

**Aline Helen Corrêa Garcia**

**PESQUISA DO POLIMORFISMO T102C NO GENE DO RECEPTOR 2A DA  
SEROTONINA NOS PORTADORES DE TRANSTORNOS INVASIVOS DO  
DESENVOLVIMENTO E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO A MAIOR  
SUSCEPTIBILIDADE PARA COMPORTAMENTOS ESTEREOTIPADOS.**

Dissertação apresentada á Universidade  
Presbiteriana Mackenzie, como requisito  
parcial para obtenção do Título de Mestre no  
curso de Pós-Graduação em Distúrbios do  
Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Décio Brunoni

São Paulo  
2008

G216p Garcia, Aline Helen Corrêa

Pesquisa do polimorfismo T102C do receptor 2A da serotonina nos portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento e possível associação a maior susceptibilidade para comportamentos estereotipados. / Aline Helen Corrêa Garcia. - - São Paulo, 2008.

95p. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Distúrbios do Desenvolvimento) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2008.

Orientação : Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Décio Brunoni.

Bibliografia: p.: 80-91

1. Transtorno Invasivo do Desenvolvimento. 2. Autismo.  
3. HTR2A. 4. Serotonina. 5. Polimorfismo. 6. T102C. I. Título.

CDD: 618.928982

**Aline Helen Corrêa Garcia**

**PESQUISA DO POLIMORFISMO T102C NO GENE DO RECEPTOR 2A DA  
SEROTONINA NOS PORTADORES DE TRANSTORNOS INVASIVOS DO  
DESENVOLVIMENTO E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO A MAIOR  
SUSCEPTIBILIDADE PARA COMPORTAMENTOS ESTEREOTIPADOS.**

Dissertação apresentada á Universidade Presbiteriana Mackenzie, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre no curso de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento.

\_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_ de 2008.

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Décio Brunoni - Orientador  
Universidade Presbiteriana Mackenzie

---

Prof. Dr. José Salomão Schwartzman  
Universidade Presbiteriana Mackenzie

---

Prof. Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez  
UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo

Ao meu esposo Adelson Luiz Garcia e a minha mãe, que apesar de todos os percalços continuaram me incentivando a prosseguir e a não desistir diante de tantas adversidades.

“Tenho o desejo de realizar uma tarefa importante na vida. Mas meu primeiro dever está em realizar humildes coisas como se fossem grandes e nobres.” *Helen Keller*

## RESUMO

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento têm como características deficiência em três domínios: comunicação, interação social e comportamentos repetitivos e estereotipados de causas ainda não bem conhecidas. Evidências têm sugerido que o autismo tem um grande componente genético de herança multifatorial complexa com modelo de interação multiloci. Várias técnicas experimentais e modelos para avaliar a atividade, expressão e alelo associação dos TIDs, enquanto doenças com algum componente genético, têm sido usados. As funções da serotonina 5HTT, tornam os genes do sistema serotoninérgico como de interesse para estudo da patologia do autismo. O nosso trabalho extraiu e analisou o DNA do sangue periférico de 50 portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento para o polimorfismo T102C do receptor 2A da serotonina (HTR2A) comparando os resultados com uma população controle de 206 indivíduos, ambos separados por sexo e antecedentes raciais. Os casos foram analisados pelos instrumentos ASQ e ABC quanto a maior susceptibilidade para comportamentos repetitivos e estereotipados. Resultados: Não houve evidência estatística significativa para a distribuição dos genótipos, tanto nos casos (qui-quadrado=2,967; 2GL;  $p=0,2268$ ) como nos controles. Contudo foi observada a grande predominância do genótipo heterozigoto entre os casos (64%) enquanto que nos controles este genótipo foi evidenciado em 50% dos indivíduos. Não houve evidência estatística significativa para a distribuição dos genótipos, tanto nos casos (qui-quadrado=2,967; 2GL;  $p=0,2268$ ) como nos controles. As freqüências genóticas também não mostraram diferença quando os sujeitos caso e controle foram estratificados por sexo e antecedentes raciais branco e não branco. Quanto ao número de estereotipias, tanto no ASQ quanto no ABC, não houve diferença na distribuição do genótipo. A amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weiberg.

Palavras Chaves: Transtornos Invasivos do Desenvolvimento; Autismo, HTR2A, serotonina, polimorfismo, T102C.

Apoio MacKpesquisa, Instituto Presbiteriano Mackenzie.

## ABSTRACT

Pervasive Developmental Disorders are characterized by deficiency in three areas: communication, social interaction, repetitive and stereotypical behavior from causes not yet fully known. Evidences have suggested that autism possesses a significant genetic component from a complex multifaceted heredity with a multiloci model of interaction. Several experimental techniques and models have been utilized in order to assess the activity, expression and the alelo association of the TIDs as illnesses with a genetic component. The role of the 5HTT serotonin renders the genes of the serotonin-energetic system of interest for the study of the pathology of autism. Our work obtained and analyzed the DNA from periferic blood samples of 50 subjects diagnosed with PDD for the polymorphism T102C of the 2<sup>a</sup> receptor of serotonin (HTR2A) comparing the results to a control population of 206 individuals, separated by both sex and racial background. The cases were analyzed through the ASQ and ABC instruments according to a greater susceptibility to repetitive and stereotyped behaviors.

**RESULTS:** There was no significant statistical evidence for the distribution of the genotypes either in the cases (  $\chi^2=2,967/ 2GL/p=0,2268$ ) or in the control. However, it was observed a large prevalence of the heterozygote genotype among the cases (64%) while in the control this genotype was present in 50% of the individuals. Also the genotypical occurrences did not demonstrate any difference when the subjects, cases and control, were divided by sex and racial background as white and non-white. Regarding the number of stereotypes, in the ASQ as well as in the ABC, there was no difference in the genotype distribution. The sample was in accordance to the Hardy-Weiberg equilibrium.

Key words: Pervasive Developmental Disorders; Autism, HTR2A, Serotonin, Polymorphism, T102C.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Transtorno Autista no DSM IV.....	24
Tabela 2	Transtorno de Asperger no DSM IV.....	26
Tabela 3	Transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem Outra especificação no DSM IV.....	27
Tabela 4	Transtornos Globais do Desenvolvimento na CID 10.....	28
Tabela 5	Genes implicados na Patogenia do Autismo.....	38
Tabela 6	Resultados replicados das amostras de DNA disponíveis de Trevizan (2006).....	60
Tabela 7	Significado da Pontuação nos instrumentos ASQ e ABC....	68
Tabela 8	Identificação dos indivíduos com TID, diagnóstico, idade, sexo e respectivas pontuações nos Instrumentos ASQ e ABC.....	69
Tabela 9	Distribuição de pacientes e controles por gênero sexual.....	70
Tabela 10	Distribuição de pacientes e controles por antecedentes raciais.....	70
Tabela 11	Distribuição Genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A de pacientes e controles.....	72
Tabela 12	Resultados obtidos do polimorfismo T102C em diversas populações e respectivos controles.....	74
Tabela 13	Distribuição genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A nos sexos femininos e masculinos de pacientes e controles.....	75
Tabela 14	Distribuição genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A nos sexos masculinos de pacientes e	



	controles.....	75
Tabela 15	Distribuição genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A segundo antecedentes raciais de pacientes e controles.....	76
Tabela 16	ASQ - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C do gene HTR2A dos pacientes associada aos comportamentos estereotipados e também distribuição do genotípica das estereotipias esperadas e observadas.....	77
Tabela 17	ABC - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C do gene HTR2A dos pacientes associada aos comportamentos estereotipados e também distribuição do genotípica das estereotipias esperadas e observadas.....	78

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1	Abordagem para análise de doenças com genética complexa (GOTTESMAN & GOULD, 2003).....	32
Ilustração 2	Esquema de influências e fatores avaliativos nos estudos de susceptibilidade para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento.....	33
Ilustração 3	Principais tipos de estudos usados na detecção de genes candidatos (MUHLE et al., 2004) .....	35
Ilustração 4	Conversão do aminoácido triptofano em Serotonina.....	40
Ilustração 5	Representação esquemática dos processos envolvidos na neurotransmissão serotoninérgica( <i>VEENSTRA-VANDERWEELE et al, 2000</i> ).....	42
Ilustração 6	Posição do gene do transportador SLC6A4.....	47
Ilustração 7	Posição dos genes do receptor.....	49
Ilustração 8	Gel de agarose da replicação dos resultados de (Trevizan,2006).....	59
Ilustração 9	Genótipo do polimorfismo T102C do gene do receptor HTR2A após digestão visualizado em U.V. (Schwanke et al,2007).....	64

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>17</b>
a.	TIDS – ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO	17
	<b>i. Aspectos Clínicos</b>	<b>18</b>
	1. Aspectos neurobiológicos dos TIDs	20
	2. O Autismo	21
	3. Outros Quadros Autísticos	22
	<b>ii. Diagnóstico</b>	<b>23</b>
	1. Critérios de diagnóstico dos TIDs no DSM – IV	24
	2. Critérios de diagnósticos de TIDs na CID -10	28
b...	EPIDEMIOLOGIA E GENÉTICA GERAL DOS TIDs	28
	<b>i. Epidemiologia</b>	<b>28</b>
	1. Estudos com Gêmeos, e Síndromes Associadas	30
	2. Outros Estudos e suas implicações	30
	<b>ii. Genética Geral</b>	<b>34</b>
	1. Genes Candidatos	34
c.	A SEROTONINA E OS TIDs	39
	<b>i. O sistema serotoninérgico</b>	<b>40</b>
	1. Serotonina – Formação e atividade central e periférica	40
	2. Serotonina e desenvolvimento embriológico	43
	3. Genes que codificam as proteínas do sistema serotoninérgico e os TIDs	44

	12
a. O gene que codifica o Transportador da serotonina	45
b. Os genes que codificam os receptores da serotonina	47
<b>5 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>52</b>
a. SUJEITOS DA PESQUISA	52
i. Instrumentos	53
5 1 1 1 Adaptações do Instrumento ABC	55
ii. Tamanho da amostra	56
iii. Delineamento	57
iv. Distribuição da Mutação	58
b. PROCEDIMENTOS	59
i. Extração de DNA	60
ii. Soluções para extração de DNA	62
iii. PCR	62
iv. Digestão do produto do PCR	64
v. Eletroforese	65
vi. Preparação dos géis para eletroforese	65
vii. Tampão de corrida para eletroforese	67
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
a. AMOSTRA DOS INDIVÍDUOS	67
i. Distribuição dos genótipos	71
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>79</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>
<b>9 ANEXOS</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais (DSM IV, 1995) e a décima edição da Classificação Internacional de Doenças (CID 10, 1993), criaram uma categoria de doenças que foram chamadas de Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID) pelo primeiro, e de Transtornos Globais do Desenvolvimento pelo segundo. Os TIDs são caracterizados por deficiência nas mais diversas áreas do desenvolvimento: social, da comunicação e de comportamentos estereotipados e restritivos. Esses transtornos incluem o Autismo, síndrome de Asperger, transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem outra especificação, Síndrome de Rett e Transtorno Desintegrativo da Infância, dos quais nos interessam os três primeiros (KLIN, 2006).

O Autismo é um distúrbio do desenvolvimento associado a três grandes domínios: comportamento excessivamente ritualístico e repetitivo, déficits na comunicação verbal e não-verbal e uma interação social anormal, que tem se transformado em uma aflição para os familiares dos afetados devido à extrema dependência destes até mesmo na vida adulta (WASSINK et al. 2002; VORTSMAN et al., 2006). Segundo o National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), o autismo é uma doença neurológica complexa, chamada de distúrbio do desenvolvimento porque ocasiona retardo ou problemas em muitas habilidades que aparecem da infância para a vida adulta. Pessoas com autismo podem ter características muito distintas, sendo consideradas dentro de um espectro, em que um grupo de desordens com características semelhantes atuam, e que pode variar de indivíduos extremamente comprometidos até um acometimento considerado dentro dos padrões da normalidade (KLIM, 2006; NICHD, 2005). Devido a isto, temos um quadro clínico variável, em que são descritos desde autistas clássicos

com ausência de comunicação e retardo mental grave até autistas com sociabilidade comprometida, mas com desenvolvimento verbal normal e inteligência também dentro dos padrões da normalidade. (KELLER et al., 2003). Segundo Smalley et al. (1995), cerca de 75% dos casos apresenta retardamento mental, 15 a 30% apresentam convulsões e de 20 a 50% mostram anormalidades nos eletroencefalogramas. Várias alterações neurobiológicas foram encontradas. Dentre elas podemos citar: convulsões, deficiência mental, níveis elevados de serotonina circulante, diminuição dos neurônios e sinapses no hipocampo, amígdala e cerebelo (ANDERSON & HOSHIONO, 1997; COURCHESNE et al., 1998; KEMPER; BAUMAN, 1998; PIVEN et al. 1996; SCHULTZ et al, 2000; VOLKMAR & PAULS, 2003). O autismo envolve difundida má formação neuronal, com algumas estruturas mais afetadas (lobo frontal e cerebelo) do que outras (COURCHESNE & PIERCE, 2005). Recentes estudos têm implicado a má-formação do lobo frontal, ocorrida na fase embrionária ou ainda muito cedo na vida pós-natal, como possível responsável por algumas características dos TIDs, dentre elas: limitações na interação social, nos processos emocionais, comunicação e função cognitiva. No cerebelo as má-formações são complexas, sendo algumas delas perdas de células nervosas, diminuição das células de purkinge no lobo cerebelar e no vermis. (COURCHESNE & PIERCE, 2005; REDCAY & COURCHESNE, 2005; COURCHESNE et al, 2004).

Sendo um distúrbio complexo, provavelmente o autismo seja o resultado de muitas causas. Muitas evidências sustentam a idéia de fatores genéticos - genes suas funções e interações - como causas do autismo. Esses genes são aqueles que codificam proteínas cujas funções são conhecidas no organismo, e que, devido a essas funções, podem estar ligados aos sintomas do autismo, sendo mais provável a existência da interação de um grupo de genes entre si e destes com fatores

ambientais, do que uma única causa para essa doença. Um total de 12 ou mais genes em cromossomos diferentes podem estar envolvidos no autismo em diferentes graus, de tal forma que alguns deles podem colocar uma pessoa mais em risco para o autismo (susceptibilidade), apesar de haver demonstração que fatores ambientais como viroses podem atuar na patogenia da doença (NICHD, 2005).

## **2 JUSTIFICATIVA**

O presente estudo está vinculado à necessidade de desvendar as causas do autismo, uma vez que a etiologia deste distúrbio do desenvolvimento é ainda desconhecida. A pesquisa genética tem sido hoje um dos meios mais palpáveis para tal façanha, principalmente frente às evidências encontradas em estudos com gêmeos e alterações cromossômicas que vieram sustentar as causas genéticas deste distúrbio.

Como uma síndrome poligênica multifatorial, a pesquisa genética em portadores de TIDs deve levar em consideração os endofenótipos dentro de um espectro. Endofenótipos são componentes mensuráveis de uma síndrome, em que cada gene variante pode trazer uma diferente contribuição para a desordem. Sendo assim, pesquisadores têm considerado como endofenótipos dentro dos quadros autísticos: falhas na linguagem, níveis de funcionamento intelectual, grau do defeito na comunicação social, presença de ataque epilético, habilidades não usuais, comportamentos restritivos e repetitivos e, particularmente, a serotonina circulante e a circunferência craniana (VEENSTRA-VANDERWEELE, et al.,2004).

O desenvolvimento cerebral anormal, em autistas, pode ser devido a má-formação neural durante o período pré-natal ou ainda na tenra infância, havendo um acelerado crescimento cerebral nos dois primeiros anos de vida, contudo com interrupção no

crescimento de algumas estruturas. O motivo desse crescimento acelerado nos primeiros anos de vida, seguido de um crescimento muito lento entre 5 e 12 anos de idade, ainda não é conhecido, sendo que existe a hipótese de que defeitos na migração neuronal, excesso na gênese dos neurônios ou falhas no mecanismo de apoptose podem ser algumas das causas deste desenvolvimento anormal. Contudo só 20% das crianças com autismo preenchem os critérios para macrocefalia. Esse crescimento maior no primeiro ano de vida corresponde ao crescimento aumentado do córtex cerebral; sendo assim, várias questões são colocadas, pensando-se na existência de um endofenótipo, envolvendo o tamanho da circunferência craniana e também o sistema serotoninérgico (VEENSTRA-VANDERWEELE, et al., 2004. COURCHESNE; REDCAY & KENNEDY, 2004. COURCHESNE & PIERCE, 2005).

Um dos mais antigos e consistentes marcadores bioquímicos para o autismo são anormalidades associadas ao sistema serotoninérgico. Alterações na quantidade de serotonina circulante ou mesmo o que estas alterações poderiam ocasionar ainda no período embrionário ou na sua atividade como neurotransmissor, bem como decorrente do alto polimorfismo dos genes que codificam as proteínas envolvidas na captação, recaptação e transporte da serotonina têm transformado os genes que codificam os receptores e o transportador desta substância como fortes candidatos de estudos.

Sendo assim, este trabalho pretende averiguar a frequência do polimorfismo do receptor HTR2A em pacientes portadores de TIDS, comparando-os com a frequência na população em geral, determinada por Trevizan (2006), e continuar com uma das linhas de pesquisa desta Universidade, além de verificar a frequência do alelo mutado com um aumento de comportamentos estereotipados e



macrocefalia em portadores de TIDs (JANUSONIS,2005. SCOTT &DENERIS,2005. VEENSTRAWANDERWEELE et al, 2002).

### **3 OBJETIVOS**

Verificar a frequência da mutação T102C no gene que codifica o receptor 2A (HTR2A) da Serotonina (5-hidroxitriptamina) em pacientes com TID e comparar a sua frequência com os dados obtidos na população (TREVIZAN, 2006).

Fazer ainda uma possível associação deste polimorfismo a comportamentos estereotipados nos portadores de TID, analisando um possível subgrupo dentro deste espectro, uma vez que novos estudos têm demonstrado que em doenças complexas como o autismo a ligação entre um dos fenótipos deste distúrbio com a maior incidência de certo polimorfismo pode se mostrar mais efetivo (SYKES &LAMB, 2007).

## **4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **4.1 TIDs – Aspectos clínicos e diagnósticos**

Apesar de o autismo ter sido descrito pela primeira vez por Leo Kanner, em 1942, como “distúrbio autístico do contacto afetivo”, e ter sido enquadrado por Ritvo (1976) como um distúrbio do desenvolvimento, permanece, ainda hoje, com um

diagnóstico quase que absolutamente clínico, tendo sido definido dentro de amplas manifestações comportamentais que incluem: déficits qualitativos na interação social e na comunicação verbal e não verbal, bem como padrões de comportamento repetitivos e estereotipados e um repertório restrito de interesses e atividades. Devido a esses fatores tornou-se mais apropriado o uso do termo “Transtornos Invasivos do Desenvolvimento” (TID), para definir os transtornos do espectro autista. Nos dias atuais os pesquisadores têm tentado enxergar além dos comportamentos observáveis e buscado endofenótipos, que são fenótipos internos biológicos e bioquímicos, sendo estes muito importantes para o enquadramento de indivíduos em subgrupos, numa doença tão complexa como o autismo, levando também ainda à busca por genes candidatos (KANNER, 1942; RITVO, 1976; GADIA et al. 2004; MERCADANTE & GAAG & SCHWARTZMAN, 2006).

Segundo Gottesman & Gould (2003), os endofenótipos são um meio para identificar traços ou facetas de um fenótipo clínico, podendo ajudar na identificação de genes aberrantes e na hipotetização de sistemas poligênicos que conferem vulnerabilidade para a doença.

#### *4.1.1 Aspectos Clínicos*

Gadia (2004), nos informa que os quadros sintomatológicos dos TIDs são muito amplos e variados. Em relação às dificuldades na interação social, os TID podem manifestar-se como isolamento ou comportamento social inapropriado, pouco contato visual, indiferença afetiva ou demonstrações inapropriadas de afeto, falta de empatia social ou emocional e limitações para participar em atividades em

grupo. Quando caminham em direção à idade adulta, existe, em geral, uma melhora do isolamento social, mas as limitações na habilidade social e a dificuldade em estabelecer amizades persistem.

Na comunicação, os déficits têm graus variados, tanto na habilidade verbal quanto na não-verbal de compartilhar informações com outros. Há crianças que não desenvolvem habilidades de comunicação. Outras têm uma linguagem imatura, caracterizada por ecolalia, reversões de pronome, prosódia anormal, entonação monótona, etc. Os que expressam adequadamente podem não possuir a habilidade em iniciar ou manter uma conversa apropriada. Os déficits de linguagem e de comunicação persistem na vida adulta, e uma proporção significativa de autistas permanece não-verbais. Aqueles que adquirem habilidades verbais podem demonstrar déficits persistentes em estabelecer conversa, tais como falta de reciprocidade, dificuldades em compreender sutilezas de linguagem, bem como problemas para interpretar linguagem corporal e expressões faciais. Dentre os padrões repetitivos e estereotipados do comportamento autístico estão: resistência a mudanças, apego excessivo a objetos e fascínio com o movimento de peças (tais como rodas ou hélices), mania com algumas rotinas. Estereotípias motoras e verbais, tais como se balançar, bater palmas repetitivamente, andar em círculos ou repetir determinadas palavras, frases ou canções são também manifestações comuns em autistas. No autista adulto, há uma melhora na adaptação a mudanças, mas não nos interesses restritos, e aqueles com habilidades cognitivas adequadas tendem a concentrar seus interesses em tópicos limitados, tais como horários de trens/aviões, mapas ou fatos históricos, etc., os quais dominam suas vidas (GADIA et al, 2004).

#### 4.1.1.1 Aspectos neurobiológicos dos TIDs

Estudos descrevem alterações neuropatológicas consistentes no sistema límbico e nos circuitos cerebelares. As células do sistema límbico (amígdala, corpos mamilares, hipocampo, giro anterior do cíngulo e núcleos do septo) são menores no tamanho e aumentadas em número por unidade de volume em comparação a controles. Nos cerebelos, foi encontrado um número diminuído de células de Purkinje, mas não perda neuronal no núcleo olivar inferior, como esperado. Isso sugere que as alterações ocorridas nos cérebros de indivíduos autistas aconteceram ao redor das 30 semanas de gestação, antes do estabelecimento da conexão entre a oliva e as células de Purkinje. Observações recentes sugerem que a organização minicolunar cerebral é anormal em autistas. Neles, um número maior de minicolunas, menores e menos compactas do que o esperado tem sido descrito (BAUMAN, 1991; COURCHESNE, 1991; CASANOVA et al, 2002; . COURCHESNE & REDCAY & KENNEDY, 2004. COURCHESNE & PIERCE, 2005).

Estudos de neuroimagem em autistas chegaram a resultados diversos, como seria de se esperar, considerando a heterogeneidade clínica dos TIDs e os achados de alterações cerebelares não foram adequadamente reproduzidos, podendo estar relacionados a fatores metodológicos. Contudo estudos de imagem cerebral e estudos de ressonância magnética funcional encontraram anormalidades na anatomia e no funcionamento em repouso do lobo temporal em autistas, sendo a área afetada o sulco temporal superior, bilateralmente.. As áreas do sulco temporal superior, giro fusiforme e amígdala, foram áreas que se encontraram hipoativadas no cérebro autista durante a execução de tarefas de cognição social. (GADIA et al, 2004; ZILBIVICIUS & MERESSE & BODDAERT, 2006).

Gadia (2004) continua em sua revisão relatando que o tamanho da cabeça de autistas é bem semelhante ao de outras crianças no nascimento, contudo entre os 2 e 4 anos de idade, 37% dos autistas tem macrocefalia e cerca de 90% dos autistas tem um volume cerebral em média maior do que os das crianças da mesma idade. Estudos de neuroimagem sugerem um padrão anormal de desenvolvimento cerebral em autistas, com um crescimento acelerado durante os primeiros anos de vida, seguido por uma desaceleração em algumas regiões do cérebro, enquanto em outras áreas há uma parada do crescimento, fazendo com que na fase adulta o tamanho da cabeça seja semelhante ao da população normal.

#### 4.1.1.2 O Autismo

O autismo, também conhecido como transtorno autístico, autismo da infância, autismo infantil e autismo infantil precoce, é o TID mais conhecido. Nessa condição, existe um marcado e permanente prejuízo na interação social, alterações da comunicação e padrões limitados ou estereotipados de comportamentos e interesses. As anormalidades no funcionamento em cada uma dessas áreas devem estar presentes em torno dos três anos de idade e, sendo que aproximadamente entre 60 a 70% dos indivíduos com autismo, funcionam na faixa do retardo mental, ainda que esse percentual esteja menor em estudos mais recentes. (KLIN, 2006).

#### 4.1.1.3 *Outros Quadros Autísticos*

Outros TIDs dentro do diagnóstico diferencial dos quadros autísticos incluem a síndrome de Asperger, a síndrome de Rett, transtornos desintegrativos e os quadros não especificados. Esse diagnóstico diferencial é uma das grandes dificuldades do clínico. Os quadros de síndrome de Asperger são : de prejuízos qualitativos na interação social e repertório de interesses restritos, assim como no autismo, só que não deve haver retardo na aquisição da linguagem e nas habilidades cognitivas, apresentando ainda maior ocorrência no sexo masculino, inteligência próxima da normalidade, déficit na sociabilidade, interesses específicos e circunscritos com história familiar de problemas similares e baixa associação com quadros convulsivos. Por outro lado, os quadros de síndrome de Rett foram diagnosticados mais no sexo feminino, contudo casos entre homens foram relatados. O diagnóstico é realizado entre 5 e 30 meses e apresentando marcado déficit no desenvolvimento, com desaceleração do crescimento craniano, retardo intelectual marcado e forte associação com quadros convulsivos. Os transtornos desintegrativos são observados antes dos 24 meses, com predomínio no sexo masculino, padrões de sociabilidade e comunicação pobres, freqüência de síndrome convulsiva associada e prognóstico pobre. Os transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação (TID-SOE) não se encaixam em nenhum outro TID, sendo uma categoria diagnóstica de exclusão (ASSUMPÇÃO & PIMENTEL, 2000; MERCADANTE & GAAG & SCHWARTZMAN, 2006).

#### 4.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico do autismo, devido a seu amplo espectro, precisa ser realizado seguindo os critérios de diagnósticos presentes no CID-10 e no DSM-IV, para obtenção de uma uniformidade diagnóstica.

Há ainda a necessidade de conhecer o curso de desenvolvimento da sintomatologia comportamental atual, e isso é realizado por descrições dessa evolução pelos pais ou cuidadores, observações diretas, entrevistas estruturadas bem como questionários de instrumentos diagnósticos (WALLER et al., 1999). Estes instrumentos podem ser questionários ou instrumentos de observação direta. Os questionários usados pelo grupo de pesquisadores da Universidade Presbiteriana Mackenzie, para triagem e diagnóstico dos transtornos invasivos do desenvolvimento, são o ASQ (Autism Screening Questionnaire), elaborado por Michael Rutter e Catherine Lord e que foi validado no Brasil, e o ABC (Autism Behavior Checklist) ou ICA (inventário de comportamentos Autísticos). O ASQ consiste em 40 questões que são feitas aos pais ou cuidadores de crianças com suspeita de diagnóstico de autismo, e o ABC consiste em 57 questões, feitas aos pais ou responsáveis pela criança avaliada, uma vez que, quanto mais precoce o diagnóstico e a intervenção, melhores são os resultados obtidos para amenizar alguns dos sintomas do quadro autístico e na educação da criança com TID (MARTELETO & PEDROMÔNICO, 2005; SATO et al, 2008).

Dentre os instrumentos diagnósticos de observação estão o The Autism Diagnostic Observation Schedule—Generic (ADOS-G), que consiste em uma avaliação semi-estruturada e padronizada da interação social, comunicação, reprodução e uso de jogos imaginativos para os indivíduos suspeitos de terem TDI.

O esquema observacional consiste em quatro módulos de 30 minutos, cada um destinado a ser administrado a indivíduos distintos, de acordo com seu nível de linguagem expressiva (LORD et al, 2004).

#### 4.1.2.1 Critérios de diagnóstico dos TIDs no DSM – IV

Tabela 1

<b>299.00 Transtorno Autista</b>	
<b>A</b> - Um total de seis (ou mais) itens de (1), (2) e (3). Com pelo menos dois de (1), um de (2) e um de (3):	
<b>(1)</b> Prejuízo qualitativo na interação social, manifestado por pelo menos dois dos seguintes aspectos:	<b>(a)</b> 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
	<b>(b)</b> fracasso em desenvolver relacionamentos com seus pares apropriados ao nível de desenvolvimento
	<b>(c)</b> falta de tentativa espontânea de compartilhar prazer, interesses ou realizações com outras pessoas (por ex., não mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse)
	<b>(d)</b> falta de reciprocidade social ou emocional
<b>(2)</b> Prejuízos qualitativos na comunicação,	<b>(a)</b> 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)
	<b>(b)</b> em indivíduos com fala adequada, acentuado prejuízo na capacidade de iniciar ou manter uma conversação



manifestados por pelo menos um dos seguintes aspectos:	(c) uso estereotipado e repetitivo da linguagem ou linguagem idiossincrática
	(d) falta de jogos ou brincadeiras de imitação social variados e espontâneos apropriados ao nível de desenvolvimento
<b>(3)</b> Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes aspectos:	(a) preocupação insistente com um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse, anormais em intensidade ou foco
	(b) adesão aparentemente inflexível a rotinas ou rituais específicos e não-funcionais
	(c) maneirismos motores estereotipados e repetitivos (por ex., agitar ou torcer mãos ou dedos, ou movimentos complexos de todo o corpo)
	(d) preocupação persistente com partes de objetos
<b>B</b> - Atrasos ou funcionamento anormal em pelo menos uma das seguintes áreas, com início antes dos 3 anos de idade:	
<b>(1)</b> interação social	
<b>(2)</b> linguagem para fins de comunicação social.	
<b>(3)</b> jogos imaginativos ou simbólicos.	
<b>C</b> – A perturbação não é melhor explicada por Transtorno de Rett ou Transtorno Desintegrativo da Infância .	

Tabela 2

<b>299.80 Transtorno de Asperger</b>	
<b>(A)</b> - Prejuízo qualitativo na interação social, manifestado por pelo menos dois dos seguintes quesitos:	<b>(1)</b> 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.
	<b>(2)</b> fracasso para desenvolver relacionamentos apropriados ao nível de desenvolvimento com seus pares.
	<b>(3)</b> 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).
	<b>(4)</b> falta de reciprocidade social ou emocional.
<b>(B)</b> - Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes quesitos:	<b>(1)</b> insistente preocupação com um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesses, anormal em intensidade ou foco.
	<b>(2)</b> adesão aparentemente inflexível a rotinas e rituais específicos e não funcionais.
	<b>(3)</b> maneirismos motores estereotipados e repetitivos (por ex., dar pancadinhas ou torcer as mãos ou os dedos, ou movimentos complexos de todo o corpo).
	<b>(4)</b> insistente preocupação com partes de objetos.
<b>(C)</b> - A perturbação causa prejuízo clinicamente significativo nas áreas social e ocupacional ou outras áreas importantes de funcionamento.	
<b>(D)</b> - 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).	

**(E)** - 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.

**(F)** - Não são satisfeitos os critérios para um outro Transtorno Invasivo do Desenvolvimento ou Esquizofrenia.

Tabela 3

**299.80 Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação  
(incluindo Autismo Atípico)**

Esta categoria deve ser usada quando existe um 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 Invasivo do Desenvolvimento específico, Esquizofrenia, Transtorno da Personalidade Esquizotípica ou Transtorno da Personalidade Esquiva. Esta categoria inclui, por ex., "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.

#### 4.1.2.2 Critérios de diagnósticos de TIDs na CID -10

Na Classificação internacional de doenças (CID-10), os transtornos invasivos do desenvolvimento são designados pelo nome de Transtornos Globais do Desenvolvimento (TGD), e estão classificados dentro dos transtornos do Desenvolvimento Psicológico ( F80-89). Os TGDs (F84), são assim estruturados:

Tabela 4

<b>CID – 10 (F84) Transtornos Globais do Desenvolvimento</b>	
F84.0	Autismo Infantil
F84.1	Autismo Atípico
F84.2	Síndrome de Rett
F84.3	Outro Transtorno desintegrativo da Infância
F84.4	Transtorno com Hipercinesia associada a retardo mental e a movimentos estereotipados
F84.5	Síndrome de Asperger
F84.8	Outros Transtornos globais do desenvolvimento
F84.9	Transtornos Globais não especificados do desenvolvimento.

## 4.2 Epidemiologia e Genética Geral dos TIDs

### 4.2.1. *Epidemiologia*

Estudos epidemiológicos são essenciais para identificar a interação gene - ambiente e como essa relação pode influenciar no comportamento autístico. Alguns fatores não genéticos têm sido descritos, em pequeno número de casos, como causa para o autismo, dentre eles: complicações obstétricas, exposição a fatores teratogênicos durante a gravidez, e infecções virais, como, por exemplo,

citomegalovírus durante a gestação que, parecem aumentar o risco para TID (SYKES & LAMB, 2007).

Contudo, evidências têm sugerido que o autismo tem um grande componente genético de herança multifatorial complexa com modelo de interação multiloci. Sua prevalência está em torno de 5–10 por 1000, dependendo do critério diagnóstico utilizado e onde a incidência por gênero sexual é de quatro meninos para uma menina (CARVALHEIRA et al, 2004; COOK et al. 1997). Contudo, se forem considerados somente os casos sem retardo mental, esta razão sobe para 7,5 meninos para cada menina. Estudos têm demonstrado que o risco de recorrência, no caso de já haver um irmão afetado, fica em torno de 2,2%, sendo um baixo índice, porém cerca de 50-100 vezes maior do que na população geral, e, se incluirmos as formas mais brandas de manifestação, esse índice sobe para 5%, e, segundo o The Autism Genome Project Consortium (2007), essa recorrência pode chegar a 10%. Esse baixo índice de recorrência associada a uma alta herdabilidade (em torno de 90%) é consistente com um modelo de herança no qual um número de diferentes genes interagem e em que há diversos loci envolvidos (CARVALHEIRA et al., 2004; CASTERMANS et al, 2004; GUPTA; STATE, 2006).

Entretanto, estimativas ainda mais recentes têm demonstrado que o risco de recorrência no caso de um irmão afetado pode chegar a ser maior que 15% para os casos de autismo infantil, o que é muito maior se comparado aos índices populacionais de aproximadamente 0,2% (1 em cada 500 crianças) para a ocorrência de autismo infantil ou de 0,7% considerando outros quadros dos transtornos invasivos do desenvolvimento (1 para cada 150 crianças) e, assim, definindo os transtornos invasivos do desenvolvimento como uma síndrome com alto grau de herdabilidade nas famílias (SUTCLIFFE, 2008).

#### 4.2.1.1 *Estudos com Gêmeos, e Síndromes Associadas*

Outros estudos têm contribuído para a confirmação dos componentes genéticos nos TIDs em geral, entre os quais os diversos estudos com gêmeos que são capazes de permitir a averiguação de componentes hereditários nas doenças complexas como o autismo. Veenstra-Vanderweele et al. (2004) e The Autism Genome Project Consortium (2007) encontraram uma concordância na presença do autismo entre 60 a 92% nos Gêmeos monozigóticos e de 0 a 10% em gêmeos dizigóticos, dependendo se um estreito ou largo fenótipo foi utilizado. Além do que muitas síndromes podem apresentar o autismo como comorbidade, reforçando assim o componente genético dessa doença. Entre elas podemos citar: fenilcetonúria, Prader Willi, Angelman, esclerose tuberosa, síndrome de Turner e síndrome do X-frágil, dando subsídios também a esse componente (CARVALHEIRA et al., 2004; THE AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2007).

#### 4.2.1.2 *Outros Estudos e suas implicações*

Determinar mudanças genéticas específicas que aumentam o risco de desenvolvimento de doenças como o autismo é muito complexo, porque diferentes tipos de variações e muitos genes estão envolvidos, podendo apresentar diferenças em relação ao grau de penetrância das mutações ou discretas mudanças na seqüência do DNA, mas poucas delas replicadas.

Outros estudos tem ainda sugerido fatores genéticos para o autismo, entre eles, translocações, inversões, deleções ou duplicações nos cromossomos, os quais aparecem em indivíduos que apresentam características de traços dismórficos e

deficiência mental severa (SUTCLIFFE, 2008; O'ROAK & STATE, 2008). Recentes estudos têm ainda sugerido que, em torno de 7% dos casos de autismo podem ser devido a anormalidades microscópicas citogenéticas. Um dos mecanismos sugeridos é a análise pela técnica de microarranjo, que tem demonstrado que pequenas perdas ou ganhos na variação do número de cópias do DNA podem estar relacionados ao autismo, pequenas variações, essas que podem ser herdadas ou surgir como novas mutações (SEBAT et al 2007; WEISS et al 2008; SUTCLIFFE,2008). Um estudo de Morrow (2008), usando tecnologia de microarranjo do DNA ( *DNA microarrays*) em famílias consangüíneas do Leste dos USA , analisou todo a herança do DNA destas famílias e identificou regiões que são herdadas em comum por indivíduos afetados com TID, que compartilham duas copias desta região, e onde os segmentos em homozigose nestes indivíduos estão em heterozigose em seus progenitores, podendo representar um fator de risco no autismo. Em várias destas famílias, as regiões ligadas aos TIDs contêm deleções, as quais poderiam alterar a função/expressão dos genes nesta região ou nas regiões vizinhas e nos quais os indivíduos alvo tinham deficiência na expressão destes genes, sendo isso a causa do autismo nestas famílias. Outra observação plausível neste estudo, foi que a maioria dos genes identificados em homozigose nos afetados eram responsáveis pela estimulação da atividade neuronal (MORROW et al, 2008; SUTCLIFFE,2008).

Outros estudos têm sugerido o uso de endofenótipos, como citado anteriormente, para análise de doenças de genética complexa como o autismo; o número de genes envolvidos no fenótipo destas doenças está teorizado para ser diretamente proporcional à complexidade do fenótipo e à dificuldade de análise genética das mesmas. (GOTTESMAN & GOULD, 2003).

Observe o esquema do mesmo autor:

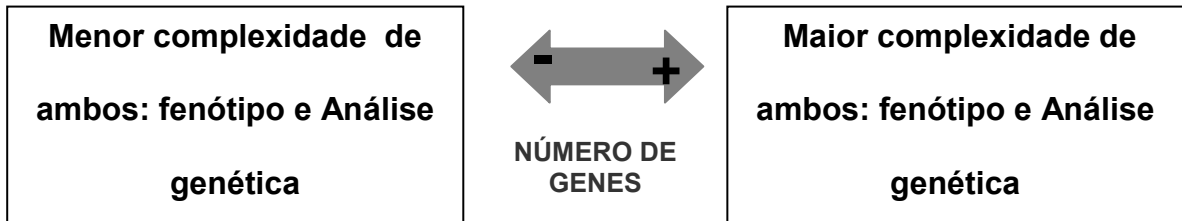


Figura 1 - Abordagem para análise de doenças com genética complexa (GOTTESMAN & GOULD, 2003).

Outros fatores como estudos envolvendo epigenética (estudo das mudanças da expressão gênica, que não são devidas a mudanças na seqüência do DNA e sim a fatores como metilação, modificação nas histonas, etc) e imprinting genômico, que ocorre provavelmente por inativação de genes durante a gametogênese por metilação seletiva dependendo da origem materna ou paterna do material hereditário, estão sendo relacionados ao autismo.

Um desses estudos relatou a associação entre uma duplicação intersticial na região 15q11-q13 de origem materna e o autismo. ( COOK et al, 1997; SYKES & LAMB,2007).

Observe o quadro de Sykes & Lamb (2007), que nos dá uma noção dos diversos mecanismos de estudos para tentar solucionar as causas do autismo:



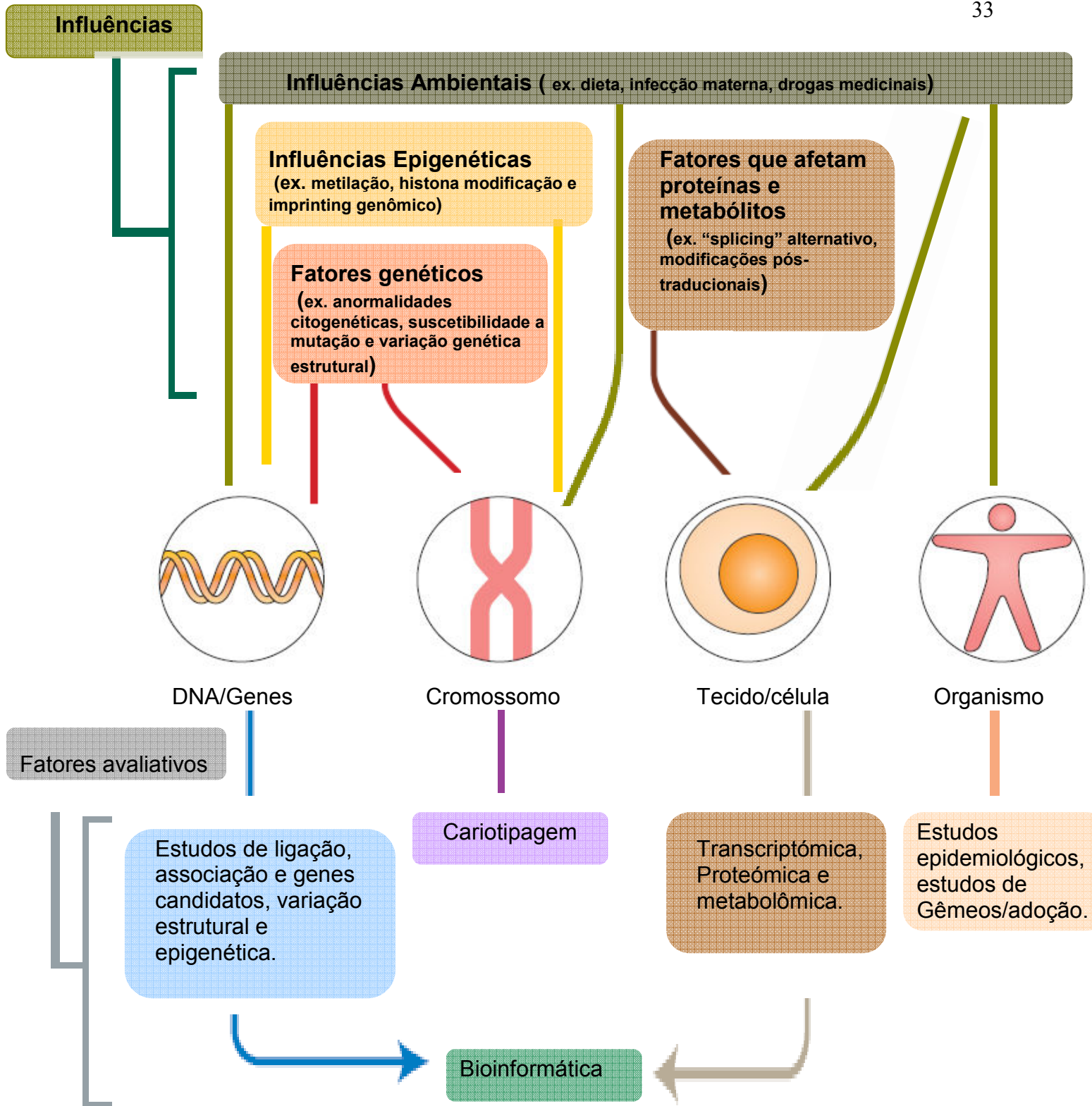


Figura 2 – **Esquema de influências e fatores avaliativos nos estudos de susceptibilidade para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento.**

Há uma complexa ação recíproca entre as influências genética, epigenética, celular e ambientais no desenvolvimento do autismo (Parte superior da figura). Uma série de técnicas, marcando diferentes níveis de funcionamento biológico, estão sendo usadas para dissecar as causas do autismo (Parte inferior da figura).

(SYKES & LAMB,2007), Traduzida por Aline Helen Corrêa Garcia.

Assim, a avaliação de fenótipos associados a doenças, bem como estudos de susceptibilidade, têm sido mais proveitosos que a análise dos fenótipos em si e, além disso, o número de genes requeridos para produzir variações nestes traços, pode ser menor que aqueles requeridos na produção do diagnóstico da própria doença.(GOTTESMAN & GOULD, 2003).

#### *4.2.2. Genética geral*

As causas do autismo são ainda desconhecidas, mas, como citado acima existem substanciais evidências para sustentar o envolvimento de fatores genéticos no quadros autístico.

##### *4.2.2.1. Genes Candidatos*

Várias técnicas experimentais e modelos para avaliar a atividade, expressão e alelo associação das TIDs, enquanto doenças com algum componente genético, têm sido usados para detectar possíveis genes candidatos e sua relevância na fisiopatologia do autismo.

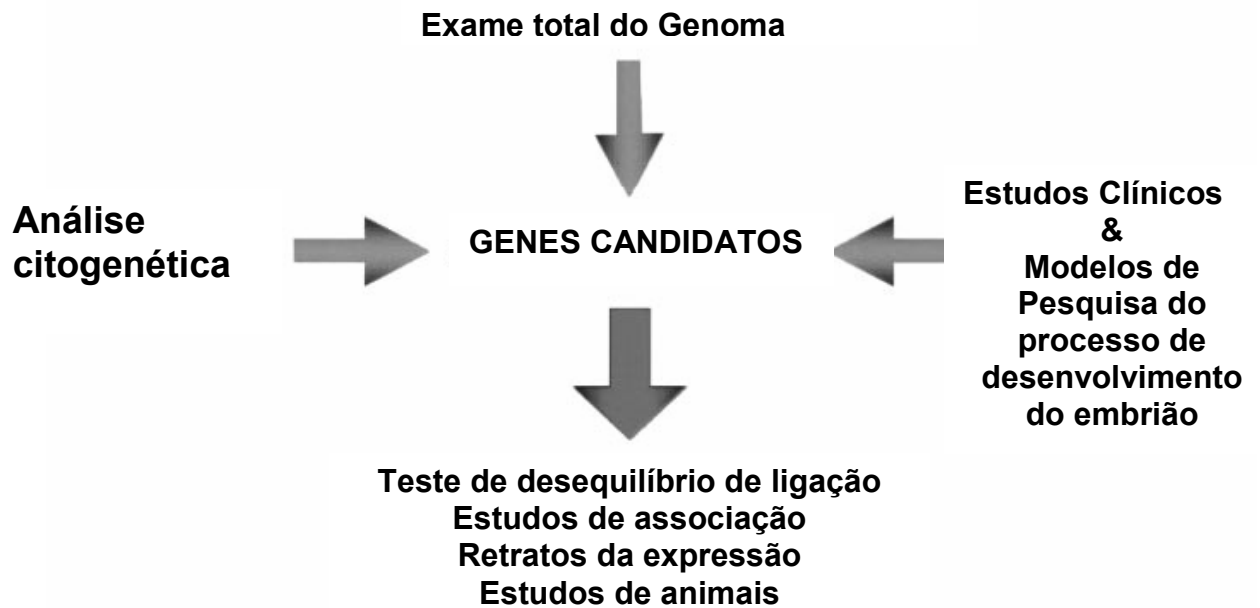


Figura 3 – Principais tipos de estudos usados na detecção de genes candidatos (MUHLE et al., 2004). Traduzido por Aline H. C. Garcia.

Muitos estudos têm encontrado alterações em quase todos os cromossomos. Dentre eles o do The Autism Genome Project Consortium (2007), que, em seus resultados, reportou que o risco para TID, devido a anormalidades cromossômicas, como duplicação no cromossomo 15q 11-13, é muito pequeno, bem como outras variações no número de cópias cromossômicas (CNA), possuem pouco ou nenhum papel nos TIDs. Neste mesmo estudo foram encontradas, através de análises de ligação, evidências sugestivas para uma modesta ligação entre o cromossomo 11p12- p13 e o autismo, contudo outras regiões foram implicadas em populações com descendência européia, sendo ela 2q 31.1 em famílias contendo fêmeas e a região 7q 22.3 para famílias contendo somente homens.

O cromossomo 7q foi o primeiro a ser identificado em estudos de ligação pelo International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (1998) e é o mais implicado em vários estudos, porém com resultados de difícil interpretação, embora

sendo uma região de interesse devido a sinais de ligação genética aí localizados. Vários rearranjos de pacientes com TID, envolvendo essa região e também devido a genes ligados à fala e à linguagem (FOXP2 e EN2) , fazem desta uma região de interesse. Outros genes candidatos no cromossomo 7 são: o HOXA1, responsável pelo desenvolvimento do metencéfalo, o DLX5, que regula o desenvolvimento do cérebro anterior, o RELN, que atua na migração neuronal e no desenvolvimento de conexões entre as células do sistema nervoso, o gene NRCAM envolvido na adesão celular neuronal, e o gene EN2, que além de ser implicado na linguagem, é também um gene homeobox, que regula o desenvolvimento do cerebelo, cujas anormalidades estão altamente relacionadas às TIDs (GUPTA & STATE, 2006; THE AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2007; NICHD, 2005).

Outras regiões implicadas estão presentes no cromossomo 2 que possui os genes Homeobox ou hox genes que controlam o crescimento e desenvolvimento embrionário e também o gene NRXN1, localizado na região 2p16.3 , que num estudo recente de análise de CNVs( variações sub-microscópicas do número de cópias), pelo The Autism Genome Project Consortium( 2007), detectou uma deleção dos exons que codificam o gene NRXN1 em um par de irmãos afetados com TIDs,. Esse resultado se tornou significativo por vários motivos: um deles é que essa alteração é um evento novo , e outros estudos também relatam uma mutação de sentido trocado, rara nesse gene em portadores de TIDs, que não foi encontrada em 500 controles. Outro fator é que raras mutações no gene NRXN1 que atua sobre as neuroliginas geram, aparentemente, risco para TIDs e retardamento mental e , por último, há uma transmissão significativa de dois Loci do gene da NRX1, sob modelo dominante em TIDs. Evidências acumuladas têm implicado as neuxinas e neuroliginas nos TIDs. As neuroxinas têm sido demonstradas por

induzir a diferenciação pós-sináptica em contato com dendritos e as neuroliquinas, na indução de diferenciação pré-sináptica em axônios glutamatérgicos. A ligação neuroxina neuroliquina é fundamental na sinaptogenese glutamatérgica. Além disso, a função aberrante do glutamato é um elemento de risco para TIDs, sendo uma hipótese compatível com isso o fato do glutamato ser um fator importante no desenvolvimento cerebral e que comportamentos ligados ao autismo e a seu diagnóstico são comuns em indivíduos com síndrome do X-frágil, ou esclerose tuberosa, ambos associados com a sinalização anormal do glutamato. (GUPTA & STATE, 2006; THE AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2007; NICHD, 2005).

Outro gene candidato é o que codifica o receptor 2A da serotonina, localizado no cromossomo 13, sendo esse cromossomo implicado em 35% dos estudos de TIDs. Os genes do cromossomo 16 que está associado à esclerose tuberosa, por possuir sintomas similares aos do autismo; no cromossomo 17 os genes candidatos são o gene codificador da galactosemia, uma doença metabólica que, se não tratada, pode levar a retardamento mental, e o gene que codifica o transportador da serotonina (5HTT). Problemas com o Transportador podem levar a transtorno obsessivo-compulsivo.

No cromossomo X, está implicada a síndrome de Rett com características semelhantes ao autismo. Há, ainda, envolvimento do cromossomo 15, que possui genes que codificam o receptor do GABA, um neurotransmissor inibidor cerebral, contudo com poucos estudos evidenciando ligação gênica nesta região (GUPTA; STATE, 2006; NICHD, 2005; MUHLE et al. 2004).

Em seu artigo Sutcliffe (2008), cita alguns dos genes acima e outros também relacionados ao autismo.

**TABELA 5 – Genes implicados na patogenia do autismo.** Genes que têm sido implicados com o autismo, com base em diferentes funções e formas de variação genética, e também na sua associação com doenças, aquelas que mostram características do autismo. Eles dividem caminhos comuns ou relacionados. (A), genes que apresentam três repetições a mais; (B) genes com mutações raras ou codificação variante; (C) genes com variação no número de cópias ou com anormalidades nos cromossomos; (D) associação de alelos comuns ( SUTCLIFFE, 2008).

*Traduzido e modificado por Aline Helen Corrêa Garcia.*

<b>ALGUNS DOS GENES RELACIONADOS AO AUTISMO</b>	
<b>SINAPSE GLUTAMATÉRGICA FUNÇÃO E / OU DE ADESÃO CELULAR NEURONAL</b>	<b>IMPLICADOS EM DOENÇAS RELACIONADAS</b>
FMR1 <sup>A,B</sup>	FMR1 <sup>A,B</sup>
NLGN3 <sup>B</sup>	<b>MECP2<sup>B,C</sup></b>
NLGN4 <sup>B</sup>	NHE6 (SLC9A6) <sup>B</sup>
NRXN1 <sup>B</sup>	A2BP1 <sup>C</sup>
SHANK3 <sup>B,C</sup>	UBA3A <sup>B,C</sup>
CNTNAP2 <sup>B,C,D</sup>	<b>OUTRAS FUNÇÕES</b>
PCDH10 <sup>C</sup>	EN2 <sup>D</sup>
CNTN3 <sup>C</sup>	SLC6A4 <sup>B,D</sup>
<b>TRÁFICO ENDOSOMAL</b>	MET <sup>D</sup>
NHE9 (SLC9A9) <sup>B,C</sup>	<b>SCN7A<sup>C</sup></b>
NHE6 (SLC9A6) <sup>B</sup>	<b>RNF8<sup>C</sup></b>
DIA1(c3orf58) <sup>C</sup>	
A2BP1 <sup>C</sup>	
<b>REGULAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL</b>	
FMR1 <sup>A,B</sup>	
<b>MECP2<sup>B,C</sup></b>	
DIA1(c3orf58) <sup>C</sup>	
PCDH10 <sup>C</sup>	
NHE9 (SLC9A9) <sup>B,C</sup>	
A2BP1 <sup>C</sup>	
UBA3A <sup>B,C</sup>	

Muhle et al.(2004), sugere que uma grande coleção de famílias se faz necessária e também a subdivisão do fenótipo (endofenótipos) pode ser útil e de importância peculiar para poder detectar melhor a susceptibilidade de genes, além do que, para entender melhor uma herança complexa como o autismo, deve-se levar em conta que a heterogeneidade alélica significa que diferentes defeitos em um mesmo gene pode levar para um mesmo ou diferentes padrões de doença, ou ainda, que diferentes grupos de genes variantes possam causar susceptibilidade para doença, em que cada variante pode trazer uma diferente contribuição para ela, ficando mais claro que traços deste fenótipo podem ser herdados separadamente, e que se tornarão em uma doença apenas quando sobrepostos (VEENSTRA-VANDERWEELE et al, 2004; MUHLE et al. 2004).

#### **4.3 A Serotonina e os TIDs**

Em autistas, uma característica encontrada é a hiperserotonemia em cerca de 30% dos indivíduos, e também aumento da serotonina nas plaquetas dos parentes de 1º grau dos portadores de TID (CASTERMANS et al., 2004; VEENSTRA-VANDERWEELE et al, 2004; ANDERSON et al., 1987; PIVEN et al., 1991). Outro fator relevante é que o tratamento com inibidores da reabsorção de serotonina mostrou diminuir parte da sintomatologia autística em alguns indivíduos afetados (BRODKIN et al., 1997; FATEMI et al, 1998) e o tratamento com medicamentos, que são potentes inibidores do transportador da serotonina, se mostraram eficazes no tratamento de comportamentos repetitivos e restritos, em TIDs quando associado com ansiedade e/ou agressividade (COOK et al, 1997). Esses achados levantaram o interesse no conhecimento da biologia molecular dos genes e proteínas envolvidos no sistema serotoninérgico.

#### 4.3.1. O sistema serotoninérgico

##### 4.3.1.1. Serotonina – Formação e atividade central e periférica

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina é um importante neurotransmissor, produzido nos núcleos da ponte e do tronco encefálico no SNC e na periferia pelas células enterocromafins intestinais (VEENSTRA-VANDERWEELE et al. 2000). Seu envolvimento no comportamento tem sido confirmado porque drogas que ativam o sistema serotoninérgico ajudam no tratamento de depressão, ansiedade, humor, agressão, sono, distúrbio obsessivo compulsivo, interações sociais, regulação do apetite, estresse pós traumático, assim como sua ação em funções cognitivas como aprendizagem e memória., déficit de atenção e esquizofrenia (HARVEY,2003; JOOBER et al.,1999).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é produzida a partir do aminoácido essencial triptofano (figura 4).

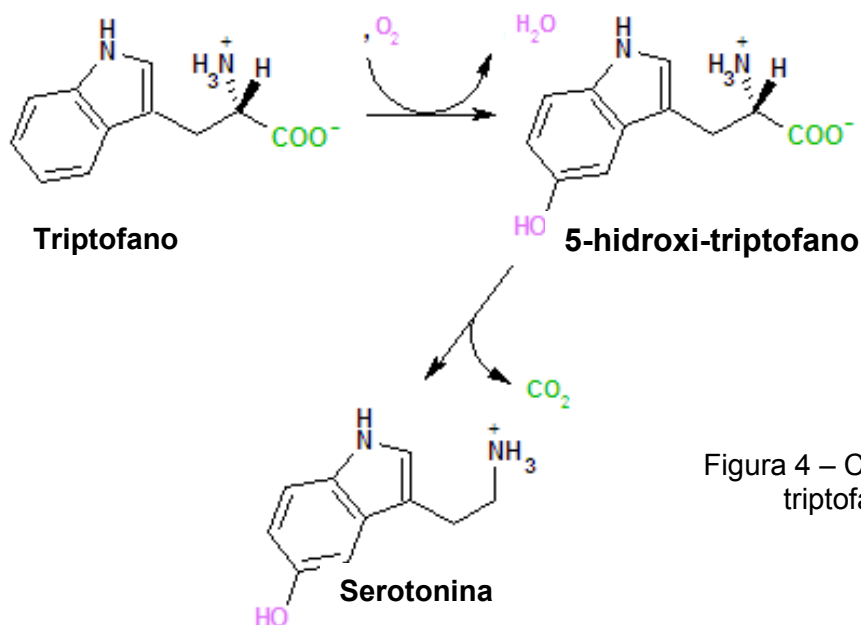


Figura 4 – Conversão do aminoácido triptofano em Serotonina

ca em uma dieta influenciada pela proporçãc ..... (WURTMAN,2005).



A quantidade de triptofano disponível no cérebro para conversão em serotonina depende: da quantidade de triptofano no plasma e da razão entre triptofano plasmático e outros cinco aminoácidos: tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina e valina. Todos esses aminoácidos, incluindo o triptofano, são comparativamente grandes moléculas e, quase todos, são fisiológica e eletricamente neutros. A sua passagem entre o sangue e o cérebro é facilitada pelo carreador de moléculas presentes nas células endoteliais dos capilares cerebrais. Uma única espécie de carreador molecular transporta todos os seis aminoácidos neutros através da barreira hematoencefálica, fazendo com que estes estejam competindo por adesão ao carreador e assim, da corrente sanguínea para o cérebro, levando o triptofano a uma diminuição em relação aos outros aminoácidos competidores. Uma refeição hiperproteica, desta forma, reduz a razão do triptofano plasmático e os outros aminoácidos (Cooper, 1991), de tal forma que pouco triptofano é carreado através da barreira hematoencefálica e ocorre então pouca reação nos neurônios. Uma dieta rica em carboidratos tem efeito oposto, porque a maior secreção de insulina, devido à ingestão de carboidratos, reduz os níveis plasmáticos dos outros aminoácidos, mas não os de triptofano. Assim, os outros aminoácidos circulam como moléculas livres, mas o triptofano é transportado ligado à albumina no plasma. O triptofano é imune aos efeitos da insulina, resultando, após uma ingestão de carboidrato, um aumento dos níveis plasmáticos de triptofano em relação aos competidores oferecendo mais triptofano para reagir com os neurônios (Zappellini, 2002; Wurtman, 2005).

Desta forma, logo após o triptofano ser transportado para dentro do neurônio serotoninérgico, pela ação da enzima triptofano-hidroxilase, ele é convertido em 5-

hidroxitriptofano e logo em seguida em 5-hidroxitriptamina pela enzima triptofano descarboxilase. . A serotonina é então formada e armazenada em vesículas de terminais nervosos para futura liberação na sinapse neuronal e é recaptada pelo neurônio pré-sináptico através do transportador da serotonina e auto-receptores e nos neurônios pós-sináptico pelos seus receptores.(figura 5) .

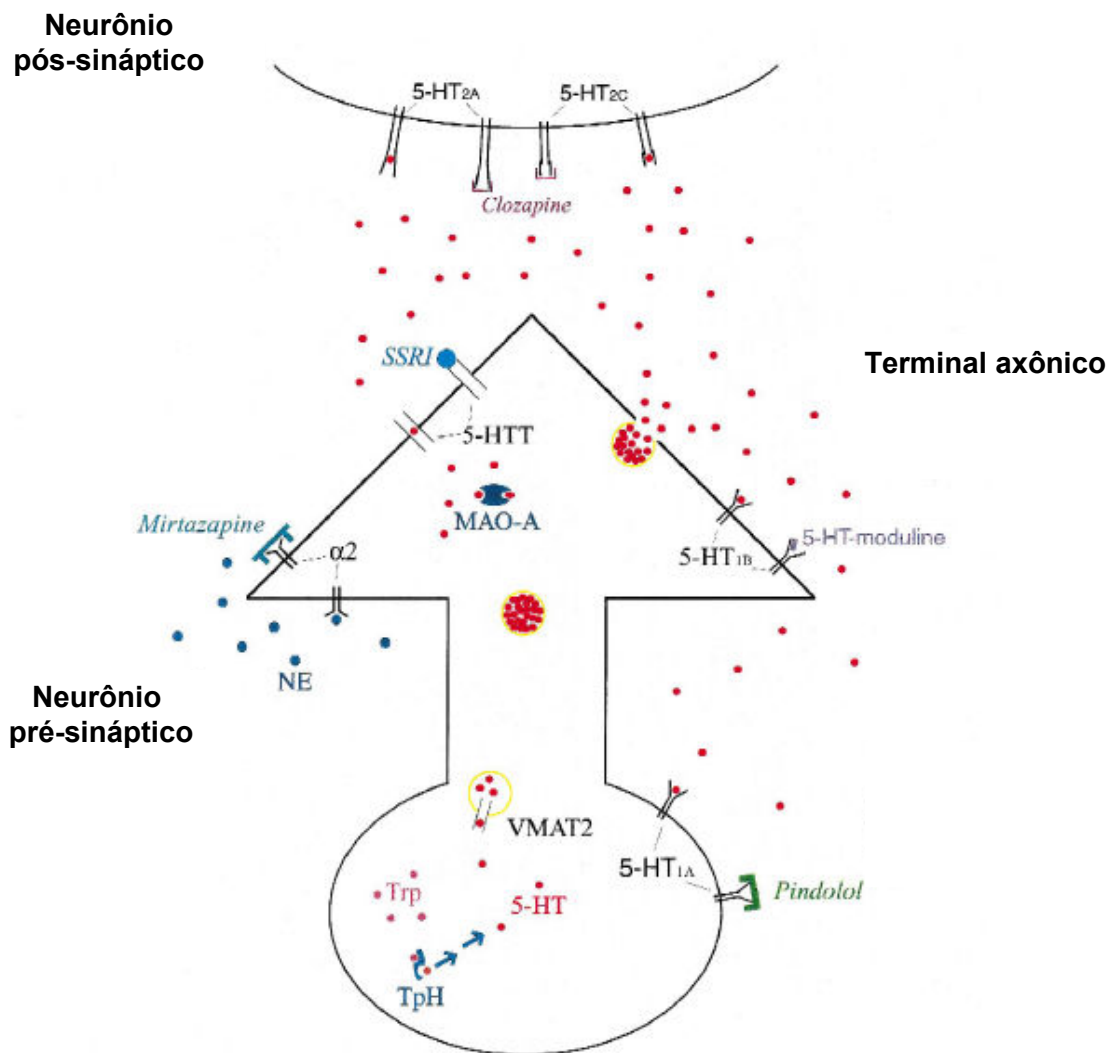


Figura 5 – Representação esquemática dos processos envolvidos na neurotransmissão serotoninérgica (VEENSTRA-VANDERWEELE et al, 2000).

#### 4.3.1.2 *Serotonina e desenvolvimento embriológico*

Whitaker-Azimitia (2001) relata que a serotonina trabalha na regulação do desenvolvimento cerebral antes de ser um neurotransmissor no cérebro maduro. Sendo que um princípio básico para maturação cerebral seja o refinamento pela experiência, o cérebro desenvolve muitas conexões, e aquelas que são redundantes precisam ser removidas, usando para isso os neurotransmissores. A serotonina é um neurotransmissor presente muito cedo no desenvolvimento cerebral, tendo um alto status nessa fase, o qual declina em direção à vida adulta. Além disso, possui ampla distribuição nos terminais neuronais, e, por isso, provavelmente, tenha um papel chave nos processos de neurodesenvolvimento.

Nos humanos, os neurônios serotoninérgicos aparecem por volta da 5ª semana de gestação e aumentam rapidamente por volta da 10ª semana e, ao redor da 15ª semana, a organização típica das células serotoninérgicas já pode ser vista no núcleo da raphe. Nos dois primeiros anos de vida, os níveis da serotonina aumentam, declinando por volta dos cinco anos. Um aumento anormal, durante o desenvolvimento, é a provável causa de perdas dos terminais serotoninérgicos, que podem levar a alterações dos processos de desenvolvimento e ocasionar diminuição do volume hipocampal, diminuição na árvore dendrítica e com isso perda de conexões com o córtex. Além dessas funções, ela possui função periférica, contribuindo em eventos hemostáticos durante sua ativação nas plaquetas, sendo capaz de efeitos vasodilatadores ou vasoconstritores, via receptores vasculares. Há ainda evidências da atuação do sistema serotoninérgico nos mecanismos de apoptose, onde seus receptores 5HT2A e 5HT1A têm um importante papel (WHITAKER-AZIMITIA, 2001).

Desde que a relação serotonina e desenvolvimento é conhecida, fica implícito que o aumento nos níveis desta substância pode causar perdas dos terminais serotoninérgicos. Isso pode ser que ocorra em crianças autistas, sendo que os dados clínicos abaixo sugerem tal informação:

- Alguns autistas respondem às drogas de elevação da serotonina.
- Alto índice de autismo registrado em crianças expostas no útero a drogas que alteram os níveis da serotonina, incluindo a cocaína e o álcool.
- Evidências de hipersensibilidade do autoreceptor 5-HT<sub>1D</sub> que pode estar relacionado a comportamentos repetitivos (WHITAKER-AZIMITIA, 2001).

Neste mesmo artigo, Whitaker-Azimitia (2001) relata que a retirada da serotonina em ratos, causa a redução permanente do número de neurônios no cérebro adulto (hipocampo e córtex), e a sua remoção em animais adultos ocasiona a perda reversível dos dendritos. Os ratos foram tratados com um agonista não seletivo da serotonina (5-metox- triptamina), entre a 12 e 20 semana de gestação. Ao nascer, os animais tratados mostraram mudanças de comportamento, particularmente nas respostas sensoriais (sacudido pronunciado da cabeça quando tocados, tremores quando acariciados na pata com um cotonete, hiper-responsivos ao barulho e não apresentado choro ultra-sônico na ausência da mãe). Essas observações sugerem que o modelo animal de autismo possui relevância comportamental e morfológica em humanos.

#### 4.3.1.3 *Genes que codificam as proteínas do sistema serotoninérgico e os TIDs*

A relação entre a alteração dos níveis de serotonina e autismo tem sido sugerida por vários autores, desde os estudos de Shain & Freedman (1961), que

encontraram hiperserotonemia em cerca de 30% dos portadores de TIDs (MAESTRINI et al, 2002; ANDRES,2002; ANDERSON et al, 2002). Outros estudos encontraram evidências de alteração dos níveis de síntese da serotonina (5-HT) em autistas, quando comparados a seus irmãos, e a melhora dos rituais obsessivo-compulsivo em portadores de TIDs, bem como da ansiedade e agressividade, quando tratados com inibidores seletivos da recaptação da serotonina, assim como uma diminuição dos níveis sanguíneos do triptofano em autistas adultos levou a um aumento de comportamentos estereotipados (ANDERSON, 2002; SCOTT&DENERIS, 2005).

É devido a essas alterações e às funções desempenhadas por essa substância no período embrionário e como neurotransmissor, cuja sinalização anormal pode contribuir para o comportamento autístico, que os genes que codificam proteínas participantes do sistema serotoninérgico são candidatos para estudo em autistas. Alguns desses genes já vêm sendo estudados em indivíduos afetados, tanto para os genes que codificam o transportador da serotonina (5-HTT) quanto os que codificam seus receptores (5-HTRs).

*a. O gene que codifica o Transportador da serotonina*

O gene SLC64A que codifica o gene do transportador da serotonina está localizado no cromossomo 17q, mais especificamente na região 17q11.1-q12 (fig. 5), e possui 31kb e 14 exons, possuindo um polimorfismo de inserção do alelo longo ou deleção do curto de 44pb e foi designado de polimorfismo 5-HTTLPR (LESH et al., 1994). O interesse nesse gene vem da função de recaptação da 5-HT pelo seu transportador na fenda sináptica ligada ao papel da serotonina em comportamentos

repetitivos e ao maior índice de serotonina plaquetária nos autistas. O primeiro estudo com o gene que codifica o 5-HTT, associando-o com o autismo foi realizado por Cook (1997) que observou a transmissão preferencial da variante curta de um polimorfismo de inserção/deleção, cuja repetição em tandem (VNTR) no 2º intron se encontra na região promotora do gene para indivíduos afetados pela doença, porém, logo depois, Klauck et al. (1997) observou o oposto, ou seja, transmissão preferencial da variante longa do gene 5-HTT para indivíduos afetados. Já, Betancur (2002), não encontrou associação entre a desordem autística e o gene do promotor.

Em um estudo recente, houve a associação do alelo longo do gene do transportador (5HTTLPR), com a resposta ao tratamento com a fluvoxamine (SUGIE et al, 2005). Mulder (2005), analisando os polimorfismos (HTT, SLC6A4), em associação com risco para TID e fenótipos autísticos, encontrou associação significativa entre o intro 2 genótipo 12/12 e prejuízos no domínio de rigidez compulsiva.

Outros estudos não puderam constatar nenhuma variante preferencial na população autista. Nesses estudos a associação tem sido controversa, dependendo da diversidade étnica, métodos de análise genética e do perfil sintomatológico (MAESTRINI et al.,1999; ZHONG et al., 1999; PERSICO et al., 2000; KIM, et al,2002; PERSICO et al, 2002; CONROY et al 2004; MCCAULEY et al, 2004).

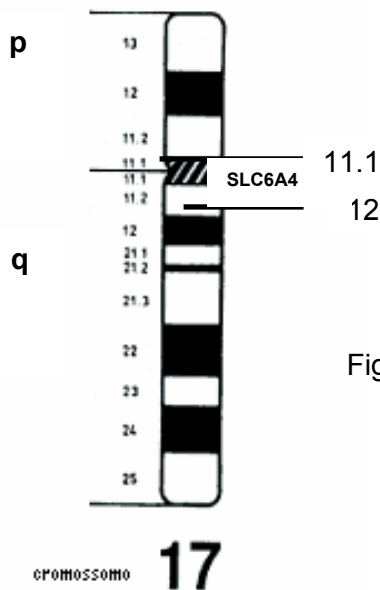


Figura 6 – Posição do gene do transportador SLC6A4.

*b. Os genes que codificam os receptores da serotonina*

A serotonina é liberada na fenda sináptica e ativa tanto os receptores pré-sinápticos quanto os receptores pós-sinápticos. Os receptores pós-sinápticos estão presentes nos neurônios alvo, que determinam inúmeros eventos intracelulares relacionados a esse neurotransmissor, sendo que suas múltiplas funções estão relacionadas com a sua interação com 14 subtipos de receptores, divididos em 7 famílias. 5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>5</sub>, 5HT<sub>6</sub>, e 5HT<sub>7</sub>.

Dentro do grupo 5HT<sub>1</sub> existem os subtipos 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>1E</sub>, e 5HT<sub>1F</sub>, que podem ser pré-sinápticos, atuando como auto-receptores ou ainda ser pós-sinápticos. Existem três subtipos de 5HT<sub>2</sub>: o 5HT<sub>2A</sub>, o 5HT<sub>2B</sub>, e 5HT<sub>2C</sub>, todos pós-sinápticos, assim como dois subtipos do 5HT<sub>5</sub>: o 5HT<sub>5a</sub> e o 5HT<sub>5B</sub>. A maioria desses receptores está acoplada a proteínas G. A classe dos receptores 5HT<sub>3</sub> são canais iônicos.

Os receptores arteriais 5HT 1B e 1D parecem mediar o tratamento de enxaqueca, o 5HT4 parece importante nas arritmias cardíacas, já o receptor 5HT2A,

que é do nosso interesse, é um receptor pós-sináptico, que possui possível papel em alucinações e psicoses (VEENSTRA-VANDERWEELE,2000) .

Os receptores 5HT1A e 5HT2A são de função oposta, ambos importantes para neuronal e mental funcionamento. O 5-HTR2 é um receptor programado, no qual eventos durante o desenvolvimento podem afetar o número, afinidade e função deste receptor no cérebro adulto, pois ele estimula sua plasticidade e a adaptabilidade, podendo mudar os níveis de cálcio e ativar muitos mecanismos de fosforilação na célula, além do que se encontram envolvidos na apoptose celular(AZMITIA,2001).

Até agora nenhuma associação tem sido observada com os receptores 5HTR7(LASSING et al.,1999).

a) O receptor 5HT2A

O receptor 5HT2A tem um papel fundamental nas sinaptogênese. Ele é funcional por volta do 7º dia pós-natal no hipocampo dos ratos, onde pode atuar na ramificação e crescimento dos terminais deste local, podendo estimular a plasticidade e a adaptabilidade cerebral e mudar os níveis de  $Ca^{++}$ , bem como ativar os mecanismos de fosforilação da célula e também a apoptose (AZMITIA,2001).

O gene do receptor 5HT2A (HTR2A) (fig. 6) está localizado no cromossomo 13q14-q21 (SPARKERS et al.,1991), que é a região de maior susceptibilidade para o autismo segundo Bartlett et al (2002)., sendo reconhecido por Veenstra et al (2002) como um dos mais plausíveis candidatos para o autismo., devido às atividades acima mencionadas.



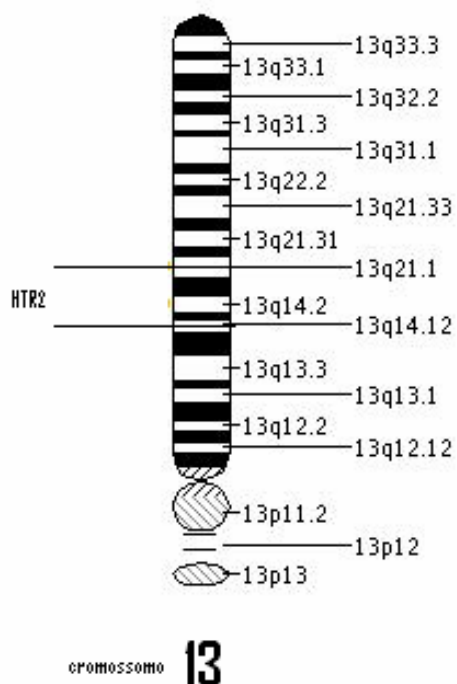


Figura 7 – Posição dos genes do receptor.

Esse gene (5HTR2A) possui 3 exons separados por 2 introns, e um comprimento total de mais de 20Kb (CHEN et al, 1992). O HTR2A possui dois polimorfismos de base única (SNPs), o -1438G/A e o 102 T/C. Vários estudos tentaram associar um desses polimorfismos com várias doenças psiquiátricas (que compartilham com os TIDs alguns sintomas, mesmo que aparentes.), outros estudos tentaram, ainda, associar um dos SNPs com TIDs. Alguns deles falharam e outros obtiveram resultados positivos na associação (INAYAMA et al, 1996; WILLIAMS et al, 1997; HOLMES et al, 1998; MASSAT et al, 2000; VEESTRA-VANDERWEELE et al, 2002; LI et al, 2002; LOHMUELLER et al, 2003; ZHANG et al, 2004).

Um estudo de Sugie (2003) mostrou algumas diferenças nas respostas à administração da fluvoxamine em autistas, dependendo do polimorfismo do gene T102C do receptor 5HT2A (TT,TC ou CC) nesses indivíduos.

Corrêa (2002), não encontrou associação entre o polimorfismo T102C e o comportamento suicida em população brasileira. Em outro estudo que relaciona o

polimorfismo da região promotora (-1438 G/A) com TOC (transtorno obsessivo-compulsivo), também em população Brasileira, não houve associação. (Gonzalez, 2001).

Li (2002), estudando o polimorfismo T102C do gene receptor HTR2A, encontrou uma frequência significativamente menor do genótipo TT e uma frequência maior do genótipo CC em indivíduos com hiperatividade e déficit de atenção, em relação aos controles.

Shaikh (2008) que procurou associar o polimorfismo T102C do receptor HTR2A em crianças com doença de humor, encontrou resultado negativo para a associação ; Também Herken (2003) estudando o polimorfismo T102C do HTR2A em esquizofrênicos, não encontrou associação estatística significativa de nenhum dos genótipos, contudo observou que indivíduos que possuíam os genótipos TT e TC, possuíam um índice de internação maior do que os indivíduos com genótipo CC.

Cho (2007), não encontrou transmissão significativa de nenhum dos SNPs do HTR2A ( -1438 G/A e T102C), contudo o haplótipo AT demonstrou significativa associação com o autismo.

Um estudo também recente, contudo não referente ao polimorfismo do receptor, mas a sua quantidade no córtex cerebral, encontrou em portadores da síndrome de Asperger uma diminuição desse receptor quando comparados aos controles (MURPHY et al, 2006).

Os vários estudos acima citados têm procurado associar o 5HTR2A com doenças psiquiátricas ou com TIDs, mas os resultados até agora, são inconsistentes, necessitando de um maior número de amostras, uma melhor designação etiológica da população controle, ou dos traços analisados a serem associados ao polimorfismo em questão. Por isso definir subtipos fenotípicos, e

saber os antecedentes étnicos tanto da população controle quanto dos indivíduos estudados, pode melhorar a habilidade para detectar efeitos genéticos em doenças complexas como o autismo, diminuindo resultados inconsistentes e heterogêneos (WILLIAMS et al, 1996; GOLIMBET et al, 2002; CORREA et al, 2002; SHAO et al, 2003; MACCAULEY et al, 2004; TANG et al, 2005; CHO et al,2007).

Nosso estudo procurou a associação do polimorfismo T102C do receptor 2A da serotonina em portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento. No exón I, do HTR2A , pode haver a troca de um nucleotídeo na posição 102 , gerando dois alelos T e C. Portanto, como cada indivíduo é portador de um par de genes alelos para um mesmo locus, e este possui dois polimorfismos (T e C), ele poderá possuir um dos três genótipos para o polimorfismo T102C do gene 5HTR2A- TT, TC e CC . As variantes polimórficas do T102C do HTR2A podem ser amplificadas através de primers que flanqueiam o local na posição 102 e geram fragmentos de 342 pares de bases. Esses Primers foram descritos por Warren et. al.( 1993), também usado por Joobar et al. (1999):

Primer Senso (5' → 3') 5' TCT GCT ACA AGT TCT GGC TT 3'

Primer Antisenso (3' → 5') 5' CTG CAG CTT CTC TAG GG 3'

Após a amplificação, os fragmentos devem ser submetidos à digestão enzimática utilizando a enzima MspI (Promega). Na presença do alelo normal (T), um sítio de restrição é abolido e os fragmentos amplificados permanecem com 342pb. Na presença do alelo mutado C, o sítio de restrição é reconhecido, gerando fragmentos de 216pb e 126pb. (INADA et al., 2003; CHOI et al, 2005).

## 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 Sujeitos

Foram examinadas e avaliadas crianças diagnosticadas com Transtorno Invasivo do Desenvolvimento (TID) e os respectivos pais. Os pacientes e familiares foram localizados através de diferentes fontes de contato, com acesso disponível pelos Professores do Programa de Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM) envolvidos no Projeto de Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID). Foi montado, na Universidade Presbiteriana Mackenzie, um ambulatório para atendimento clínico do paciente e família. Os pacientes foram atendidos pelos médicos do programa, especialistas em genética clínica, neurologia e psiquiatria infantil. Foi aplicado um protocolo de atendimento (MERCADANTE & BRUNONI & SCHWARTZMAN, 2004) constando de história clínica, exame físico morfológico e neurológico, antecedentes pessoais e da família e avaliação neuropsicológica. Contudo a maioria dos sujeitos veio de uma entidade de São Bernardo do Campo, a AVAPE, de onde obtivemos mais da metade da nossa amostra aos quais também foram aplicados os mesmos instrumentos e critérios de diagnóstico. Os critérios diagnósticos foram baseados no DSM-IV e CID-10.

A nossa amostra incluiu indivíduos com idade superior a 3 anos e que foram diagnosticados conforme critério acima com Autismo, Síndrome de Asperger ou Transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem outra especificação (TID-NE). Pacientes com TID, com quaisquer comorbidades de etiologia conhecida associada, seja ela uma cromossomopatia, doença monogênica ou por fatores ambientais, foram excluídos.

### 5.1.1 Instrumentos

Para avaliar a sintomatologia dos sujeitos nas áreas de comunicação, interação social e comportamentos estereotipados foram utilizados os instrumentos "ASQ" - Autism Screening Questionnaire (BERUMENT et al., 1999) que é um instrumento para rastreamento dos casos de transtornos invasivos do desenvolvimento, cujo estudo preliminar de validação para o Brasil já foi realizado (SATO et al, 2008) e o "Autism Behavior Checklist" (ABC), que, após a sua adequação à língua portuguesa, recebeu a sigla ICA "Inventário de comportamentos Autísticos", o qual consiste em uma lista de comportamentos atípicos característicos dos quadros autísticos, e é usado para triagem de crianças suspeitas de apresentar essa patologia, sendo usado em entrevista com os pais destas crianças, contribuindo para um diagnóstico diferencial (MARTELETO & PEDROMÔNICO, 2007). Estes questionários foram usados pelo grupo de pesquisadores da Universidade Presbiteriana Mackenzie, para triagem e diagnóstico dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento e foram também aplicados às famílias da AVAPE.

O Instrumento ASQ (ANEXO A) é um questionário de 40 itens abordando: 16 questões de interação social, 13 de linguagem e comunicação, e 10 de comportamentos repetitivos.

As seguintes questões referem-se aos respectivos domínios: 1. interação social: 10, 11, 20, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 40; 2. Linguagem e comunicação: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 21, 22, 23, 24, 25, 34, 35; Comportamentos repetitivos e estereotipados: 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19. Pontua-se 1 para presença de comportamento e 0 para ausência. O item 1, referente à fala não é pontuado, portanto o escore total é 39. Para os indivíduos que não apresentam fala, o escore é 34. Como não houve diferença significativa na pontuação dos indivíduos

autistas com ou sem fala considerou-se, com fins práticos, uma escala só de 39 pontos. É considerada triagem positiva para Transtorno Invasivo de 15 pontos para cima e de 22 para cima para o diagnóstico de Autismo Infantil. (BERUMENT et al., 1999; SATO et al,2008).

O ABC (ANEXO B) consiste em uma lista de comportamentos e características típicas da patologia, totalizando 57 perguntas relacionadas a áreas específicas e dispostas de forma aleatória para evitar manipulação de resultados por parte dos entrevistados. Na tradução para o português, os domínios do ABC foram definidos da seguinte forma: 1. Estímulo Sensorial (ES); 2. Relacionamento (RE); 3. Uso do Corpo e de Objetos (CO); 4. Linguagem (LG) e 5. Postura Social (PS).

Cada uma das questões é avaliada sob uma graduação de intensidade que varia de 1 a 4, sendo 4 o grau mais intenso e de maior relação positiva em relação ao item avaliado. A mensuração dos resultados é feita a priori por cada subgrupo, cuja somatória proporcionará o resultado final, ou *score* bruto. A classificação mediante o *score* bruto é feita da seguinte forma: pontuação superior ou igual a 68 pontos caracteriza um sujeito autista, resultados entre 54 (inclusive) e 67 pontos caracterizam sujeitos com possibilidades moderadas de serem autistas, pontuação entre 47 (inclusive) e 53 pontos representam sujeitos com classificação considerada como inconclusivo e sujeitos que obtiverem resultado inferior a 47 pontos são tidos como não autistas (KRUG, ARIK, ALMOND,1980). No presente trabalho consideraremos a nota de corte proposta pela versão brasileira: de 49 pontos para cima o instrumento apresenta a melhor sensibilidade e especificidade (MARTELETO & PEDROMÔNICO, 2007)..

### 5.1.1.2 Adaptação do instrumento ABC

O instrumento foi validado no Brasil pelas pesquisadoras Márcia Regina Fumagalli Marteleto e Márcia Regina Marcondes Pedromônico do Departamento de Terapia da Fala da Universidade Federal de São Paulo. Após as devidas alterações de adequação sócio-cultural, testagem e validação o ABC, foi aprovado para utilização no Brasil e nomeado como: Inventário de Comportamentos Autísticos – ICA (MARTELETO & PEDROMÔNICO, 2007).

As questões 6/10/21/26/34/39/44/52/57 compõem o domínio Estímulo Sensorial (ES). Só serão consideradas válidas para pontuarem no escore bruto do domínio e no total do Inventário, quando o sujeito obtiver as seguintes pontuações em cada questão: 34 pontua com 1; 6 pontua com 2; 10/21/26/44/52 pontuam com 3; 39/57 pontuam com 4. As questões 3/7/13/17/24/25/27/28/33/38/43/47 compõem o domínio Relacionamento (RE). Só serão consideradas válidas para pontuarem no escore bruto do domínio e no total do Inventário, quando o sujeito obtiver as seguintes pontuações em cada questão: nenhuma questão pontua com 1; 7/13/28 pontuam com 2; 17/27/33/43 pontuam com 3; 3/24/25/38/47 pontuam com 4. As questões 1/5/9/12/16/22/30/35/40/51/53/54 compõem o domínio Uso do Corpo e de Objetos (CO). Só serão consideradas válidas para pontuarem no escore bruto do domínio e no total do Inventário, quando o sujeito obtiver as seguintes pontuações em cada questão: nenhuma questão pontua com 1; 5/30/35/54 pontuam com 2; 9/51 pontuam com 3; 1/12/16/22/40/53 pontuam com 4. As questões 4/8/11/15/18/20/29/32/37/42/46/48/56 compõem o domínio Linguagem (LG). Só serão consideradas válidas para pontuarem no escore bruto do domínio e no total do

Inventário, quando o sujeito obtiver as seguintes pontuações em cada questão: 4/20/37 pontuam com 1; 15/18/29/42 pontuam com 2; 8/32/46/56 pontuam com 3; 11/48 pontuam com 4. As questões 2/14/19/23/31/36/41/45/49/50/55 compõem o domínio Postura Social (PS). Só serão consideradas válidas para pontuarem no escore bruto do domínio e no total do Inventário, quando o sujeito obtiver as seguintes pontuações em cada questão: 41/45/55 pontuam com 1; 2/31/36/49 pontuam com 2; 14/23 pontuam com 3; 19/50 pontuam com 4.

Resumindo, estes instrumentos consistem em uma lista de comportamentos atípicos característicos dos TID e estão designados para triagem da criança suspeita de possuir a doença, contribuindo para um diagnóstico diferencial e orientação na educação destas crianças, uma vez que, quanto mais precoce o diagnóstico e a intervenção, melhores os resultados obtidos para amenizar alguns dos sintomas do quadro autístico e na educação da criança com TID (BERUMENT ET, 1999; MARTELETO & PEDROMÔNICO, 2005; SATO et al, 2008).

Nosso estudo foi de caso-controle, cuja realização dos testes nos controles já havia sido avaliada pelo trabalho de Trevizan (2006). Os sujeitos foram divididos segundo o comprometimento nas áreas de comunicação, interação social e comportamentos estereotipados. A distribuição das freqüências dos genótipos nos diferentes grupos foi comparada através de testes estatísticos.

### *5.1.2 Tamanho da Amostra*

#### *a) Sujeitos*

Este trabalho analisou o sangue de 50 crianças diagnosticadas com um dos quadros de TID e sem nenhuma comorbidade associada. A entrevista e a realização da aplicação dos instrumentos diagnósticos foi realizada com 47 destas famílias



(três famílias não possuíam os questionários respondidos), contudo, em duas destas 47 famílias, não foi aplicado o questionário ASQ e em uma o questionário ABC.

#### b) *Controles*

O Centro de Genética Médica da Universidade Federal de São Paulo, tem realizado uma série de pesquisas sobre polimorfismos dos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do ácido fólico. Para isso constituíram um amplo banco de DNA com indivíduos controles, representativos da população atendida no Hospital São Paulo, na AVAPE-SP e na AACD-SP. Deste banco de dados foi escolhido aleatoriamente um número de amostras de DNA pertencentes a indivíduos do sexo masculino, do sexo feminino, com antecedentes raciais branco e com antecedentes raciais não-branco. O antecedente racial foi determinado pelas características étnicas do indivíduo e pela informação da família sobre o país de nascimento dos 4 avós do sujeito do qual era obtido uma amostra de DNA. Foi considerado como sendo de antecedente racial branco os indivíduos sem evidência de antecedente racial negro e/ou indígena e/ou oriental e como não-branco os indivíduos que apresentassem evidência de qualquer um destes antecedentes raciais (VERGANI,2002; PEREZ et al.,2003; DA SILVA et al.,2005).

#### 5.1.3 *Delineamento*

A análise estatística foi realizada usando o teste do qui-quadrado, para verificar a distribuição dos genótipos entre os indivíduos, com nível de significância de 5%, assim como a averiguação das distribuições gênicas e genotípicas, para testar se as proporções estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os genótipos tanto dos afetados como de um dos progenitores, ou de ambos, foram descritos. Como este

trabalho faz parte de uma pesquisa mais ampla do grupo dos distúrbios do desenvolvimento da UPM, sua primeira etapa foi realizada analisando-se o mesmo polimorfismo em indivíduos da população de ambos os sexos, de antecedentes raciais brancos e não-brancos. O antecedente racial dos indivíduos foi determinado pelas características étnicas destes, bem como pela informação da família sobre o país de nascimento dos 4 avós dos sujeitos de quem era obtida uma amostra de DNA, tanto para os controles quanto para o protocolo de atendimento dos afetados.

A presente pesquisa foi amparada pelo parecer do Comitê de Ética do projeto SISNEP número: 166405, com o Título: Transtornos Invasivos Do Desenvolvimento (TID): Estudo dos Polimorfismos do Gene Receptor 2a (HTR2A) e do Gene Transportador (SLC6A4) da Serotonina, dos pesquisadores Ana Paula Pimentel Costa; Aline H. Corrêa Garcia, Bruno Coprerski , Daniela de Oliveira Toyama ; Décio Brunoni , no qual se garantiu que a coleta de sangue e o estudo genético de cada paciente só fosse realizado após entrevista com os pais ou responsáveis, que preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido e também foram informados sobre a importância deste trabalho, sobre o procedimento e destino da coleta, bem como do sigilo devido a ser aplicado.

#### *5.1.4 Distribuição da mutação*

A distribuição da mutação T102C será de acordo com o comprometimento dos domínios do ASQ e ABC: a hipótese testada é a de que deveria haver correlação entre a pontuação nestas escalas e o número de alelos mutantes. Esperava-se também que os indivíduos com os genótipos vulneráveis apresentassem maior comprometimento na área do comportamento repetitivo e estereotípias.

## 5.2 Procedimentos

Os procedimentos usados foram seguindo o mesmo protocolo de Trevisan (2006), depois de realizadas e padronizadas as alterações necessárias para que o trabalho fosse inteiramente realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Biológicas desta Universidade.

Para isso, testamos todos os procedimentos abaixo e replicamos os resultados das nove famílias da pesquisadora Trevisan, com relação as amostras em que ainda havia DNA disponível e alcançamos os mesmos resultados, conforme figura (figura 8) do gel abaixo:

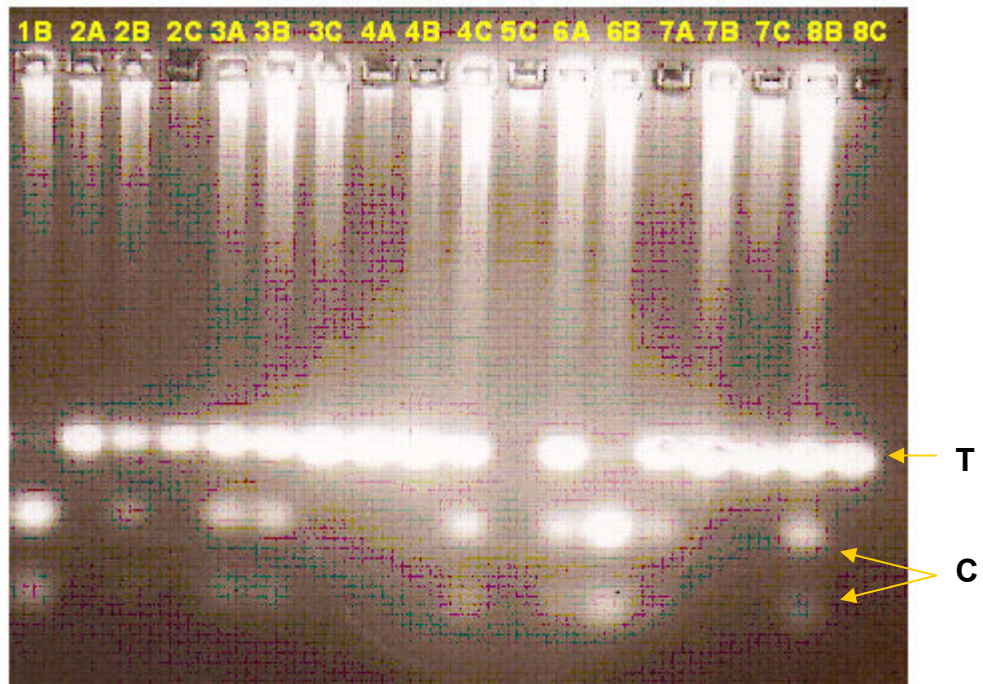


Figura 8 – gel de agarose da replicação dos resultados de (Trevisan,2006)

.Tabela 6 – Resultados replicados das amostras de DNA disponíveis de Trevizan (2006).

<b>FAMÍLIA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Filho (A)</b>	Sem amostra	TT	CT	TT	Sem reação	CT	TT	Sem amostra
<b>Pai (B)</b>	CC	CT	CT	TT	Sem amostra	CT	TT	CT
<b>Mãe (C)</b>	Sem amostra	TT	TT	CT	Sem amostra	Sem amostra	TT	TT

### 5.2.1 Extração de DNA

Para o estudo genético foi realizada a extração do DNA genômico e amplificação do DNA pela técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O produto da PCR foi submetido à eletroforese e os resultados analisados através do teste do quiquadrado.

A extração de DNA genômico foi realizada através de punção venosa de 5ml a 10ml de sangue periférico, segundo a técnica descrita por Miller et al. (1988), seguindo as etapas abaixo:

1. Iniciar a extração a partir de 2 a 10 ml de sangue coletado em tubo contendo 0,4 ml de EDTA 5%. Inverter o tubo várias vezes para obter uma solução homogênea;
2. Diluir o sangue em *bloodlysis* 1X em tubo tipo Falcon® até completar 15mL;
3. Deixar no gelo durante 30 minutos para a obtenção da lise das hemácias;
4. Centrifugar por 25 minutos a 2000 rpm;
5. Descartar o sobrenadante;
6. Lavar cuidadosamente o tubo e o precipitado com *bloodlysis* 1X até completar 10mL de solução e misturar em vórtex;

7. Centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm;
8. Descartar o sobrenadante;
9. Repetir etapas 6 e 7 e 8 até obter solução transparente, com precipitado bem branco;
10. Ressuspender o precipitado em 3 mL de *nucleolysis* 1X e misturá-lo em vórtex;
11. Adicionar 300 µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e 70 µL de proteinase K (200 U/mL) e misturar cuidadosamente;
12. Incubar a solução a 37°C durante a noite. A solução ficará clara e viscosa;
13. Após a incubação, adicionar 1 mL de NaCl saturado 6 M e misturar vigorosamente durante 15 segundos;
14. Centrifugar a solução durante 30 minutos a 3000 rpm;
15. Transferir o sobrenadante para um tubo tipo Falcon® limpo. Misturar vigorosamente durante 10 segundos;
16. Centrifugar a solução durante 20 minutos a 3000 rpm;
17. Precipitar o DNA adicionando 2 vezes o volume de etanol absoluto e coletar com um bastão de vidro (tubo capilar com a extremidade soldada);
18. Passar o DNA em uma solução de álcool 70%;
19. Diluir o DNA em 400-1000 µL de TE<sup>-4</sup> em um tubo Eppendorf®;
20. Incubar a 65°C durante 30 minutos.

Para os casos em que no momento da coleta de material de algum paciente houve dificuldades, o DNA foi extraído por kit comercial (GFX genomic – Amershan Biociences) a partir de pequenas quantidades (100µl) de sangue periférico.

### 5.2.2 Soluções para Extração de DNA

As soluções de *Bloodlysis* 1X e *Nucleolysis* 1 X serão obtidas através de diluição das soluções de *Bloodlysis* 10X e *Nucleolysis* 10X, respectivamente.

- *Bloodlysis* 10X:

155 mM NH<sub>4</sub>Cl;

100 mM KHCO<sub>3</sub>;

10 mM EDTA pH 7,4;

- *Nucleolysis* 10X:

100 mM Tris-HCl pH 8,0;

4 M NaCl;

20 mM EDTA pH 8,2;

- TE<sup>4</sup>:

10 mM Tris pH 8,0;

0,1 mM EDTA pH 7,4.

### 5.2.3 PCR

Após a extração do DNA, foi realizada sua amplificação pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a partir dos seguintes oligonucleotídeos (WARREN et al., 1993)

Senso(5'→3'): 5' - TCT GCT ACA AGT TCT GGC TT – 3'

Anti-senso (3'→ 5'): 5' - CTG CAG CTT TTT CTC TAG GG – 3'

Foi utilizado:

- 150ng (2µl) de DNA genômico
- 2,5µL de tampão comercial da enzima
- 200µM de cada dNTP (0,2 µl das dNTPs 25mM)
- 0,4µM de cada primer (0,9 µl so senso e 1,5 µl do antisenso)
- 2,0mM (1µl) de MgCl<sub>2</sub>
- 1,0U/µL de enzima *taq polimerase*
- *Água bidestilada até completar o volume.*

Volume final 25,0µL de solução

O programa PCR consistiu de:

- Desnaturação Inicial de 94°C por 5 minutos
- 35 ciclos de desnaturação por:
  - 50 segundos a 94°C
  - 45 segundos de pareamento a 59°C
  - 50 segundos de extensão a 72°
- 10 minutos de extensão final a 72°C
- 24 horas de resfriamento a 4°C

(Levitan et al, 2002)

#### 5.2.4 Digestão do produto da PCR

O produto da amplificação resultou em fragmentos de 342pb, que foram submetidos à digestão pela enzima de restrição *Msp I*.

Foram utilizados para digestão:

8,0µL a 15 µl do produto da PCR

2,0µL de tampão comercial da enzima

15,0U/ 0,75 µl de enzima de restrição *Msp I*

Volume final: 20,0µL

O produto foi digerido em Banho Maria a 37°C *overnight* .

Após a digestão, os fragmentos foram clivados( conforme o protocolo acima, usando a enzima *MspI*), a partir do alelo mutado (C) em fragmentos de 216pb e 126pb. Na presença do alelo normal (T), um sítio de restrição é abolido e os fragmentos amplificados permanecem com 342pb. (INADA et al., 2003; CHOI et al, 2005). O produto digerido foi submetido à eletroforese .

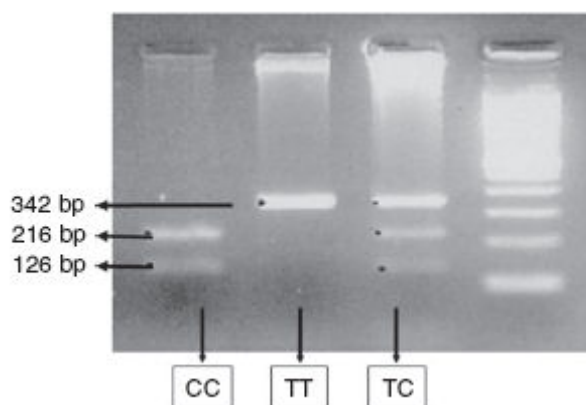


Figura 9- Genótipo do polimorfismo T102C do gene do receptor HTR2A após digestão visualizado em U.V. (Schwanke et al,2007)



### 5.2.5 *Eletroforese*

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% a 100V, corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador U.V. para verificar se houve a amplificação do fragmento. Os fragmentos constatados amplificados foram digeridos e seu produto submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% a 100V, corado também com brometo de etídio e visualizado em transluminador U.V. Ou então, como procedimento opcional, o produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% a 80-90V.

### 5.2.6 *Preparação dos géis para eletroforese*

#### Gel de agarose 2%

0,4 g de agarose (Gibco BRL®)

2 mL de TBE 10X

Volume final: 20mL

#### Preparar solução tampão para corrida do gel

TBE 1X ou 0,5X. Sendo 250 ml de solução final.

Solução:

• 10XTBE:

54g Tris

27,4g Ácido bórico

25mL EDTA

Volume final: 500mL

Após a corrida o gel foi colocado em uma solução de brometo de etídio e água por 5 minutos e depois retirado o excesso de brometo com água destilada e só após colocado no trans-iluminador para verificação das bandas da corrida.

### Gel de poliacrilamida 8%

Inicialmente a poliacrilamida foi preparada na concentração 30% na proporção 29:1 (29g de acrilamida (Gibco BRL®), 1 g de bisacrilamida (Merck®), volume final 100mL).

Esta solução foi então diluída para a concentração desejada, acrescentando-se água destilada e TBE 10X, de forma que a concentração de TBE na solução final fosse à mesma usada na solução tampão da cuba de eletroforese (1x).

Para que haja polimerização da acrilamida é acrescentado à solução final persulfato de amônia 10% e TEMED (Gibco BRL®).

- Poliacrilamida 30%

29,0 g de acrilamida (Gibco BRL®)

1,0 g de bisacrilamida (Merck®)

Volume final: 100,0 mL

- Poliacrilamida 8%

1,6 mL de poliacrilamida 30%

600µl TBE 10X

3,76 ml de água

42µl de APS 10%

6µl de TEMED

2µl de Brometo de etídio

Volume final: 6,0mL

### 5.2.7 *Tampão de corrida para eletroforese*

- 2 Litros de TBE 0,5X

Aplicar 6 a 8µl da amostra com 2µl de Bromoxilenocianol (BFB)

0,025g Xilenocianol (Sigma ®)

0,025g Bromofenol blue (Sigma ®)

3mL Glicerol

Volume final: 10mL

Adicionar 4uL de tampão de corrida em cada amostra antes de aplicá-la no gel.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Amostra dos Indivíduos**

Foram analisados o DNA de 50 portadores de Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID) distribuídos com idades entre 3 e 40 anos, média de 11,84 anos, desvio padrão de 6,96 sendo que 75% da amostra apresentava idade até 14 anos.

Os tipos de TID diagnosticados foram: Autismo Infantil ou Atípico: 15 indivíduos; 11 indivíduos com Síndrome de Asperger, 1 indivíduo com o tipo não especificado e os demais com Transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem outra especificação (TID-NE). Apenas 5 sujeitos são do sexo feminino.

Os dados referentes à categorização das tabelas ASQ e ABC são descritos assim: Indivíduos com pontuações maiores que 67 no ABC e maiores que 21 pontos no ASQ são considerados autistas; indivíduos com pontuações entre 54 e 67 no ABC e entre 15-21 no ASQ são considerados, respectivamente, com moderada probabilidade e portadores de TID e finalmente indivíduos com pontuações inferiores a 49 no ABC e menores que 15 no ASQ são considerados como pertencentes fora do espectro autista (Tabelas 7 e 8).

TABELA 7 - Significado da pontuação dos instrumentos ASQ e ABC.

<b>ASQ</b>	Normal	0-14
	TID	15-21
	Autista	> 21
<b>ABC</b>	Normal	<b>&lt;49</b>
	leve probabilidade	47-53
	Moderada probabilidade	54-67
	autismo	>68

TABELA 8- Identificação dos Indivíduos com TID, diagnóstico, idade, sexo e respectivas pontuações nos instrumentos ASQ e ABC.

IDENTIFICAÇÃO	IDADE	SEXO	PONTUAÇÃO ASQ	PONTUAÇÃO ABC	DIAGNÓSTICO CLÍNICO
1	15	M	22	104	S. DE ASPERGER
2	22	M	19	122	S. DE ASPERGER
3	12	M	20	78	S. DE ASPERGER
4	15	M	28	102	AUTISMO INFANTIL
5	13	M	31	126	S. DE ASPERGER
6	13	M	NÃO CONSTA	68	S. DE ASPERGER
7	8	M	15	70	TID-NE
8	11	M	25	NÃO CONSTA	TID-NE
9	8	M	14	67	AUTISMO INFANTIL
10	10	M	19	44	TID-NE
11	10	M	25	66	AUTISMO INFANTIL
12	5	F	19	75	TID-NE
13	6	M	15	25	TID-NE
14	6	M	26	76	AUTISMO INFANTIL
15	15	M	26	65	S. DE ASPERGER
16	24	M	22	73	S. DE ASPERGER
17	20	M	29	96	S. DE ASPERGER
18	14	M	25	87	AUTISMO INFANTIL
19	6	M	26	89	TID-NE
20	11	M	27	90	TID-NE
21	16	M	24	75	AUTISMO INFANTIL
22	11	M	NÃO CONSTA	84	AUTISMO INFANTIL
23	15	M	27	45	TID-NE
24	8	M	27	90	AUTISMO INFANTIL
25	23	M	32	93	S. DE ASPERGER
26	11	M	28	112	TID-NE
27	9	F	27	106	TID-NE
28	10	M	35	107	TID-NE
29	6	M	27	74	TID-NE
30	40	M	32	96	AUTISMO ATÍPICO
31	31	M	19	76	S. DE ASPERGER
32	8	M	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	?
33	13	M	30	90	TID-NE
34	9	M	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	TID-NE
35	9	M	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	TID-NE
36	8	M	22	64	TID-NE
37	7	M	29	80	TID-NE
38	5	F	18	73	AUTISMO INFANTIL
39	9	M	26	67	AUTISMO INFANTIL
40	10	F	13	59	AUTISMO INFANTIL
41	6	M	18	74	TID-NE
42	7	M	26	75	TID-NE
43	11	M	25	72	AUTISMO ATÍPICO
44	8	M	20	82	TID-NE
45	8	M	23	52	S. DE ASPERGER
46	21	M	13	81	TID-NE
47	3	M	23	56	AUTISMO INFANTIL
48	8	F	10	54	TID-NE
49	4	M	9	60	AUTISMO INFANTIL
50	14	M	16	43	TID-NE

Nossa amostra foi analisada com relação à distribuição dos pacientes por gênero sexual e comparados aos controles, obtendo os resultados, conforme a tabela abaixo:

TABELA 9 - Distribuição de pacientes e controles por gênero sexual.

	MASCULINO		FEMININO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
CASOS	45	90%	5	10%	50	100%
CONTROLES	100	48,54%	106	51,46%	206	100%
<b>TOTAL</b>	<b>145</b>	<b>56,64%</b>	<b>111</b>	<b>43,36%</b>	<b>256</b>	<b>100%</b>

Segundo a bibliografia nos mostra a predominância do sexo masculino sobre o feminino em TID é claramente observável, pois obtivemos 9 meninos para cada menina (9:1), apesar de, a quantidade de indivíduos do sexo masculino ser bem mais expressiva do que o esperado (4:1), essa distorção, provavelmente, se deve ao tamanho reduzido da nossa amostra (CARVALHEIRA et al, 2004; COOK et al. 1997; CHO et al., 2007). Contudo, em um trabalho sobre a questão da prevalência do gênero sexual no autismo foi proposto que apesar dos indivíduos do sexo masculino serem acometidos com maior frequência, o são em graus mais leves que os do sexo feminino, sugerindo que haja uma carga genética diferente em relação ao gênero (WING,2002).

Além disso, em nossa amostra, há uma sobre-representação de indivíduos com síndrome de Asperger (22,45%), pois, como têm melhor rendimento, freqüentam a Instituição AVAPE para capacitação profissional. Sabe-se que neste grupo de indivíduos a razão sexual aproxima-se a 9 homens para 1 mulher.

Por outro lado quanto à frequência por antecedentes raciais brancos e não-brancos foram obtidos os resultados abaixo:

TABELA 10 - Distribuição de pacientes e controles por antecedentes raciais.

	BRANCO		NÃO-BRANCO		ANTECEDENTE IGNORADO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
CASOS	21	42%	26	52%	3	6%	50	100%
CONTROLES	102	49,51%	104	50,49%	0	0%	206	100%
TOTAL	123	48,04%	130	50,78%	3	1,18%	256	100%

Não houve diferença significativa quanto à distribuição de casos e controles por antecedentes raciais, os valores encontrados foram de 42% de brancos nos casos contra 49,25% nos controles e de 52% de não-brancos nos casos e 50,49% nos controles (qui-quadrado ( $X^2$ ) = 0,358;  $p=0.55$ ). Apesar da dificuldade na caracterização dos antecedentes étnicos na população brasileira, estes resultados são coerentes pois a maioria dos sujeitos do grupo casos e dos controles possuem extrato sócio-cultural similar o que reflete na mistura racial.

### 6.1.1 Distribuição dos Genótipos

A distribuição dos genótipos se deu de acordo com a Tabela 12 na qual se observa a grande predominância do genótipo heterozigoto entre os casos (64%) enquanto que nos controles este genótipo foi evidenciado em 50% dos indivíduos. Por outro lado o genótipo vulnerável CC foi encontrado em 14% dos casos e em 27,2% dos controles. Não há significância estatística nesta distribuição (qui-

quadrado( $X^2$ ) = 4.48; 2GL;  $p=0,10$ ) porém há uma tendência de possível diferença para o genótipo TC e CC. É claro que esta tendência pode-se confirmar ou não com maior número de sujeitos estudados.

Por outro lado a frequência do alelo T é de 0,54 e do alelo C, considerado a variante polimórfica, é de 0,46. As frequências gênicas e genotípicas não se afastam do esperado estando em equilíbrio de Hardy-Weiberg (qui-quadrado=2,967; 2GL;  $p=0,2268$ ).

TABELA 11 - Distribuição genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A de pacientes e controles.

GENÓTIPO	OBSERVADOS	
	N	%
<b>CASOS</b>		
TT	11	22%
TC	32	64%
CC	07	14%
<i>TOTAL</i>	50	100%
<b>CONTROLES</b>		
TT	48	23,3%
TC	102	49,52%
CC	56	27,18%
<i>TOTAL</i>	206	100%

O gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> apresenta diversos polimorfismos sendo que o T102C e o C516A não alteram a seqüência de aminoácidos na proteína. Assim, espera-se de ambos possíveis efeitos similares, ou seja, a variante alélica mutada poderia alterar a expressão gênica levando, de alguma forma, a alteração no metabolismo da serotonina.

A análise da literatura mostra-nos que a distribuição dos genótipos em diferentes populações, contém resultados contraditórios, encontrando algumas



vezes resultados positivos e em outros negativos. Um deles, realizado com população caucasiana, comparou o polimorfismo T102C e a frequência dos alelos em 188 pacientes esquizofrênicos e 440 controles encontrando diferenças significantes na distribuição dos genótipos TT, TC e CC e também na frequência dos alelos em controles e esquizofrênicos, encontrando uma maior frequência do alelo C em esquizofrênicos que nos controles (LORENZO et al.,2006). Outro estudo, também realizado com população caucasiana, demonstrou a associação do genótipo TT com um elevado número de receptores 5HT2A nas plaquetas dos controles e não dos pacientes com transtornos de humor. Nos pacientes, o genótipo TC foi mais freqüente dentre os que tentaram suicídio (KHAIT,2005).

Bertola et al. (2007) estudaram em população brasileira o polimorfismo C516T. O estudo era caso-controle com 246 indivíduos esquizofrênicos e 315 controles. Os autores não encontraram associação preferencial com o alelo mutado T e as distribuições genotípicas de casos e controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mesmo que a diferença dos quadros clínicos estudados (TID e esquizofrenia) sejam consideráveis e apesar dos polimorfismos diferentes (102TC e 516CT) os autores encontraram resultados similares aos nossos. A tabela abaixo faz um pequeno resumo dos resultados obtidos do polimorfismo T102C em diversas populações e respectivos controles:

Tabela 12 - Resultados obtidos do polimorfismo T102C em diversas populações e respectivos controles:

AUTOR	TRANSTORNO	N	TT	TC	CC	T	C	P*
SHAIKH (2008)	DO HUMOR	203	20,6	44,8	34,5	42,7	57,3	-
	CONTROLES	199	18,0	49,2	32,6	42,7	57,3	-
KHAIT (2005)	DO HUMOR	152	28,3	37,5	34,2	47	53	+
	CONTROLES	63	31,75	46,03	22,22	54	45	-
SHINKAI(1998)	AUTISMO	106	28,3	51,9	19,8	54,2	45,8	-
	CONTROLES	109	37,6	41,6	20,8	58,3	41,5	-
ESTE TRABALHO	AUTISMO	50	22	64	14	54	52	-
	CONTROLES	206	23,3	49,52	27,18	48	46	-

P = diferença significativa : + não-significativa: -

Quando observamos a distribuição do genótipo por sexo na Tabela 13, verificamos que a mesma se deu muito irregularmente, isso porque o sexo feminino é representado por apenas 5 indivíduos entre os casos não sendo possível estabelecer alguma tendência. Entre os indivíduos do sexo masculino, repete-se praticamente a mesma distribuição do total dos casos como era esperado, já que praticamente a integralidade da amostra é composta de homens (Tabela 14). Entre os controles a distribuição é similar, não havendo diferença (qui-quadrado ( $X^2$ ) = 0,194; 2GL; p=0,9073). Já a comparação da distribuição dos genótipos entre os homens tanto dos casos como dos controles manteve a mesma tendência em relação à amostra total: maior concentração do genótipo TC entre os casos e do genótipo CC entre os controles. A diferença continua não sendo significativa (qui-quadrado ( $X^2$ ) = 4,26; 2GL; p=0,1187).

A distribuição do polimorfismo T102C na população chinesa não mostrou diferença entre homens e mulheres (YU et al.,2004). Já em esquizofrênicos, um trabalho relacionando este fenótipo e a resposta para um medicamento chamado clozapine, mostrou uma diferença significativa na resposta para homens jovens portadores do alelo CC, mas não para mulheres (JOOBER,1999).

TABELA 13 - Distribuição genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A nos sexos feminino e masculino de pacientes e controles.

GENÓTIPO	SEXO				TOTAL	
	M		F		N	%
	N	%	N	%	N	%
<b>CASOS</b>						
TT	11	22%	00	0%	11	22%
TC	29	58%	03	6%	32	64%
CC	05	10%	02	4%	07	14%
<i>TOTAL</i>	<i>45</i>	<i>90%</i>	<i>05</i>	<i>10%</i>	<i>50</i>	<i>100%</i>
<b>CONTROLES</b>						
TT	23	11,17%	25	12,14%	48	23,30%
TC	51	24,76%	51	24,76%	102	49,52%
CC	26	12,62%	30	14,56%	56	27,18%
<i>TOTAL</i>	<i>100</i>	<i>48,54%</i>	<i>106</i>	<i>51,46%</i>	<i>206</i>	<i>100%</i>
<b>TOTAL</b>	<b>145</b>	<b>56,64%</b>	<b>111</b>	<b>43,36%</b>	<b>256</b>	<b>100%</b>

TABELA 14 - Distribuição genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A no sexo masculino de pacientes e controles.

GENÓTIPO	SEXO	
	Masculino	
	N	%
<b>CASOS</b>		
TT	11	24,44%
TC	29	64,44%
CC	05	11,12%
<i>TOTAL</i>	<i>45</i>	<i>100%</i>
<b>CONTROLES</b>		
TT	23	23%
TC	51	51%
CC	26	26%
<i>TOTAL</i>	<i>100</i>	<i>100%</i>

Em relação aos antecedentes raciais nota-se na Tabela 15 que brancos e não brancos representam mais ou menos a metade da amostra tanto nos casos como nos controles. A distribuição dos genótipos dos indivíduos com TID não diferiu quanto aos antecedentes raciais (aplicação do teste de Fisher pelo tamanho reduzido da amostra não mostrou diferença estatística). Entre os controles a distribuição dos genótipos, entre indivíduos brancos e não brancos, também não mostrou diferença (qui quadrado ( $X^2$ ) =0,542; 2GL; p = 0,7625). A comparação da distribuição dos diversos genótipos TT, TC e CC entre casos e controles por antecedente racial também não mostrou diferença (brancos casos X brancos controles: qui-quadrado ( $X^2$ ) =1,341; 2GL; p = 0,5114; não brancos casos X não branco controles: qui-quadrado ( $X^2$ )= 3,566; 2GL; p = 0,1681).

Em que pese as dificuldades da caracterização étnica da população brasileira nossos resultados são consistentes já que a maioria dos indivíduos das duas amostras, casos e controles, apresentam extrato sócio-econômico similar. Como se sabe esta variável no Brasil se correlaciona com o tipo de mistura racial.

TABELA 15 - Distribuição genotípica observada do polimorfismo T102C do gene HTR2A segundo antecedentes raciais de pacientes e controles.

GENÓTIPO	BRANCO		ANTECEDENTE NÃO BRANCO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
<b>CASOS</b>						
TT	04	8,51%	05	10,64%	09	19,15%
TC	13	27,66%	18	38,30%	31	65,96%
CC	04	8,51%	03	6,38%	07	14,89%
<i>TOTAL</i>	<i>21</i>	<i>44,68%</i>	<i>26</i>	<i>55,32%</i>	<i>47</i>	<i>100%</i>
<b>CONTROLES</b>						
TT	26	12,62%	22	10,68%	48	23,30%
TC	49	23,79%	53	25,73%	102	49,52%
CC	27	13,11%	29	14,08%	56	27,18%
<i>TOTAL</i>	<i>102</i>	<i>49,52%</i>	<i>104</i>	<i>50,48%</i>	<i>206</i>	<i>100%</i>
<b>TOTAL</b>	<b>123</b>	<b>48,61%</b>	<b>130</b>	<b>51,39%</b>	<b>253</b>	<b>100%</b>

Por outro lado na população dos Estados Unidos, com melhor nitidez na separação étnica, a pesquisa das freqüências alélicas T e C foram idênticas (50%) entre brancos e afro-americanos (ERTUGUL et al, 2004).

Ao analisarmos os dados para averiguação se o alelo vulnerável CC estaria ligado a maior susceptibilidade para comportamentos repetitivos e estereotipados, e, considerando apenas indivíduos que tiveram pelo menos 50% de estereotipias, observou-se que os genótipos se distribuíram com freqüências muito similares entre os dois grupos, tanto no ASQ quanto no ABC (teste exato de Fisher pelo tamanho da amostra, sem diferença significativa).

TABELA 16 - ASQ - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C do gene HTR2A dos pacientes associada aos comportamentos estereotipados e também Distribuição genotípica das estereotipias esperadas X as observadas

	ASQ				Total	%
	Sim	%	Não	%		
TT	5	15,62	3	25,00	8	18,18
TC	22	68,75	7	58,33	29	65,90
CC	5	15,62	2	15,62	7	15,90
Total	32		12		44	100
DISTRIBUIÇÃO DAS ESTEREOTIPIAS NO ASQ						
GENÓTIPO	OBSERVADO		ESPERADO			
TT	45		80			
TC	153		290			
CC	36		70			
	234		440			

TABELA 17 - ABC - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C do gene HTR2A dos pacientes associada aos comportamentos estereotipados e também Distribuição genotípica das estereotipias esperadas X as observadas

ABC						
	Sim	%	Não	%	Total	%
TT	5	19,23	3	16,66	8	18,18
TC	17	65,38	12	66,66	29	65,90
CC	4	15,38	3	16,66	7	15,19
Total	26		18		44	100

DISTRIBUIÇÃO DAS ESTEREOTIPIAS NO ABC		
GENÓTIPO	OBSERVADO	ESPERADO
TT	41	80
TC	138	290
CC	33	70
	212	440

Quanto ao número de estereotipias, considerando que o máximo seriam 10 por indivíduo, total 440, evidenciamos que tanto no ASQ ( qui-quadrado ( $X^2$ ) = 0,124; 2GL; P=0,94) quanto no ABC, não houve diferença na distribuição do genótipo.

Apesar dos nossos resultados não terem revelado associação entre o polimorfismo T102C do HTR2A e maior susceptibilidade para comportamentos repetitivos e estereotipados, ainda assim o uso de endofenótipos comportamentais continua sendo um caminho para melhorar a habilidade para detectar efeitos genéticos em doenças complexas como o autismo (CHO et al.,2005; TANG et al., 2005). Isso fica evidente em um estudo recente que não encontrou diferença significativa na distribuição genotípica e na frequência dos alelos do polimorfismo T102C do HTR2A entre pacientes com transtorno do pânico e controles, contudo as frequências se mostraram alteradas quanto a severidade dos sintomas, demonstrando assim, a necessidade da melhor categorização dos endofenótipos ( YOON et al.,2008).

O papel potencial do sistema serotoninérgico com o desenvolvimento dos TID tem sido sugerido há muito tempo, baseado na observação de hiperserotonemia em 30% dos sujeitos autistas. Modelos animais de autismo que foram produzidos através do tratamento de ratos com agonistas não seletivos da serotonina durante a gestação, a retirada do triptofano da dieta de indivíduos adultos com síndrome de Asperger que aumenta o comportamento estereotipado, além do que, drogas inibidoras da recaptação da serotonina melhoram alguns sintomas como comportamentos repetitivos e estereotipados, agressividade e linguagem em indivíduos autistas. (WHITAKER-AZIMITIA, 2001; GORDON et al,1993; ANDERSON, 2002).

Por tudo isso, a genética do sistema serotoninérgico continua sendo um importante foco para estudo, e a subdivisão dos fenótipos comportamentais associados ao autismo continua sendo um caminho que deve ser cada vez mais refinado ao ser percorrido.

## **7 CONCLUSÃO**

A frequência da mutação T102C no gene que codifica o receptor 2A (HTR2A) em pacientes com TID, não tem diferença da população controle. A frequência alélica e genotípica de casos e controles está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Há predominância do genótipo heterozigoto TC entre os casos, fato este que poderá ser confirmado ou não, com um maior número de sujeitos estudados. A distribuição genotípica em casos e controles estratificados por antecedentes raciais também não mostrou diferença.

Não encontramos associação da variante polimórfica com comportamentos repetitivos e estereotipados nos portadores de TID

## 8 REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKY, H.M.; Faraone, S.V.; Glatt, S.J.; Tsuang, M.T.. Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 67 (1) 53 – 62, 2004.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION – APA. Diagnostic and statistical Manual of mental disorders: DSM-IV.4th ed. Washington: APA, 1994.
- ANDERSON, G.M.; Freedman, D.X.; Cohen, D.J.; Volkmar, F.R.; Hoder, E.L.; McPhedran, P.; Minderaa, R.B.; Hansen, C.R.; Young, J.G.. Whole blood serotonin In autistic and normal subjects. *J Child Psychol Psychiatry*. 28(6):885-900, Nov 1987.
- ANDERSON, G. M. Genetics of childhood disorders: XLV. Autism, part 4: serotonin in autism. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psych.* 41 (12): 1513-1516, 2002.
- ANDERSON, G.M.; Hoshiono Y.. Neurochemical studies of autism. In Cohen DJ, Volkmar FR; editors. *Handbook of autism and a pervasive developmental disorders*. New York: John Wiley, p. 325-43, 2005.
- ANDRES, C.. Molecular genetics and animal models in autistic disorder. *Brain Res. Bull.* 57(1),109–119,January, 2002. in <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03619230>.
- ARANGO, V.; Huang, Y.; Underwood, M. D.; Mann, J. J.; Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J. Psych. Research*. 37: 375-386,2003.
- ASSUMPÇÃO, Jr. F.B.; PIMENTEL, A C.M.. TIDs Infantil. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 22(1):37-39, 2000.
- AZMITIA, E.C.; Whitaker-Azmitia, P.M.. Awakening the sleeping giant: anatomy And plasticity of the brain serotonergic system. *J. Clin. Psychiatry*. Review. 52 Supl:4-16; Dec 1991.
- AZMITIA, E.C. Modern view on an ancient chemical: serotonin effects on proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* 56: 414–424, 2001.



- BARTLETT, C.W.; Flax, J. F.; Logue, M. W.; Vieland, V. J.; Basset, A. S.; Tallal, P. And Brzustowicz, M.. A Major Susceptibility Locus for Specific Language Impairment is Located on 13q21. *Am. J. Hum. Genet.* 71:45-55, 2002.
- BERTHIER, M.L.; Bayes, A.; Tolosa, E.S.. Magnetic resonance imaging in patients with concurrent Tourette's disorder and Asperger's syndrome. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 32:633-9, 1993.
- BAUMAN, M.. Microscopic neuroanatomic abnormalities in autism. *Pediatric:* 87(5):791-5, 1991.
- BERUMENT, S.; Rutter, M.; Lord, C.; Pickles, A.; Bailey, A.. The autism screening questionnaire: diagnostic validity. *British Journal of Psychiatry,* 175: 444-451, 1999.
- BERTOLA, V.; Cordeiro, Q.; Zung, S.; Miracca, E. C.; Vallada, H. Association analysis between the C516T polymorphism in the 5-HT2A receptor gene and Schizophrenia. *Arq Neuropsiquiatr,* 65(1):11-14, São Paulo, 2007.
- CARVALHEIRA, G.; Vergani, N.; Brunoni, D.. Genetics of autism. *Rev. Bras. Psiquiatria:* 26 (4):270-272, Dezembro, 2004.
- CASANOVA, M.F.; Buxhoeveden, D.P. ; Brown, C.. Clinical and macroscopic correlates of minicolumnar pathology in autism. *J. Child Neurol.* (17):692-695, 2002. in [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- CASANOVA, M.F.; Buxhoeveden, D.P.; Switala, A.E.; Roy, E.. Minicolumnar pathology in autism. *Neurology,* (58):428-32, 2002.
- CASTERMANS, D.; Wilquet, V.; Steyaert, J.; Van de Ven, W.; Fryns, J.P.; Devriendt, K.. Chromosomal anomalies in individuals with autism: a strategy towards the Identification of genes involved in autism. *SAGE Publications and The National Autistic Society,* Vol 8(2):141-161, 2004.
- CHEN, K.; Yang, W.; Grimsby, J.; Shih, J.C.. The human 5-HT2 receptor is encoded by a multiple intron-exon gene. *Brain Res. Mol.* 14 (1-2):20-6, Jun. 1992.
- CHOI, J. H.; Zhang, S. Y., Park, K.W.; Cho, Y.S.; Oh, B.H.; Lee, M. M.; Park, Y. B.; Kim, H. S. The Association between the T102C Polymorphism of the HTR2A Serotonin Receptor Gene and HDL Cholesterol Level in Koreans. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 38(2): 238-242; mar, 2005.
- CHO, H.; Yoo, H. J.; Parck, M.; Lee, Y. S.; Kim, S.A.. Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT2A receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios. *Brain research,* 1139: 34-41, march, 2007.

- CID-10 – *Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde*. 10o. Revisão; p. 361-362. OMS/OPAS. EDUSP–2000.
- CONROY, J.; Meally, E.; Kearney, G.; Fitzgerald, M.; Gill, M.; Gallagher, L. Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population. *Mol. Psychiatry* 9 (6), 587–593., 2004.
- COOK, E. H. Jr.; Courchesne, R.; Lord, C.; Cox, N. J.; Yan, S.; Lincoln, A.; Haas, R.; Courchesne, E.; Leventhal, B. L.: Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Molec Psychiat.* 2:247-250, 1997.
- COOK, E. H. Jr.; Lindgren, V.; Leventhal, B. L.; Courchesne, R.; Lincoln, A.; Shulman, C.; Lord, C.; Courchesne, E.: Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am. J. Hum. Genet.* 60:928-934, 1997.
- COOK, E. H. Jr.; Courchesne, R. Y.; Cox, N. J; Lord, C.; Gonen, D.; Guter, S.J.; Lincoln, A.; Nix, K.; Haas, R.; Leventhal, B. L.; Courchesne, E. Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers. *Am. J. Hum Gen.* 62(5):1077-83, May 1998.
- COOPER, J.R., Bloom, F.E., Roth,R.H. The Biochemical basis of neuropharmacology. 6 th ed. Oxford Univ. Press., New York, 1991.
- CORREA, H.; Romano, Silva M.A.; Bóson, W.; Machado, M.; Lima, V.; Juarez, O. Castro; De Marco. Estudo de associação entre o polimorfismo T102C do gene 5-HT2A e tentativas severas de suicídio em pacientes psiquiátricos. *Rev.. Bras. Psiquiatria.* 24(2): 44-46, oct 2002.
- COURCHESNE, E.. Neuroanatomic imaging in autism. *Pediatrics.* 87:781-790,1991.
- COURCHESNE, E.; Redcay, E.; Kennedy, D.P.. The autistic brain: birth through adulthood. Review. *Current opinion in Neurobiology* 17(4): 489-96, Aug, 2004.
- COURCHESNE, E.; Yeung. Courchesne R.; Press GA; Hesselink Jr.; Jemigam T.L.; Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *N. Engl. J. Med.*, 318: 349-54, 1998.
- COURCHESNE, E.; Redcay, E.; Kennedy, D.P.. The autistic brain: birth through adulthood. Review. *Current opinion in Neurobiology*, 17(4): 489-96, Aug 2004.
- COURCHESNE, E.; Pierce,K.: Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long distance disconnection. *Rewiew Current opinion in Neurobiology* 15:225-230, March 2005.
- COURCHESNE, E.; Pierce K.: Brain overgrowth in autism during a critical time in developmental: implications for frontal pyramidal neuron and interneuron development and connectivity. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 23:153-170, 2005.

- DA SILVA, L.R.; Vergani, N.; Galdieri, L.; Longhitano, S.B.; Brunoni, D.; D'Almeida, V.; Perez, A.B.A.. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am.J.Med.Genet.* 135:263-7, 2005.
- DEL-BEN, C.M.. Neurobiologia do transtorno de personalidade anti-social. *Rev. Psiq. Clín.* 32 (1); 27-36, 2005.
- DSM-IV- Critérios Diagnósticos. Traduzido por Batista, D. Porto Alegre: Artes Médicas, 2000. Disponível em <http://virtualpsy.locaweb.com.br/dsm.php> Acesso em 15 fev. 2007.
- ERTUGUL A; Kennedy JL; Masellis M; Basile VS; Jayathilake K; Meltzer HY. No association of the T102C polymorphism of the serotonin 2A receptor gene (HTR2A) with suicidality in schizophrenia . *Schizophr. Res.* 69: 301-305, 2004.
- FOLSTEIN, E.S.; Rutter, M.. Infantile Autism: A Genetic Study of 21 Twin Pairs. *Journal of Child Psychology and Psychiatry.* 18(4):297-321, 1977.
- FOLSTEIN, E.S.; Rosen-Sheidley, B.. Genetics of Autism: Complex aetiology for a heterogeneous disorder. Review. *Nature Reviews Genetic.* 2:943-955, 2001.
- GADIA, Carlos A., TUCHMAN, Roberto and ROTTA, Newra T. Autism and pervasive developmental disorders. *J. Pediatr. (Rio de J.)*, Apr. 2004, vol.80, nº. 2, suppl, p.83-94. ISSN 0021-7557.
- GOLIMBET, V.E.; Alfimova, M.V.; Manandyan, K.K.; Mitushina, N.G.; Abramova, L.I.; Kaleda, V.G.; Oleichik, I.V.; Yurov, Y.; Trubnikov, V.I. 5HTR2A gene polymorphism and personality traits in patients with major psychoses. *European Psychiatry*, 17(1): 24-28, March, 2002.
- GOLIMBET, V.E. et al. Supportive evidence for the association between the T102C 5-HTR2A gene polymorphism and schizophrenia: A large-scale case-control and family-based study. *European Psychiatry*, 2007.
- GONZALEZ, C. H.Aspectos genéticos do transtorno obsessivo-compulsivo.*Rev. Bras. Psiquiatr.* 23(supl):38-41, 2001.

- GUPTA, A.R.; State, M.W.. Autism: genetics. *Rev. Bras Psiquiatria. Review.* 28 Suppl 1:S29-382; Jun 12, 2006.
- HARVEY, J. A.. Role of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in learning. *Learn & Memory*, 10(5):355-362, Sep-Oct 2003.
- HERKEN, H.; Erdal, E.; Erdal, N.; Avnacioglu, S.. T102C Polymorphisms at the 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Gene in Turkish Schizophrenia Patients: A Possible Association with Prognosis. *Neuropsychobiology*, vol 41:1,2003.
- HOLLANDER, E.; Kaplan, A.; Cartwright, C.; Reichman, D. Venlafaxine in children, adolescents, and young Adults with Autism Spectrum disorders: An open retrospective clinical report. *J. of child Neurology.* Vol 15: 2, 132-135, 2000.
- INADA, Y.; Yoneda, H.; Koh, J.; Sakai, J.; Himei, A.; Kinoshida, Y.; Akabame, K.; Hiraoka, Y. and Sakai, T.; Positive Association between panic disorder and polymorphism of serotonin 2A receptor gene. *Psychiatry Research.* Vol. 118(1):25-31; May 2003.
- INAYAMA, Y.; Yoneda, H.; Sakai, T.; Ishida, T.; Nonomura, Y.; Kono, Y.; Takahata, R.; Koh, J.; Sakai, J.; Takai, A.; Inada, Y.; Asaba, H.. Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.* 67 (1): 103–105, 1996.
- INTERNATIONAL MOLECULAR GENETIC STUDY OF AUTISM CONSORTIUM (IMGSAC). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Hum Mol Genet* 7, 571-578, 1998.
- JANUSONIS, S.. Serotonergic paradoxes of autism replicated in a simple mathematical model. *Medical Hypotheses.* 64(4):742-50; 2005.
- JANUSONIS, S.. Statistical distribution of blood serotonin as a predictor of early autistic brain abnormalities. *Theoretical Biology and Medical Modelling.* 19;2:27; Jul 2005. in: <http://www.tbiomed.com/content/2/1/27>.
- JOOBER, Ridha et al. T102C polymorphism in the 5HT<sub>2A</sub> gene and schizophrenia: relation to phenotype and drug response variability. *Pharmacogenetics.* Vol 24, n. 2: 141-145, 1999.
- KANNER L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child.* 2 : 217-50.1943.
- KANNER L. Early infantile autism – 1943-1955. *J. Orthopsychiat.* 26:55-65; 1956.
- KELLER, F.; Persico, A.. The neurobiological context of autism. Review. *Mol. Neurobiol.*, 28(1):1-22; Aug 2003.

- KEMPER, T.L.; Bauman, M.. Neuropathology of infantile autism. Review. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 57(7):645-52; 1998
- KHAIT, Vadim D. et al. Association of Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Binding and The T102C Polymorphism in Depressed and Healthy Caucasian Subjects. *Neuropsychopharmacology* 30: 166-172, 2005.
- KIM, S.J.; Cox, N.; Courchesne, R.; Lord, C.; Corsello, C.; Akshoomoff, N.; Guter, S.; Leventhal, B.L.; Courchesne, E.; Cook, E.H.. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Mol. Psychiatry* 7 (3), 278–288, 2002.
- KLAUCK, SM; Poustka, F.; Benner, A.; Lesh, KP; Poustka A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum. Mol. Genetics*: 2233-2238, 1997
- KLIN, A.; Mercadante, M. T.. Autism and the pervasive developmental disorders. *Rev Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v.28; 2006.
- LAMB, J.A.; Moore, J.; Bailey, A.; Monaco, A.P.. Autism: recent molecular genetic advances. *Review Human Molecular Genetics*. 12;9(6):861-8; Apr 2000.
- LASSIG, J.P.; Vachirasomtoon, K.; Hartzell, K.; Leventhal, M.; Courchesne, E.; Courchesne, R.; Lord, C.; Leventhal, B.L.; Cook, E.H. Jr.. Physical mapping of the serotonin 5-HT<sub>7</sub>receptor gene (HTR7) to chromosome 10 and pseudogene (HTR7P) to chromosome 12, and testing of linkage disequilibrium between HTR7 and autistic disorder. *Am.J. Med. Genet.* 15;88(5):472-5; Oct 1999.
- LESCH, K.P.; Balling, U.; Gross, J.; Strauss, K.; Wolozin, B.L.; Murphy, D.L.; Riederer, P.. Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission*. 95(2):157-62; 1994.
- LEVITAN, R.D.; Masellis, M.; Basile, V.S.; Lam, R.W.; Jain, U.; Kaplan, A.S.; Keneddy, S.H.; Siegel, G.; Walker, M.L.; Vaccarino, F.J.; Kennedy, J. L.. Polymorphism of the serotonin-2A receptor gene (HTR2A) associated with childhood attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in adult women with seasonal affective disorder. *Journal of Affective Disorders*. 71:229-233; 2002.
- LI, J.; Wang, Y.; Qian, Q.; Wang, B.; Zhou, R.. Association of 5-HT(2A) receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in children. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 10;82(17):1173-6; Sep 2002.
- LOHMUELLER, K. E.; Pearce, C. L.; Pike, M.; Lander, E. S.; Hirschhorn, J. N.. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* 33 (2):177–18, 2003.
- LORD, C.; Rutter, M.; Le Couteur, A.. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with

- possible pervasive developmental disorders. *J. Aut. Develop. Disord.*, 24:659-685; 1994.
- LORENZO, Concepcion V. et al. Association between the T102C polymorphism of the serotonin-2<sup>a</sup> receptor gene and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30;30(6):1136-8; aug, 2006.
- LORD, C; Risi, S.; Lambrecht, L; Cook, E. H. Jr.; Leventhal, B. L.; Dilavore, P.C.; Pickles, A; Rutter, M.. The Autism Diagnostic Observation Schedule—Generic: A Standard Measure of Social and Communication Deficits Associated with the Spectrum of Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 30 (3) 205-223, november, 2004.
- MAESTRINI, E.; Lai, C.; Marlow, A.; Matthews, N.; Wallace, S.; Bailey, A.; Cook, E. H.; Weeks, D. E.; Monaco, A. P.. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* 88:492-496; 1999.
- MARTELETO, M. R.F.; Pedromônico, M.R.M.. Validity of Autism Behavior Checklist (ABC): preliminary study. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 27(04):295-301, 2005.
- MASSAT, I.; Souery, D.; Lipp, O.; Blairy, S.; Papadimitriou, G.; Dikeos, D.; Ackenheil, M.; Fuchshuber, S.; Hilger, C.; Kaneva, R.; Milanova, V.; Verheyen, G.; Raeymaekers, P.; Staner, L.; Oruc, L.; Jakovljevic, M.; Serretti, A.; Macciardi, F.; Van Broeckhoven, C.; Mendlewicz, J.. A European multicenter association study of HTR2A receptor polymorphism in bipolar affective disorder. *Am. J. Med. Genet.* 96 (2): 136–140, 2000.
- MCCAULEY, J. L.; Olson, L.M.; Dowd, M.; Amin, T.; Steele, A.; Blakely, R.D.; Folstein, S.E.; Haines, J.L.; Sutcliffe, J.S.. 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 (1), 104–112, 2004.
- MERCADANTE, M.T.; Gaag, R. J. V.; Schwartzman, J. S.. Transtornos invasivos do desenvolvimento não-autísticos: síndrome de Rett, transtorno desintegrativo da infância e transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação. *Rev. Bras. de Psiquiatr.*, 28(supl I): s 12-20, 2006.
- MILLER, M.A.; Korn, D.; Wang, T.S.. The evolutionary conservation of DNA polymerase alpha. *Nucleic Acids Res.* 25;16(16):7961-73; Aug 1988.
- MORROW, Eric M. et al. Identifying Autism Loci and Genes by Tracing Recent Shared Ancestry *Science*, vol 321, n.5886. pp 218-223. DOI:10.1126/1157657.

- MUHLE, R.; Trentacoste, S.V.; Rapin, I.. The genetics of autism. Review. *Pediatrics* 113(5):472-86; 2004.
- MULDER, E. J.; Anderson, G. M.; Kema, I. P.; Brugman, A. M.; Ketelaars, E. J.; Bildt, A.; Lang, D. J. V.; Boer, J. A. D.; Minderaa, R. B.. Serotonin transporter intron 2 polymorphism associated with rigid-compulsive behaviors in Dutch individuals with pervasive developmental disorder. *American journal of medical genetics part B: Neuropsychiatric Genetics*. 133b, 1: 93-96, jan. 2005.
- MURPHY, D.G.M.; Daly, E.; Schmitz, N.; Toal, F.; Murphy, K.; Curran, S.; Erlandsson, K.; Eersels, J.; Kerwin, R.; Ell, P.; Travis, M.. Cortical Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Binding and Social Communication in Adults With Asperger's Syndrome: An in Vivo SPECT Study. *Am J Psychiatry*. 163: 934-936, 2006.
- NICHD. Autism and Genes. Disponível em: [http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/upload/autism\\_genes\\_2005.pdf](http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/upload/autism_genes_2005.pdf) - Acesso em 24 de outubro de 2007.
- OMIM – Online Mendelian Inheritance in Men. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – Acesso em 04 de abril de 2007.
- ORABONA, Guilherme M. Identificação de genes de predisposição aos Transtornos do Espectro Autista. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 92f, São Paulo, 2007.
- O'ROAK, B. J. and STATE, M. W. Autism Genetics: Strategies, Challenges and opportunities, *Autism Research*. vol 1, pp 4-17, 2008.
- PAE, Chi-UN et al.. No evidence for interaction between 5-HTR2A receptor and serotonin transporter genes in schizophrenia. *Neuroscience Research*, vol 52 issue 2, 2005.
- PEREZ, A.B.A.; D'Almeida V; Vergani, N; De Oliveira ,A.C.; Lima, F.T., Brunoni, D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlations with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am.J.Med.Genet.* 119:20-5, 2003
- PERSICO, A. M.; Militerni, R.; Bravaccio, C.; Schneider, C.; Melmed, R.; Conciatori, M.; Damiani, V.; Baldi, A.; Keller, F.. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. *Am. J. Med. Genet.* 96: 123-127; 2000.
- PERSICO, A. M.; Pascucci, T.; Puglisi-Allegra, S.; Militerni, R.; Bravaccio, C.; Schneider, C.; Melmed, R.; Trillo, S.; Montecchi, F.; Palermo, M.; Rabinowitz, D.; Reichelt, K.L.; Conciatori, M.; Marino, R.; Keller, F.. Serotonin transporter gene promoter variants do not explain the hyperserotonemia in autistic children. *Mol. Psychiatry* 7 (7), 795–800, 2002.

- PIVEN, J.; Arndt, Stephan; Bailey, James B. S.; Andreasen, Nancy. Regional Brain Enlargement in Autism: A magnet Resonance Imaging Study. *Journal of the American academy of child & adolescent Psychiatry*. 35(4):530-536, april, 1996.
- PIVEN, J.; Tsai, G.; Nehme, E.; Coyle, J.; Chase, G.; Folstein, S.. Platelet serotonin, a possible marker for familial autism. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 45 (suppl.): A58;1989.
- PIVEN, J.; Tsai, G. C.; Nehme, E.; Coyle, J. T.; Chase, G. A.; Folstein, S. E.: Platelet serotonin, a possible marker for familial autism. *J. Autism Dev. Disord.* 21:51-59; 1991.
- POLESSKAYA, O.O.; Sokolov, B.P.. Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *J Neurosci Res.* 15;67 (6): 812-822; Mar 2002.
- REDCAY, E.; Courchesne, E.: When is the brain Enlarged in Autism? A meta analysis of all brain size Reports. *Journal boil. Psychiatry* 58: 1-9, 2005.
- RIBEIRO, Sabrina Helena Bandini. Prevalência dos transtornos invasivos do desenvolvimento no município de Atibaia: Um estudo piloto, 2007.114f. Dissertação (Mestrado em distúrbios do desenvolvimento) – Universidade presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2007.
- RITVO, E.R.; Ornitz, E.M.. Autism: diagnosis, current research and Management. Spectrum: New York, 1976.
- SATO, F. P.; Paula, C. S.; Lowenthal, R.; Nakato, E.; Brunoni, D.; Schwartzman, J.S.; Mercadante, M.T.. Validation of the Social Communication Questionnaire to Portuguese language: a screening instrument for Pervasive Developmental Disorders. In press, 2008.
- SEBAT, Jonathan et al. Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science*, vol 316, n.5823 pp 445-449, 20 de april de 2007.
- SCHWANKE, C.H.A.; Bittencourt, L.; Noronha, J.A.P.; Augustin, S.A.J.; Jung, I.E.; Cruz, I.B.M. Is there an association between T102C polymorphism of the serotonin receptor 2A gene and urinary incontinence? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 40: 1315-1322, 2007. ISSN 0100-879X
- SCOTT, M.; Deneris, E.S. Making and breaking serotonin neurons and autism. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 23: 277-285, 2005.
- SHAIKH, S.A.; Strauss, J.; King, N.; Bulgin, N. L.; Vetro, A.; Kiss, E.; George, C. J.; Kovacs, M.; Barr, C. L.; Kennedy, J. L.; THE INTERNATIONAL CONSORTIUM FOR CHILDHOOD-ONSET MOOD DISORDERS.



- Association study of serotonin system genes in childhood-onset mood disorder. *Psychiatric Genetics*. 18(2):47-52, 2008.
- SHINKAI, T.; Ohmori, Osamu; Kojima, H.; Terao, T.; Suzuki, T.; Abe, K. Negative Association between T102C Polymorphism of the 5HT2A Receptor Gene and Schizophrenia in Japan. *Human Heredity*, 48: 212-215, 1998.
- SMALLEY, S.L.; McCracken J.; Tangray P. Autism Affective Disorders and social folbia. *Am. J. Med. Genet.* 60:19-26.
- SPARKES, R.S.; Lan, N.; Klisak, I.; Mohandas, T.; Diep, A.; Kojis, T.; Heinzmann, C.; Shih, J. C.. Assignment of a serotonin 5HT-2 receptor gene (HTR2) to human chromosome 13q14-q21 and mouse chromosome 14. *Genomics*. 9(3):461-5, March 1991.
- STONE, W.L.; Hogan, K.L.. A structured parent interview for identifying young children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. Vol.23 (4): 639-652, january, 2005.
- SUGIE, Y.; Sugie, H.; Fukuda, T.; Ito, M.; Ohzeki, T. Studies on the adverse effects of fluvoxamine treatment in children with autistic disorder: correlation with genetic polymorphism in serotonin related genes. *No to Hattatssu*. 35(3) 233-237, 2003.
- SUGIE, Y.; Sugie, H.; Fukuda, T.; Ito, M.; Sasada, Y.; Nakabayashi, M.; Fukashiro, K.; Ohzeki, T. Clinical efficacy of fluvoxamine and functional polymorphism in serotonin transporter gene on childhood autism. *J. Autism Dev. Disord.* 35(3), 377-385, 2005.
- SYKES, Nuala H.; LAMB, Janine A.. Autism: the quest for the genes. *Expert reviews in molecular medicine*, vol.9(24), September 2007.
- TANG, H.; Quertermous, T.; Rodriguez, B.; Kardia, S. L. R.; Zhu, X.; Brown, A.; Pankow, J. S.; Province, M. A.; Hunt, S. C.; Boerwinkle, E.; Schork, N. J.; Risch, N. J.. Genetic Structure, Self-Identified Race/Ethnicity, and Confounding in Case-Control Association Studies. *Am. J. Genet.*, 78:268-275, 2005.
- THE AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genet.* 39:319–328, 2007.
- TREVIZAN, Fabiane. Polimorfismo T102C do gene receptor 2A da serotonina: pesquisa em indivíduos da população e relação com os Transtornos Invasivos do desenvolvimento. 2006. 108f. Dissertação (Mestrado em distúrbios do Desenvolvimento) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2006.
- TRIKALINOS, T. A.; Karvouni, A.; Zintzaras, E.; Ylisaukko-oja, T.; Peltonen, L.; Jarvela, I.; Ioannidis, J.P.A.. A heterogeneity-based genome search meta-analysis for autism-spectrum disorders. *Mol. Psychiatry*, (11) 29-36, 2006.

- VEENSTRA-WANDERWELLE, J.; Anderson, George M.; Cook Jr.; Edwin H.; Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and Future directions. *European Journal of Pharmacology*, 410,165-181 ;2000.
- VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; Kim, S.J.; Lord, C.; Courchesne, R.; Akshoomoff, N.; Leventhal, B. L.; Courchesne, E.; Cook, E. H.. Transmission disequilibrium studies of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene (HTR<sub>2A</sub>) in autism. *Am. J. Med. Genet.* 114 (3): 277–283, 2002.
- VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; Christian, S.L.; Cook E.H.Jr.. Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. Review. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 5:379-405, 2004.
- VERGANI, N. Análise da frequência de mutações nos genes cistationina beta-sintase, metionina sintase e metionina sintase redutase em amostra de pacientes com defeitos de fechamento do tubo neural. *Dissertação de Mestrado*. UNIFESP, 2002.
- VORTSMAN, JAS; Staal W.G.; Daalen Evan; Engeland H. Van; Hochstenbach P.F.R.; Franke L. Identification of novel Autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism – *Molecular Psychiatry* (11) 18-28, 2006.
- VOLKMAR, F.R.; Pauls, D.. Autism. *Lancet*. 2003 Oct 4;362(9390):1133-41. Review. Erratum in: *Lancet*. 17;363(9404):250, Jan 2004.
- WARREN, J.T. Jr.; Peacock, M.L.; Rodriguez, L.C.; Fink, J.K.. An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (HTR<sub>2</sub>): detection by DGGE and RFLP analysis. *Hum Mol Genet.* 2(3):338, Mar 1993.
- WASSINK, T.H.; Sutcliffe, James S.; Vieland, Veronica J. Piven, Joseph. The molecular and cellular genetics of autism *Neuropsychopharmacology the first generation of progress* 549-563, 2002.
- WASSINK, T.H.; Piven, J.; Vieland, V.J.; Huang, J.; Swiderski, R.E.; Pietila, J.; Braun, T.; Beck, G.; Folstein, S.E.; Haines, J.L.; Sheffield, V.C.. Evidence supporting WNT2 as an autism susceptibility gene. *Am. J. Med Genet.* 8;105(5):406-413, Jul 2001.
- WEISS, Lauren A. et al.. Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. *New England Journal of Medicine.* 358, 667-675, 2008.
- WHITAKER-AZMITIA, P.. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull.* 56:479-85, 2001.

- WILLIAMS, J.; Spurlock, G.; McGuffin, P.; Mallet, J.; Nöthen, M.M.; Gill, M.; Aschauer, H.; Nylander, P.O.; Macciardi, F.; Owen, M.J.. Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group. *Lancet*. 347(9011):1274-1276. May, 1996.
- WILLIAMS, J.; McGuffin, P.; Nothen, M.; Owen, M.J.. Meta-analysis of association between the 5-HT<sub>2a</sub> receptor T102C polymorphism and schizophrenia. EMASS Collaborative Group. European Multicentre Association Study of Schizophrenia. *Lancet* 349: 1221, 1997.
- WURTMAN, R.J.. Genes, stress, and depression. *J. Metabolism*. Review.54(5): 16-19, may 2005.
- YOON, Ho-Kyoung; Yang, J.; Lee, H.; Kim, Y. The association between serotonin-related gene polymorphisms and panic disorder. *J. Anxiety Disord*, 2008.
- YU, B. N. et al. T102C Genetic Polymorphism of the 5-HTR<sub>2A</sub> receptor in Chinese hypertensive patients and healthy controls. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 31(12): 847-9, 2004.
- ZAPPELLINI, Eda Maria Scur. Aspectos relevantes para formação do estudante de nutrição: a dietoterapia na neurotransmissão. 2002. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- ZALSMAN, G. et al. Family-based association study of 5HT<sub>2A</sub> receptor T102C polymorphism and suicidal behavior in Ashkenazi in patient adolescents. *Int. J. Adolesc Med Health*. 17(3): 231-238, 2005.
- ZHANG, X. N.; Jiang, S. D.; He, X. H.; Zhang, L.N.. 102T/C SNP in the 5-hydroxytryptamine receptor 2A (HTR<sub>2A</sub>) gene and schizophrenia in two southern Han Chinese populations: lack of association. *Am. J. Med. Genet., Part B Neuropsychiatr. Genet*. 126 (10):16–18, 2004.
- ZILBOVICIUS, M.; Meresse, I.; Boddaert, N. Autismo: neuroimagem. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 28(supl I): s21-28,2006.
- ZHONG,H.; Ye , L.; Ju, W.; Tsiouis, J.; Cohen, I.. 5HTTLPR variants not associated with autistic spectrum disorders. *Neurogenetics*.2(2):129-31,1999.

## ANEXO A

### ASQ Questionário de Comportamento e Comunicação Social\*

		Sim	Não
<b>1</b>	Ele é capaz de conversar usando frases curtas ou sentenças?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<b><u>Se não, prossiga para questão 9.</u></b>		
<b>2</b>	Ele fala com você só para ser simpático (mais do que para ganhar algo)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>3</b>	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)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>4</b>	Ele costuma usar 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?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>5</b>	Ele costuma usar socialmente perguntas inapropriadas ou declarações? Por exemplo, ele costuma fazer perguntas pessoais ou comentários em momentos inadequados?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>6</b>	Ele costuma usar os pronomes de forma invertida, dizendo você ou ele quando deveria usar eu?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>7</b>	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.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>8</b>	Ele costuma dizer a mesma coisa repetidamente, exatamente da mesma maneira, ou insiste para você dizer as mesmas coisas muitas vezes?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>9</b>	Existem coisas que são feitas por ele de maneira muito particular ou em determinada ordem, ou seguindo rituais que ele te obriga a fazer? Por exemplo, sempre do mesmo jeito?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>10</b>	Até onde você percebe, a expressão facial dele geralmente parece apropriada à situação particular? Por exemplo, demonstra felicidade ou tristeza no rosto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>11</b>	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)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

		Sim	Não
12	Ele costuma ter interesses especiais por objetos que parecem esquisitos a outras pessoas (por exemplo, semáforos, ralos de pia ou itinerários de ônibus)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13	Ele costuma se interessar mais por partes específicas de um objeto ou brinquedo (por exemplo, girar as rodas de um carro) mais do que usá-lo com sua função original?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14	Ele costuma ter interesses específicos, apropriados para sua idade e para seu grupo de colegas, porém estranhos pela intensidade exagerada do interesse (por exemplo, conhecer todos os tipos de trens, conhecer muitos detalhes sobre dinossauros)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15	Ele costuma de maneira estranha olhar, sentir/examinar, escutar, provar ou cheirar coisas ou pessoas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16	Ele costuma ter maneirismos, manias com as mãos, ou jeitos estranhos de mover suas mãos ou dedos, tal como “um bater de asas” ( <i>flapping</i> ), ou mover seus dedos na frente dos seus olhos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17	Ele costuma fazer moviemntos complexos (e esquisitos) com o corpo inteiro, tal como girar, pular ou balançar repetidamente para fernte e para trás?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18	Ele costuma machucar-se de propósito, por exemplo, mordendo o braço ou batendo a cabeça?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19	Ele tem algum objeto (que não um brinquedo macio ou cobertor) que ele carrega por toda parte?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20	Ele tem algum amigo em particular ou um melhor amigo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
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)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
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)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23	Quando ele tinha 4-5 anos ele costuma usar gestos para mostrar o que ele queria (não considere se ele usava a tua mão para apontar o que ele queria) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24	Quando ele tinha 4-5 anos usava a cabeça para dizer sim?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		Sim	Não
25	Quando ele tinha 4-5 anos sacudia a cabeça para dizer ‘não’?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- 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? Como por exemplo, alguma brincadeira
- 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 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 para 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 para 5 anos jogava jogos imaginários ou brincava de “faz de conta”?
- 36 Quando ele estava com 4 para 5 anos parecia interessado em outras crianças da mesma idade que ele não conhecia?
- 37 Quando ele estava com 4 para 5 anos reagia positivamente quando outra criança aproximava-se dele?
- 38 Quando ele estava com 4 para 5 anos, se você entrasse no quarto e iniciasse uma conversa com ele sem chamar seu nome, ele usualmente te olhava e prestava atenção em você?
- 39 Quando ele estava com 4 para 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 4-5 anos brincava cooperativamente em jogos de grupo, tal como esconde-esconde e jogos de bola?

## ANEXO B

## ABC

		ES	RE	CO	LG	PS
01	Gira em torno de si por longo período de tempo			4		
02	Aprende uma tarefa, mas esquece rapidamente					2
03	É raro atender estímulo não-verbal social/ambiente (expressões, gestos, situações)		4			
04	Ausência de resposta para solicitações verbais - venha cá; sente-se				1	
05	Usa brinquedos inapropriadamente			2		
06	Pobre uso da discriminação visual (fixa uma característica objeto)	2				
07	Ausência do sorriso social		2			
08	Uso inadequado de pronomes ( eu por ele)				3	
09	Insiste em manter certos objetos consigo			3		
10	Parece não escutar ( suspeita-se de perda de audição)	3				
11	Fala monótona e sem ritmo				4	
12	Balança-se por longos períodos de tempo			4		
13	Não estende o braço para ser pego (nem o fez quando bebê)		2			
14	Fortes reações frente a mudanças no ambiente					3
15	Ausência de atenção ao seu nome quando entre 2 outras crianças				2	
16	Corre interrompendo com giros em torno de si, balanceio de mãos			4		
17	Ausência de resposta para expressão facial/sentimento de outros		3			
18	Raramente usa "sim" ou "eu"				2	
19	Possui habilidade numa área do desenvolvimento					4
20	Ausência de respostas a solicitações verbal envolvendo o uso de referenciais de espaço				1	
21	Reação de sobressalto a som intenso (suspeita de surdez)	3				
22	Balança as mãos			4		
23	Intensos acessos de raiva e/ou frequentes "chiliques"					3
24	Evita ativamente o contato visual		4			
25	Resiste ao toque / ao ser pego / ao carinho		4			
26	Não reage a estímulos dolorosos	3				
27	Difícil e rígido no colo (ou foi quando bebê)		3			
28	Flácido quando no colo		2			
29	Aponta para indicar objeto desejado				2	
30	Anda nas pontas dos pés			2		
31	Machuca outros mordendo, batendo, etc					2
32	Repete a mesma frase muitas vezes				3	
33	Ausência de imitação de brincadeiras de outras crianças		3			
34	Ausência de reação do piscar quando luz forte incide em seus olhos	1				
35	Machuca-se mordendo, batendo a cabeça, etc			2		
36	Não espera para ser atendido (quer as coisas imediatamente)					2
37	Não aponta para mais que cinco objetos				1	
38	Dificuldade de fazer amigos		4			
39	Tapa as orelhas para vários sons	4				
40	Gira, bate objetos muitas vezes			4		
41	Dificuldade para o treino de toalete					1
42	Usa de 0 a 5 palavras/dia para indicar necessidades e o que quer				2	
43	Frequentemente muito ansioso ou medroso		3			
44	Franze, cobre ou virar os olhos quando em presença de luz natural	3				
45	Não se veste sem ajuda					1
46	Repete constantemente as mesmas palavras e/ou sons				3	
47	"Olha através" das pessoas		4			
48	Repete perguntas e frases ditas por outras pessoas				4	
49	Frequentemente inconsciente dos perigos de situações e do ambiente					2
50	Prefere manipular e ocupar-se com objetos inanimados					4
51	Toca, cheira ou lambe objetos do ambiente			3		
52	Frequentemente não reage visualmente à presença de novas pessoas	3				
53	Repete seqüências de comportamentos complicados (cobrir coisas, por ex.)			4		
54	Destrutivo com seus brinquedos e coisas da família			2		
55	O atraso no desenvolvimento identificado antes dos 30 meses					1
56	Usa mais que 15 e menos que 30 frases diárias para comunicar-se				3	
57	Olha fixamente o ambiente por longos períodos de tempo	4				