

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE**

TÍTULO

Estudo de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento

Pesquisadores

Ana Paula Pimentel Costa¹; Andrew Thomaz⁴, Luiz Fernando Morata⁴, Clayton R. Tavares⁴, Juliana Pachioni⁴, Livia Zaquieu da Conceição³, Décio Brunoni²

1 Professora Doutora do CCBS- UPM, líder do projeto

2 Professor Doutor, pós-graduação Programa Distúrbios do Desenvolvimento do CCBS / UPM, colaborador do projeto

3 Aluna de pós-graduação, Programa Distúrbios do Desenvolvimento / UPM

4 Aluno de graduação, Curso de Ciências Biológicas/ Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UPM

Estudo de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento

Resumo do projeto inicial

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID), também denominados transtornos globais do desenvolvimento, constituem um grupo caracterizado por alterações presentes desde idades precoces e que se manifestam nas áreas de desenvolvimento da comunicação, comportamento e relação interpessoal. Essas alterações são constatadas quando há atraso em relação ao esperado para uma determinada idade ou estágio de desenvolvimento da criança. Composto tal grupo temos: o transtorno autista, o transtorno de Asperger, a síndrome de Rett, o transtorno desintegrativo infantil e transtornos invasivos do desenvolvimento não especificados de outra forma. (DSM IV, 1995).

O autismo é um transtorno invasivo do desenvolvimento que prejudica a interação social, a comunicação e o comportamento do indivíduo. Pacientes autistas apresentam dificuldades na comunicação e interação social e/ou comportamentos repetitivos e estereotipados (LEVY, MANDELL, SCHULTZ, 2009). Do ponto de vista clínico, o autismo apresenta um quadro altamente variado. Têm sido descritos tanto autistas clássicos, com ausência de comunicação verbal e deficiência mental grave, quanto autistas com sociabilidade comprometida, que apresentam habilidades verbais e inteligência normal (KELLER *et al.*, 2003). O autismo é a manifestação mais severa do espectro de distúrbios conhecidos como Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID).

O autismo apresenta um forte componente genético e há muito se avalia que os genes desempenham um papel central na fisiopatologia do autismo e de suas condições relacionadas. Ainda não se sabe a identidade e o número de genes envolvidos com o autismo. Um estudo realizado por Pickles *et al.* (1995) indicou que pelo menos 3 a 10 genes devam estar relacionados ao aparecimento do transtorno, enquanto outros autores sugerem um número maior de genes responsáveis pelo estabelecimento do autismo (RISCH *et al.*, 1999). A relevância desses genes na origem do autismo é determinada pelo uso de métodos experimentais para estimar a atividade biológica, expressão e associações alélicas nas populações com autismo e em suas famílias. O intuito dessas pesquisas é obter uma evidência genética que suporte a relação de certos polimorfismos com a suscetibilidade ao autismo.

As relações entre polimorfismos de DNA e as diferenças fenotípicas humanas, como a suscetibilidade a doenças, ainda são pouco compreendidas. Deste modo, uma busca extensiva sobre as influências genéticas nas doenças complexas deveria envolver o exame de todos os polimorfismos genéticos em um grande número de indivíduos afetados e controles. Isto seria eventualmente possível através de um resequenciamento completo do genoma, o que ainda é uma prática pouco acessível e dispendiosa. Contudo, é possível estudar de forma sistemática, utilizando técnicas usuais de biologia molecular, variantes genéticas ou polimorfismos associados a doenças genéticas (CLAYTON et al, 2005; ROPERS, 2007).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo o estudo de polimorfismos de DNA associados aos TID, tendo como base a detecção e análise da frequência de polimorfismos de genes candidatos em amostras de DNA de sujeitos afetados e controles oriundos da nossa população. É sabido que a população brasileira constitui um dos grupos mais heterogêneos do mundo, como resultado de cruzamentos interétnicos entre europeus, africanos, ameríndios e asiáticos (ALVES-SILVA *et al*, 2000). Há pouquíssimos dados sobre esse tipo de estudo na população brasileira, o que evidencia a importância de um estudo nessa área. Além disso, nossos dados serão importante fonte de comparação com trabalhos já realizados com populações européias, africanas e asiáticas. Estes polimorfismos podem explicar muito da nossa diversidade genética e trazer subsídios importantes para a melhor compreensão do tema e das pesquisas desenvolvidas na área.

Aqui estão apresentados os resultados iniciais da investigação de variantes de três polimorfismos funcionais do gene SLC6A4. Nossas análises englobaram indivíduos portadores de transtorno invasivo do desenvolvimento, e grupo controle, oriundos da população brasileira. Este é um levantamento inicial de dados visando analisar as variantes polimórficas deste gene e suas possíveis relações com endofenótipos comportamentais do TID e grau de suscetibilidade ao autismo.

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 profunda e severa 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 (KLIM, 2006).

O autismo é a manifestação mais severa dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID). O Autismo é uma Síndrome comportamental associada 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 deficiência do desenvolvimento porque começa antes dos três anos de vida, ocasionando 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, onde um grupo de desordens com características semelhantes atuam, e que pode variar de indivíduos extremamente comprometidos até um acometimento considerado dentro de um padrão superdotado (KLIM, 2006; NICHD, 2005).

As manifestações neurológicas apresentadas pelos pacientes autistas sugerem maior contribuição de componentes genéticos do que de fatores ambientais na etiologia da doença (BAILEY *et al.*, 1995; LAURITSEN and EWALD, 2001; RUTTER, 2000), Uma evidência da presença de um importante componente genético na etiologia do autismo foi obtida através de estudos de concordância em gêmeos, nos quais pelo menos um dos membros de um par era afetado (BAILEY *et al.*, 1995). A alta concordância entre gêmeos monozigóticos observada nesses estudos indica a

grande importância de um componente genético na gênese do autismo e a baixa concordância em gêmeos dizigóticos, sugere um modelo de herança poligênico ou multifatorial para a doença (CARVALHEIRA *et al.*, 2004; COOK *et al.* 1997).

A etiologia do autismo é pouco compreendida tanto no nível celular quanto no molecular. As abordagens genéticas para o entendimento do autismo visam a identificação de variantes de risco em genes específicos, e através destas começar a desvendar os mecanismos biológicos envolvidos na sua etiologia. Ainda não se sabe a identidade e o número de genes envolvidos com o autismo. Existem por volta de 13 estudos publicados de triagens genômicas sobre o espectro autista (IMGSAC, 1998; BARRETT *et al.*, 1999; PHILIPPE *et al.*, 1999; BUXBAUMET *et al.*, 2001; IMGSAC, 2001; LIU *et al.*, 2001; AURANEN *et al.*, 2002; SHAO *et al.*, 2002; YONAN *et al.*, 2003; BUXBAUM *et al.*, 2004; YLISAUKKOOJA *et al.*, 2004; MCCAULEY *et al.*, 2005, THE AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2007). Evidências sobre a localização dos possíveis genes candidatos podem ser encontrados em diversas regiões ao longo do genoma, mais especificamente nas regiões 2q, 7q, 11p e 17q.

Muitos estudos analisam polimorfismos de genes candidatos aos TID, particularmente relacionados ao transtorno autista (SYKES e LAMB, 2007; CHOO *et al.*, 2007; HRANILOVI *et al.*, 2008). Devido à presunção óbvia pela qual, variantes alélicas poderiam redundar em proteínas funcionalmente diferentes houve a realização de inúmeros experimentos na esperança de estabelecer associações positivas com um ou outro alelo e o espectro autista.

Uma categoria de genes que vem recebendo muita atenção engloba os genes responsáveis pela codificação das proteínas envolvidas no metabolismo do neurotransmissor cerebral serotonina (COOK e LEVENTAL, 1996). O interesse nestes genes deve-se as primeiras descobertas de hiperserotonemia em aproximadamente 30% dos indivíduos autistas (SCHAIN e FREEDMAN, 1961). Assim mutações em genes importantes para a função do sistema serotoninérgico, têm sido alvos de muitos estudos. A serotonina é essencial durante o desenvolvimento e se alterada pode contribuir para as anomalias estruturais no cérebro e para as características centrais de comportamento encontradas em autistas (ANDERSON, 2002). Whitaker-Azimitia (2001) relata que a serotonina trabalha na regulação do desenvolvimento cerebral antes de ser um neurotransmissor no cérebro maduro, e que o seu aumento durante o desenvolvimento é a causa provável 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. É devido a estas alterações e as 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 genes que codificam seus receptores (5-HTRs).

O gene do transportador da serotonina (SLC6A4) é um dos maiores moduladores da neurotransmissão serotoninérgica. O gene SLC6A4 está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q11.2) e contém 14 éxons compreendendo mais de 35 kb, com seus dois primeiros exons (1a e 1b) sendo alternativamente transcritos. Evidências tem sido encontradas entre o autismo e marcadores cobrindo a região 17q11.2 e o gene SLC6A4 (IMGSAC 2001; Cantor *et al* 2005; McCauley *et al* 2004; Stone *et al* 2004; Sutcliffe *et al* 2005; Yonan *et al* 2003). Porém não foram encontradas de forma consistente mutações diretamente relacionadas com o autismo. Por outro lado, diferentes estudos sugerem associações entre o autismo e diferentes polimorfismos no gene SLC6A4. São três os polimorfismos mais extensivamente estudados dentro deste gene, a inserção-deleção de 44 pares de base na região promotora do gene, as VNTR (número variável de repetições em tandem) no intron 2 (12, 10 ou 9 repetições), e polimorfismos de base única (SNP) (Cook *et al* 1997; Conroy *et al* 2004; Coutinho *et al* 2004; Kim *et al* 2002; Klauck *et al* 1997; McCauley *et al* 2004; Maestrini *et al* 1999; Mulder *et al* 2005; Persico *et al* 2002; Tordjman *et al* 2001; Yirmiya *et al* 2001, Devlin, 2005, Brune *et al*, 2006, Longo *et al*, 2009).

Foi demonstrada que a variante longa do promotor era responsável por um aumento na eficiência da transcrição e uma maior taxa de recaptção da serotonina, em contraste com o alelo curto (LESCH *et al*, 1996; GREENBERG *et al*, 1999; NOBILE *et al*, 1999). O alelo com 12 repetições é a variante mais comum das VNTR e foi observada uma maior expressão em tecido cerebral embrionário em ratos (MACKENZIE *et al*, 1999). Em outros trabalhos foi descrita uma transmissão preferencial da variante longa do promotor relacionada com o autismo (KLAUCK *et al* 1997, YIRMIYA *et al* 2001). O estudo de Tordjman *et al* (2001) descreveu a transmissão da variante curta do promotor em indivíduos severamente comprometidos, e também encontrou evidência da transmissão da variante longa dentro do grupo geral analisado. Cook *et al* (1997) encontraram evidência do aumento da transmissão da variante curta em 86 trios autísticos. Em contraste existem vários trabalhos que não encontraram evidências da associação tanto da variante

curta ou longa (MAESTRINI et al 1999, PERSICO et al 2002, BETANCUR et al, 2002, KIM et al, 2005).

Apesar de associações entre os transtornos do espectro autista (ASD) e o 5-HTTLPR (DEVLIN 2005; MUHLE, 2006; CHO et al, 2007), muitos resultados ainda são contraditórios ou inconclusivos. Muitos destes estudos têm uma amostra de tamanho reduzido ou restrita a um grupo étnico específico para que seja rejeitada ou confirmada definitivamente a hipótese da associação (RAMOZ, 2006). Assim é importante a realização de novos estudos onde com uma amostragem maior de diferentes grupos étnicos, pois o acúmulo de informações sobre o trará importantes subsídios para a melhor compreensão do tema. Neste ponto um estudo com a população brasileira notadamente miscigenada mostra-se extremamente vantajoso, além do que se deve levar em conta que poucos destes estudos foram levados a efeito em amostras de famílias brasileiras.

Objetivos

Estudar variantes polimórficas do gene transportador serotonina em indivíduos portadores de transtorno invasivo do desenvolvimento e em controles, oriundos da população brasileira. Determinar a frequência dos alelos longo e curto do gene transportador da serotonina, do polimorfismo de inserção de VNTR do intron 2, do polimorfismo da 3'UTR em indivíduos portadores de transtorno invasivo do desenvolvimento e em controles. Verificar a hipótese de associação preferencial de um dos alelos do gene transportador da serotonina e do polimorfismo de VNTR, e da 3'UTR nos sujeitos com TID.

Metodologia

Casuística

Os sujeitos com TID foram averiguados a partir da Clínica de Atendimento TID-Mack, mantida pelo Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Presbiteriana Mackenzie (São Paulo, SP). Também foram averiguados sujeitos com TID a partir da clínica de atendimento da AVAPE (Associação para Valorização e Promoção dos Excepcionais) de São Bernardo do Campo. Todos os pacientes foram submetidos aos mesmos instrumentos e critérios de diagnóstico baseados no DSM-IV e CID-10. Em (MARTELETO E PEDREMÔNICO, 2005). Todos os indivíduos com TID foram aplicados 2 questionários de triagem para o espectro do autismo, o ASQ - Autism Screening Questionnaire (BERUMENT et al, 1999) e o ABC- Autism Behavior Checklist Estes instrumentos exploram as diversas áreas de dificuldades que os indivíduos com TID apresentam: na comunicação, interação social e comportamentos repetitivos e estereotipados.

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. Pacientes com TID, com quaisquer comorbidades de etiologia conhecida associada foram excluídos.

Este trabalho analisou, até o momento, o sangue de 50 crianças diagnosticadas com TID e sem nenhuma comorbidade associada, e de seus pais biológicos. Nossa população controle consiste, de indivíduos normais da população presente na Universidade Presbiteriana Mackenzie (alunos e funcionários). Até o momento foram coletadas 111 amostras sanguíneas de uma população controle representativa da população atendida na clínica TID-Mack e AVAPE. 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 antecedente racial branco os indivíduos sem evidencia de antecedente racial negro e/ou indígena e/ou oriental e como não-branco os indivíduos que apresentassem evidencia de qualquer um destes antecedentes raciais (DA SILVA ET AL, 2005).

A autorização para o estudo genético de cada paciente foi realizada após entrevista com os pais ou responsável, na qual foram expostas as informações sobre o trabalho, seguidas do preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido. Após o consentimento, foram colhidas amostras de sangue periférico, dos pacientes e controles, para a extração de DNA genômico e triagem das mutações do gene em estudo.

A presente pesquisa foi amparada pelo parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UPM do projeto SISNEP número 1166405.

Extração de DNA

A extração de DNAg foi realizada após a coleta por punção venosa de 5ml de sangue periférico, segundo a técnica descrita por MILLER et al. (1988). As amostra de DNA obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7% para quantificação utilizando marcadores de concentração (λ DNA, Invitrogen).

Análise de polimorfismos no gene (SLC6A4) do transportador da Serotonina

O gene transportador da serotonina possui 14 éxons (Lesch et. al., 1994). Foi detectado um polimorfismo localizado a aproximadamente 1 kb a montante do sítio iniciador da transcrição do SLC6A4, composto por 16 elementos repetidos. O polimorfismo consiste numa inserção (ins) – configurando o alelo longo - ou deleção (del) – configurando o alelo curto- de 44 pares de bases envolvendo os elementos repetidos 6 a 8. Este polimorfismo foi designado como 5-HTTLPR por LESCH (1996). Foi pesquisado portanto o polimorfismo SLC6A4, 44bp ins ou del.

A amplificação das variantes curta (484 bp) e longa (528 bp) do 5-HTTLPR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos stpr5, (correspondendo aos nucleotídeos – 1416 a –1397) com a seqüência (5-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3), e stpr3,(

correspondendo aos nucleotídeos -910 a -888) com a seqüência 5-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3, como previamente descrito Lesch (1996). Para avaliação do polimorfismo do número de VNTR no intron 2 do gene também foi utilizada a amplificação por PCR com os iniciadores HTT 2X (5'-TGGATTTCTTCTCTCAGTGATTG-3') e HTT2Y (5'-TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG -3'). O tamanho dos produtos amplificados permite identificar o número de cópias das VNTR: 390bp (12 cópias), 360 bp (10 cópias) ou 345bp (9 cópias), segundo COOK e LEVENTHAL (1996).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 30 µl contendo 20-100ng de DNA, 100 mM dNTPs, 0.1 mg de cada iniciador, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.6, 50 mM KCl, 0.2% (w/v) bovine serum albumin, 5% DMSO e 0.5 U Taq polymerase. Desnaturação inicial 95°C por 3 min, seguido por dois ciclos a 95°C (30 s), 63°C (30 s) e 72°C (1 min), dois ciclos com temperatura de anelamento de 62°C (30 s) e 35 ciclos com temperatura de anelamento de 61°C (30 s), com extensão (72°C) final de 10 min

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 3% para visualização dos alelos polimórficos.

A análise do polimorfismo da região 3'UTR do gene SLC6A4 foi realizada através de amplificação por PCR segundo Conroy et al (2004). Variantes polimórficas da região 3'UTR, foram amplificadas através de primers que flanqueiam o local (Senso(5'→3'): 5'CCG CTT GAA TGC TGT GTA ACA CAC- 3', Anti-senso (3'→ 5'): 5'- GTA CCC TTC CAA TAA TAA CCT CC - 3') e geram fragmentos de 714 pares de bases

Após a amplificação, os fragmentos foram submetidos a digestão enzimática utilizando a enzima *MseI* (Promega). Na presença do alelo normal (G), um sítio de restrição é abolido e os fragmentos amplificados permanecem com 741 pb. Na presença do alelo mutado T, o sítio de restrição é reconhecido, gerando fragmentos de 689 pb e 52 pb.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 60-100 ng de DNA, 100 mM dNTPs, 0.1 mg de cada iniciador, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.6, 50 mM KCl, 0.2% (w/v) bovine serum albumin, 5% DMSO e 0.5 U Taq polymerase. Desnaturação inicial 95°C por 3 min, seguido por dois ciclos a 95°C (30 s), 63°C (30 s) e 72°C (1 min), dois ciclos com temperatura de anelamento de 62°C

(30 s) e 35 ciclos com temperatura de anelamento de 56°C (30 s), com extensão final de 10 min a 72°C. O produto da amplificação (fragmentos de 741pb) será submetido à digestão pela enzima de restrição *Mse I*, a 37°C, por 4h, segundo as instruções do fabricante (Promega).

Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos alelos polimórficos.

Análise dos resultados

Freqüências alélicas foram estimadas por contagem direta. A distribuição dos genótipos e freqüências alélicas nas amostras controles e pacientes foram comparadas através do teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%. As distribuições gênicas e genotípicas foram calculadas para testar se as proporções estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Resultados e discussão

1-Amostra de indivíduos

Por motivos de força maior, não foi possível obter o número de pacientes esperado para a análise, conforme inicialmente programado. Aqui foram analisados o DNA de 50 portadores de Transtornos invasivos do desenvolvimento (TID) distribuídos com idades entre 3 e 40 anos (media de $11,84 \pm 6,96$ anos) sendo que 75% da amostra apresentava idade de até 14 anos. Os tipos de TID diagnosticados foram: Autismo infantil ou Atípico (15 indivíduos), Síndrome de Asperger (11 indivíduos), tipo não especificado (1 indivíduo), e os demais com TID sem outra especificação (TID-NE). Apenas 5 sujeitos são do sexo feminino. Foram analisados também o DNA dos pais biológicos dos portadores de TID.

A todos os indivíduos com TID foram aplicados 2 questionários de triagem para o espectro do autismo, o ASQ e o ABC. 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 (tabela 1).

Tabela 1: Significado da pontuação dos instrumentos ASQ e ABC

ASQ	Normal	0-14	ABC	Normal	<49
	TID	15-21		Leve probabilidade	47-53
Autista	>21	Moderada probabilidade	54-67		
		Autismo	>68		

Tabela 2 – Identificação dos indivíduos com TID, diagnóstico, sexo, idade e pontuações no ASQ e ABC

Identificação	Idade	sexo	Pontuação ASQ	Pontuação ABC	Diagnostico clinico
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	14	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	M	27	106	TID-NE
28	10	F	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

Cont.Tabela 2

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

A amostra foi analisada com relação a distribuição dos pacientes por gênero sexual e comparados aos controles, conforme observado na tabela abaixo:

Tabela 3: Distribuição de pacientes e controles por gênero sexual

	Masculino		Feminino		Total	
	N	%	N	%	N	%
Casos	45	90	5	10	50	100
Controles	44	39,6	67	60,4	111	100
Total	89	55,3	72	44,7	161	100

Na literatura é descrita a predominância do sexo masculino sobre o feminino em TID, aqui obtivemos uma proporção de 9 meninos para cada menina, apesar de, a quantidade de indivíduos do sexo masculino ser bem mais expressiva do que o esperado (4:1), essa distorção, provavelmente deve-se ao tamanho reduzido da nossa amostra (CARAVALHEIRA *et al*, 2004; COOK *et al*, 1997; CHO *et al*, 2007). Wing (2002), ao estudar a prevalência do gênero sexual no autismo, propôs 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 diferentes em relação ao gênero.

Devemos ressaltar também que em nossa amostra, há uma sobre-representação de indivíduos com síndrome de Asperger (22,45%), pois como tem melhor rendimento, freqüentam a Instituição AVAPE para capacitação profissional.

Sabe-se que neste grupo de indivíduos a razão sexual aproxima-se de 9 homens para 1 mulher.

A amostra foi analisada com relação a distribuição dos pacientes por antecedentes raciais brancos e não-brancos e comparados aos controles, conforme observado na tabela abaixo:

Tabela 4: 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	69	62,1	42	37,9	0	0	111	100
Total	90	55,9	68	42,24	3	1,86	161	100

Podemos observar diferença quanto a distribuição de casos e controles por antecedentes raciais, onde nos casos temos 42% de brancos contra 62,1% nos controles e de 52% de não-brancos contra 37,9% nos controles.

Os índices encontrados em nossa população controle, até agora, refletem os dados da população brasileira, segundo dados do censo feito pelo IBGE (2006), onde 56,5% da população declaram-se branca e 43,6% não-branca. Cabe ressaltar também que a nossa população controle foi composta de majoritariamente de alunos da Universidade Presbiteriana Mackenzie, com uma maioria de pessoas com antecedentes raciais branco.

Dois pontos devem ser ressaltados: primeiro, em estudos tipo caso-controle, é necessário que as amostras do grupo controle sejam similares quanto a distribuição dos antecedentes raciais e gênero aos pacientes estudados. As freqüências alélicas podem variar entre os indivíduos do sexo masculino e feminino, assim como entre os diferentes grupos étnicos. Segundo, a população brasileira reflete o resultado de cinco séculos de miscigenação entre povos de quase todos os continentes (europeus, africanos e asiáticos), bem como de ameríndios autóctones, compondo uma das mais heterogêneas populações do mundo (CARVALHO-SILVA *et al*, 2001). É interessante

também ter uma representação equitativa dos grandes grupos raciais que compõem a população brasileira. Há pouquíssimos dados sobre a frequência dos polimorfismos genéticos aqui estudados com a nossa população. Assim, a coleta de novos casos tanto como de controles terá prosseguimento para atingirmos uma ampliação e diversificação equitativa das amostras para maior embasamento em nossas análises.

2- Distribuição dos Genótipos

As amostras de DNA dos casos, seus progenitores e do grupo controle foram analisadas para determinação dos genótipos a partir da identificação dos polimorfismos no gene (SLC6A4) do transportador da Serotonina. Para o polimorfismo 5-HTTLPR um produto de PCR de 484 pb identifica o alelo S, e um produto de 538 pb o alelo L. Para o polimorfismo de variações do número de repetições (VNTR) do intron 2, um produto de PCR de 390 pb identifica o alelo com 12 repetições, um produto de 360 pb o alelo com 10 repetições e um produto de 345 pb o alelo de 9 repetições. Para o polimorfismo da 3'UTR, um produto de PCR de 741 pb identifica o alelo G e um produto de 689 pb identifica o alelo T.

Não foi possível concluir a análise do número total das amostras de pacientes, devido a problemas ou nas amostras de DNA, ou na identificação dos genótipos. Apenas os dados referentes aos pacientes claramente genotipados, até o momento, encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela 5: Distribuição genotípica e frequência alélica observada dos polimorfismos no gene (SLC6A4) de pacientes e controles

	n	Distribuição genotípica (%)			Frequência alélica (%)	
		L / L	L / S	S / S	L	S
Caso	34	23,33	53,34	23,33	50	50
Controle	111	25,22	48,65	26,13	49,5	50,5
		12r/12r	12r/10r	10r/10r	12r	10r
Caso	35	54,28	40	5,72	74,3	25,7
Controle	111	54,05	39,64	6,31	73,9	26,1
		G/G	G/T	T/T	G	T
Caso	39	15,38	61,54	27,07	46,2	53,8
Controle	111	26,13	53,15	20,72	52,7	47,3

Tabela 6: Distribuição genotípica e frequência alélica observada dos polimorfismos no gene (SLC6A4) nos sexos masculino e feminino, de pacientes e controles

	sexo	n	Distribuição genotípica (%)			Frequência alélica (%)	
			L / L	L / S	S / S	L	S
Caso	M	29	15,79	47,37	36,84	48	52
	F	5	33,33	33,33	33,33	60	40
Controle	M	44	29,55	40,91	29,55	50	50
	F	67	22,39	53,73	23,88	49,3	50,7
			12r/12r	12r/10r	10r/10r	12r	10r
Caso	M	30	56,67	36,67	6,66	75	25
	F	5	40	60	0	70	30
Controle	M	44	56,82	31,82	11,36	72,7	27,3
	F	67	52,24	44,78	2,99	74,6	25,4
			G/G	G/T	T/T	G	T
Caso	M	34	17,65	58,83	23,53	47,1	52,9
	F	5	0	80	20	60	40
Controle	M	44	29,55	50	20,45	54,5	45,5
	F	67	23,88	55,22	20,90	51,5	48,5

Quanto a distribuição dos genótipos, segundo a tabela 5, para o polimorfismo 5-HTTLPR, observamos que há predominância do genótipo heterozigoto (L/S) entre os casos (53,34%) como entre os controles (48,65%). Por outro lado, não há diferença significativa na distribuição dos genótipos L/L e S/S tanto nos casos e nos controles. Podemos observar também que os alelos L e S apresentam-se igual freqüência nos dois grupos.

De acordo com a tabela 5, observamos que para o polimorfismo de VNTR do intron 2, o genótipo 12r/12r é o mais freqüente em ambos os grupos, enquanto o genótipo 10r/10r é o menos freqüente. Há diferença significativa na freqüência dos alelos 12r e 10r nos dois grupos. É possível observar também que em nossas amostras (pacientes e controles) analisadas não foi identificado o alelo com 9 repetições. Para o polimorfismo da 3'UTR, os dados demonstram que também há predominância do genótipo heterozigoto na população controle (53,15%) como nos casos (61,54%), porém o genótipo TT apresenta-se numa freqüência maior que o genótipo G/G nos casos, ocorrendo o inverso no grupo controle.

As distribuições gênicas e genótípicas para todos os polimorfismos foram calculadas e não há desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Quando observamos a distribuição do genótipo por sexo na tabela 6, verificamos que a mesma se deu muito irregularmente entre os pacientes, isso porque o sexo feminino é representado por apenas 5 indivíduos não sendo possível estabelecer alguma tendência. Entre os pacientes do sexo masculino, observamos que há predominância (56%) do genótipo heterozigoto (L/S) no polimorfismo 5-HTTLPR, enquanto para o polimorfismo de VNTR do intron 2, o genótipo homozigoto (12r/12r) é o mais freqüente (53,85%). Para o polimorfismo da 3'UTR, os dados demonstram entre pacientes do sexo masculino o genótipo heterozigoto (G/T) também é o mais freqüente (58,83%).

Não se observa diferença significativa na distribuição dos genótipos L/L e S/S, mas amostras de pacientes do sexo masculino (20% e 24%, respectivamente). Podemos observar também que os alelos L e S apresentam-se freqüência similar (48% e 52% respectivamente). Por outro lado, observa-se diferença significativa na distribuição dos genótipos 12r/10r (38,46%) e 10r/10r (7,69%). O alelo 10r apresenta-se em menor freqüência entre os pacientes analisados (26,93%).

Em relação às amostras do grupo controle, observamos, na tabela 6, que em ambos os gêneros o genótipo 12r/12r é o mais freqüente, freqüência maior que 50%. Apesar do genótipo 10r/10r ser o menos frequente nos dois gêneros, notamos uma diferença entre os sexos, onde o genótipo 10r/10r é mais freqüente em homens do que em mulheres. Em ambos os gêneros o alelo 12r é muito mais freqüente do que o alelo 10r. As distribuições gênicas e genotípicas foram calculadas e se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nesta amostra ($\chi^2=0,080$, $P>0,05$.)

Para o polimorfismo de VNTR do intron 2, de acordo com a tabela 6, observamos que em ambos os gêneros o genótipo L/S é o mais freqüente. Porém notamos uma tendência entre os sexos, onde o genótipo L/L é mais freqüente em homens do que em mulheres. Nos dois gêneros não há diferença significativa na frequência dos alelos L e S. As distribuições gênicas e genotípicas foram calculadas e se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nesta amostra ($\chi^2= 0,081$, $P>0,50$).

Em relação ao polimorfismo da 3'UTR da região promotora, foi observado a maior freqüência do genótipo heterozigoto, em ambos os sexos. Em ambos os gêneros o genótipo G/G é o mais freqüente do que o genótipo T/T, e em ambos o alelo G é mais freqüente do que o alelo T. As distribuições gênicas e genotípicas foram calculadas e se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nesta amostra ($\chi^2= 0,486$, $P>0,50$).

Nossos dados iniciais quanto a análise do polimorfismo do número de repetições no intron 2 vão de encontro com o que é descrito na literatura. Em um estudo com população coreana foi demonstrada uma predominância significativa do alelo 12r (90,4%) em comparação com o alelo 10r (9,6%), assim com uma predominância do genótipo 12r/12r (82,5%) (KIM *et al.* 2002). Mulder *et al.* (2005) também observou uma transmissão preferencial do alelo 12r, sugerindo uma associação de tal alelo com comportamentos compulsivos-rígidos. O polimorfismo do intron 2 do gene do transportador tem sido associado a transtornos afetivos e foi provado sua atuação como um regulador transcricional, proporcionando assim um potencial mecanismo de contribuição para a sua suscetibilidade ao autismo (BETANCUR *et al.* 2002).

Com relação ao polimorfismo 5-HTTLPR, nossos resultados se mostram diferentes dos resultados encontrados na literatura. Esau *et al.* (2007) apresenta uma freqüência de 85,67% para o alelo L e 14,33% para o alelo S, em um estudo em um realizado em uma população controle proveniente da África do Sul. Já Lotrich *et al.* (2003), reporta um freqüência de 60,94% para o alelo L e de 39,06% para o alelo S,

em uma população controle também sul-africana. Murukami *et al.* (1999), mostram uma frequência maior do alelo S (80,94%) em comparação com o alelo L (19,06%), em uma população controle formada por japoneses. Guhathakurta *et al.* (2006), também relata uma maior porcentagem do alelo S (68,53%) em relação ao alelo L (31,47%), em um grupo controle indiano.

Na análise do nosso grupo controle encontramos algumas diferenças entre os diferentes grupos raciais (dados não apresentados), porém não podemos confirmar estes dados, pois em nossa amostra não havia um equilíbrio entre os diferentes grupos raciais que compõem a população brasileira. Na nossa amostra há uma sub-representação dos grupos de antecedentes Oriental e Negra. Os dados sugerem que uma análise amostral maior de indivíduos da população brasileira trará importantes dados sobre a distribuição destes polimorfismos na nossa população em contraponto aos dados descritos da literatura sobre populações mais homogêneas.

Apesar do número reduzido da nossa amostra, os nossos resultados são importantes, pois compõem um levantamento inicial de dados para investigar variantes de três polimorfismos funcionais do gene SLC6A4 e suas relações com comportamentos específicos do TID. Para confirmar nossos resultados de distribuição genotípica e analisar as correlações possíveis, um número maior de amostras de pacientes, a ampliação e diversificação equitativa das amostras do grupo controle são necessárias. O maior número de dados associados aos instrumentos utilizados para definir clinicamente os diferentes subgrupos na nossa amostra de pacientes TID resultarão em um maior embasamento de nossas análises. Há descrições na literatura de associações destes polimorfismos com endofenótipos do espectro autista (LONGO *et al.*, 2009, HU *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2004; TORJAM *et al.*, 2001). Os trabalhos associam um ou outro polimorfismo dentro de um mesmo grupo de amostras, aqui pretendemos correlacionar as análises dos três polimorfismos com endofenótipos do TID em casos da nossa população. Isto amplifica o número de informações e correlações que podem ser geradas, resultando em um maior embasamento ao trabalho.

Devemos ressaltar que este projeto foi primordial para a consolidação do grupo de pesquisa na instituição, sua associação com o grupo de pesquisa sobre autismo do curso de pós-graduação em Distúrbios do desenvolvimento da UPM e possibilitou a capacitação de alunos e pessoal técnico na área de pesquisa científica. Diretamente este projeto já resultou em dois trabalhos apresentados em congressos/reuniões científicas e dois trabalhos de conclusão de curso (um já

finalizado e outro com apresentação prevista para maio/2010). Com os recursos obtidos neste projeto será possível dar continuidade ao trabalho. Já está prevista uma reunião com o corpo clínico da AVAPE (Associação para Valorização e Promoção dos Excepcionais) em 20/04/2010 com vistas a programar novas coletas de amostras de pacientes, bem como a associação com o projeto QUALIMACK e com o serviço de genética médica da UNIFESP, para a obtenção de amostras do grupo controle. O MackPesquisa será informado, de todos os dados resultantes do prosseguimento deste trabalho, bem como terá o devido crédito nos trabalhos apresentados e/ou publicados oriundos deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-SILVA J, SANTOS MDS, GUIMARÃES PEM, FERREIRA ACS, BANDELT HJ, PENA SDJ, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*;67:444–61. 2000
- AMIR RE, VAN DEN VEYVER IB, WAN M, TRAN CQ, FRANCKE U, ZOGHBI HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*.;23:185-8. 1999.
- ANDERSON G. Genetics of childhood disorders: XLV. Autism, part 4: serotonin in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*.;41:1513. 2002.
- AURAREN M, VANHALA R, VARILO T, AYERS K, KEMPAS E, YLISAUKKO-OJA T, SINSHEIMER JS, PELTONEN L, JARVELA I. A genomewide screen for autism-spectrum disorders: evidence for a major susceptibility locus in chromosome 3q25-27. *Am J Hum Genet* 71:777-790, 2002.
- AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM, Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*.39(3):319-28. 2007.
- BAILEY A, LE COUETUR A., GOTTESMAN I., BOLTON P., SIMONOFF E., YUZDA E., RUTTER M. Autism as strongly genetic disorder: evidence a British twin study. *Psych Med*. 25:63-77, 1995
- BARRETT S, BECK JC, BERNIER R, et al. "An autosomal genomic screen for autism. Collaborative Linkage Study of Autism". *Am J Med Genet*.;88:609–615. 1999.
- BERUMENT S, RUTTER M, LORD , PICKLES A, BAILEY A. The autism screening questionnaire: diagnostic validity. *Bristh J psych* 175:444-451.1999.
- BETANCUR C, CORBEX M, SPIELEWOY C, PHILIPPE A, LAPLANCHE JL, LAUNAY JM, GILLBERG C, MOUREN-SIMÉONI MC, HAMON M, GIROS B, NOSTEN-BERTRAND M, LEBOYER M. Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. *Mol Psychiatry*.7(1):67-71. 2002.
- BRUNE CW, KIM SJ, SALT J, LEVENTHAL BL, LORD C, COOK EH JR. 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. *Am J Psychiatry* :163(12):2148-56. 2006.
- BUXBAUM JD, SILVERMAN J, KEDDACHE M, SMITH CJ, HOLLANDER E, RAMOZ N, REICHERT JG. Linkage analysis for autism in a subset families with obsessive-compulsive behaviors: evidence for an autism susceptibility gene on chromosome 1 and further support for susceptibility genes on chromosome 6 and 19. *Mol Psychiatry*. 9(2):144-50. 2004
- BUXBAUM JD, SILVERMAN JM, SMITH CJ, KILIFARSKI M, REICHERT J, HOLLANDER E, LAWLOR BA, FITZGERALD M, GREENBERG DA, DAVIS KL. Evidence for a susceptibility gene for autism on chromosome 2 and for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*.; 68:1514-1520. 2001.
- CANTOR RM, KONO N, DUVALL JA, ALVAREZ-RETUERTO A, STONE JL, ALARCÓN M, NELSON SF, GESCHWIND DH. Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21. *Am J Hum Genet*.;76(6):1050-6. 2005.
- CARVALHEIRA, G., VERGANI, N. E BRUNONI, D. Genetics of autism. *Rev. Bras. Psiquiatr*.,26.:270-272., 2004.

- CARVALHO-SILVA DR, SANTOS FR, ROCHA J, PENA SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 281–286.
- CHO H, YOON H J, PARK M, SIK L Y, 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* 139: 34-41. 2007.
- CLAYTON DG, WALKER NM, SMYTH DJ, PASK R, COOPER JD, MAIER LM, SMINK LJ, LAM AC, OVINGTON NR, STEVENS HE, NUTLAND S, HOWSON JM, FAHAM M, MOORHEAD M, JONES HB, FALKOWSKI M, HARDENBOL P, WILLIS TD, TODD JA. Population structure, differential bias and genomic control in a large-scale, case-control association study. *Nat Genet*;37(11):1243-6. 2005 .
- 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. *Molec. Psychiat.* 9: 587-593, 2004.
- COOK, E.H. , LEVENTHAL, B.L. The serotonin system in autism. *Curr. Opin. Pediat.*, 8, 348–354, 1996.
- 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.
- COUTINHO AM, OLIVEIRA G, MORGADINHO T, FESEL C, MACEDO TR, BENTO C, MARQUES C, ATAÍDE A, MIGUEL T, BORGES L, VICENTE AM. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. *Mol Psychiatry*. 2004 Mar;9(3):264-71.
- DA SILVA LR; VERGANI N; GALDIERI L; LONGHITANO SB; BRUNONI D; D'ALMEIDA V; PEREZ ABA. 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.
- DEVLIN B, COOK EH JR, COON H, DAWSON G, GRIGORENKO EL, MCMAHON W, MINSHEW N, PAULS D, SMITH M, SPENCE MA, RODIER PM, STODGELL C, SCHELLENBERG GD; CPEA GENETICS NETWORK. Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. *Mol Psychiatry*. 2005 Dec;10(12):1110-6
- DSM-IV - Critérios Diagnósticos. Traduzido por Batista, D. Porto Alegre: Artes Médicas. 1995 Disponível em <http://www.psiqweb.med.br/dsm/dsm.html>
- GOLDSTEIN, D B., CAVALLERI G. L. Understanding human diversity. *Nature* 437:1241-1242.2005.
- GREENBERG BD, TOLLIVER TJ, HUANG SJ, LI Q, BENDEL D, MURPHY DL. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *Am J Med Genet.*;88(1):83-7. 1999.
- HRANILOVI D, NOVAK R, BABI M, NOVOKMET M, BUJAS-PETKOVI Z , JERNEJ B. Hyperserotonemia in Autism: The Potential Role of 5HT-related Gene Variants. *Coll. Antropol.* 32 Suppl. 1: 75–80.2008.
- IMGSAC (Internacional Molecular Genetic Study of Autism Consortium). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. *Human Molecular Genetics.*;7:571–578. 1998.
- IMGSAC (Internacional Molecular Genetic Study of Autism Consortium). A Genomewide Screen for Autism: Strong Evidence for Linkage to Chromosomes 2q, 7q and 16p. *Am. J. Hum. Genet.* 69:570-581. 2001.

- JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" regions of human DNA. *Nature* 314: 67-73. 1985.
- KELLER, F.; PERSICO, A.. The neurobiological context of autism. Review. *Mol Neurobiol.* 28(1):1-22; Aug 2003.
- KIM SJ, BADNER J, CHEON KA, KIM BN, YOO HJ, KIM SJ, COOK E JR, LEVENTHAL BL, KIM YS. Family-based association study of the serotonin transporter gene polymorphisms in Korean ADHD trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*;139B(1):14-8. 2005
- KIM SJ, COX N, COURCHESNE R, LORD C, CORSELLO C, AKSHOOMOFF N, GUTER S, LEVENTHAL BL, COURCHESNE E, COOK EH JR. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Mol Psychiatry.*;7(3):278-88. 2002.
- KLAUCK, S.M., POUSTKA F, BENNER A, LESCH KP, POUSTKA A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum Mol Genet.*;6:2233–2238.1997.
- KLIN, A.; MERCADANTE, M. T.. Autism and the pervasive developmental disorders. *Rev Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v.28; 2006.
- LESCH,K.P., BENDEL,D., HEILS,A., SABOL,S.Z., GREENBERG,B.D., PETRI,S., BENJAMIN,J., MÜLLER,C.R., HAMER,D.H. AND MURPHY,D.L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, 274, 1527–
- LEVY SE, MANDELL DS, SCHULTZ RT. Autism. *Lancet*: 374(9701):1627-38. 2009.
- LIU J, NYHOLT DR, MAGNUSSEN P, PARANO E, PAVONE P. A genome wide screen for autism susceptibility loci. *Am J Hum Genet*, 69:327-340, 2001.
- LONGO D., SCHÜLER-FACCINIA L., RNDALIZE ,A P C, RIESGO R S, BAU C H D, Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain research* 1267:9-17.2009
- MACKENZIE A, QUINN J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;96(26):15251-5. 1999
- MAESTRINI, E.; LAI, C.; MARLOW, A.; MATTHEWS, N.; WALLACE, S.; BAILEY, A.; COOK, E. H.; WEEKS, D. E.; MONACO, A. P.; International Molecular Genetic Study of Autism, 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.
- MCCAULEY JL, OLSON LM, DOWD M, AMIN T, STEELE A, BLAKELY RD, FOLSTEIN SE, HAINES JL, SUTCLIFFE JS .Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*15;127 B (1): 104-12. 2004.
- MERCADANTE M T., VAN DER GAAG R. J., 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 Psiquiatr.*;28(Supl I):12-20. 2006.
- MILLER AS, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215, 1988.

- MUHLE R., TRENTACOSTE S. V., RAPIN I. The Genetics of Autism. *Pediatrics*; 113;472-486 *Nature Genetics* 37: 1243-1246. 2004.
- MULDER E.J., Anderson G.M., Kema I.P., Brugman A.M., Ketelaars C.E., de Bildt A., et al. Serotonin transporter intron 2 polymorphism associated with rigid-compulsive behaviors in Dutch individuals with pervasive developmental disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*;133:93–6, 2005.
- NICH.D. Autism and Genes. *Disponível em* : http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/upload/autism_genes_2005.pdf -
- NOBILE M, BEGNI B, GIORDA R, FRIGERIO A, MARINO C, MOLteni M, FERRARESE C, BATTAGLIA M. Effects of serotonin transporter promoter genotype on platelet serotonin transporter functionality in depressed children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*; 38(11):1396-402. 1999
- PEREZ ABA, D'ALMEIDA V, VERGANI N, DE OLIVEIRA AC, LIMA FT, BRUNONI D. Methylene tetrahydrofolate 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.
- PICKLES, A, BOLTON P, MACDONALD H, BAILEY A, LE COUTEUR A, SIM CH, RUTTERM. Latent-class analysis of recurrence risks for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. *Am J Hum Genet* 57:717–726, 1995
- RAMOZ N, REICHERT JG, CORWIN TE, SMITH CJ, SILVERMAN JM, HOLLANDER E, BUXBAUM JD. Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. *Biol Psychiatry.* 15; 60(2):186-91. 2006.
- RISCH, N., SPIKER, D., LOTSPEICH, L., NOURI, N., HINDS, D., HALLMAYER, J., KALAYDJIEVA, L., MCCAGUE, P., DIMICELI, S., PITTS, T. et al. "(1999) A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology". *American Journal of Human Genetics*, 65:493–507, 1999.
- ROPER H-H .New Perspectives for the Elucidation of Genetic Disorders *Am. J. Hum. Genet.*; 81:199–207. 2007.
- SCHAFER, A; HAWKINS J.R.. DNA variation and the future of human genetics. *Nature Biotechnology* 16:33-39,1998.
- SHAIN RJ, FREEDMAN DX. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J Pediatrics*;58:315-320.1961.
- SHAO Y, WOLPERT CM, RAIFORD KL, MENOLD MM, DONNELLY SL, RAVAN SA, BASS MP, MCCLAIN C, VON WENDT L, VANCE JM, ABRAMSON RH, WRIGHT HH, ASHLEY-KOCH A, GILBERT JR, DELONG RG, CUCCARO ML, PERICAK-VANCE MA. "Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder". *Am J Med Genet.* 8;114(1):99-105. 2002.
- STONE JL, MERRIMAN B, CANTOR RM, YONAN AL, GILLIAM TC, GESCHWIND DH, NELSON SF.Evidence for sex-specific risk alleles in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.*;75(6):1117-23. 2004.
- SUTCLIFFE JS, DELAHANTY RJ, PRASAD HC, MCCAULEY JL, HAN Q, JIANG L, LI C, FOLSTEIN SE, BLAKELY RD. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter

- locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am J Hum Genet.*;77(2):265-79. 2005.
- SYKES NH, LAMB JA. Autism: the quest for the genes. *Expert Rev Mol Med.* 3;9(24):1-15. 2007.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851-861 . 2007.
- TORDJMAN S., GUTKNECHT L., CARLIER M., SPITZ E., ANTOINE C., SLAMA F., et al. Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism. *Mol Psychiatry*;6:434–9, 2001.
- 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.; DAALLEN 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.
- 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
- WEBER, J.L., MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Am. J.Hum. Genet* 44: 388-396. 1989.
- WEIR, B.S., CARDON, L.R., ANDERSON, A.D., NIELSEN, D.M., AND HILL,W.G. Measures of human population structure show heterogeneity among genomic regions. *Genome Research*, 15: 1468-1476. 2005.
- WHITAKER-AZMITIA P. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull.*;56:479-85.2001.
- YIRMIYA N, PILOWSKY T, NEMANOV L, ARBELLE S, FEINSILVER T, FRIED I, EBSTEIN RP. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *Am J Med Genet.* 8;105(4):381-6. 2001
- YLISAUKKO-OJA T, NIEMINEN-VON WENDT T, KEMPAS E, SARENIUS S, VARILO T, VON WENDT L, PELTONEN L, JÄRVELÄ I. Genome-wide scan for loci of Asperger syndrome. *Mol Psychiatry.* ;9(2):161-8. 2004.
- YONAN AL, PALMER AA, SMITH KC, FELDMAN I, LEE HK, YONAN JM, FISCHER SG, PAVLIDIS P, GILLIAM TC. Bioinformatic analysis of autism positional candidate genes using biological databases and computational gene network prediction. *Genes Brain Behav.*;2(5):303-20.2003