population. *Pharmacogenetics and genomics* 17, 85-91 doi:10.1097/01.fpc.0000236327.80809.f8
- Toma, C., et al. (2013). Exome sequencing in multiplex autism families suggests a major role for heterozygous truncating mutations. *Molecular psychiatry*, doi:10.1038/mp.2013.106
- Treffert, D.A. (2009). The savant syndrome: an extraordinary condition. A synopsis: past, present, future. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 364, 1351-7 doi:10.1098/rstb.2008.0326
- Tuchman, R., M. Cuccaro (2011). Epilepsy and autism: neurodevelopmental perspective. *Current neurology and neuroscience reports* 11, 428-34 doi:10.1007/s11910-011-0195-x
- Tuchman, R., I. Rapin (2002). Epilepsy in autism. *Lancet neurology* 1, 352-8
- Valencia, A.V., et al. (2012). [Evidence for association and epistasis between the genetic markers SLC6A4 and HTR2A in autism etiology]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud* 32, 585-601 doi:10.1590/S0120-41572012000400014
- Vallender, E.J., C.M. Priddy, S. Hakim, H. Yang, G.L. Chen, G.M. Miller (2008). Functional variation in the 3' untranslated region of the serotonin transporter in human and rhesus macaque. *Genes, brain, and behavior* 7, 690-7 doi:10.1111/j.1601-183X.2008.00407.x
- van Santen, J.P., R.W. Sproat, A.P. Hill (2013). Quantifying repetitive speech in autism spectrum disorders and language impairment. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 6, 372-83 doi:10.1002/aur.1301

- Viding, E., S.J. Blakemore (2007). Endophenotype approach to developmental psychopathology: implications for autism research. *Behavior genetics* 37, 51-60 doi:10.1007/s10519-006-9105-4
- Wang, H.X., et al. (2009a). Personality and lifestyle in relation to dementia incidence. *Neurology* 72, 253-259
- Wang, K., et al. (2009b). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459, 528-33 doi:10.1038/nature07999
- Wassink, T.H., et al. (2007). Cerebral cortical gray matter overgrowth and functional variation of the serotonin transporter gene in autism. *Archives of general psychiatry* 64, 709
- Watanabe, M.A., et al. (2011). Genetic polymorphism of serotonin transporter 5-HTTLPR: involvement in smoking behaviour. *Journal of genetics* 90, 179-85
- Wegiel, J., et al. (2010). The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta neuropathologica* 119, 755-70 doi:10.1007/s00401-010-0655-4
- Weiss, E.J., et al. (1996). A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 334, 1090-4 doi:10.1056/NEJM199604253341703
- Weiss, L.A., M. Abney, E.H. Cook, Jr., C. Ober (2005a). Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *American journal of human genetics* 76, 33-41 doi:10.1086/426697
- Weiss, L.A., M. Abney, R. Parry, A.M. Scanu, E.H. Cook, Jr., C. Ober (2005b). Variation in ITGB3 has sex-specific associations with plasma lipoprotein(a) and whole blood serotonin levels in a population-based sample. *Human genetics* 117, 81-7 doi:10.1007/s00439-004-1250-3
- Weiss, L.A., D.E. Arking, M.J. Daly, A. Chakravarti (2009). A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* 461, 802-8 doi:10.1038/nature08490
- Weiss, L.A., et al. (2006a). Variation in ITGB3 is associated with whole-blood serotonin level and autism susceptibility. *European journal of human genetics : EJHG* 14, 923-31 doi:10.1038/sj.ejhg.5201644
- Weiss, L.A., C. Ober, E.H. Cook, Jr. (2006b). ITGB3 shows genetic and expression interaction with SLC6A4. *Human genetics* 120, 93-100 doi:10.1007/s00439-006-0196-z
- Weiss, L.A., et al. (2004). Genome-wide association study identifies ITGB3 as a QTL for whole blood serotonin. *European journal of human genetics : EJHG* 12, 949-54 doi:10.1038/sj.ejhg.5201239
- Wendland, J.R., et al. (2008). A novel, putative gain-of-function haplotype at SLC6A4 associates with obsessive-compulsive disorder. *Human molecular genetics* 17, 717-23 doi:10.1093/hmg/ddm343
- Whitaker-Azmitia, P.M. (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23, 75-83 doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.07.022
- Whyte, A., T. Jessen, S. Varney, A.M. Carneiro (2013). Serotonin transporter and integrin beta 3 genes interact to modulate serotonin uptake in mouse brain. *Neurochemistry international*, doi:10.1016/j.neuint.2013.09.014

- Windham, G.C., L. Zhang, R. Gunier, L.A. Croen, J.K. Grether (2006). Autism spectrum disorders in relation to distribution of hazardous air pollutants in the san francisco bay area. *Environmental health perspectives* 114, 1438-44
- Yamagata, M., J.R. Sanes, J.A. Weiner (2003). Synaptic adhesion molecules. *Current opinion in cell biology* 15, 621-32
- Yang, Z., et al. (2013). Serotonin transporter and receptor genes significantly impact nicotine dependence through genetic interactions in both European American and African American smokers. *Drug and alcohol dependence* 129, 217-25
doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.12.007
- Ye, F., et al. (2010a). Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *The Journal of cell biology* 188, 157-73 doi:10.1083/jcb.200908045
- Ye, H., J. Liu, J.Y. Wu (2010b). Cell adhesion molecules and their involvement in autism spectrum disorder. *Neuro-Signals* 18, 62-71 doi:10.1159/000322543
- Yeargin-Allsopp, M., C. Rice, T. Karapurkar, N. Doernberg, C. Boyle, C. Murphy (2003). Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 289, 49-55
- Yu, T.W., et al. (2013). Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* 77, 259-73 doi:10.1016/j.neuron.2012.11.002
- Zhang, Y., et al. (2013). Genetic variation of ITGB3 is associated with asthma in Chinese Han children. *PloS one* 8, e56914 doi:10.1371/journal.pone.0056914
- Zhao, X., et al. (2007). A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12831-6 doi:10.1073/pnas.0705803104
- Zilbovicius, M., I. Meresse, N. Boddaert (2006). [Autism: neuroimaging]. *Rev Bras Psiquiatr* 28 Suppl 1, S21-8 doi:/S1516-44462006000500004

CAPÍTULO IX – ANEXOS

IX. 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente: _____ Data: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(RESOLUÇÃO Nº 196/96 - CNS)

A proposta deste trabalho é sistematizar o atendimento, o diagnóstico e o estabelecimento de estratégias de intervenção para os transtornos invasivos do desenvolvimento, em especial para os casos compatíveis com autismo infantil.

Caso eu aceite que meu dependente participe deste protocolo, estou ciente de que terei que responder a uma série de entrevistas semi-estruturadas e escalas de avaliação que podem durar de 4 a 6 horas para seu total preenchimento. Quando necessário poderá ser colhido material sangüíneo ou raspado da mucosa da boca, desde que não estejam envolvidos riscos para a saúde do meu filho(a). O material poderá ser congelado por até 5 anos, para eventuais análises em projetos futuros. Caso a utilização desse material seja enquadrada em algum novo projeto, sei que o novo projeto deverá passar novamente por análise da Instituição adequada (Conselho de Ensino e Pesquisa), para receber aprovação específica. Também estou ciente de que poderei ser novamente contatado para dar meu novo consentimento.

As tarefas a serem realizadas para a conclusão deste projeto não possuem riscos para o paciente, no que se refere à coleta de material biológico. O único inconveniente é o tempo de duração da entrevista, por vezes demorada.

O potencial benefício para a sociedade é que este estudo pode incrementar o conhecimento sobre estes transtornos. Também meu filho (a) estará recebendo uma detalhada avaliação neuropsiquiátrica que poderá ser útil na clarificação de meu diagnóstico.

Eu entendo que a participação do meu dependente é voluntária e ligada ao meu consentimento. Ele poderá receber atendimento neste mesmo hospital ou na rede de saúde da comunidade, caso eu decida não participar.

Eu entendo que células, tecidos, sangue e outros espécimes de material, colhidos de meu dependente, durante o curso da pesquisa, podem ser utilizados para avaliações científicas, pesquisa e ensino.

Eu entendo que as informações produzidas nesta tarefa serão mantidas em lugar seguro, codificadas e a identificação só poderá ser realizada pelo pessoal envolvido diretamente com o projeto. Caso o material venha a ser utilizado para publicação científica ou atividades didáticas, não serão utilizados nomes que possam vir a identificar meu dependente.

Eu entendo que poderei obter mais informações com o Prof. Dr. Rudimar dos Santos Riesgo, pelo telefone 2101-8293, que está apto a solucionar minhas dúvidas. Aceito que serei informado de qualquer conhecimento significativo descoberto durante este projeto o qual poderá influenciar a minha participação na sua continuidade. Eu compreendo que poderei solicitar o desligamento do meu dependente do presente projeto a qualquer momento.

Porto Alegre, _____ de _____ de 20_____ .

Paciente

Pesquisador que obteve o consentimento

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DO SISTEMA NEUROTRANSMISSOR
SEROTONERGICO NA DETERMINAÇÃO DO TRANSTORNO AUTISTA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

O Autismo é uma doença neurológica que se caracteriza por problemas de linguagem e integração social acompanhados por comportamentos repetitivos e interesses restritos. Atinge mais ou menos uma em cada 500 crianças e é causado por fatores genéticos e ambientais. Gostaríamos de convidar sua família a participar deste projeto, cujo objetivo do trabalho é entender algumas das possíveis causas do Autismo, o que poderá auxiliar no tratamento e prevenção dessa doença no futuro.

Para tanto, estudaremos, através de coleta de sangue, uma parte do material genético que existe no núcleo das células. Este material, chamado DNA contém genes que são unidades que possuem códigos responsáveis pela fabricação de várias proteínas e enzimas do organismo. Estaremos estudando genes que codificam proteínas que agem no cérebro e que podem ter alguma influência na predisposição da pessoa a desenvolver o autismo.

II. Procedimentos que serão realizados:

Será realizado um questionário com vocês, sobre características da criança afetada, da família e da gravidez de seu filho (a).

Serão coletados do filho(a), da mãe e do pai de 5 a 10 ml de sangue. As amostras serão estudadas para análise genética relacionada com Autismo (genes do sistema neurotransmissor). As amostras de sangue serão armazenadas e analisadas no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, campus do Vale, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lavínia Schüller-Faccini.

As amostras de material genético serão utilizadas apenas para este estudo. Entretanto pretendemos guardar as amostras após o término do estudo. Se for de interesse da equipe de

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
13/04/06
8 05451

GPPG - Recebido

12 ARR. 2006
Per.  Nº 054510

pesquisa realizar novas investigações utilizando estas amostras guardadas, isto somente será feito após novo contato e assinatura de novo termo de consentimento por parte de sua família.

III. Riscos e desconfortos potenciais:

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias.

IV. Benefícios esperados:

Este estudo poderá no futuro beneficiar as famílias dos afetados através de aconselhamento nos quais fatores de risco genéticos poderão ser identificados, contribuindo no diagnóstico e estimativa de risco de ocorrência de outros casos nestas famílias. Sabemos, entretanto, que nenhum destes genes estudados se constitui na causa única do autismo, e os resultados serão interpretados em forma de probabilidades.

V. Procedimentos alternativos:

Eu entendo que tive o direito de recusar a participar deste projeto e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira os cuidados médicos do meu filho(a) ou de minha família.

VI. Formas de acompanhamento e assistência:

O atendimento clínico e as informações sobre o aconselhamento genético da família serão realizadas pelo Dr. Rudimar Riesgo e pela Dra. Lavínia Schüler-Faccini. As coletas de sangue serão realizadas por pessoal especializado.

Pelo presente Consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente projeto de pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
13/04/06
8 05451

- da garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;

Os pesquisadores responsáveis por esse projeto de pesquisa são a profa. Dra. Lavinia Schüller-Faccini (Fone: 51 2101-8008) e Dânae Longo (Fone: 51 3316-6727), tendo sido esse documento revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em ___ / ___ / ___ .

Data ___ / ___ / ___ .

Nome do Paciente:

Nome e da assinatura da Mãe:

Nome e assinatura do Pai:

Pesquisador responsável:

Lavinia Schuler-Faccini

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
13/04/06
8 05451

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PROJETO FENÓTIPO AMPLIADO DO AUTISMO

Estamos realizando um estudo com a finalidade de investigar os traços de personalidade de pais de crianças com Transtorno do Espectro Autista e suas possíveis relações com variantes genéticas.

Fui igualmente informado(a):

- da garantia de receber resposta a qualquer dúvida acerca dos procedimentos e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar de qualquer um dos dois estudos (o da Psicologia ou da Genética) ou de ambos;
- da segurança de que não serei identificado(a) e que se manterá o caráter confidencial das informações registradas relacionadas com minha privacidade;
- de que será realizada entrevista para obter informações sobre a história da criança, seu desenvolvimento e sobre os dados demográficos da família (por exemplo, profissão dos pais, estado civil, escolaridade);
- de que será realizada a administração dos seguintes questionários aos pais: ADI- R (*Autism Diagnostic Interview - Revised*); BFP (Bateria Fatorial de Personalidade); BAPQ (*Broader Autism Phenotype Questionnaire*); M.I.N.I. (*Mini International Neuropsychiatric Interview*); Matrizes de Raven- escala geral;
- de que estes encontros serão realizados em até dois momentos;
- de que será realizada a administração do seguinte instrumento na criança: PROTOCS – TEA (Protocolo de Observação de Crianças com Suspeita de Transtorno do Espectro Autista)
- de que a administração do instrumento na criança será realizada em até dois encontros, com aproximadamente 30 minutos cada;
- de que, se necessário, será realizado encaminhamento para atendimento psicoterápico para os pais e para a criança;

- de que os formulários preenchidos por mim e as gravações serão arquivadas junto ao banco de dados da pesquisadora responsável da UFRGS, sendo que somente o grupo de pesquisa terá acesso a esse material;

- da probabilidade de apresentar os resultados dessa pesquisa em eventos científicos e em publicá-los, mantendo o anonimato dos participantes.

Fico ciente que, quando necessário e por minha livre escolha, poderá ser colhido material biológico (sangue periférico ou raspado da mucosa da boca), desde que não estejam envolvidos riscos para a saúde dos envolvidos, sendo necessária a coleta de material biológica do(a) filho(a) e de seus pais. O material poderá ser congelado por até 5 anos, para eventuais análises em projetos futuros. Caso a utilização desse material seja enquadrada em algum novo projeto, sei que o novo projeto deverá passar novamente por análise da Instituição adequada (Conselho de Ensino e Pesquisa), para receber aprovação específica. Também estou ciente de que poderei ser novamente contatado para dar meu novo consentimento.

As tarefas a serem realizadas para a conclusão deste projeto não possuem riscos para o paciente, no que se refere à coleta de material biológico.

- Pelo presente termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado(a), de forma clara e detalhada dos objetivos e justificativa do Projeto de Pesquisa.

- **A pesquisadora responsável por este projeto é a Prof^a. Dr^a. Cleonice Bosa, que pode ser contatada pelo telefone: (51) 3316-5449.**

Tendo esse documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética dessa Instituição em/...../.....

Data:/...../.....

Nome e assinatura do voluntário (pai):

.....

.....

Nome e assinatura do voluntário (mãe):

.....

Assinatura do pesquisador responsável:

.....

IX. 2. PROTOCOLO DE PESQUISA

CHECK-LIST PACIENTES AUTISMO

PACIENTE:

1 – Termo de Consentimento

2 – Ficha de avaliação geral

3 – Coleta de sangue Paciente Mãe Pai

4 – Extração de DNA Paciente Mãe Pai

5 – ASQ Escore: _____

6 – CARS Escore: _____

7 – QI Total: _____

Verbal: _____

Execução: _____

8 – Plasma Paciente Mãe Pai

FICHA DE AVALIAÇÃO GERAL – Entrevista

IDENTIFICAÇÃO PACIENTE: _____

Data: _____

Nome: _____

DN: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

Nome do pai: _____

DN: _____

Nome da mãe: _____

DN: _____

Telefone: _____

DADOS DO PACIENTE:

Sexo: 1 – Masculino 2 – Feminino Idade: _____

Nacionalidade: 1 – Brasileira 2 – Estrangeira Especifique: _____

Procedente: 1 – Capital RS 2 – Região metropolitana 3 – Interior: _____

Gemelar: 1 – Sim 2 – Não 3 – Não sabe

Irmãos afetados: 1 – Sim 2 – Não 3 – Não sabe

Etnia: 1 – Européia 2 – Africana 3 – Asiático

4 – Ameríndia 5 – Mestiço Especifique: _____

Cor: 1 – Branca 2 – Negra 3 – Parda

4 – Outra Especifique: _____

Encaminhado por: 1 – Clínicas privadas 2 – HCPA 3 – Outros hospitais

4 – APAE's 5 – Escola especial 6 – Outra: _____

7 – CEMA

Atualmente atendido: 1 – APAE's 2 – Escola especial pública 3 – Escola especial privada

4 – AMA 5 – Não recebe atendimento 6 – CEMA

Atendido pelo HCPA: 1 – Sim 2 – Não

Etiologia do TEA: 1 – Idiopático
2 – Secundário a síndromes genéticas
3 – Mesopatias (asfixia, TORCH, hipoglicemia, etc)
4 – Alterações lesionais
5 – Lesões pré-natais (infecção do SNC, traumatismo)
6 – Epilepsia refratária
7 – Malformação no SNC
9 – Não se sabe

HISTÓRIA E DADOS CLÍNICOS:

Consangüinidade: 1 – Sim _____ 2 – Não

Casos na família: Irmão, pais, tios, primos, avós com autismo? Lado Materno ou Paterno...

Familiares com algum outro transtorno ou doença? Quem?

Foi ao médico ou hospital por causa disso?/Toma algum medicamento prescrito?

Qual?

Idade de início dos sintomas (desconfiança de comportamento estranho/diferente): _____

O início dos sintomas aconteceu após algum trauma físico?

1 – Sim, idade _____ 2 – Não 9 – Não sabe

Idade do primeiro diagnóstico de autismo, traços autistas ou transtorno espectro autista: _____

Qual o diagnóstico? 1 – Autismo 2 – Síndrome de Asperger

3 – Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação

4 – Traços autistas 5 – Síndrome de Rett

6 – Transtorno Desintegrativo da Infância 9 – Não se sabe

Teste do X-frágil: 1 – Sim, resultado negativo 2 – Sim, resultado positivo

3 – Não fez 4 – Inconclusivo 9 – Não sabe

Cariótipo: 1 – Sim, resultado negativo 2 – Sim, resultado positivo

3 – Não fez 9 – Não sabe

Local de tratamento médico:

1 – HCPA 2 – Rede pública na capital

3 – Rede pública da região metropolitana 4 – Rede pública no interior

5 – Rede privada 6 – Não recebe 9 – NSA

Estimulação psico-pedagógica (psicólogas, fono, terapia ocupacional, educação especial)

1 – Sim, quanto tempo _____ 2 – Não

3 – Não recebe mais 9 – Não sabe

Identifique comportamentos do seu filho ANTES de iniciar o uso de medicações neurológicas:

1 – Convulsões 2 – Epilepsia 3 – Hiperatividade

4 – Hetero-agressividade 5 – Auto-agressividade 6 – Ataques de pânico

7 – Troca de humor 8 – Problemas para se alimentar 9 – Problemas para dormir

10 – Movimentos estranhos repetitivos 11 – Ecolalia: repete palavras

12 – Intolerância ao toque 13 – Outros 14 – Não apresentava nada

15 – Não sabe

Idade de início do uso de medicações neurológicas (em meses): _____

Medicamentos usados:

Medicamentos (nome comercial)	Tempo de uso – idade início	Escore de melhora
Fenobarbital (gardenal)		EC 0 1 2 3
Carbamazepina (tegretol)		EC 0 1 2 3
Ácido valpróico (epilenil, depakene)		EC 0 1 2 3
Outros:		

Escore de melhora: EC: efeito colateral (vômitos, agitação, agressividade, sonolência), 0 – sem melhora, 1 – pouca melhora, 2 – boa melhora, 3 – ótima melhora

Linguagem:

Forma palavras 1 – Sim 2 – Não Idade de início: _____

Forma frases 1 – Sim 2 – Não Idade de início: _____

Outros tipos de linguagem:

Apontar com a mão o que quer 1 – Sim 2 – Não

Manter contato visual 1 – Sim 2 – Não (contato visual pobre)

Regressão da linguagem 1 – Sim 2 – Não Idade de início: _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTETRÍCIOS:

Você (mãe) tem alguma doença que necessite tratamento com medicação regular?

1- Sim, qual doença _____ 2 – Não 9 – Não sabe

Teve algum aborto anterior?

1 – sim, um aborto espontâneo 2 – Sim, um aborto induzido

3 – Sim, mais de um aborto espontâneo 4 – Sim, mais de um aborto induzido

5 – Não 9 – Não sabe

Número de abortos _____

Número de filhos _____ filhas _____ Ordem de nascimento _____

Você fez pré-natal na gestação do paciente? 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Resultados das ecografias: 1 – Normal 2 – Alterado 3 – Não fez 9 – Não sabe

Se houve alteração na ecografia, quando foi detectado?

1 – 1º trimestre 2 – 2º trimestre 3 – 3º trimestre

4 – Não sabe (999) 5 – Sem alteração 9 – Não fez

Foi realizado algum exame especial (raio X, biópsia, amniocentese, etc)?

1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Você tomou alguma bebida alcoólica durante a gestação? 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Doses por dia (1 lata de cerveja/taça de vinho): _____

Quando: 1 – 1º trimestre 2 – 2º trimestre 3 – 3º trimestre
4 – Toda gestação 5 – Esporadicamente 6 – Não sabe 9 – Não bebeu

Você fumou durante a gestação? 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Quantos cigarros por dia? _____

Quando: 1 – 1º trimestre 2 – 2º trimestre 3 – 3º trimestre
4 – Toda gestação 5 – Esporadicamente 6 – Não sabe 9 – Não fumou

Ocorrências da sua gestação na tabela seguinte:

	Ocorrências	Período na gravidez (semana ou meses)	Medicamentos utilizados
1	Febre		
2	Sangramento		
3	Diabete gestacional		
4	Rubéola, sarampo, caxumba, toxoplasmose, citomegalovírus		
5	Sífilis ou outras doenças venéreas		
6	Infecção (cistite, etc...)		
7	Pressão alta		
8	Cólicas		
9	Outras (especifique)		
10	Sem ocorrências		

Marque outras substâncias usadas durante a gestação:

	Substâncias	Período na gravidez
1	Drogas de uso social (maconha, cocaína, etc)	
2	Abortivos	
3	Anticonvulsivantes	
4	Drogas psicoativas (antidepressivos, ansiolíticos, etc)	
5	Tratamentos dermatológicos (ácido retinóico, etc)	
6	Hormônios	
7	Outros (especifique)	
8	Não usou nada	
9	Não sabe	

ANTECEDENTES NEONATAIS:

Duração da gestação do paciente:

1 – menos de 37 semanas 2 – 37-42 semanas 3 – mais que 41 semanas 9 – não sabe

Apgar: 1º: _____ 5º: _____

Tipo de parto:

- 1 – Normal espontâneo 2 – Normal induzido 3 – Normal induzido + fórceps
4 – Normal induzido + fórceps + anestesia regional 5 – Cesária marcada
6 – Cesária de urgência 7 – Outro tipo: _____ 9 – Não sabe

Peso do paciente: _____ Comprimento: _____ Perímetro cefálico: _____

Atualmente:

Peso do paciente: _____ Comprimento: _____ Perímetro cefálico: _____

Algum problema DURANTE o parto 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Algum problema APÓS o parto 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Indique o problema após parto:

1	Asfixia perinatal, nó ou circular de cordão umbilical	7	Fratura durante o parto
2	Infecção generalizada	8	Problema cardíaco
3	Hipoglicemia neonatal	9	Doença cirúrgica
4	Aspiração de líquido	10	Outra:
5	Convulsões	11	Sem intercorrência
6	Icterícia	99	Não sabe

Intervenção de emergência especial após o nascimento (oxigênio, cirurgia, antibióticos, soro)?

1 – Sim _____ 2 – Não _____ 9 – Não sabe _____

Quantos dias de internação do bebê após o parto? _____

O paciente fez o Teste do Pezinho?

1 – Sim, normal 2 – Não 3 – Sim, alterado 9 – Não sabe

Foi realizado o exame Eletroencefalograma (EEG)? 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Quantos EEG? _____

Qual o resultado do primeiro? 1 – Normal 2 – Alterado 3 – Não fez 9 – Não sabe

Idade do paciente: _____

Qual o resultado do último? 1 – Normal 2 – Alterado 3 – Não fez 9 – Não sabe

Idade do paciente: _____

Foi realizado Tomografia computadoriza (TC)? 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Idade do paciente: _____

Foi realizada Ressonância magnética (RM)? 1 – Sim 2 – Não 9 – Não sabe

Idade do paciente: _____

IX. 3. ASQ (AUTISM SCREENING QUESTIONNAIRE)

Nome _____ DN ____ / ____ / _____

As questões 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 pontuam 1 se a resposta for “sim”.
As demais pontuam 1 quando a resposta for “não”.

Ponto de corte para TGD: 15. Ponto de corte para autismo clássico: 22.

1 Ele é capaz de conversar usando frases curtas ou sentenças?

Se não, prossiga para questão 9.

2 Ele fala com você só para ser simpático (mais do que para obter algo)?

3 Você pode ter um diálogo (por exemplo, ter uma conversa com ele que envolva alternância, isto é, um de cada vez) a partir do que você disse?

4 Ele usa frases estranhas ou diz algumas coisas repetidamente da mesma maneira? Isto é, ele copia ou repete qualquer frase que ele ouve outra pessoa dizer, ou ainda, ele constrói frases estranhas?

5 Ele costuma usar socialmente perguntas inapropriadas ou declarações? Por exemplo, ele costuma fazer perguntas pessoais ou comentários em momentos inadequados?

6 Ele costuma usar os pronomes de forma invertida, dizendo você ou ele quando deveria usar eu?

7 Ele costuma usar palavras que parece ter inventado ou criado sozinho, ou usa maneiras estranhas, indiretas, ou metafóricas para dizer coisas? Por exemplo, diz “chuva quente” ao invés de vapor.

8 Ele costuma dizer a mesma coisa repetidamente, exatamente da mesma maneira, ou insiste para você dizer as mesmas coisas muitas vezes?

9 Existem coisas que são feitas por ele de maneira muito particular ou em determinada ordem, ou seguindo rituais que ele te obriga fazer?

10 Até onde você percebe, a expressão facial dele geralmente parece apropriada à situação particular?

11 Ele alguma vez usou a tua mão como uma ferramenta, ou como se fosse parte do próprio corpo dele (por exemplo, apontando com seu dedo, pondo a sua mão numa maçaneta para abrir a porta)?

12 Ele costuma ter interesses especiais que parecem esquisitos a outras pessoas (e.g., semáforos, ralos de pia, ou itinerários de ônibus)?

13 Ele costuma se interessar mais por partes de um objeto ou brinquedo (e.g., girar as rodas de um carro), mais do que usá-lo com sua função original?

14 Ele costuma ter interesses específicos, apropriados para sua idade e para seu grupo de colegas, porém estranhos pela intensidade do interesse (por exemplo, conhecer todos os tipos de trens, conhecer muitos detalhes sobre dinossauros)?

15 Ele costuma de maneira estranha olhar, sentir/examinar, escutar, provar ou cheirar coisas ou pessoas?

16 Ele costuma ter maneirismos ou jeitos estranhos de mover suas mãos ou dedos, tal como “um bater de asas” (*flapping*), ou mover seus dedos na frente dos seus olhos?

17 Ele costuma fazer movimentos complexos (e esquisitos) com o corpo inteiro, tal como girar, pular ou balançar repetidamente para frente e para trás?

18 Ele costuma machucar-se de propósito, por exemplo, mordendo o braço ou batendo a cabeça?

- 19** Ele tem algum objeto (que não um brinquedo macio ou cobertor) que ele carrega por toda parte?
- 20** Ele tem algum amigo em particular ou um melhor amigo?
- 21** Quando ele tinha 4-5 anos ele repetia ou imitava espontaneamente o que você fazia (ou a outras pessoas) (tal como passar o aspirador no chão, cuidar da casa, lavar pratos, jardinagem, consertar coisas)?
- 22** Quando ele tinha 4-5 anos ele apontava as coisas ao redor espontaneamente apenas para mostrar coisas a você (e não porque ele as desejava)?
- 23** Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava usar gestos para mostrar o que ele queria (não considere se ele usava tua mão para apontar o que queria)?
- 24** Quando ele tinha 4-5 anos usava a cabeça pra dizer sim?
- 25** Quando ele tinha 4-5 anos sacudia a sua cabeça para dizer ‘não’?
- 26** Quando ele tinha 4-5 anos ele habitualmente olhava você diretamente no rosto quando fazia coisas com você ou conversava com você?
- 27** Quando ele tinha 4-5 anos sorria de volta se alguém sorrisse para ele?
- 28** Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava mostrar coisas de seu interesse para chamar a sua atenção?
- 29** Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava dividir coisas com você, além de alimentos?
- 30** Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava querer que você participasse de algo que o estava divertindo?
- 31** Quando ele tinha 4-5 anos ele costumava tentar confortá-lo se você ficasse triste ou magoado?
- 32** Entre as idades de 4 a 5 anos, quando queria algo ou alguma ajuda, costumava olhar para você e fazia uso de sons ou palavras para receber sua atenção?
- 33** Entre as idades de 4 a 5 anos tinha expressões faciais normais, isto é, demonstrava suas emoções por expressões faciais?
- 34** Quando ele estava com 4 ou 5 anos ele costumava participar espontaneamente e/ou tentava imitar ações em jogos sociais – tais como “Polícia e Ladrão” ou “Pega-Pega”?
- 35** Quando ele estava com 4 ou 5 anos jogava jogos imaginários ou brincava de “faz de conta”?
- 36** Quando ele estava com 4 ou 5 anos parecia interessado em outras crianças da mesma idade que ele não conhecia?
- 37** Quando ele estava com 4 ou 5 anos reagia positivamente quando outra criança aproximava-se dele?
- 38** Quando ele estava com 4 ou 5 anos, se você entrasse no quarto e iniciasse uma conversa com ele sem chamar seu nome, ele habitualmente te olhava e prestava atenção em você?
- 39** Quando ele estava com 4 ou 5 anos ele costumava brincar de “faz de conta” com outra criança, de forma que você percebia que eles estavam entendendo ser uma brincadeira?
- 40** Quando ele estava com 4 ou 5 anos ele brincava cooperativamente em jogos de grupo, tal como esconde-esconde e jogos com bola?

IX. 4. CARS (CHILDHOOD AUTISM RATING SCALE)

Childhood Autism Rating Scale (CARS) - Questionário para os pais

I. RELACIONAMENTO INTERPESSOAL	
1	Sem evidência de dificuldade ou anormalidade na relação com as pessoas : o comportamento da criança é apropriado a sua idade. Alguma timidez, nervosismo ou aborrecimento podem ser observados, mas não em grau atípico.
1.5	
2	Relacionamento levemente anormal: A criança pode evitar olhar o adulto nos olhos, evitar o adulto ou ficar nervoso se a interação for forçada, ser excessivamente tímido, não ser responsivo ao adulto como seria típico ou agarrar-se ao pais mais que o normal para crianças da mesma idade
2.5	
3	Relacionamento moderadamente anormal: A criança demonstra indiferença (parece ignorar o adulto). Tentativas persistentes e vigorosas são necessárias para se conseguir a atenção da criança. O contato iniciado pela criança é mínimo.
3.5	
4	Relacionamento gravemente anormal: A criança é constantemente indiferente ou inconsciente ao que o adulto está fazendo. Ela quase nunca responde ou inicia contato com o adulto. Somente a tentativa mais persistente para atrair a atenção tem algum efeito.
	Observações:
II. IMITAÇÃO	
1	Imitação apropriada: A criança é capaz de imitar sons, palavras e movimentos, os quais são apropriados para o seu nível de habilidade.
1.5	
2	Imitação levemente anormal : A criança imita comportamentos simples como bater palmas ou sons verbais únicos, a maior parte do tempo; ocasionalmente imita somente após estimulação ou com atraso.
2.5	
3	Imitação moderadamente anormal: A criança imita somente parte do tempo e requer uma grande dose de persistência ou ajuda do adulto; freqüentemente imita somente após um tempo (com atraso).
3.5	
4	Imitação gravemente anormal: A criança raramente ou nunca imita sons, palavras ou movimentos mesmo com estímulo e assistência de um adulto.
	Observações:

III. RESPOSTA EMOCIONAL

- 1** Resposta emocional apropriada à situação e à idade: A criança demonstra tipo e grau apropriados de resposta emocional evidenciada por mudança na expressão facial, postura e conduta.
- 1.5
- 2** Resposta emocional levemente anormal: A criança ocasionalmente apresenta um tipo ou grau inapropriados de resposta emocional. As reações nem sempre estão relacionadas a objetos ou eventos que envolve a criança.
- 2.5
- 3** Resposta emocional moderadamente anormal: A criança demonstra sinais claros de resposta emocional inadequada (tipo ou grau). As reações podem ser inibidas ou excessivas e sem relação com a situação; pode fazer caretas, rir ou tornar-se rígido até mesmo quando não há objetos ou eventos produtores de emoção.
- 3.5
- 4** Resposta emocional gravemente anormal: As respostas são raramente apropriadas a situação. Uma vez que a criança atinja um determinado humor, é muito difícil alterá-lo. Por outro lado, a criança pode demonstrar emoções diferentes quando nada mudou.

Observações:

IV. USO DO CORPO

- 1** Uso do corpo apropriado à idade: A criança move-se com a mesma facilidade, agilidade e coordenação de uma criança normal na mesma idade.
- 1.5
- 2** Uso do corpo levemente anormal :Algumas peculiaridades menores podem estar presentes, tais como movimentos desajeitados, repetitivos, coordenação pobre ou o raro aparecimento de mais movimentos não usuais.
- 2.5
- 3** Uso do corpo moderadamente anormal: Comportamentos que são claramente estranhos ou incomuns para uma criança nesta idade podem incluir movimentos estranhos com os dedos, postura peculiar do corpo ou mãos, fixar-se em uma parte do corpo, auto-agressão, balanceio, agitação dos dedos ou caminhar nas pontas dos pés.
- 3.5
- 4** Uso do corpo gravemente anormal: Movimentos intensos ou freqüentes do tipo listado acima são sinais de uso corporal gravemente anormal. Estes comportamentos podem persistir apesar das tentativas de desencorajá-los ou de envolver a criança em outras atividades.

Observações:

V. USO DE OBJETOS

- 1** Uso e interesse apropriados por brinquedos ou outros objetos: A criança demonstra interesse normal por brinquedos e os utiliza de maneira apropriada para seu nível de habilidade
- 1.5
- 2** Uso e interesse levemente inapropriados por brinquedos ou outros objetos: A criança pode demonstrar um interesse atípico por um brinquedo ou brincá-lo de maneira inadequadamente pueril (exemplo: bater ou chupar o brinquedo)
- 2.5
- 3** Uso e interesse moderadamente inapropriados por brinquedos ou outros objetos: A criança pode demonstrar pequeno interesse em brinquedos ou outros objetos ou pode estar preocupada em usá-los de maneira estranha. Ela pode focalizar em alguma parte insignificante do brinquedo, tornar-se fascinada com a luz que reflete do mesmo, repetitivamente mover alguma parte do objeto ou brincar com um objeto exclusivamente.
- 3.5
- 4** Uso e interesse gravemente inapropriados por brinquedos ou outros objetos: A criança ocupa-se com algum dos comportamentos acima com maior frequência e intensidade. É difícil distrair a criança quando ela está ocupada com estas atividades inadequadas.

Observações:

VI. ADAPTAÇÃO A MUDANÇAS

- 1** Resposta apropriada a mudanças: Se a criança pode perceber ou comentar as mudanças na rotina, ela é capaz de aceitar estas mudanças sem angústia.
- 1.5
- 2** Adaptação a mudanças levemente anormal: Quando um adulto tenta mudar tarefas, a criança pode continuar na mesma atividade ou usar os mesmos materiais.
- 2.5
- 3** Adaptação a mudanças moderadamente anormal: A criança resiste ativamente a mudanças na rotina, tenta continuar sua antiga atividade e é difícil de distrair. Ela pode tornar-se infeliz e zangada quando uma rotina estabelecida é alterada.
- 3.5
- 4** Adaptação a mudanças gravemente anormal: A criança demonstra reações graves às mudanças. Se uma mudança é forçada, ela pode tornar-se extremamente zangada ou não colaborativa e responder com acessos de raiva.

Observações:

VII. RESPOSTA VISUAL

- | | |
|----------|--|
| 1 | Resposta visual apropriada: O comportamento visual da criança é normal e adequado para sua idade. A visão é utilizada em conjunto com outros sentidos como forma de explorar um objeto novo. |
| 1.5 | |
| 2 | Resposta visual levemente anormal: A criança deve ocasionalmente ser lembrada de olhar para objetos. A criança pode estar mais interessada em olhar espelhos ou iluminação, pode eventualmente ficar olhando para o vazio ou pode evitar olhar as pessoas nos olhos. |
| 2.5 | |
| 3 | Resposta visual moderadamente anormal: A criança deve ser lembrada frequentemente de olhar para o que está fazendo, ela pode olhar fixamente para o vazio, evitando olhar as pessoas nos olhos, olhar objetos de um ângulo incomum ou segurar os objetos muito próximos aos olhos. |
| 3.5 | |
| 4 | Resposta visual gravemente anormal: A criança constantemente evita olhar para as pessoas ou para certos objetos e pode demonstrar formas extremas de outras peculiaridades visuais descritas acima. |

Observações:

VIII. RESPOSTA AUDITIVA

- | | |
|----------|---|
| 1 | Resposta auditiva apropriada: O comportamento auditivo da criança é normal e adequado para idade. A audição é utilizada conjuntamente com outros sentidos. |
| 1.5 | |
| 2 | Resposta auditiva levemente anormal: Pode haver ausência de resposta ou reação levemente exagerada a certos sons. Respostas a sons podem estar atrasadas e os sons podem necessitar de repetição para conseguir a atenção da criança. A criança pode ser distraída por sons externos. |
| 2.5 | |
| 3 | Resposta auditiva moderadamente anormal: A resposta da criança aos sons é variável. Frequentemente ignora o som nos primeiros momentos em que é feito. Pode assustar-se ou cobrir as orelhas ao ouvir alguns sons diários. |
| 3.5 | |
| 4 | Resposta auditiva gravemente anormal: A criança sobre reage ou subreage aos sons num grau extremamente evidente, independente do tipo de som. |

Observações:

IX. RESPOSTA AO PALADAR, OLFATO E TATO

- 1** Uso e resposta normais: A criança explora novos objetos de um modo apropriado à idade, geralmente sentindo ou olhando. Paladar ou olfato podem ser usados quando apropriados. Ao reagir a uma dor pequena, a criança expressa desconforto mas não reage exageradamente.
- 1.5
- 2** Uso e resposta levemente anormais: A criança pode insistir em colocar objetos na boca; pode cheirar ou provar objetos não comestíveis. Pode ignorar ou ter reação levemente exagerada à dor mínima, para a qual uma criança normal expressaria somente desconforto.
- 2.5
- 3** Uso e resposta moderadamente anormais: A criança pode estar moderadamente preocupada em tocar, cheirar ou provar objetos ou pessoas. A criança pode reagir muito ou pouco.
- 3.5
- 4** Uso e resposta gravemente anormais: A criança está preocupada em cheirar, provar e sentir objetos, mais pela sensação que pela exploração normal ou uso dos objetos. A criança pode ignorar completamente a dor ou reagir muito vigorosamente a desconfortos leves.

Observações:

X. MEDO OU NERVOSISMO

- 1** Medo ou nervosismo normais: O comportamento da criança é adequado a ambas situações e à idade.
- 1.5
- 2** Medo ou nervosismo levemente anormais: A criança ocasionalmente demonstra muito ou pouco medo ou nervosismo quando comparada às reações de uma criança normal da mesma idade e em situação similar.
- 2.5
- 3** Medo ou nervosismo moderadamente anormais: A criança demonstra um pouco mais ou um pouco menos de medo do que seria típico para uma criança mais nova ou mais velha em uma situação similar.
- 3.5
- 4** Medo ou nervosismo gravemente anormais: O medo persiste mesmo após experiências repetidas com eventos ou objetos inofensivos. É extremamente difícil acalmar ou confortar a criança. A criança pode, por outro lado, falhar em demonstrar adequado respeito por perigos que outras crianças da mesma idade evitam.

Observações:

XI. COMUNICAÇÃO VERBAL

- 1** Comunicação verbal normal, idade e situação apropriadas.
- 1.5
- 2** Comunicação verbal levemente anormal: A linguagem demonstra um atraso global. A maior parte do discurso tem significado; porém alguma ecolalia ou inversão do pronome podem ocorrer. Algumas palavras peculiares ou jargões podem ser usados ocasionalmente.
- 2.5
- 3** Comunicação verbal moderadamente anormal: O discurso pode estar ausente. Quando presente, a comunicação verbal pode ser uma mistura de alguma comunicação significativa e alguma linguagem peculiar, tais como jargão, ecolalia ou inversão do pronome. Peculiaridades relativas à linguagem com significado podem incluir questionamentos excessivos ou preocupação com algum tópico em particular.
- 3.5
- 4** Comunicação verbal gravemente anormal: Linguagem com significado não é utilizada. A criança pode emitir gritos infantis, sons animais ou bizarros, barulhos complexos reproduzindo linguagem, ou pode apresentar o uso bizarro e persistente de palavras reconhecíveis ou frases.

Observações:

XII. COMUNICAÇÃO NÃO VERBAL

- 1** Uso normal da comunicação não verbal, idade e situação apropriadas.
- 1.5
- 2** Uso da comunicação não verbal levemente anormal: Uso imaturo da comunicação não verbal; pode somente apontar vagamente ou esticar a mão para pegar o que quer de maneira imprecisa, nas mesmas situações nas quais uma criança da mesma idade pode apontar ou gesticular mais especificamente para indicar o que quer.
- 2.5
- 3** Uso da comunicação não verbal moderadamente anormal: A criança geralmente não é capaz de expressar suas necessidades ou desejos não verbalmente e não consegue compreender a comunicação não verbal dos outros.
- 3.5
- 4** Uso da comunicação não verbal gravemente anormal: A criança utiliza somente gestos bizarros ou peculiares, sem significado aparente e não apresenta consciência do significado associado aos gestos ou expressões faciais dos outros.

Observações:

XIII. NÍVEL DE ATIVIDADE

- 1** Nível de atividade normal para idade e circunstâncias. A criança não é nem mais nem menos ativa que uma criança da mesma idade em uma situação similar.
- 1.5
- 2** Nível de atividade levemente anormal: A criança pode tanto ser um pouco irrequieta quanto preguiçosa e mover-se lentamente algumas vezes. O nível de atividade da criança interfere pouco na sua performance.
- 2.5
- 3** Nível de atividade moderadamente anormal: A criança pode ser bastante ativa e difícil de conter. Ela pode ter uma energia ilimitada ou pode não dormir facilmente à noite. Por outro lado, a criança pode ser bastante letárgica e necessitar de um grande estímulo para mover-se.
- 3.5
- 4** Nível de atividade gravemente anormal: A criança exhibe extremos de atividade ou inatividade e pode até mesmo mudar de um extremo ao outro frequentemente.

Observações:

XIV. NÍVEL E COERÊNCIA DA RESPOSTA INTELECTUAL

-
- 1** A inteligência é normal e razoavelmente coerente em várias áreas: A criança é tão inteligente quanto uma criança da mesma idade e não possui qualquer habilidade intelectual incomum ou problemas.
- 1.5
- 2** Funcionamento intelectual levemente anormal: A criança não é tão inteligente quanto uma típica criança da mesma idade; as habilidades aparecem uniformemente atrasadas em todas as áreas.
- 2.5
- 3** Funcionamento intelectual moderadamente anormal: Em geral, a criança não é tão inteligente quanto uma criança da mesma idade, porém, a criança pode funcionar próximo do normal em uma ou mais áreas intelectuais.
- 3.5
- 4** Funcionamento intelectual gravemente anormal: Apesar da criança não ser tão inteligente quanto uma criança da mesma idade, ela pode funcionar até mesmo melhor que uma criança normal da mesma idade em uma ou mais áreas.

Observações:

XV. IMPRESSÕES GERAIS

1	Sem autismo: a criança não apresenta nenhum dos sintomas característicos do autismo.
1.5	
2	Autismo leve: A criança apresenta somente um pequeno número de sintomas ou somente um grau leve de autismo.
2.5	
3	Autismo moderado: A criança apresenta um número de sintomas ou um grau moderado de autismo.
3.5	
4	Autismo grave: a criança apresenta muitos sintomas ou um grau extremo de autismo
Observações:	

Escore por categoria

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Total	

Resultado:

15-30: sem TGD

30-36: quadro leve-moderado

36-60: quadro grave

IX. 5. INFLUENCE OF THE 5-HTTLPR POLYMORPHISM AND ENVIRONMENTAL RISK FACTORS IN A BRAZILIAN SAMPLE OF PATIENTS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres

**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders

Dânae Longo^a, Lavínia Schüler-Faccini^{a,b}, Ana Paula Carneiro Brandalize^a,
Rudimar dos Santos Riesgo^c, Claiton Henrique Dotto Bau^{a,b,*}

^aGraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^bDepartment of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^cDepartment of Pediatrics, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 28 February 2009

Available online 10 March 2009

Keywords:

5-HTTLPR

Serotonin transporter

Autism spectrum disorder

Environmental risk factor

Genetics

ABSTRACT

The 5-HTTLPR polymorphism of serotonin transporter gene is widely investigated in association studies in autism spectrum disorders (ASD). The results of such studies, however, remain controversial possibly due to the great genetic heterogeneity related to ASD and the lack of evaluation of the triallelic functional structure of 5-HTTLPR. This study tested for association between the 5-HTTLPR and ASD in a Brazilian sample by case–control and family-based association test (FBAT) methods, considering the biallelic and triallelic structures of this polymorphism. In addition, we performed an exploratory analysis of associations between specific clinical outcomes of ASD patients and 5-HTTLPR as well as several prenatal environmental factors. Genotyping was achieved in 151 ASD patients, 179 unrelated controls and 105 complete trios. There was no evidence of association between the 5-HTTLPR with ASD in both case–control and FBAT tests, but the LaLa 5-HTTLPR genotype was associated with mood instability in patients ($P=0.006$). The prenatal exposure to potential neuroteratogenic drugs was associated with epilepsy ($P<0.001$). Our findings suggest that the 5-HTTLPR is not associated with ASD in the Brazilian population, even considering the triallelic structure. Additionally, this study suggested a role of the 5-HTTLPR and environmental factors in the clinical expression of ASD.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal: 15053, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 3308 7311.

E-mail address: claiton.bau@ufrgs.br (C.H.D. Bau).

URL: <http://www.ppgbm.com.br/> (C.H.D. Bau).

Abbreviations: 5-HTTLPR, 5-hydroxytryptamine transporter linked polymorphic region; ASD, autism spectrum disorders; FBAT, family-based association test; PDD-NOS, pervasive development disorder-not otherwise specified; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; SLC6A4, solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4; 5-HTT, serotonin transporter; SNP, single nucleotide polymorphism; TDT, transmission disequilibrium test; SSRIs, selective serotonin reuptake inhibitors

1. Introduction

Autistic disorder, Asperger disorder and pervasive development disorder-not otherwise specified (PDD-NOS), collectively designated as autism spectrum disorders (ASD), are complex neurodevelopmental conditions characterized by impairments in social interaction and communication, and restricted and stereotyped patterns of interests and behaviors (American Psychiatric Association, 2000). The prevalence of narrowly defined autism is ~1/1,000 (Chakrabarti and Fombonne, 2001), and inclusion of broad spectrum autism increases this rate to ~1/300–1/500 (Fombonne, 2003; Yeargin-Allsopp et al., 2003). Males are affected more often, with a male:female ratio of 4:1. The sibling-recurrence risk of narrowly defined autism is ~6%–8% (Jones and Szatmari, 1988; Ritvo et al., 1989). Family and twin studies provided heritability estimates as high as 90% (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001; Lamb et al., 2000), pointing to an important role of genetic factors in the etiology of ASD.

Schain and Freedman (1961) reported elevated levels of platelet serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in ~20%–25% of autistic individuals. Since then, other studies have reinforced the potential role of serotonin in ASD etiology. Serotonin acts as a morphogenetic agent and differentiation factor in the developing brain (Whitaker-Azmitia, 2001). The manipulation of 5-HT levels in developing brains in animal models induces neuroanatomic changes, with behavioral manifestations similar to autism (reviewed in Whitaker-Azmitia, 2005). There are also evidences of defects in 5-HT peripheral metabolism in autistic patients (Croonenberghs et al., 2005). Finally, a rich 5-HT innervation is found in limbic areas, which are critical for emotional, social and affiliative behavior (Bachevalier, 1994), as well as in areas controlling sensory gating, behavioral inhibition, aggression, sleep and mood (Lucki, 1998), often observed to be affected in individuals with autism.

Among the candidate genetic factors for association studies in ASD, the serotonin transporter gene (SLC6A4)

(Lesch et al., 1993) is one of the most promising. The neuronal serotonin transporter (5-HTT) is the target of reuptake inhibitors used to improve part of the symptoms cited above (Cook et al., 1992; Fatemi et al., 1998; Gordon et al., 1993; Hollander et al., 2000; McDougle et al., 1996; Namerow et al., 2003). The SLC6A4 gene bears a 44 base pair insertion/deletion polymorphism in the promoter region (5-HTT gene-linked polymorphic region, 5-HTTLPR, Heils et al., 1996). This polymorphism was initially considered functionally biallelic, with a short (S) and a long (L) frequent alleles (Lesch et al., 1996). However, an A→G single-nucleotide polymorphism (SNP, rs25531) was detected within 5-HTTLPR (Nakamura et al., 2000) and shown to be functional, modifying the SLC6A4 transcriptional level (Hu et al., 2006). Since a G variation almost always occurs in the context of the long allele, 5-HTTLPR is currently considered triallelic with S (short), La (long with SNP “A”) and Lg (long with SNP “G”) alleles (Hu et al., 2006).

Three meta-analyses of association studies of the biallelic 5-HTTLPR and ASD have been published to date. Guhathakurta et al. (2006), in a group of 12 family-based studies, observed preferential transmission of the S allele to affected offspring. On the other hand, Betancur et al. (2002) and Huang and Santangelo (2008) found no association of either the short or long alleles with autistic disorder.

Among the possible explanations for these controversial results is the fact that the real functional status of the 5-HTTLPR polymorphism derives from the triallelic structure, which was not assessed in previous studies. Considering that Lg drives expression nearly equivalently to S, studies that include many Lg alleles within the SL and LL genotypes may underestimate the real effect of 5-HTTLPR.

Another point to consider is the great genetic heterogeneity related to ASD (Risch et al., 1999; Szatmari, 1999), which adds complexity to the identification of susceptibility genes (Ioannidis, 2006). The most recent genetic studies tend to evaluate subsets of patients who share certain clinical characteristics (McCauley et al., 2004; Nurmi et al., 2003; Shao et al., 2002; Sutcliffe et al., 2005). No studies to date, however, have

Table 1 – Genotype and allele frequencies of triallelic and biallelic structures of 5-HTTLPR in a Brazilian sample.

Genotypes ^a	Triallelic 5-HTTLPR		Genotypes ^b	Biallelic 5-HTTLPR	
	Patients N (%)	Controls N (%)		Patients N (%)	Controls N (%)
SS	33 (21.8)	40 (22.3)	SS	33 (21.8)	40 (22.3)
SLa	59 (39.1)	76 (42.5)	SL	68 (45.1)	83 (46.5)
SLg	9 (6.0)	7 (4.0)			
LaLa	36 (23.8)	45 (25.1)	LL	50 (33.1)	56 (31.2)
LaLg	14 (9.3)	11 (6.1)			
Total	151 (100)	179 (100)	Total	151 (100)	179 (100)
Allelic frequency ^c			Allelic frequency ^d		
S	0.44	0.45	S	0.44	0.45
La	0.48	0.5	L	0.56	0.55
Lg	0.08	0.05			

^a $\chi^2=2.061$; $df=4$; $P=0.725$.

^b $\chi^2=0.126$; $df=2$; $P=0.939$.

^c $\chi^2=1.884$; $df=2$; $P=0.390$.

^d $\chi^2=0.089$; $df=1$; $P=0.765$.

analyzed the triallelic 5-HTTLPR data among clinical subsets of autistic patients.

Finally, besides genetic factors, epidemiological studies have also considered a role for environmental factors in ASD etiology. Harmful factors to fetal growth, such as smoking during pregnancy, intrapartum hypoxia, hypoglycemia after delivery, obstetric conditions like hypertension and preeclampsia, or history of maternal medical disorders, are particularly considered (Kolevzon et al., 2007; Wallace et al., 2008). Although many genetic and environmental risk factors associated with ASD are already identified, no study to date has investigated the role of such factors on clinical subsets of ASD individuals.

The objective of this study was to investigate the role of the 5-HTTLPR polymorphism (biallelic and triallelic presentations) in ASD etiology. In addition, we investigated a possible association between specific clinical outcomes of ASD patients and 5-HTTLPR as well as several prenatal environmental factors. None of these genetic or environmental factors have been previously studied in Brazilian patients with ASD.

2. Results

DNA samples were available for 151 patients with ASD, 105 complete trios (mother, father and ASD patient) and 179 control individuals. The allelic and genotypic frequencies of the 5-HTTLPR polymorphism are listed in Table 1 for biallelic (S and L alleles) and triallelic forms (S, La and Lg alleles). The genotypic frequencies in patient and control samples were distributed according to the Hardy–Weinberg equilibrium. In the case–control study, the frequencies of the biallelic and triallelic 5-HTTLPR genotypes and alleles did not differ among patients and controls (Table 1). The allelic frequencies in our control sample (0.45 for the S allele) were very similar to other control samples from the same population (Grevet et al., 2007; Segal et al., 2006). A very rare ultra-long allele was found in our sample (in only one patient). This finding has already been reported in other studies (Cho et al., 2007; Guhathakurta et al., 2006; Narita et al., 2003). However, following the strategy of Cho et al. (2007) and for the convenience of further analyses, it was included in the group of long allele variants.

Results of the transmission disequilibrium test (TDT) in the 105 complete trios are shown in Table 2. No preferential transmission of any 5-HTTLPR allele, in the biallelic or triallelic forms, was observed.

The results of association analyses between risk factors and clinical and behavior outcomes are shown in Table 3. There were no significant ASQ score differences in any risk factor tested. Considering the occurrence of specific symptoms, the use of potential neuroteratogenic substances (including misoprostol, psychiatric drugs and anticoagulants) was associated with epilepsy in ASD patients ($P < 0.001$). Overall, 5-HTTLPR genotypes were not associated with the clinical and behavioral outcomes in this study. The only exception was an association between the triallelic genotypes (LaLa vs. other genotypes) and mood instability ($P = 0.006$; $OR = 2.9$; 95% CI: 1.3–6.4). Results for some comparisons were not maintained after correction for multiple comparisons, but might deserve attention considering their biological plausibility. Maternal chronic disease in pregnancy (including mood disorders, thrombosis and hypothyroidism) presented a trend towards association with epilepsy in ASD patients ($P = 0.02$). Likewise, smoking during pregnancy was slightly related to stereotyped movements ($P = 0.046$).

3. Discussion

The present study presents for the first time suggestive evidence that the 5-HTTLPR polymorphism (LaLa genotype) is associated with mood instability in patients with ASD. Another new and interesting finding was the association between the use of potential neuroteratogenic substances and the occurrence of epilepsy in these patients.

Despite substantial evidence for the role of variations in the serotonergic system on ASD, results of association studies of the 5-HTTLPR polymorphism have been controversial. Our results, as many others (Coutinho et al., 2004; Guhathakurta et al., 2006; Kim et al., 2002; Koishi et al., 2006; Maestrini et al., 1999; Mulder et al., 2005; Persico et al., 2000; Ramoz et al., 2006; Zhong et al., 1999), show lack of association between 5-HTTLPR and ASD. However, there are also positive findings, and the overall set of investigations has already been subject to three meta-analyses, two of them suggesting lack of association (Betancur et al., 2002; Huang and Santangelo, 2008) and one suggesting association of 5-HTTLPR with autism (Guhathakurta et al., 2006). The lack of evaluation of the triallelic structure of the 5-HTTLPR polymorphism could be a possible explanation for these controversial results, since all the association studies of ASD and this polymorphic region have considered just two alleles, S and L. As the present work

Table 2 – Association analysis of 5-HTTLPR and ASD by family-based association test (FBAT).

Marker	Allele	Frequency	Family	Z	P
Biallelic 5-HTTLPR	S	0.440	73	–0.632	0.527089
Biallelic 5-HTTLPR	L	0.560	73	0.632	0.527089
Triallelic 5-HTTLPR	S	0.440	73	–0.318	0.750485
Triallelic 5-HTTLPR	La	0.500	70	0.218	0.827259
Triallelic 5-HTTLPR	Lg	0.060	24	0.200	0.841481

Family: number of informative families for that allele; Z: statistic value, indicate if transmission of a specific allele deviate from expected under the null hypothesis of no linkage and no association.

Table 3 – Clinical outcomes, ASQ score and frequency of genetic and environmental pre/postnatal risk factors in subjects with ASD.

Risk factors	Clinical and behavioral outcomes														
	Epilepsy		Mood instability		Stereotyped movements		Aggression		Self-injury		Sleep disorders		Psychom. agitation		ASQ (mean + SD)
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sex															
M (n=131)	22	16.9 ^a	58	45.0 ^a	94	72.3 ^a	49	37.7 ^a	53	40.8 ^a	72	55.8 ^a	69	53.1 ^a	22.04 (5.45)
F (n=38)	11	29.7 ^a	19	51.4 ^a	27	73.0 ^a	16	43.2 ^a	16	42.1 ^a	22	59.5 ^a	23	62.2 ^a	21.34 (5.76)
Maternal chronic disease															
Yes (n=13)	6	46.2 ^b	7	53.8	9	69.2	8	61.5	7	53.8	10	76.9	8	61.5	24.14 (5.02)
No (n=139)	26	18.7	63	45.3	99	71.2	52	37.4	57	41.0	82	59.0	78	56.1	21.93 (5.42)
Maternal teratogen exposure															
Yes (n=12)	8	66.7 ^c	5	41.7	9	75.0	7	58.3	5	41.7	9	75.0	7	58.3	21.09 (6.82)
No (n=144)	23	16.0	67	46.9 ^a	104	72.2	53	36.8	60	41.6	83	58.0 ^a	78	54.2	22.16 (5.31)
Maternal smoking															
Yes (n=26)	8	30.8	13	50.0	23	88.5 ^d	12	46.2	14	53.8	13	50.0	13	50.0	22.39 (4.41)
No (n=134)	24	17.9	60	45.1 ^a	93	69.4	50	37.3	53	39.5	77	57.9 ^a	75	56.0	21.95 (5.60)
Maternal alcohol use															
Yes (n=40)	12	30.0	16	40.0	29	72.5	13	32.5	17	42.5	20	50.0	23	57.5	21.61 (4.79)
No (n=117)	20	17.1	57	49.1 ^a	85	72.6	48	41.0	49	41.9	70	60.3 ^a	63	53.8	22.27 (5.63)
Obstetric occurrences															
Yes (n=50)	13	26.0	24	48.0	39	78.0	22	44.0	26	52.0	29	58.0	28	56.0	23.16 (5.03)
No (n=87)	15	17.2	39	44.8	59	67.8	29	33.3	33	37.9	50	57.5	54	62.1	21.78 (5.24)
5-HTT genotypes^f															
Low (n=42)	8	19.0	15	35.7	29	69.0	16	38.1	15	35.7	25	59.5	22	52.4	21.05 (6.59)
Medium (n=72)	16	22.2	28	38.9	55	76.4	23	31.9	34	47.2	41	56.9	37	51.4	22.00 (5.51)
High (n=36)	7	19.4	23	63.9 ^e	26	72.2	17	47.2	12	33.3	18	50.0	22	61.1	22.32 (5.26)

^a Percentage referring to the available data for each variable (these cells have some missing information).

^b P=0.02.

^c P<0.001.

^d P=0.046.

^e P=0.006 (low+medium×high).

^f Genotypes are classified based on the assumed gene expression (Hu et al., 2006): low = SS, SLg; medium = SLa, LaLg; high = LaLa.

is the first association study between 5-HTTLPR and ASD which take into account the triallelic polymorphism, other investigations are necessary to confirm or refute our findings.

Similar to our results, other studies could not find an association of 5-HTTLPR with ASD, but with clinical subsets of ASD patients. Coutinho et al. (2004), for instance, did not find an association of 5-HTTLPR with autism, but with hyperserotonemia in their patients. Likewise, Tordjman et al. (2001) observed that the 5-HTT promoter alleles do not influence the severity of autistic impairment, but modify some behavior domains, particularly social and communication skills. This observation is consistent with our findings, where 5-HTTLPR did not influence ASD itself but was associated with excessive and disabling variations in mood. The L allele and, particularly, the LaLa genotype, were associated with higher 5-HTT expression (Hu et al., 2006), which could lead to increased serotonin reuptake in neurons and depletion of the 5-HT in the synaptic cleft (Cook and Leventhal, 1996; Klauck et al., 1997). Several investigations of 5-HTTLPR in disorders such as Alzheimer, schizophrenia, fragile X syndrome, ADHD and autism found associations between the L allele or LL genotype and phenotypic subgroups defined by behaviors influenced by serotonergic activity, such as aggression, psychomotor agitation, stereotypy, irritability and emotional instability (Brune et al., 2006; Han et al., 2004; Hessel et al., 2008; Retz et al., 2002; Sukonick et al., 2001; Sweet et al., 2001).

There is evidence that environmental risk factors play a role in the clinical heterogeneity of ASD. We observed a higher frequency of epilepsy in individuals whose mothers were treated with potential neuroteratogens during pregnancy (misoprostol, warfarin, psychiatric drugs). This is an interesting result, considering the potential disruptive effect of these medications on the developing brain. Neurological sequelae secondary to intrauterine warfarin and misoprostol exposure may be due to a direct teratogenic effect or from secondary causes such as fetal vascular disruption damage (Raghav and Reutens, 2007; Vargas et al., 2000), while psychiatric drugs theoretically can interfere with the action of neuromorphogens, like serotonin itself. The use of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) during pregnancy, for example, has been shown to be associated with an increased risk of seizure development in infants (De las Cuevas and Sanz, 2006; Wen et al., 2006). Therefore, we can infer the existence of a neurological liability in ASD brain, in which epilepsy could be triggered by fetal exposure to adverse factors during pregnancy. Maternal chronic diseases could also represent a potential risk factor for epilepsy, but possibly with a smaller effect than neuroteratogenic drugs.

Although non-significant, we observed a trend toward association of smoking during pregnancy with a higher frequency of repetitive movements. Since carbon monoxide from tobacco smoke has the property of inhibiting the release of oxygen into fetal tissues (Benowitz et al., 1990; Luck et al., 1985), our finding might reflect an indirect effect of fetal hypoxia on stereotypy. This hypothesis is consistent with the Laviola et al. (2004) study on the exposure to chronic hypoxia during pregnancy in an animal model. The authors reported in the offspring increased stereotypy, decreased social contact and maladaptation to novel situations, all of them part of the ASD diagnostic criteria (American Psychiatric Association,

2000). Since epidemiological studies have indicated daily smoking and fetal hypoxia as risk factors for autism (review in Kolevzon et al., 2007), it is reasonable to expect that smoking could be a risk factor for some behavior domains in ASD as well.

Any investigation on genetic and environmental factors in a group of complex disorders such as ASD has several limitations. First of all, a larger sample size would bring significant improvement to this study which is relatively underpowered for small effect sizes, with odds-ratios lower than 2. However, the fact that the sample size is too small to draw definite conclusions is balanced by the novel description on genetic (especially the triallelic approach) and environmental risk factors in a different country. We did not use some instruments frequently applied to ASD in other countries, such as the ADI-R (Lord et al., 1994) and ADOS (Lord et al., 1989). Unfortunately, these instruments have not been validated in Portuguese up to now. Our group is involved in the validation process of ADI-R, and we hope that the availability of this method will stimulate new studies of ASD in Brazil. The simultaneous application of neuroimaging techniques could certainly help to identify potential pathways for analyzing the relationships between risk factors and clinical outcomes. Unfortunately, these techniques are still very expensive for application in a reasonable number of patients. Population stratification could be a limitation in the case-control branch of the present study. However, this analysis provided similar results to the present FBAT analysis, which is not vulnerable to this confounding factor.

In conclusion, the 5-HTTLPR polymorphism does not seem to be a risk factor for ASD per se, but may influence the phenotypic expression in ASD patients. Additionally, we observed a group of environmental factors modifying the behavioral phenotype in ASD. To confirm and further clarify these findings, future ASD studies with larger sample sizes should focus not only in the core disorder, but also in the possible role of genetic and environmental agents on the heterogeneity of ASD.

4. Experimental procedures

4.1. Subjects

Patients and their biological parents were recruited at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) or other medical and educational institutions of the State of Rio Grande do Sul, following clinical and diagnostic evaluation by experienced professionals from PROTID (Programa para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento), a multidisciplinary program directed to research and treatment of Pervasive Developmental Disorders. Patients were diagnosed using DSM-IV-TR criteria (American Psychiatric Association, 2000), and/or the Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Schopler et al., 1986) in its Brazilian version (Pereira et al., 2008). The selected patients fulfilled diagnostic criteria for autistic disorder, Asperger disorder or PDD-NOS. Exclusion criteria were age lower than three years and diagnoses of neurofibromatosis, tuberous sclerosis, fragile X syndrome, Rett syndrome, chromosomal abnormalities or other genetic condition, cerebral palsy or other encephalopathy possibly associated with ASD, fetal

rubella, toxoplasmosis and other prenatal infections associated with neurological damage. The aim of these criteria was to obtain a sample of idiopathic cases of ASD.

All patients were screened for FMR1 (fragile X mental retardation 1) gene expansions by a polymerase chain reaction (PCR) protocol (O'Connell et al., 2002). Since the screening result was inconclusive in 23 female patients, they were submitted to a careful evaluation to confirm absence of clinical signals of fragile X syndrome. In total, 3 male patients were excluded due to fragile X syndrome. Cytogenetic studies were available for 40% of children. For individuals with no cytogenetic assessment, we performed a very careful clinical evaluation and excluded from the study all children with dysmorphic features. There is evidence that it is unlikely that the non-dysmorphic patients have cytogenetic alterations (Miles et al., 2005).

Each patient was assessed through an evaluation questionnaire administered by trained interviewers. The questionnaires were administered in a clinic setting. Information was collected from mothers, fathers or both parents. The questionnaire included questions on demographic data, familiar history of diseases, mother's prior obstetric history with respect to child, perinatal and neonatal periods, as well as child behavior characteristics. A total of 169 idiopathic ASD patients were clinically evaluated, 131 males (77.5%) and 38 females, with a mean age of 10.5 years (± 5.2 years). Sixty-five patients (38.4%) had autistic disorder, 89 (52.7%) had PDD-NOS, and 15 (8.9%) had Asperger disorder. The mean age of onset of symptoms was 17.5 months (± 13.6 months) and the average ASQ score was 21.88 (± 5.5).

Control subjects consisted of 179 unrelated children, 102 males (57%) and 77 females, recruited at an outpatient clinic for orofacial clefts (115 non-syndromic individuals, with isolated cleft lip and/or palate) or during routine exams at HCPA (64 individuals). We compared the allele and genotype frequencies of the 5-HTTLPR in both groups and verified that there are no significant differences. For these reasons, all individuals were included together in the control group. These children have undergone a clinical examination in order to exclude genetic and/or developmental disorders, but no specific assessment for ASD diagnosis was done. The control sample was thus designed to be non-screened for ASD, representative of the gene frequencies in Porto Alegre. The expected frequency of ASD in this group is the same as in the general population. Cases and controls were predominantly European derived (92% and 93%, respectively). Considering this frequency similarity, the fact that there were no genotype differences in relation to ethnicity in cases or controls, and that these frequencies were similar to other samples studied in Porto Alegre (Grevet et al., 2007; Marques et al., 2006; Segal et al., 2006) we disregarded ethnicity as a possible confounder and included the entire sample in the analyses.

The study was approved by the Ethics Committee of HCPA, and all participants or legal representatives signed an informed consent form.

4.2. Clinical and behavioral outcomes

The score obtained in the Brazilian version of Autism Screening Questionnaire (ASQ) (Berument et al., 1999) was

used as a severity measure of autistic behavioral symptoms. The presence of specific symptoms was assessed by clinical examination performed by neurologists, under de supervision of RSR. Clinical outcomes included concurrent clinical disorders that are frequently observed in ASD individuals (Ming et al., 2008), which disrupt family and educational activities and usually require pharmacological treatment. The clinical outcomes evaluated included: (a) epilepsy, defined as at least two unprovoked seizures; (b) mood instability, defined as excessive and disabling variations in mood; (c) stereotyped movements defined as repetitive and purposeless movements; (d) aggression, including unprovoked and recurrent aggressive behavior such as kicking, biting, pinching, hitting, or head-banging toward others; (e) self-injury, defined as unexplained and recurrent aggressive behavior toward self; (f) sleep disorders, including any of the following disorders: sleep psychomotor agitation, night terror, chronic daily night awakening for an estimated duration of 10 or more minutes, sleep maintenance disorder (total nightly sleep time of less than 6 h) and (g) psychomotor agitation, defined as excessive motor activity disconnected from the situation. To be considered affected by a clinical outcome cited above, except for epilepsy, the patient should exhibit it daily, with behavior persisting for an estimated period of 6 months or more.

4.3. Environmental pre/perinatal risk factors evaluation

The maternal medical history during pregnancy was recovered by interview with parents and review of medical records. Pre and postnatal events that have been associated with ASD in epidemiological studies were considered as environmental risk factors for fetal development (Kolevzon et al., 2007; Wallace et al., 2008). They were: (a) maternal history of medical conditions during pregnancy, including hypothyroidism, mood disorders and thrombosis; (b) maternal smoking; (c) alcohol use; (d) maternal exposure to neuroteratogenic drugs including misoprostol, psychiatric drugs including SSRIs e anticoagulant drugs, like warfarin; (e) obstetric occurrences including fetal distress, hypoxia, hypoglycemia, cardiorespiratory arrest, and neonatal sepsis.

4.4. Genotyping

Blood samples from patients, their parents, and control individuals were used for DNA extraction by salting out (Lahiri and Numberger, 1991). The polymorphic region 5-HTTLPR was amplified using the primers and PCR protocol described in Kaiser et al. (2001) but with $MgCl_2$ concentration adjusted according to Yonan et al. (2006) in order to improve genotyping accuracy. PCR products were analyzed on 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide, resulting in a 484-bp PCR product for the S allele, a 528-bp PCR product for the L allele and 613-bp for a very rare ultra-long allele. PCR products were submitted to enzymatic cleavage for discrimination of La and Lg alleles, according to Stein et al. (2006). In this protocol, the A→G substitution inside the L allele (i.e., La→Lg) creates an additional MspI site besides two other constant MspI sites. After restriction digestion, the digest mixture was size-fractionated on 2.5% agarose gel stained

with ethidium bromide. Band sizes were: 165, 174, 62, and 128 bp for the Lg allele; 339, 62, and 128 bp for the La allele; and 295, 62, and 128 bp for the S allele.

4.5. Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by direct counting. The genotype and allele frequencies among ASD patients and controls, as well as other categorical variables, were compared with the chi-square test. The only continuous variable (ASQ scores) was analyzed by ANOVA.

The transmission disequilibrium test (TDT) (Spielman and Ewens, 1996) was performed using the FBAT program, version 2.0.2C (Laird et al., 2000) under additive genetic model. The test determined how often a specific allele was transmitted by normal parents to ASD patients. Positive Z statistic of single locus FBAT indicated that a specific locus was more frequently transmitted to patients with ASD in informative families than expected under the null hypothesis of no linkage and no association.

The Bonferroni procedure, used for correction for multiple comparisons, considered a conceptual analysis of the literature as well as the pattern of correlations between the variables included in the study, since independence between variables is an assumption for such corrections. The two “predictor” risk factors were the gene and a group of moderately correlated environmental risk factors. The variance in the “outcome” variables could be ascribed to three main factors: (a) a group of variables including the general ASQ measure, mood instability, sleep disturbances, self-injury, aggression and psychomotor agitation; (b) epilepsy; and (c) stereotyped movements. Therefore, the number of independent comparisons to correct for was 6 and the P value set at 0.008.

Acknowledgments

We are indebted to Sandra Leistner Segal for helping at genotyping standards; to Marcos T. Mercadante for the cession of ASQ Brazilian Version; to Julia Genro for assistance in statistical analysis and to Bibiane Armiliato de Godoy for kind help with laboratory procedures. This project was funded by FIFE-HCPA, CNPq, CAPES, FAPERGS-DECIT-/PPSUS and CNPq-Institutos do Milênio.

REFERENCES

- American Psychiatric Association, 2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, text revision. American Psychiatric Association, Washington D.C.
- Bachevalier, J., 1994. Medial temporal lobe structures and autism. A review of clinical and experimental findings. *Neuropsychologia* 32, 627–648.
- Benowitz, N.L., Porchet, H., Jacob, P., 1990. Pharmacokinetics, metabolism and pharmacodynamics of nicotine. In *Nicotine Psychopharmacology*, ed. Oxford Press, New York, pp. 112–157.
- Berument, S.K., Rutter, M., Lord, C., Pickles, A., Bailey, A., 1999. Autism screening questionnaire: diagnostic validity. *Br. J. Psychiatry* 175, 444–451.
- Betancur, C., Corbex, M., Spieleswoy, C., Philippe, A., Laplanche, J.L., Launay, J.M., Gillberg, C., Mouren-Simeoni, M.C., Hamon, M., Giros, B., Nosten-Bertrand, M., Leboyer, M., 2002. Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. *Mol. Psychiatry* 7, 67–71.
- Brune, C.W., Kim, S.J., Salt, J., Leventhal, B.L., Lord, C., Cook Jr., E.H., 2006. 5-HTTLPR genotype-specific phenotype in children and adolescents with autism. *Am. J. Psychiatry* 163, 2148–2156.
- Chakrabarti, S., Fombonne, E., 2001. Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA* 285, 3093–3099.
- Cho, I.H., Yoo, H.J., Park, M., Lee, Y.S., Kim, S.A., 2007. Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT2A receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios. *Brain Res.* 1139, 34–41.
- Cook, E.H., Leventhal, B., 1996. The serotonin system in autism. *Curr. Opin. Pediatr.* 8, 348–354.
- Cook, E.H., Rowlett, R., Jaselskis, C., Leventhal, B.L., 1992. Fluoxetine treatment of children and adults with autistic disorder and mental retardation. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* 31, 739–745.
- Coutinho, A.M., Oliveira, G., Morgadinho, T., Fesel, C., Macedo, T.R., Bento, C., Marques, C., Ataíde, A., Miguel, T., Borges, L., Vicente, A.M., 2004. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. *Mol. Psychiatry* 9, 264–271.
- Croonenberghs, J., Verkerk, R., Scharpe, S., Deboutte, D., Maes, M., 2005. Serotonergic disturbances in autistic disorder: L-5-hydroxytryptophan administration to autistic youngsters increases the blood concentrations of serotonin in patients but not in controls. *Life Sci.* 76, 2171–2183.
- De las Cuevas, C., Sanz, E.J., 2006. Safety of selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy. *Curr. Drug. Saf.* 1, 17–24.
- Fatemi, S.H., Realmuto, G.M., Khan, L., Thuras, P., 1998. Fluoxetine in treatment of adolescent patients with autism: a longitudinal open trial. *J. Autism Dev. Disord.* 28, 303–307.
- Folstein, S.E., Rosen-Sheidley, B., 2001. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat. Rev. Genet.* 2, 943–955.
- Fombonne, E., 2003. The prevalence of autism. *JAMA* 289, 87–89.
- Gordon, C.T., State, R.C., Nelson, J.E., Hamburger, S.D., Rapoport, J.L., 1993. A double-blind comparison of clomipramine, desipramine, and placebo in the treatment of autistic disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 50, 441–447.
- Grevet, E.H., Marques, F.Z.C., Salgado, C.A.I., Fischer, A.G., Kalil, K.L., Victor, M.M., Garcia, C.R., Sousa, N.O., Belmonte-de-Abreu, P., Bau, C.H.D., 2007. Serotonin transporter gene polymorphism and the phenotypic heterogeneity of adult ADHD. *J. Neural Transm.* 114, 1631–1636.
- Guhathakurta, S., Ghosh, S., Sinha, S., Chatterjee, A., Ahmed, S., Chowdhury, S.R., Gangopadhyay, P.K., Ghosh, S., Singh, M., Usha, R., 2006. Serotonin transporter promoter variants: analysis in Indian autistic and control population. *Brain Res.* 1092, 28–35.
- Han, D.H., Park, D.B., Na, C., Kee, B.S., Lee, Y.S., 2004. Association of aggressive behavior in Korean male schizophrenic patients with polymorphisms in the serotonin transporter promoter and catecholamine-O-methyltransferase genes. *Psychiatry Res.* 129, 29–37.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stober, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K.P., 1996. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J. Neurochem.* 66, 2621–2624.
- Hessl, D., Tassone, F., Cordeiro, L., Koldewyn, K., McCormick, C., Green, C., Wegelin, J., Yuhas, J., Hagerman, R.J., 2008. Brief report: aggression and stereotypic behavior in males with fragile X syndrome — moderating secondary genes in a “single gene” disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 38, 184–189.
- Hollander, E., Kaplan, A., Cartwright, C., Reichman, D., 2000. Venlafaxine in children, adolescents, and young adults with

- autism spectrum disorders: an open retrospective clinical report. *J. Child Neurol.* 15, 132–135.
- Hu, X., Lipsky, R.H., Zhu, G., Akhtar, L.A., Taubman, J., Greenberg, B.D., Xu, K., Arnold, P.D., Richter, M.A., Kennedy, J.L., Murphy, D.L., Goldman, D., 2006. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 815–826.
- Huang, C.H., Santangelo, S.L., 2008. Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. Part B* 147B, 903–913.
- Ioannidis, J.P., 2006. Common genetic variants for breast cancer: 32 largely refuted candidates and larger prospects. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1350–1353.
- Jones, M.B., Szatmari, P., 1988. Stoppage rules and genetic studies of autism. *J. Autism Dev. Disord.* 18, 31–40.
- Kaiser, R., Tremblay, P.B., Schmider, J., Henneken, M., Dettling, M., Müller-Oerlinghausen, B., Uebelhack, R., Roots, I., Brockmöller, J., 2001. Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparanoid and residual subtypes of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 6, 179–185.
- Kim, S.J., Cox, N., Courchesne, R., Lord, C., Corsello, C., Akshoomoff, N., Guter, S., Leventhal, B.L., Courchesne, E., Cook, E.H., 2002. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Mol. Psychiatry* 7, 278–288.
- Klauck, S.M., Poustka, F., Benner, A., Lesch, K., Poustka, A., 1997. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum. Mol. Genet.* 6, 2233–2238.
- Koishi, S., Yamamoto, K., Matsumoto, H., Koishi, S., Enseki, Y., Oya, A., Asakura, A., Aoki, Y., Atsumi, M., Iga, T., Inomata, J., Inoko, H., Sasaki, T., Nanba, E., Kato, N., Ishii, T., Yamazaki, K., 2006. Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev.* 2, 257–260.
- Kolevzon, A., Gross, R., Reichenberg, A., 2007. Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161, 326–333.
- Lahiri, D.K., Nurnberger Jr., J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444.
- Lamb, J.A., Moore, J., Bailey, A., Monaco, A.P., 2000. Autism: recent molecular genetics advances. *Hum. Mol. Genet.* 9, 861–868.
- Laird, N., Horvath, S., Xu, X., 2000. Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet. Epidemiol.* 19 (Suppl. 1), S36–S42.
- Laviola, G., Adriani, W., Rea, M., Aloe, L., Alleva, E., 2004. Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology* 175, 196–205.
- Lesch, K.P., Wolozin, B.L., Murphy, D.L., Riederer, P., 1993. Primary structure of the human platelet serotonin (5-HT) uptake site: identity with the brain 5-HT transporter. *J. Neurochem.* 60, 2319–2322.
- Lesch, K.P., Bebgel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L., 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274, 1527–1531.
- Lord, C., Rutter, M., Le Couteur, A., 1994. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 24, 659–685.
- Lord, C., Rutter, M., Goode, S., Heemsbergen, J., Jordan, H., Mawhood, L., Schopler, E., 1989. Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J. Autism Dev. Disord.* 19, 185–212.
- Luck, W., Nau, H., Hansen, R., Stelding, R., 1985. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. *Dev. Pharmacol. Ther.* 8, 384–395.
- Lucki, I., 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry* 44, 151–162.
- Marques, F.Z., Hutz, M.H., Bau, C.H., 2006. Influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcohol-dependent individuals. *Psychiatr. Genet.* 16, 125–131.
- Maestrini, E., Lai, C., Marlow, A., Matthews, N., Wallace, S., Bailey, A., Cook, E.H., Weeks, D.E., Monaco, A.P., 1999. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. Serotonin transporter (5-HTT) and d-aminobutyric acid receptor subunit b3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. *Am. J. Med. Genet., Part B Neuropsychiatr. Genet.* 88, 492–496.
- McCauley, J.L., Olson, L.M., Dowd, M., Amin, T., Steele, A., Blakely, R.D., Folstein, S.E., Haines, J.L., Sutcliffe, J.S., 2004. Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. *Am. J. Med. Genet., Part B Neuropsychiatr. Genet.* 127, 104–112.
- McDougle, C.J., Naylor, S.T., Cohen, D.J., Volkmar, F.R., Heninger, G.R., Price, L.H., 1996. A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 53, 1001–1008.
- Ming, X., Brimacombe, M., Chaaban, J., Zimmerman-Bier, B., Wagner, G.C., 2008. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J. Child Neurol.* 23, 6–13.
- Mulder, E.J., Anderson, G.M., Kema, I.P., Brugman, A.M., Ketelaars, C.E., de Bildt, A., van Lang, N.D., den Boer, J.A., Minderaa, R.B., 2005. Serotonin transporter intron 2 polymorphism associated with rigid-compulsive behaviors in Dutch individuals with pervasive developmental disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 133, 93–96.
- Nakamura, M., Ueno, S., Sano, A., Tanabe, H., 2000. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol. Psychiatry* 5, 32–38.
- Narita, M., Nishigami, N., Narita, N., Yamaguti, K., Okado, N., Watanabe, Y., Kuratsune, H., 2003. Association between serotonin transporter gene polymorphism and chronic fatigue syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 264–266.
- Namerow, L.B., Thomas, P., Bostic, J.Q., Prince, J., Monuteaux, M.C., 2003. Use of citalopram in pervasive developmental disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 24, 104–108.
- Nurmi, E.L., Dowd, M., Tadevosyan-Leyfer, O., Haines, J.L., Folstein, S.E., Sutcliffe, J.S., 2003. Exploratory subsetting of autism families based on savant skills improves evidence of genetic linkage to 15q11–q13. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* 42, 856–863.
- O’Connell, C.D., Atha, D.H., Jakupciak, J.P., Amos, J.A., Richie, K.L., 2002. Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin. Genet.* 61, 13–20.
- Pereira, A.M., Vagner, M.B., Riesgo, R.S., 2008. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J. Pediatr. (Rio J)* 84, 487–494.
- Persico, A.M., Militerni, R., Bravaccio, C., Schneider, C., Melmed, R., Conciatori, M., Damiani, V., Baldi, A., Keller, F., 2000. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. *Am. J. Med. Genet.* 96, 123–127.
- Raghav, S., Reutens, D., 2007. Neurological sequelae of intrauterine warfarin exposure. *J. Clin. Neurosci.* 14, 10–99.
- Ramoz, N., Reichert, J.G., Corwin, T.E., Smith, C.J., Silverman, J.M., Hollander, E., Buxbaum, J.D., 2006. Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. *Biol. Psychiatry* 60, 186–191.
- Retz, W., Thome, J., Blocher, D., Baader, M., Rosler, M., 2002. Association of attention deficit hyperactivity disorder-related psychopathology and personality traits with the serotonin

- transporter promoter region polymorphism. *Neurosci. Lett.* 319, 133–136.
- Risch, N., Spiker, D., Lotspeich, L., Nouri, N., Hinds, D., Hallmayer, J., Kalaydjieva, L., McCague, P., Dimiceli, S., Pitts, T., Nguyen, L., Yang, J., Harper, C., Thorpe, D., Vermeer, S., Young, H., Hebert, J., Lin, A., Ferguson, J., Chiotti, C., Wiese-Slater, S., Rogers, T., Salmon, B., Nicholas, P., Petersen, P.B., Pingree, C., McMahon, W., Wong, D.L., Cavalli-Sforza, L.L., Kraemer, H.C., Myers, R.M., 1999. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 493–507.
- Ritvo, E.R., Freeman, B.J., Pingree, C., Mason-Brothers, A., Jorde, L., Jenson, W.R., McMahon, W.M., Petersen, P.B., Mo, A., Ritvo, A., 1989. The UCLA–University of Utah epidemiologic survey of autism: prevalence. *Am. J. Psychiatry* 146, 194–199.
- Shao, Y., Raiford, K.L., Wolpert, C.M., Cope, H.A., Ravan, S.A., Ashley-Koch, A.A., Abramson, R.K., Wright, H.H., DeLong, R.G., Gilbert, J.R., Cuccaro, M.L., Pericak-Vance, M.A., 2002. Phenotypic homogeneity provides increased support for linkage on chromosome 2 in autistic disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1058–1061.
- Schain, R.J., Freedman, D.X., 1961. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J. Pediatr.* 58, 315–320.
- Schopler, E., Reihler, R.J., Rothen Renner, B.R., 1986. The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism. Irvington Publishers Inc, New York.
- Segal, J., Pujol, C., Birck, A., Gus Manfro, G., Leistner-Segal, S., 2006. Association between suicide attempts in south Brazilian depressed patients with the serotonin transporter polymorphism. *Psychiatry Res.* 143, 289–291.
- Spielman, R.S., Ewens, W.J., 1996. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 983–989.
- Stein, M.B., Seedat, S., Gelernter, J., 2006. Serotonin transporter gene promoter polymorphism predicts SSRI response in generalized social anxiety disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 187, 68–72.
- Sukonick, D.L., Pollock, B.G., Sweet, R.A., Mulsant, B.H., Rosen, J., Klunk, W.E., Kastango, K.B., DeKosky, S.T., Ferrell, R.E., 2001. The 5-HTTPR^S/^L polymorphism and aggressive behavior in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 58, 1425–1428.
- Sutcliffe, J.S., Delahanty, R.J., Prasa, H.C., McCauley, J.L., Han, Q., Jiang, L., Li, C., Folstein, S.E., Blakely, R.D., 2005. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 265–279.
- Sweet, R.A., Pollock, B.G., Sukonick, D.L., Mulsant, B.H., Rosen, J., Klunk, W.E., Kastango, K.B., Dekosky, S.T., Ferrell, R.E., 2001. The 5-HTTPR polymorphism confers liability to a combined phenotype of psychotic and aggressive behavior in Alzheimer disease. *Int. Psychogeriatr.* 13, 401–409.
- Szatmari, P., 1999. Heterogeneity and the genetics of autistic disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 24, 159–165.
- Tordjman, S., Gutknecht, L., Carlier, M., Spitz, E., Antoine, C., Slama, F., Carsalade, V., Cohen, D.J., Ferrari, P., Roubertoux, P.L., Aderson, G.M., 2001. Role of the serotonin transporter in the behavioral expression of autism. *Mol. Psychiatry* 6, 434–439.
- Vargas, F.R., Schuler-Faccini, L., Brunoni, D., Kim, C., Meloni, V.F., Sugayama, S.M., Albano, L., Llerena Jr., J.C., Almeida, J.C., Duarte, A., Cavalcanti, D.P., Goloni-Bertollo, E., Conte, A., Koren, G., Addis, A., 2000. Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *Am. J. Med. Genet.* 95, 302–306.
- Wallace, A.E., Anderson, G.M., Dubrow, R., 2008. Obstetric and parental psychiatric variables as potential predictors of autism severity. *J. Autism Dev. Disord.* 38, 1542–1554.
- Wen, S.W., Yang, Q., Garner, P., Fraser, W., Olatunbosun, O., Nimrod, C., Walker, M., 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 961–966.
- Whitaker-Azmitia, P.M., 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.* 56, 479–485.
- Whitaker-Azmitia, P.M., 2005. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 75–83.
- Yeargin-Allsopp, M., Rice, C., Karapurkar, T., Doernberg, N., Boyle, C., Murphy, C., 2003. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA* 289, 49–55.
- Yonan, A.L., Palmer, A.A., Gilliam, T.C., 2006. Hardy–Weinberg disequilibrium identified genotyping error of the serotonin transporter (SLC6A4) promoter polymorphism. *Psychiatr. Genet.* 16, 31–34.
- Zhong, N., Ye, L., Ju, W., Brown, W.T., Tsiouris, J., Cohen, I., 1999. 5-HTTLPR variants not associated with autistic spectrum disorders. *Neurogenetics* 2, 129–131.