

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Análise de mutações nos genes FMR1 e MTHFR em pacientes com transtornos do espectro autista idiopático**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Pollyanna Almeida Costa dos Santos

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Lavínia Schüler-Faccini

Co-orientadora: Dra. Sandra Leistner-Segal

Porto Alegre  
05 de março 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o apoio financeiro do CNPq, CAPES e FIPE-HCPA.

*(...) Já ancorado na Antártica, ouvi ruídos que pareciam de fritura. Pensei: Será que até aqui existem chineses fritando pastéis? Eram cristais de água doce congelada que faziam aquele som quando entravam em contato com a água salgada. O efeito visual era belíssimo. Pensei em fotografar, mas falei pra mim mesmo - Calma, você terá muito tempo para isso... Nos 637 dias que se seguiram, o fenômeno não se repetiu. As oportunidades são únicas (...).*

Amir Klink

A todas as crianças, especialmente as “especiais”:

*As pessoas grandes não compreendem nada sozinhas, e é cansativo, para as crianças, estar a toda hora explicando.*

O pequeno príncipe – Saint-Exupéry

## **Agradecimentos**

Agradeço às famílias que aceitaram participar do estudo por compartilharem conosco suas expectativas e suas frustrações, e por acreditarem no nosso trabalho.

À minha orientadora, Dra. Lavínia Schüller-Faccini, por lutar junto comigo neste projeto, e pelo apoio nos momentos mais necessários.

À minha co-orientadora, Dra. Sandra Leistner-Segal, pela exequibilidade laboratorial deste trabalho.

Aos amigos e funcionários do PPGBM pelo companheirismo, especialmente à Luciana Tovo, Caio César e Ana Paula Brandalize pela cumplicidade e deliciosos momentos de descontração.

À Eliane Bandinelli pela ajuda com os polimorfismos, pelas idéias sempre muito pertinentes, e por estar sempre disposta e animada.

À Danae Longo, por ter sido tudo neste trabalho. Sem ela este projeto sequer existiria.

Aos meus queridíssimos colegas de laboratório Daniel Graichen, Guilherme B. Santos, Lucas Fraga, Bibiane Godoy e Caroline Gross, pelas enriquecedoras e nem-tão-enriquecedoras conversas.

À minha família que sempre me apóia em todas as minhas escolhas, e acredita no meu potencial.

Ao Ricardo Abu Hana pelo companheirismo, afeto, incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Têmis Felix pela avaliação clínica dos pacientes.

E a todos os amigos que de alguma forma fazem parte da minha vida: simplesmente por saber que vocês existem, torno-me muito mais feliz.

## Sumário

Sumário.....	vi
Índice de Quadros.....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Índice de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
<b>Capítulo I.....</b>	<b>14</b>
1. Introdução.....	15
1.1. Autismo.....	15
1.2. Incidência.....	19
1.3. Etiologia.....	20
1.4. O autismo secundário: fatores genéticos e ambientais.....	21
1.5. Síndrome do X-Frágil.....	26
1.6. Autismo e X-Frágil.....	32
1.7. Autismo e o metabolismo do ácido fólico.....	35
<b>Capítulo II.....</b>	<b>40</b>
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo Geral.....	41
2.2. Objetivos Específicos.....	41
<b>Capítulo III.....</b>	<b>42</b>
3. Materiais e Métodos.....	43
3.1. População alvo.....	43
3.2. Critérios de Inclusão.....	43
3.3. Critérios de Exclusão.....	44
3.4. Termo de Consentimento Informado.....	44
3.5. Tamanho da amostra.....	45
3.6. Métodos Laboratoriais.....	45

3.7. Análise Comportamental.....	47
3.8. Análise de dados.....	47
<b>Capítulo IV - Artigo 1</b> .....	49
MTHFR C677T is not a risk factor for Autism Spectrum Disorders in South Brazil.....	50
<b>Capítulo V- Artigo 2</b> .....	64
Fragile X Syndrome diagnostic in sample of individuals with idiopathic Autism Spectrum Disorders.....	65
<b>Capítulo VI</b> .....	80
6. Discussão.....	81
<b>Capítulo VII</b> .....	87
7. Referências Bibliográficas.....	88
<b>Anexo I</b> .....	97
8. Anexo.....	98

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1.</b> Subgrupos das desordens de desenvolvimento global (PDDs) segundo a classificação do Manual Estatístico e Diagnóstico das Desordens Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association, 2000). ....	18
<b>Quadro 2.</b> Prevalência estimada para síndromes ligadas ao X com características autistas. Adaptado de Marco & Skuse (2006) .....	23
<b>Quadro 3.</b> Patologias potencialmente associadas ao Transtorno Autista.....	26



## Índice de Tabelas

**Tabela 1.** Frequências de SXF em amostras de TEA.....81

**Tabela 2.** Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo C677T do gene MTHFR em diferentes estudos.....86

## **Índice de Figuras**

**Figura 1.** Representação do gene FMR1.....29

**Figura 2.** Representação esquemática do metabolismo da homocisteína.....38

## Lista de Abreviaturas

APAE = Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais

DP = Desvio padrão

EEG = Eletroencefalograma

*FMR1 = Fragile Mental Retardation 1*

*FMRP1 = Fragile Mental Retardation Protein 1*

*MECP2 = Methyl-CpG-binding protein 2*

*MTHFR = Metilenotetrahidrofolato redutase*

PCR = Reação de Polimerização em Cadeia

POF = Disfunção Ovariana Prematura

STA = Síndrome do Tremor/Ataxia associada a Síndrome do X-frágil

SXF = Síndrome do X-frágil

TC = Tomografia computadorizada

TDAH = Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TEA = Transtorno do Espectro Autista

TGD-NE = Transtorno Global do Desenvolvimento sem nenhuma especificação

5' – UTR = Região não traduzida 5'

## Resumo

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma alteração do desenvolvimento neuropsiquiátrico que afeta três grandes áreas: interesse social, dificuldade de comunicação e comportamentos restritos. O TEA pode estar presente em algumas síndromes já bem descritas, como a Síndrome do X frágil (SXF), que é a mais frequente causa de retardo mental herdável, e também está associada a transtornos de desenvolvimento. O gene *MTHFR* faz parte do metabolismo do ácido fólico e está associado a síntese de nucleotídeos e metilação do DNA. O polimorfismo C677T deste gene, está relacionado a hipometilação quando na presença do alelo T, levando a alterações na expressão gênica. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência da síndrome do X-frágil e de variantes polimórficas no gene *MTHFR* em uma amostra de pacientes do sexo masculino e feminino com TEA. Analisamos uma amostra de 154 crianças diagnosticadas com TEA idiopático, sendo que 136 destas foram testadas para a SXF (97 meninos e 39 meninas). Todas as análises moleculares foram feitas a partir da técnica de PCR. Uma vez que a triagem fosse positiva para SXF, o DNA do paciente foi encaminhado para confirmação por Southern Blotting. Nossa análise molecular identificou três (3,1%) meninos com mutação completa, e para a maioria das meninas o resultado se mostrou inconclusivo (71,8%). Para o teste de associação do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e a susceptibilidade a TEA, analisamos 151 crianças com TEA idiopático e 100 crianças controles. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição alélica ( $T=0,38$  casos e  $T=0,35$  controle) nem na distribuição genotípica ( $p=0,72$ ) entre os dois grupos. Nenhuma associação foi encontrada entre a presença do alelo T e comportamentos autistas selecionados: evitação do olhar, movimentos corporais complexos e auto-agressão. Estes resultados mostram que a SXF representa uma fração importante dos casos de autismo idiopático pois nem sempre a expressão clínica da doença é identificada pela equipe médica. Além disto, ao contrario de outros trabalhos prévios, na nossa população, polimorfismos no gene

MHTFR não representam papel na suscetibilidade aos transtornos do espectro autista.

## **Abstract**

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder that acts in three areas: social interests, communication difficulties and restrict behaviors. ASD can be present in Fragile X Syndrome (FXS) that is the most frequent cause of inherited mental retardation and it is also associated a developmental disorders. The MTHFR gene plays in acid folic pathway and it is associated with the nucleotide synthesis and DNA methylation. The C677T MTHFR polymorphism is related with hypomethylation when T allele is present, leading to genic expression alterations. We analyzed a sample of 154 children with idiopatic TEA, being 136 tested for XFS through PCR technique (97 males and 39 females). All molecular analysis were made from PCR technique. Once the screening was positive for FXS, the patient DNA was referred for confirmation by Southern Blotting. In our molecular analyse, we identified three (3.1%) boys with full mutation, and for the girls, 71.8% was inconclusive. By analysing the MTHFR C677T polymorphism association and the susceptibility for TEA, we analyzed 151 children with idiopatic TEA and 100 controls children. There were any significant differences in allelic distribution ( $T=0.38$  cases and  $T=0.35$  controls) or genotypic distribution ( $p=0.72$ ) between the groups. No association was found between the presence of T allele and autistic behaviors selected: averted gaze, complex body movements and self-injury behavior. These results show that FXS presents a significant part of idiopatic autism cases because is not always the expression of clinical disease is identified by the medical team. Moreover, unlike other previous studies, in our population, polymorphisms in the gene *MHTFR* do not represent role in susceptibility to autism spectrum disorders.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

### 1.1. Autismo

O termo 'autismo' foi primeiramente usado por Bleuler, em 1911, para designar crianças que, aparentemente, haviam perdido o contato com a realidade apresentando grande dificuldade ou incapacidade de comunicação. Mais tarde, em 1943, Leo Kanner, um psiquiatra da Universidade Johns Hopkins, usou o mesmo termo para descrever 11 crianças que compartilhavam o mesmo comportamento peculiar: dificuldade na interação social e extrema atração por objetos inanimados. Ele descreveu o autismo como uma síndrome rara, caracterizada pela inabilidade inata em estabelecer contato afetivo com outras pessoas.

Em 1944, Hans Asperger, pediatra austríaco, publicou um artigo que descrevia crianças com os mesmos sintomas dos pacientes de Kanner; entretanto as habilidades cognitivas e verbais eram mais preservadas em seus pacientes. O transtorno de Asperger é, algumas vezes, chamado como “uma forma mais branda de autismo”, o que subestima o impacto negativo do transtorno na maioria dos indivíduos afetados. Indivíduos com Asperger têm, por definição, habilidades cognitivas medianas ou acima da média e desenvolvimento da linguagem durante a pré-escola; eles podem desenvolver conhecimentos

avançados de linguagem e interesses atípicos num assunto e/ou intensidade (Johnson *et al.* , 2007; Caronna *et al.* , 2008).

Baseados na descrição de Kanner, numerosos estudos envolvendo a epidemiologia, classificação e identificação do autismo se seguiram. Esses estudos contribuíram significativamente para a elucidação dos aspectos biológicos envolvidos na síndrome, mas, ao mesmo tempo, revelaram que o autismo não é uma entidade simples, e sim uma desordem comportamental complexa, com etiologias múltiplas e variáveis níveis de severidade (Keller & Persico, 2003).

O nível de gravidade do quadro clínico dos indivíduos caracterizados como autistas varia de crianças não-verbais com importante retardo mental (Gillberg & Coleman, 2000) até estudantes de QI acima da média, a despeito de linguagem e uso de habilidades sociais inadequados (Baron-Cohen *et al.*, 2001). Apesar de 80% das crianças autistas apresentarem retardo mental, as habilidades *Savant*, ou seja, desempenho extraordinário em certos domínios cognitivos como cálculo, música, artes e memória, apesar de QI global baixo; são 200 vezes mais comuns em autistas do que em outras formas de retardo mental (Treffert & Wallace, 2002).

Autismo é um transtorno global do desenvolvimento neurológico, e é evidente a partir dos três anos de idade. Neste transtorno as crianças podem apresentar vários níveis de dificuldades nas áreas de comunicação, interação social, tendência a comportamentos repetitivos e falta de imaginação. Crianças



com autismo têm dificuldades de entender como iniciar e responder a uma conversa, têm dificuldades de acompanhar o ritmo de comunicação social, e podem não entender as intenções dos outros, principalmente quando estas são expressadas através de gestos e linguagem (McConachie & Diggle , 2007).

Portanto, devido à heterogeneidade fenotípica, ou seja, a grande variação observada nos padrões comportamentais e nos níveis de habilidade social e comunicativa dos pacientes, hoje esses padrões são mais propriamente reunidos sob a designação de Transtornos do Espectro Autista (TEA).

Os critérios de diagnóstico para TEA não estavam incluídos na terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), sendo que os mais recentes são encontrados no DSM-IV. Segundo a classificação dos transtornos de desenvolvimento global (*pervasive developmental disorders* – PDD) da Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association, 2000), as PPDs são divididas em Transtorno Autista, Transtorno de Asperger, Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno de Rett (Quadro 1). Embora a Síndrome de Rett e o Transtorno Desintegrativo do Infância estejam incluídos na listagem do DSM-IV, eles não são considerados TEA, mas devem ser contemplados no diagnóstico diferencial de cada criança, dependendo da apresentação dos sinais e sintomas (Freitag, 2007; Johnson *et al.* , 2007). A Síndrome de Rett não está incluída nos TEA por ter uma causa genética conhecida – mutações no gene

*MeCP2*, e o Transtorno Desintegrativo da Infância está associado a transtornos metabólicos e neurológicos, como mucopolissacaridose San Filippo e encefalite virótica, além de apresentar um desenvolvimento normal até os 2 anos de vida, ao contrário dos casos de TEA, onde a criança pode apresenta sintomas desde os primeiros meses de vida (Mercadante *et al.*, 2006).

**Quadro 1. Subgrupos dos transtornos de desenvolvimento global (PDDs) segundo a classificação do Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association, 2000).**

Transtornos de Desenvolvimento Global (PDD)	Características
Transtorno Autista *	Autismo clássico.
Transtorno de Rett	Desordem genética no desenvolvimento cerebral pós-natal, causado por um gene simples, afetando predominantemente meninas.
Transtorno Desintegrativo da Infância	Regressão cognitiva, comportamental e na linguagem entre dois e 10 anos, precedida de desenvolvimento completamente normal.
Transtorno de Asperger *	Desenvolvimento da linguagem na idade esperada, sem retardo mental.
Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação *	Indivíduos com algumas características autistas e não pertencem as categorias anteriores.

\*Também denominadas conjuntamente como transtornos do espectro do autismo (TEA).

## 1.2. Incidência

As estimativas da prevalência de TEA vêm aumentando nas últimas décadas. Na década de 1970 e 1980, a incidência era de 5 a 6 por 10 mil. No ano 2002, aumentou para 66 por 10 mil. As possíveis origens desse aumento na incidência parecem estar ligadas à maior informação da população, e aos avanços na detecção e na ampliação dos critérios de diagnóstico (Deth *et al.* , 2007; Rice *et al.* , 2007).

A prevalência do TEA varia dependendo do critério de inclusão e da população em estudo, variando de 4 a 66 por 10 mil. Uma pesquisa nacional britânica com crianças de 5 a 15 anos de idade encontrou uma prevalência de 26 por 10 mil; nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção a Doenças estimou uma prevalência de 6,7 casos de TEA para cada mil crianças (Williams *et al.*, 2006; Centers for Disease Control and Prevention, 2007; McConachie & Diggie, 2007; MMWR Surveillance, 2007).

Os TEA aparecem em terceiro lugar entre os transtornos de desenvolvimento depois das malformações congênitas e a síndrome de Down (Williams *et al.*, 2006). A taxa aumenta para duas a cinco ocorrências em cada 1.000 indivíduos em estudos que consideraram os critérios de TEA (Wing & Potter, 2002). No Brasil, na ausência de dados oficiais, a Associação Brasileira de Autismo calcula que existam cerca de 600.000 pessoas com a doença (Bosa & Callias, 2000). O Transtorno Autista é mais comum em meninos do que em

meninas, com razão sexual em torno de 3:1 e 4:1 (Gillberg, 1993; Fombonne, 1998, AACAP Official Action, 1999).

### 1.3. Etiologia

Desde a primeira descrição do autismo por Kanner (1943), alguns dos seus aspectos característicos começaram a ser notados na personalidade de alguns dos pais de crianças autistas. Essas observações, inicialmente, foram interpretadas como se as características parentais, influenciando na educação dos filhos, estivessem levando ao desenvolvimento do transtorno. Posteriormente, foi reconhecido que o autismo estava associado com retardo mental em mais do que 75% dos casos (Lockyer & Rutter, 1969) e com epilepsia em cerca de 33% (Rutter, 1970), o que levou a confirmação de que o autismo, de fato, possuía uma base orgânica.

Centenas de estudos têm tentado desvendar os fatores genéticos associados à doença. As causas neurobiológicas, associadas ao autismo, tais como convulsões, deficiência mental, diminuição de neurônios e sinapses na amígdala, hipocampo e cerebelo, tamanho aumentado do encéfalo e concentração aumentada de serotonina circulante, sugerem um forte componente genético. Além disso, estudos com gêmeos têm demonstrado uma concordância que varia de 32 a 90%, em contraste com gêmeos dizigóticos, onde a concordância é mais baixa, de 0 a 5%. Embora o risco de recorrência para o autismo seja baixo, entre 2 e 8%, o risco relativo é de 50 a 200 vezes maior que

a prevalência da doença na população em geral (Carvalheira *et al.* , 2004;Marco & Skuse, 2006).

Os casos de autismo podem ser divididos em: “idiopático”, sem causa definida, o qual compreende a maioria dos casos e se estima que mais de 10 genes estejam associados, e “secundário”, onde agentes ambientais, anomalias cromossômicas ou alterações gênicas podem ser identificadas. De 5-10% dos indivíduos com autismo podem ser diagnosticados como secundário; os restantes 90-95% possuem autismo idiopático resultado das interações de múltiplos genes (Lintas and Persico, 2008). Cerca de 30% das crianças com autismo idiopático possuem uma forma complexa, definida pela presença de características dismórficas ou microcefalia ou uma má-formação estrutural do cérebro (Barton & Volkmar, 1998; Marco & Skuse, 2006).

#### 1.4. O autismo secundário: fatores genéticos e ambientais

Muitas doenças genéticas estão associadas com um aumento de risco para TEA. As mais comuns são Esclerose Tuberosa, Síndrome do X-frágil. Algumas mais raras, mas tratáveis com medicamentos, são a Fenilcetonúria e Síndrome de Smith-Lemli-Optiz. A Fenilcetonúria não tratada como causa de TEA tem se tornado cada vez mais rara em países com um programa de acompanhamento neonatal. Estudos epidemiológicos têm mostrado que a

prevalência de TEA em portadores de Esclerose Tuberosa é mais de 100 vezes maior que o esperado (Caronna *et al.*, 2008; Freitag, 2007).

Evidências sugerem que influências genéticas do cromossomo X tenham um papel importante na vulnerabilidade masculina para TEA. No quadro 2 estão descritas as prevalências estimadas para algumas síndromes ligadas ao X com características secundárias do TEA. Anormalidades citogenéticas são encontradas em 3-5% de indivíduos portadores de TEA. De 7-10% das crianças portadores da Síndrome de Down apresentam autismo, sendo a mais prevalente anormalidade citogenética (Gosh *et al.*, 2008). Outra anormalidade genética frequentemente encontrada é a do cromossomo 15q11-13, com uma taxa de aproximadamente 1%, sendo na maioria dos casos uma duplicação da região materna ou um cromossomo supernumerário, que é uma duplicação invertida. O fenótipo da duplicação ou inversão em 15q11-13 é caracterizado por uma alta incidência de epilepsia na infância, hipotonia muscular e problemas de coordenação motora, juntamente com retardo mental grave ou moderado, atraso ou falta de fala, e algumas vezes, grave hiperatividade. Deleções das regiões cromossômicas 15q11-13 maternas ou paternas são associadas com duas doenças relacionadas a imprinting: Síndrome de Angelman e Prader-Willi, respectivamente (Freitag, 2007; Gupta & State, 2007).

**Quadro 2. Prevalência estimada para as principais síndromes ligadas ao X com características autistas. Adaptado de Marco & Skuse (2006)**

Doença ligada ao X	Prevalência
Síndrome de Turner (XO)	- 5/10.000 nascimentos de mulheres - Mais de 25% com TEA
Síndrome de Klinefelter (XXY)	- 10-40/10.000 na população em geral
Síndrome do X-Frágil	- 2,5/10.000 homens - Mais de 30% tem critérios para TEA
Síndrome de Rett (MECP2)	- 1/10.000 meninas recém-nascidas - 2,8% das meninas com TEA

Em uma revisão, Freitag (2007) relatou algumas deleções cromossômicas em 2q37, 7q31, 22q11 e 22q13.3 como alvos importantes no estudo de avaliação citogenética para autismo. Algumas síndromes causadas por microdeleções cromossômicas estão associadas à presença de autismo secundário, como por exemplo, síndrome velocardiofacial, síndrome DiGeorge, síndrome de anomalia facial conotruncal.

O gene que codifica a Proteína de Ligação Methyl-CpG 2 (*MeCP2*), que causa a maioria dos casos de Síndrome de Rett – doença dominante ligada ao X, é considerado, também um dos fatores etiológicos para um pequeno número de autistas. Análise do sequenciamento do *MeCP2* é, normalmente, solicitada para meninas com fenótipo de Rett, e mutações nos éxons 2, 3 e 4 são as mais freqüentes (Ghidoni, 2007; Caronna *et al.*, 2008). Inicialmente *MeCP2*, um

importante fator de transcrição neuronal, foi identificado por sua habilidade de se ligar à DNA metilado, e se pensava que esta ligação era repressora de transcrição. Portanto, esperava-se que mutações interrompendo a função MeCP2 fossem responsáveis pelo aumento da expressão gênica, perturbando a função neuronal. Entretanto, uma pesquisa recente demonstrou que MeCP2 tem um papel muito complexo, coordenando tanto repressão da transcrição quanto ativação, dependendo do contexto molecular. Se o promotor do gene está enriquecido com ilhas CpG este é ativado. Sabe-se, também, que esta proteína tem um papel relevante na organização estrutural da cromatina (Cohen *et al.* , 2008).

Mutações em MeCP2 em meninos normalmente são letais ou causam encefalopatias extramente graves. Mas há casos descritos na literatura de meninos que carregam mutações mais leves que não levam ao fenótipo Rett-Like, mas apresentam retardo mental, autismo, ataxias e distúrbios psiquiátricos. E quando a família era estudada, encontrava-se muitos homens com fenótipos variáveis de portadores da mutação (Ghidoni, 2007).

Ainda que as evidências mostrem que a maioria dos casos de TEA sejam causados por fatores genéticos, a expressão desses genes pode ser modulada por fatores ambientais desde o período gestacional. Muitas deficiências de desenvolvimento cerebral que estão associadas ao TEA ocorrem durante o primeiro e segundo trimestre da gravidez, fatores ambientais com efeito teratogênico – como talidomida e ácido valpróico – são os mais prováveis de



interagir com o feto via meios maternos. É também possível que doença materna, como a rubéola, tenha um papel importante (Johson *et al.*, 2007). No quadro 3 estão descritas algumas patologias associadas ao TEA.

A exposição a xenobióticos é uma característica inevitável da vida contemporânea, principalmente pelos resíduos químicos encontrados no ar, água e comida e outros materiais que entram em contato durante toda nossa rotina diária. Metais pesados, como arsênico, chumbo e mercúrio foram listados como as três substâncias mais perigosas pelo departamento de saúde humana dos Estados Unidos ([www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html](http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html)), desde os seus mais baixos níveis são associados com danos neurológicos, incluindo déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e baixo QI. Outros metais pesados (cádmio, manganês, níquel etc) exercem efeitos similares, levando a doenças neurodegenerativas, como Mal de Parkinson e Alzheimer, indicando que o cérebro humano é especialmente sensível (Deth *et al.*, 2008).

Vacinas para caxumba, sarampo e rubéola têm uma atenção considerável nos últimos anos. Os estudos com estas vacinas consideram a presença do timerosol (mercúrio usado para conservação da vacina) como principal fator de risco para desenvolver o TEA, principalmente em neonatos com deficiência de enzimas de detoxificação, uma vez que o mercúrio é neurotóxico. Entretanto, alguns estudos encontraram associação e outros não (Freitag, 2007; Schultz *et al.*, 2008).

**Quadro 3. Patologias potencialmente associadas ao Transtorno Autista**

Classificação	Patologias
Ambiental	Infecções Congênicas: Sarampo, Toxoplasmose, Citomegalovírus, Encefalite, Rubéola, Intoxicação por chumbo e mercúrio, Síndrome da talidomida fetal (Sykes and Lamb, 2007).
Genéticas ou Congênicas	Anormalidades cromossômicas, Síndrome do X Frágil, Esclerose Tuberosa, Neurofibromatose, Amaurose congênita de Leber, Lipofuscinose ceróide, Doença celíaca, Adrenoleucodistrofia, Distrofia Muscular de Duchenne, Síndrome de Angelman, Sequencia de Moebius, Síndrome de Dandy-Walker, Síndrome de Cornelia de Lange, Síndrome de Sotos, Síndrome de Goldenhar, Síndrome Williams, Hipomelanose de Ito, Síndrome de Joubert, Síndrome de West, Microcefalia, Hidrocefalia, Meduloblastoma do cerebelo (Fombonne, 1999; Hertz-Picciotto <i>et al.</i> , 2006).
Metabólica	Fenilcetonúria, Histidinemia, Desordem do metabolismo de purinas (Newschaffer <i>et al.</i> , 2007).

### 1.5. Síndrome do X-Frágil

A Síndrome do X-frágil (SXF), descrita pela primeira vez por Martin e Bell em 1943, é a mais comum causa de retardo mental herdável com aproximadamente 1:4000 homens afetados e 1:8000 mulheres, com penetrância

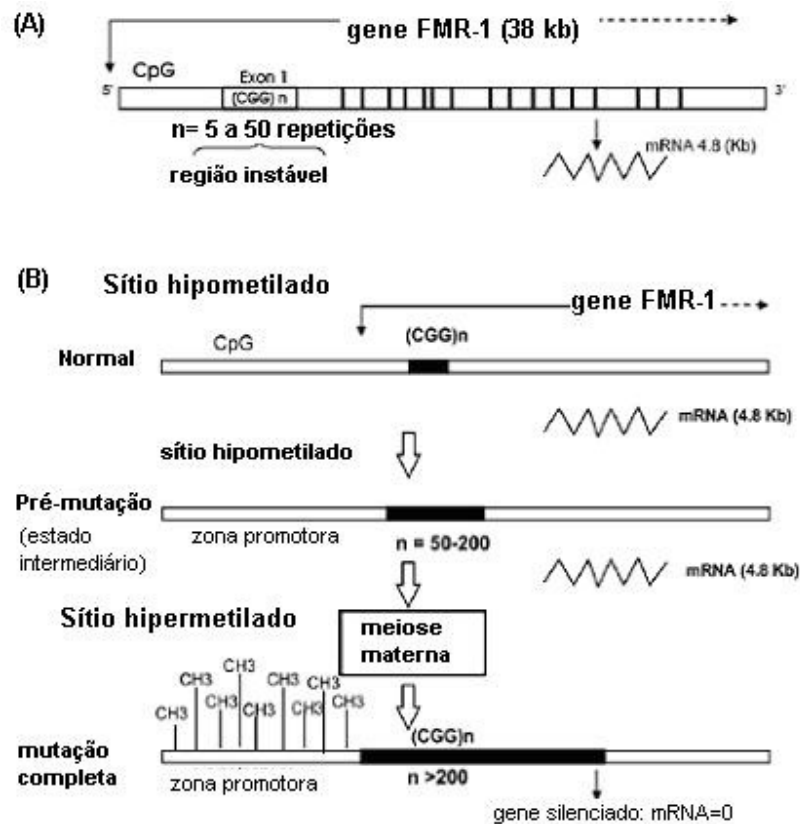
de 80% em homens e 30% em mulheres. Na maioria dos casos, a doença ligada ao X é causada pela expansão de repetições CGG na região 5' não traduzida (5'-UTR) do gene *FMR1* – localizado no braço longo do cromossomo X (Xq27.3) – o que confere uma instabilidade meiótica. Mais de 99% dos indivíduos com X-frágil possuem mutação com perda de função no gene *FMR1* causada pelo aumento do número de trinucleotídeos CGG repetidos acompanhado por hipermetilação da ilha CpG na região promotora do gene e silenciamento da transcrição (Curry *et al.*, 1997; Garber *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2008).

O número de repetições CGG é altamente polimórfico, indo de 5-40 em indivíduos normais, 41-58 repetições em intermediários, 59-200 repetições em indivíduos com pré-mutação, e acima de 200 repetições em indivíduos com mutação completa, ou seja, X-frágil. Quando a pré-mutação é transmitida por via materna, ela pode ser expandida para mutação completa, devido a uma instabilidade na meiose da mulher. O alelo intermediário parece ser levemente instável (Allen *et al.*, 2005; Sherman, 2005; Otsuka *et al.*, 2009) (Figura 1).

O gene *FMR1* tem 38kb de tamanho, possui 17 éxons e um RNAm de aproximadamente 4kb. Uma repetição de trinucleotídeos, composta primariamente de CGG, está presente na região não traduzida do éxon 1 finalizando com 69 pares de base a montante do início de tradução. Existe uma variação do número de cópias nos alelos normais com uma distribuição trimodal tendo um pico maior em torno de 30 repetições e um menor pico em 20 e 40 repetições. Um aumento no número de repetições do trinucleotídeo CGG no

gene *FMR1* ocorre exclusivamente durante a meiose de mulheres portadoras de pré-mutação. O risco de aumento no tamanho da expansão de alelos maternos com pré-mutação depende do número de repetições CGG e a presença de AGG entre os segmentos repetidos de CGG (Curry *et al.*, 1997).

O produto de *FMR1*, *fragile X mental retardation 1 protein* – FMRP, é encontrado no citoplasma de muitos tipos celulares, mas é mais abundante nos neurônios. A proteína contém dois domínios de ligação KH, encontrado em outras proteínas com propriedades de ligação ao RNA e parece funcionar como uma proteína de ligação ao RNA que interage com um conjunto de RNAs mensageiros contendo motivos quaternários. FMRP contém tanto sinal de localização nuclear quanto sinal de exportação nuclear, sugerindo que possui uma função de proteína nucleocitoplasmática que se liga a muitos RNAs mensageiros, inclusive ao seu próprio RNAm; forma complexos de ribonucleoproteínas mensageiras; e se associa a ribossomos de tradução. Esta proteína também está envolvida na maturação estrutural e funcional de sinapses servindo como um supressor traducional nos espaços pós-sinápticos (Ceman *et al.*, 1999; Weiller & Greenough, 1999).



**Figura 1. Representação do gene FMR1 (A) representação esquemática do gene *FMR1* (B) Processo de expansão e hipermetilação do gene. Adaptado de Florência *et al.* (2006).**

As características clínicas das SXF são frequentemente sutis, e a primeira indicação clínica é, geralmente, atraso no desenvolvimento, como atraso de linguagem e motor, ou ainda comportamentos autistas. Características físicas incluem macroorquidismo, displasia do tecido conjuntivo, que inclui face longa e estreita, dando um aspecto triangular, orelhas proeminentes, hipermobilidade de articulações e pé chato. Refluxo gastrointestinal ocorre na infância, e pode apresentar irritabilidade ou vômito recorrente. Exames de Eletroencefalograma (EEG) confirmam que a epilepsia é outra característica comum em SFX na

infância, com uma incidência entre 13 e 18% em meninos, e 5% em meninas (Garber *et al.*, 2008; Koukoui & Chaudhui, 2007).

O fenótipo comportamental pode ser sugestivo para o diagnóstico de SXF. Características autistas são comuns em indivíduos portadores da síndrome, e incluem movimento de “flap” com as mãos, dificuldade em olhar fixo ou nos olhos, defensiva tátil, dificuldades em manter contato social e reciprocidade sócio-emocional. Estas características são expressas com grandes níveis de variabilidade em crianças com SXF, e pode ser um indicativo de diagnóstico precoce para TEA (Garber *et al.* , 2008).

Aproximadamente 50% das mulheres com mutação completa para X-frágil apresentam retardo mental, e embora sejam, geralmente, menos gravemente afetadas que os homens, também podem apresentar ansiedade, déficit de linguagem, labilidade de humor e depressão. Cerca de 50% das mulheres heterozigotas para mutação completa são intelectualmente normais, esta variabilidade deve-se ao processo de inativação de um cromossomo X nas mulheres (Allen *et al.* , 2005; Garber *et al.* , 2008).

A maioria dos indivíduos com pré-mutação são considerados não afetados cognitivamente, mas alguns estudos têm documentado déficits cognitivos ou de comportamento em um subgrupo de homens e mulheres, sendo menos freqüente neste último. Os homens são mais propensos a desenvolver problemas de atenção, disfunções executivas, déficits sociais, e comportamento obsessivo compulsivo (TOC). Aproximadamente 20% das mulheres com pré-mutação têm

disfunção ovariana prematura (POF) que é a cessação da menstruação antes dos 40 anos de idade. É interessante ressaltar que mulheres com mutação completa não desenvolvem POF, e uma explicação para isto seria que os níveis de RNAm tendem a se normalizar, em mulheres, quando o número de cópias CGG aumentam (Farzin *et al.* , 2006; Garber *et al.* , 2008; Tejada *et al.* , 2008).

Um fenótipo neurológico foi descrito e parece estar restrito a homens mais velhos portadores da pré-mutação. Estes homens têm a Síndrome do Tremor/Ataxia (STA) com declínio neurológico associado. Estudos neurofisiológicos em uma amostra de homens com pré-mutação e fenótipo de STA mostraram inclusões eosinofílicas intranucleares em neurônios e astrócitos, e a ressonância magnética mostrou um padrão de imagem característico (Hagerman & Hagerman, 2002; Allen *et al.* , 2005).

Ao nível celular, há evidências que a pré-mutação, na forma de RNA, causa toxicidade ao neurônio, levando a grande vulnerabilidade para apoptose quando submetido a estresse. Em um estudo usando células de linhagem humana, a pré-mutação causou uma super-regulação de muitos genes, incluindo interação com a proteína FMRP citoplasmática, que controla a conectividade neuronal em *Drosophila* e com a rho-GTPase, Rac1; caspase-8, uma proteína envolvida com a via de morte por apoptose induzida por receptor; UBE3A, uma proteína associada à Síndrome de Angelman, e também ligada ao autismo; e neurotensina, um componente do axis hipotalâmico-pituitário-gonadal, que é importante na regulação da fertilidade feminina. É evidente que a pré-mutação é

tóxica para a célula e sua toxicidade está presente desde o início do desenvolvimento (Schenk *et al.* , 2003; Farzin *et al.* , 2006)

A prevalência estimada de portadores de pré-mutação na população em geral é de 1 a cada 113 – 441 mulheres e 1 em 813 – 1674 homens (Otsuka *et al.* , 2009). Um estudo realizado em Taiwan com 10.046 recém-nascidos estimou uma prevalência de 1:1.674 em meninos com pré-mutação e 1:1.143 com alelos intermediários. Em mulheres, presume-se que seja a metade da prevalência dos homens (Crawford *et al.* , 2002; Tzeng *et al.* , 2005).

## 1.6. Autismo e X-Frágil

O autismo é um dos achados clínicos comuns na síndrome do X-frágil. Estima-se sua prevalência entre indivíduos com X-frágil entre 25 a 33% (Bailey *et al.* , 1998; Rogers *et al.* , 2000; Johnson *et al.* , 2007). Usando análises moleculares, a incidência da Síndrome do X-frágil em indivíduos diagnosticados como autistas idiopáticos foi estimada em 5% por Havlovicova *et al.* (2002), 11,1% por Estécio *et al.* (2002), 12% por Gurling *et al.* (1997), 2,1% por Kielinen *et al.* (2004), 2,2% por Reddy (2005), e 1,5% por Steiner *et al.* (2005). A diferença na incidência estimada pelos diferentes estudos pode ser devida ao pequeno tamanho populacional ou diferenças nos critérios clínicos de seleção de pacientes.



Em uma pesquisa realizada por Clifford *et al.* (2007), numa amostra de 33 homens e 31 mulheres com mutação completa no gene *FMR1*, eles encontraram que 67% e 23% tinham critérios para diagnóstico de TEA, respectivamente, utilizando escalas específicas para detectar este transtorno. E no grupo portador da pré-mutação, 14% dos homens e 5% das mulheres apresentaram critérios para TEA.

Zhang *et al.* (2009) analisaram a expressão do gene *FMR1* em cinco regiões cerebrais (hipocampo, córtex, cerebelo, diencéfalo e tronco cerebral) de camundongos selvagens e nocauteados para SXF usando a técnica de qRT-PCR. Como esperado, os níveis de expressão do gene *FMR1* foram significativamente mais baixos em camundongos nocauteados comparados com os controles selvagens. Juntamente com isto, eles avaliaram se a expressão de RNA de *MecP2* variava nos camundongos nocauteados em relação aos selvagens. O qRT-PCR mostrou que os níveis de mRNA *MecP2* no hipocampo, córtex, diencéfalo e tronco cerebral foram significativamente mais baixos nos camundongos nocauteados.

A proteína FMRP pode influenciar a expressão de muitos outros genes que devem estar relacionados ao desenvolvimento do autismo. Foi mostrado, neste mesmo trabalho, que camundongos nocauteados para SXF apresentaram nível de expressão de genes associados ao autismo drasticamente afetados no cérebro desses animais.

O TEA pode não ser devido a uma patologia célula-específica, mas sim por uma perturbação das propriedades de redes neuronais que emergem quando os neurônios interagem. Portanto, apesar da SXF e do autismo diferirem no nível de função de um único gene, eles podem carregar um grande número de similaridades em relação a disfunções de rede neuronal e a combinação de efeitos genéticos, epigenéticos e ambientais que modificam fatores nestas disfunções, justamente pela importante função da proteína FMRP interagir com outras proteínas associadas ao autismo (Liao *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Embora ainda não conclusivas, diversas investigações sugerem que meninos portadores da pré-mutação possuem um risco aumentado de desenvolver TEA (Borghgraef *et al.*, 2004; Farzin *et al.*, 2006). O TEA nos pacientes com a pré-mutação poderia ser resultado da elevação anormal do RNAm do gene *FMR1*, ou talvez em função da redução dos níveis da FMRP a qual é a responsável pela SXF e é sabido que ocorre em alguns homens portadores da pré-mutação, especialmente aqueles com grandes números de repetições (Hessl *et al.*, 2007).

Devido às evidências, é inquestionável que existe uma relação entre a patogenia do TEA e a expansão do gene *FMR1*. Uma vez que os sinais dismórficos da SXF se apresentam de maneira variável, o diagnóstico clínico desta síndrome pode não ser evidente. Por isso, sugere-se que todos pacientes com diagnóstico de autismo idiopático sejam também testados para a expansão no gene *FMR1*.

## 1.7. Autismo e o Metabolismo do ácido fólico

O ácido fólico, folato ou vitamina B11, é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, considerada um nutriente essencial para o homem. A única fonte desta vitamina para o organismo humano é a dieta. O folato é essencial na síntese de DNA, tRNA e aminoácidos (Eskes, 1997).

O folato é um importante substrato para o metabolismo da homocisteína. A deficiência de folato é uma condição geralmente associada à baixa ingestão em relação à demanda metabólica. Isto é particularmente importante durante a gestação, sendo que qualquer alteração genética envolvendo o metabolismo do folato em gestantes, pode representar um papel importante na etiologia de várias malformações congênitas, principalmente na dos defeitos de tubo neural (Rosemblat & Fenton, 2001). Diversos estudos apontam para uma associação entre a ingestão materna de vitaminas e o metabolismo envolvendo o ácido fólico e a homocisteína na gênese destes efeitos estruturais.

Vários estudos demonstraram que a suplementação vitamínica periconcepcional leva a uma diminuição tanto de ocorrência como de recorrência de anomalias congênitas, como DTN, cardiopatias, fissuras lábio-palatinas e transtornos neurológicos (Mattson & Shea, 2003; Czeizel, 2004).

Os eventos moleculares que levam a anomalias congênitas devido à deficiência de folato ainda não estão bem definidos, mas podem incluir a metilação do DNA, que está envolvido na diferenciação, estrutura da cromatina,

expressão gênica tecido-específica, *imprinting*, inativação do cromossomo X, eventos epigenéticos e apoptose. A frequência de TEA aumenta em crianças portadoras de doenças genéticas que alteram a metilação do DNA, como SXF, Síndrome de Angelman e Rett (Razin, 1998; Schanen, 2006).

Níveis baixos de vitamina B12 e folato ocasionam um aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína. Em gestantes, tem-se a hipótese de que o nível elevado de homocisteína poderia atuar como agente teratogênico, inibindo reações de metilação do DNA e a síntese *de novo* de timina. Sendo assim, este processo induziria danos no DNA pela incorporação errada de uracilas no lugar de timina, seguida por reações de excisão-reparo, quebras na fita de DNA, pausa no ciclo celular e, finalmente, apoptose (Mattson & Shea, 2003). Em conclusão, folato, vitamina B12 e homocisteína têm um papel relevante no crescimento celular, no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento neurológico.

Após a sua obtenção, o ácido fólico é rapidamente reduzido a sua forma ativa chamada tetrahidrofolato, passando a 5,10-metilenotetrahidrofolato. A partir de então ocorre uma reação muito importante, catalisada pela enzima codificada pelo gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), que tem um papel fundamental neste metabolismo, convertendo 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, a forma circulante do folato (Goyette *et al.*, 1994). Este substrato é vital para o metabolismo de ácidos nucléicos e aminoácidos, incluindo aqueles que são requeridos para a síntese de nucleotídeos e, conseqüentemente a divisão celular, base substancial da gestação (Bailey, 2000). O produto desta

reação são grupos metil utilizados para a síntese de metionina, necessários para a metilação de DNA (Goyette *et al.*, 1994) (figura 2).

Em humanos, o gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1 (1p36.3). Sua seqüência de DNA complementar apresenta 2,2 kilobases e 11 éxons. A atividade normal deste gene ajuda a manter os níveis adequados de homocisteína (Frosst *et al.*, 1995). Foram identificadas 18 variantes alélicas para esse gene, normalmente raras, de herança autossômica recessiva e que podem levar a deficiência grave da enzima metilenotetrahidrofolato redutase. A deficiência desta enzima pode estar relacionada ao aumento no risco de desenvolver retardo de desenvolvimento neuropsicomotor, alterações psiquiátricas e complicações vasculares (Botto & Yang, 2000).

Alguns estudos brasileiros relataram associação entre polimorfismos do gene *MTHFR* e defeitos cardíacos congênitos (Arruda *et al.*, 2007; Brandalize *et al.*, 2009), enquanto outros não encontraram associação quando avaliaram defeitos de tubo neural e fendas lábio-palatinas (Félix *et al.*, 2004; Brandalize *et al.*, 2007).

O polimorfismo mais estudado e considerado de maior relevância é o C677T, (que troca uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677, resultando na forma termolábil da enzima), convertendo alanina em resíduo de valina (Frosst *et al.*, 1995). O alelo 677T é comumente chamado de termolábil, pois a atividade redutora da enzima se dá a partir de 37° C, e está associado com uma redução da atividade enzimática em até 60% quando em homozigose (Rozen, 1997).

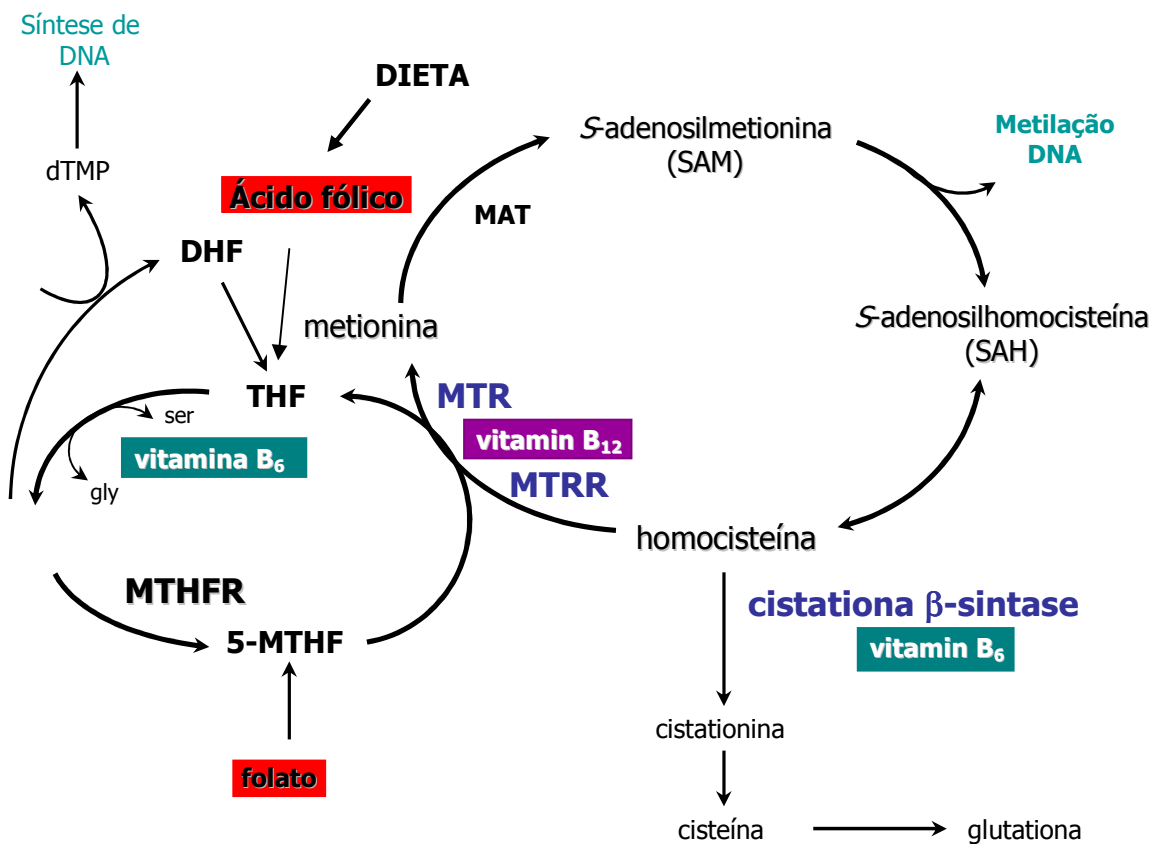


Figura 2. Representação esquemática do metabolismo da homocisteína (adaptado de Sharp & Little, 2004).

Nos últimos anos muitos trabalhos vêm sendo publicados questionando o aumento na frequência de diagnósticos de TEA. Além da hipótese já discutida sobre hipometilação do DNA devido a deficiência de folato, alguns estudiosos formularam a hipótese que em virtude do melhor aporte nutricional da população nos últimos anos, principalmente devido aos programas de enriquecimento de farináceos e cereais com ácido fólico, o processo de seleção natural foi alterado. O número de rupturas placentárias e abortos devido à hiperhomocisteinemia diminuíram, o que levou a um aumento na sobrevivência neonatal e, portanto, as

taxas de neonatos com genótipo 677T do gene *MTHFR* (Roger, 2008; Mayor-Olea *et al.*, 2008).

Existem, atualmente, poucos estudos de associação entre *MTHFR* e TEA. Dentre eles, apenas um estudo encontrou associação (Mohammad *et al.*, 2009) e outros dois que não a encontraram (James *et al.*, 2006; Pasça *et al.*, 2008). Goin-Kochel *et al.* (2009) encontrou uma frequência maior do alelo T do gene *MTHFR* em crianças autistas que apresentavam alguns comportamentos característicos, como evitação de olhar, movimentos corporais complexos e auto-agressão.

Devido à heterogeneidade do TEA e a importância do metabolismo do ácido fólico, em particular o gene *MTHFR*, para processos celulares e desenvolvimento neurológico, fica clara a relevância de se testar a associação entre esses processos.

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar a ocorrência da síndrome do X-frágil e de variantes polimórficas no gene *MTHFR* em uma amostra de pacientes do sexo masculino e feminino com Transtornos do Espectro Autista Idiopático.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a frequência de mutação completa em um dos alelos do gene *FMR1* em meninos e meninas com diagnóstico de TEA;
- Relacionar a presença da alteração no gene *FMR1* e o quadro clínico comportamental dos portadores;
- Investigar a associação de variantes polimórficas no gene *MTHFR* e o TEA idiopático.

**CAPÍTULO III**  
**MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. População alvo**

Casos: Crianças com diagnóstico de transtornos do espectro autista (Transtorno Autista, Transtorno de Asperger ou Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação), de acordo com os critérios do DSM IV-TR (American Psychiatric Association, 2000), que foram encaminhadas através das APAEs (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais) do Rio Grande do Sul e do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os pais das crianças responderam um questionário e uma escala para diagnóstico de autismo na infância.

As crianças foram avaliadas pelo PROTID (Programa de Transtornos Invasivos de Desenvolvimento) e por seus médicos particulares.

Controle: crianças saudáveis selecionadas durante coleta de sangue para testes laboratoriais rotineiros no HCPA.

### 3.2. Critérios de Inclusão

- Indivíduos com idade superior a 03 anos de idade, com Diagnóstico de Transtorno Autista, Transtorno de Asperger ou Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação, conforme diagnóstico referido acima;

- Pais ou responsáveis legais concordarem em participar do estudo assinando o termo de consentimento informado.

### 3.3. Critérios de Exclusão

- Presença de síndrome neurológica, genética, congênita ou metabólica associada (por exemplo, X Frágil, Esclerose Tuberosa, e outras descritas no Quadro 3);

- Pais ou responsáveis legais não concordarem em participar do estudo.

### 3.4. Termo de Consentimento Informado

Os pais ou responsáveis pela criança, antes de assinarem o termo, foram esclarecidos sobre o diagnóstico de Transtorno Autista e sobre o procedimento de retirada e o destino da amostra de sangue, sendo exposta de forma acessível a questão do sigilo sobre a identificação do paciente. Este projeto e seu termo de

consentimento livre e esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 05-451 (anexo I).

### 3.5. Tamanho da amostra

Fizeram parte deste estudo 154 crianças casos, sendo que apenas 136 foram testadas para SXF. As 18 crianças restantes já possuíam o respectivo exame.

No grupo controle contamos com 100 crianças.

### 3.6. Métodos Laboratoriais

#### Extração de DNA:

A partir de 5 mL de sangue total coletado através de punção venosa periférica, utilizando a técnica de precipitação de sal descrita por Lahiri e Nurnberger (1991).

#### Genotipagem para X-frágil - Triagem:

- PCR triagem: foi utilizado um protocolo para X-frágil descrito por O'Connell *et al.* (2002) com os seguintes primers:

5' GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT 3'

5' AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA 3'

A amplificação foi verificada em gel de agarose 2.5%, onde a ausência de banda significa positivo pra Síndrome do X-frágil quando se analisa os meninos; quanto as meninas, duas bandas significa que ela possui os dois alelos normais, e na presença de apenas uma banda, seu resultado é inconclusivo, visto que não é possível saber por este método se os dois alelos possuem o mesmo tamanho, ou um dos alelos porta a expansão.

#### Genotipagem para o gene MTHFR C677T:

O PCR foi realizado segundo protocolo e primers descritos por Frosst *et al.* . (1995).

A amplificação do PCR resultou em um fragmento de 198 pb que foi visualizado em gel de agarose 1,5%. O fragmento obtido foi digerido com a enzima de restrição *Hinf I* a 37°C por no mínimo 3 horas, em seguida a análise foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% por 2 horas a 80 V. Após a digestão, o genótipo CC resultou em um fragmento de 198 pb, enquanto no genótipo CT foram três fragmentos de 198, 175 e 23 pb, e o genótipo TT mostrou dois fragmentos de 175 e 23 pb.

### 3.7. Análise Comportamental

A avaliação dos comportamentos foi realizada segundo critérios do ADI-R – Autism Diagnostic Interview Revised (Lord *et al.*, 1994). Nós testamos os três

comportamentos que Goin-Kochel *et al.* (2009) encontraram associação significativa com o polimorfismo C677T do gene *MTHFR*, os quais são: evitação do olhar (evitar olhar nos olhos para se comunicar e para responder aos chamados dos outros), movimentos corporais complexos (movimentos complexos, esteriotipados e voluntários com todo o corpo, como movimentar os braços como se estivesse voando enquanto fica na ponta dos pés) e auto-agressão (atos agressivos consigo mesmo em período mínimo de três meses). A escala ADI-R foi convertido para “0” na ausência do comportamento específico e de 1 a 2 na presença do comportamento.

### 3.8. Análise dos Dados

Um banco de dados com os dados clínicos e de laboratório foi estabelecido no programa Excel®. Dados para análise epidemiológica e clínica foram tratados de maneira descritiva.

Os dados genotípicos foram analisados no software SPSS versão 10.0. O teste de qui-quadrado foi utilizado para testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, comparar freqüências alélicas e genotópicas entre os grupos, e comparar os comportamentos selecionados de acordo com os genótipos. O nível de significância foi  $p < 0,05$  e o intervalo de confiança foi de 95%.

## **CAPÍTULO IV**

### **ARTIGO 1**

***MTHFR* C677T IS NOT A RISK FACTOR FOR AUTISM SPECTRUM  
DISORDERS IN SOUTH BRAZIL**

Artigo aceito para publicação na Psychiatric Genetics mediante correções



***MTHFR* C677T IS NOT A RISK FACTOR FOR AUTISM SPECTRUM  
DISORDERS IN SOUTH BRAZIL**

**(Influence of *MTHFR* C677T on ASD - Santos et al.)**

Pollyanna Almeida Costa dos Santos<sup>1</sup>, Dânae Longo<sup>1</sup>, Ana Paula Carneiro  
Brandalize<sup>1</sup>, Lavínia Schüler-Faccini<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre,  
Brasil

Correspondence to Lavínia Schüler-Faccini, Departamento de Genética. Instituto  
de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15031. Porto Alegre – RS – Brasil

Zip Code 91501-970

Tel: +55 51-3308-9826

E-mail: [lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

Research supported by CNPq and CAPES. The authors declare no conflict of  
interest.

## **Abstract**

Many studies have suggested that autism may be associated with metabolic abnormalities in the folate/homocysteine pathway, which is involved in DNA methylation, thus altering gene expression. One of the most important polymorphisms in this pathway is C677T of the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene, because the T allele is associated with a decrease in enzymatic activity. We evaluated the association between C677T polymorphism and autism spectrum disorders (ASD) through a case-control study. Additionally, we analyzed the influence of this polymorphism on certain autistic behaviors like complex body movements, self-injury and averted gaze according to the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R). The analyses involved 151 children with idiopathic ASD and 100 healthy control children. The frequency of the T allele was 0.38 for the case group and 0.35 for the control group ( $p=0.77$ ). The genotypic distribution did not show significant differences between cases and controls ( $p=0.72$ ), nor association between the T allele and selected behaviors.

Key-words: homocysteine metabolism, autism spectrum disorders, *MTHFR*, averted gaze, self-injury.

## Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) form a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders defined behaviorally by three core disturbances: marked deficits in interpersonal social interaction, disrupted communication, and restricted repetitive and stereotyped patterns of behavior and interests (American Psychiatric Association, 2000). ASD is one of the most heritable among neuropsychiatric disorders, with a concordance rate in monozygotic twins between 60% and 90%, and 5% in dizygotic twins (Chakrabarti S and Fombonne E, 2005; Marco and Skuse, 2006).

One of the main difficulties in research on autism, besides its clinical heterogeneity, is the lack of biological markers. Several studies have revealed that folate plays an important role in neurological development due to its involvement in metabolic routes of transfer of methyl groups. The efficiency of this process depends on an interaction between nutritional, metabolic and genetic factors (Muskiel and Kemperman, 2006; Sudgen, 2006).

Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) is one of the most important enzymes in this pathway. It converts 5,10- methylenetetrahydrofolate to 5-methylenetetrahydrofolate and regulates the intracellular flow of folate (Frosst *et al.*, 1995). The C677T polymorphism in the *MTHFR* gene (A222V, rs1801133) is associated with a decrease in enzymatic activity to 50-60% in homozygotes T (Rozen, 1997).

The possible pathogenic mechanisms derived from imbalance of folate metabolism during embryo-fetal development and autism involve two hypotheses: (1) the modulation of the concentration of placental homocysteine, which may lead to teratogenesis, miscarriages and ruptures in the placenta, when in excessive levels. The folate supplementation programs adopted in several countries is one of the reasons for the lowest prevalence of pregnancy complications, and consequently fetal viability and the frequency of children carriers of the *MTHFR* 677T allele (Altomare *et al.*, 2007; Mayor-Olea *et al.*, 2008; Rogers, 2008); and (2) DNA methylation that is responsible for a variety of functions, like myelination, tissue-specific gene expression, chromatin structure, imprinted gene expression and inactivation of the X chromosome. Mutations in the *MTHFR* gene lead to hypomethylation and thus alter the accessibility to transcription factors. The fragile X syndrome and Rett syndrome are examples of diseases exhibiting changes in DNA methylation, and may present ASD as a characteristic (Schanen, 2006; James *et al.*, 2006; Lopes-Rangel and Lewis, 2006; James *et al.* 2008).

Some case-control studies reported an association between the T allele of the *MTHFR* 677T polymorphism and greater susceptibility to ASD (Rogers, 2008; Mohammad *et al.*, 2009), whereas others have not found any association (James *et al.*, 2006; Pasça *et al.*, 2008). Goin-Kochel *et al.* (2009) have found higher frequency of behaviors like averted gaze, complex body movements and self-injury in autistic children with at least one copy of the T allele.

This work investigates whether the *MTHFR* C677T polymorphism is associated with susceptibility to ASD through a case-control approach in a south Brazilian population. Additionally, we analyzed the influence of this polymorphism on certain autistic behaviors such as complex body movements, self-injury and averted gaze according to information provided in the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R).

### **Methods and Materials**

The case group (n=151) comprised patients with idiopathic ASD in treatment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) or at autistic support groups. Those patients were evaluated by experienced professionals from PROTID (Programa para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento), a multidisciplinary program directed to the research and treatment of Pervasive Developmental Disorders in HCPA. Patients were diagnosed using Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4<sup>th</sup> Edition (DSM-IV-TR criteria (American Psychiatric Association, 2000), or the Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Schopler *et al.*, 1986) in its Brazilian version (Pereira *et al.*, 2008). Exclusion criteria were age under three years and/or diagnosis of genetic or neurological disorder associated with ASD. The control group (n=100) comprised healthy children randomly selected during a blood collection for routine laboratory tests at HCPA. Case and control groups were predominantly European derived (92% and 93%, respectively). This study was approved by Research Ethics

Committee of HCPA (n° 05-451) and informed consent was obtained from all guardians of participants.

The ADI-R criteria were used for evaluation of patient's behavior (Lord *et al.*, 1994). We have tested three behaviors that Goin-Kochel *et al.* (2009) have found as significantly associated to C677T *MTHFR* polymorphism, namely averted gaze, complex body movements and self-injurious behavior. We converted the "0" ADI-R scale into absence of the specific behavior, or presence (1 to 2).

We collected 5 ml peripheral blood in EDTA. DNA was extracted according to Lahiri and Nurnberger (1991). *MTHFR* C677T polymorphism gene was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and performed according to Frosst *et al.* (1995).

The data were analyzed in SPSS software version 10.0. The chi-square test was used to test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), to compare allelic and genotype frequencies between the groups, and to compare the selected behaviors according to genotypes. The significance level was  $p < 0.05$  and the confidence interval (CI) was 95%.

## **Results**

The genotype distribution of the *MTHFR* C667T polymorphism was similar in both groups ( $p=0.72$ ) and it was in HWE in both (Table 1). Similarly, no significant differences were observed across genotypes (CC, CT, TT) for the three

selected behaviors – averted gaze, complex body movements, self-injurious,  $p=0.12$ ,  $p=0.57$  and  $p=0.91$ , respectively (Table 2).

## **Discussion**

We assessed the C677T polymorphism in the *MTHFR* gene in children with ASD and control children, and did not find differences in allelic and genotypic distributions. The frequency of the T allele observed in the control group in the present study (35%) is similar to that recorded in other studies conducted in samples formed by white subjects, since 93% of our sample was formed by descendants of European immigrants. Stevenson *et al.* (1997) and Yanamandra *et al.* (2003) recorded frequencies of 35% of this allele in North American Caucasian subjects.

A small study conducted by Pasca *et al.* (2008) with 39 subjects with ASD and 80 controls likewise did not observe any association between the C677T *MTHFR* polymorphism and susceptibility to ASD. However, Mohammad *et al.* (2009) found a significant association between 677T *MTHFR* and ASD, in a study conducted in India with 138 cases and 138 matched controls. The authors reported that this polymorphism increases the risk for ASD by 8 times when conjointly evaluated with the 1298C *MTHFR*.

James *et al.* (2006) investigated several polymorphisms in genes linked to folate/homocysteine pathways and to oxidative stress in ASD patients, among which were the polymorphisms *MTHFR* C677T and *MTHFR* A1298C, and did

not report any significant association when these polymorphisms were assessed separately. Yet, when these polymorphisms were analyzed conjointly, it was observed that they contributed to an increase in the risk for ASD. This type of analysis is important, since it includes the set of genetic enzyme variants that act in the same metabolic pathway, where there is an actual expectation that some kind of interaction occurs in terms of the role they play.

Goin-Kochel *et al.* (2009) analyzed autistic children and observed an association between presence of at least one T allele of *MTHFR* C677T and some frequent behaviors, including direct gaze, current complex body movements and self-injurious behavior. In the present study, we assessed the same behaviors and did not record any association.

Conflicting results are common in studies on complex diseases, which do not have defined biomarkers, and on metabolic routes where several genes are involved. In this study, we restricted our efforts to assess the effect of *MTHFR* C667T, since it is considered a key enzyme in the folate/homocysteine pathway.

In conclusion, from our findings and from other similar studies we infer that *MTHFR* C677T alone is not a risk factor for autism spectrum disorders.



## References

Altomare I, Adler A and Aledort LM (2007). The 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature. *Thrombosis Journal* **5**:17.

American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR. 4<sup>th</sup>ed. *Am Psychiatric Association*, Washington DC.

Chakrabarti S and Fombonne E (2005). Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry* **162**:1133-1141.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG *et al.* (1995). A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **10**:111-113.

Goin-Kochel RP, Porter AE, Peters SU, Shinawi M, Sahoo T and Beaudt AL (2009). The *MTHFR* 677C→T polymorphism and behaviors in children with autism: exploratory genotype-phenotype correlations. *Autism Res* **2(2)**:98-108.

James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH *et al.* (2006). Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **141**:947-956.

James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Hubanks A, Rose S and Gaylor DW (2008). Abnormal transmethylation/transsulfuration metabolism and DNA hypomethylation among parents of children with autism. *J Autism Dev Disord* **38(10)**:1976.

Lahiri KM and Nurnberger JI Jr (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **19**:5444.

Lopes-Rangel E and Lewis ME (2006). Loud and clear evidence for gene silencing by epigenetic mechanisms in autism and related neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* **69**:21-22

Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*. **24(5)**:659-685.

Marco EJ and Skuse DH (2006). Autism-lessons from the X chromosome. *SCANI*: 183 – 193.

Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares AR, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Rodríguez A *et al.* (2008). Human genetic selection on the *MTHFR* 677C>T polymorphism. *BMC Medical Genetics* **9**:104.

Mohammad NS, Jain JMN, Chintakind KP, Singh RP, Naik U and Akella RRD (2009). Aberrations in folate metabolic pathway and altered susceptibility to autism. *Psychiatric Genet* **19(4)**:171-176.

Muskiet FA and Kemperman RF (2006). Folate and long-chain polyunsaturated fatty acid in psychiatric disease. *J Nutr Biochem* **17**:717-727.

Pasca SP, Dronca E, Kaucsár T, Craciun EC, Endreffy E, Ferencz BK *et al.* (2008) One Carbon metabolism disturbances and the C677T *MTHFR* gene polymorphism in children with autism spectrum disorders. *J Cell Mol Med* Aug 9.

Pereira AM, Vagner MB, Riesgo RS (2008). Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J Pediatr* **84**: 487–494.

Rogers EJ (2008). Has enhanced folate status during pregnancy altered natural selection and possibly Autism prevalence? A closer look at a possible link. *Med Hypotheses* **71**(3):406-10.

Rozen R (1997). Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). *Thromb Haemost* **78**(1):523-6.

Schanen NC (2006). Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* **15**:R128-R150.

Schopler E, Reichler RJ, Rochen Renner BR (1986). The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism. *Irvington Publishers Inc*, NewYork.

Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ Jr (1997). Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between whites and blacks. (Letter) *Am J Hum Genet* **60**: 229-230

Sugden C (2006). One-Carbon metabolism in psychiatric illness. *Nutr Res Rev* **19**:117-36.

Yanamandra K, Bocchini JA Jr, Thurmon TF (2003) Absence of association of fetal *MTHFR* C677T polymorphism with prenatal Down syndrome pregnancies. (Letter) *Europ. J. Hum. Genet.* **11**: 5.

Table 1. Genotype and allelic distribution of *MTHFR* C677T polymorphism in patients with autism spectrum disorders (case group) and control individuals.

Genotype	<i>MTHFR</i> C677T			<i>p</i>	Allele T	OR (CI)	<i>p</i>
	CC	CT	TT				
	N (%)	N (%)	N (%)				
Case (n=151)	60 (40)	68 (45)	23 (15)	0.72	0.38	1.15 (0.8 – 1.7)	0.52
Control (n=100)	45 (45)	41 (41)	14 (14)		0.35		

Table 2. *MTHFR* C677T polymorphism and autistic behaviors in patients with autism spectrum disorders.

Behavior (according to ADI-R)	<i>MTHFR</i> C677T			$\chi^2$	<i>p</i>
	CC	CT	TT		
	Y/N <sup>a</sup>	Y/N	Y/N		
Averted gaze	37/19	34/28	15/5	4.30	0.12
Complex body movements	44/16	52/16	15/8	1.12	0.57
Self-injurious behavior	29/31	31/37	10/13	0.19	0.91

ADI-R, autism diagnostic interview revised;

<sup>a</sup> “Y” indicates that the behavior is present, “N” indicates that the behavior is not present

## **CAPÍTULO V**

### **ARTIGO 2**

Fragile X Syndrome Diagnostic in sample of individuals with idiopathic Autism  
Spectrum Disorders

Manuscrito em preparação para Genetics and Molecular Biology

Fragile X Syndrome Diagnostic in sample of individuals with idiopathic Autism  
Spectrum Disorders

Pollyanna Almeida Costa dos Santos <sup>1</sup>; Dânae Longo<sup>1</sup>; Sandra Leistner-Segal<sup>2</sup>;  
Têmis Maria Félix<sup>2</sup>; Lavínia Schüler-Faccini<sup>1;2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – RS – Brasil.

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – RS – Brasil

Short running: Fragile X Syndrome in Autism

Key words: Fragile X syndrome, autism, autistic spectrum disorders, full mutation,  
Pervasive Developmental Disorders

Correspondence to Lavínia Schüler-Faccini, Departamento de Genética. Instituto de  
Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15031. Porto Alegre – RS – Brasil

Zip Code 91501-970

Tel: +55 51-3308-9826

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Research supported by CNPq and CAPES. There was not conflict of interest.



## **Abstract**

Fragile X syndrome (FXS) is the most frequent cause of inherited mental retardation, and it is associated to developmental disorders, behavioral problems and autism spectrum disorders (ASD). The present study aimed to investigate FXS frequency in an idiopathic ASD sample. We studied a sample of 136 children, 97 were males and 39 females, presenting idiopathic ASD using the PCR technique. Our molecular analysis showed three (3.1%) males with full mutation, though it was inconclusive for most females (71.8%). These results show that it is essential to investigate FXS in all ASD patients, since the dysmorphological clinical feature of FXS is not enough to identify this disorder.

## Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASDs) represent a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders characterized by social and communication deficits, accompanied by repetitive and stereotyped behaviors, with onset before 3 years of age (American Psychiatric Association, 1994; McConachie and Diggle, 2007). The male:female sex ratio for autistic disorder is 4:1, implying an involvement of the X chromosome and/or imprinting mechanisms. Autism is associated with seizures and mental retardation (MR) in up to 30% and 80% of cases, respectively (Fombonne, 1999; Tuchman and Rapin, 2002).

Many genetic disorders are associated with a higher risk of ASD, the most common are tuberous sclerosis, Fragile X Syndrome (FXS) and Down Syndrome. FXS is the most frequent cause of inherited mental retardation. It occurs in approximately one in 4,000 males and more than 30% of those children are also diagnosed with ASD (Pembrey *et al.*, 2001; Reddy, 2005). The incidence of FXS in ASD patients is shown in table 1. Females are also affected at a rate of one in 8,000, but often with a milder phenotype (Marco and Skuse, 2006).

In most cases, this disorder is caused by expansions of a CGG repeat in the 5'-untranslated (UTR) region of the FMR1 gene that arises due to the mother meiotic instability (Garber *et al.*, 2008). This gene normally contains a stable repeat of 6-45 CGG trinucleotides, expansions ranging from 55-200 CGG repeats, defined as permutation that do not cause FMRP1 protein deficits, but demonstrate meiotic instability. If the expansion is over 200 CGG repeats, it is called full mutation and this condition leads to switching off the gene causing the FXS (O'Connel *et al.*, 2002;

Clifford *et al.*, 2007). The FMRP1 protein is involved in complex messenger ribonucleoproteins and translation ribosome association (Ceman *et al.*, 1999). Approximately 50% of the women with complete fragile X mutation present mental retardation, though they are in general less affected than men, and may also exhibit anxiety, language impairments, mood swings and depression. Around 50% of the females heterozygous for the complete mutation are intellectually normal. This variability is due to the process of inactivation of an X chromosome in women (Allen *et al.*, 2005; Garber *et al.*, 2008).

Clinically, patients with FXS exhibit mental retardation, macroorchidism, large ears and long faces. In most cases, the MR is moderate to severe, with frequent occurrence of autistic-like behaviors, including hyperarousal, social anxiety, withdrawal, stereotypic behaviors, gaze aversion and impaired social reciprocity (Rogers *et al.*, 2001; Hessler *et al.*, 2006; Otsuka *et al.*, 2009).

Because ASD and FXS share same behaviors characteristics and the clinical features in FXS are not always evident, the aim of this study was to investigate the frequency of FXS in an idiopathic ASD.

## **Material and Methods**

We evaluated 136 patients (39 females and 97 males) with idiopathic ASD in treatment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) or at autistic support groups. Those patients were evaluated by experienced professionals from PROTID (Programa para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento), a multidisciplinary program directed to research and treatment of Pervasive Developmental Disorders in

HCPA. Patients were diagnosed using Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4<sup>th</sup> Edition (DSM-IV-TR criteria) (American Psychiatric Association, 1994), or the Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Schopler *et al.*, 1986) in its Brazilian version (Pereira *et al.*, 2008). Exclusion criteria were age under three years and/or diagnosis of disorder associated to ASD. This study was approved by Research Ethics Committee of HCPA (n<sup>o</sup> 05-451) and informed consent was obtained from all guardians of participants.

We collected 5 ml peripheral blood in EDTA. DNA was extracted according to Lahiri and Nurnberger (Lahiri and Nurnberger, 1991). The *FMR1* gene was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) for specific amplification of the CGG repeat in the 5'end, according the protocol described by O'Connel *et al.* (2002). After amplification, the samples were submitted to electrophoresis in a 2.5% agarose gel at 80V for one hour. Two reactions were performed on each patient sample to confirm the results. The male FXS patients did not show amplified bands. Female patients were considered normal when showing two bands, and inconclusive when showing one band, because it is not possible to establish whether this unique band represents homozygosity for the normal allele or whether it in fact indicates the presence of an expanded allele, which cannot be identified using the PCR technique (figure 1).

## **Results**

Table 2 summarizes the number of cases per diagnosis. The full mutation of *FMR1* gene was observed in 3 males (3.1%), but in 28 females (71.8%) the result was inconclusive.

## Discussion

Frequently the clinical characteristics of FXS are very subtle, and therefore medical assistance is sought after due to motor delays, mental deficiency and autism signs because these are the most evident clinical manifestations. Our sample was selected so as to include only idiopathic ASD patients, that is, with no defined causes, according to the medical records. Among these, we observed a frequency of 3.1% of boys with positive result for FXS. Other groups conducted the same analysis and observed different frequencies, which may be explained by sample size and the inclusion criteria utilized (Table 1). Johnson *et al.* (2007) estimate that the prevalence of FXS in idiopathic ASD patients is between 2 and 8% of the general population, since there are no differences in relative prevalence in terms of ethnicity.

In our sample it was possible to identify 28 (71.8%) of girls with only one amplified band. Therefore, it is not possible to affirm whether the patient is homozygous for the normal allele or one of the alleles presents a pre-mutation or a complete mutation, and the result is called inconclusive. Steiner *et al* (2005) conducted a study with 82 autistic children, of which 69 were boys and 13 girls, finding one boy (1.5%) with FXS and 12 girls (92.2%) with inconclusive results, as observed in the present study.

Studies have demonstrated that due to the synaptic importance of the FMRP protein, which is abundant in neurons and is involved in structural and functional maturity of synapses, even acting as a RNA ligation protein that interacts with a set of messenger RNAs, it is believed that this association with other RNAs influence the expression of several other genes also related to autism, and would explain why 30% of children with FXS present not only ASD, but also epilepsy, mental retardation,

obsessive compulsive disorder, TDAH, among other psychiatric manifestations (Ceman *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009).

Due to the aspects addressed, it is recommended to sort for FXS all boys with ASD diagnosis, and if possible also girls, since the frequency of permutation in girls is twice as high as that observed in boys: one in 113 – 441 women and one in 813 – 1674 men, and in 5% of girls with pre-mutation have diagnosis criteria for ASD (Clifford *et al.*, 2007; Otsuka *et al.*, 2009). It is fundamental, therefore, to track all boys with ASD diagnosis, since the dysmorphological clinical picture of FXS is not enough to identify the syndrome.

## References

Allen EG, Sherman S, Abramowitz A, Leslie M, Novak G, Rusin M, Scott E, Letz R (2005) Examination of the effect of the polymorphic CGG repeat in the FMR1 gene on cognitive performance. *Behav Genet* 35:435-445.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4th edn. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994.

Ceman S, Brown V, Warren ST (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* 19:7925-7932.

Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins R, Taylor AK, Loesch DZ (2007) Autism Spectrum phenotype in males and females with Fragile X Syndrome full mutation and permutation. *J autism Dev Disord* 37:738-747.

Estécio M, Fett-Conte AC, Varella-Garcia M, Fridman C, Silva AE (2002) Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 32:35-41.

Fombonne E. The epidemiology of autism: a review. *Psychol Med* 1999;29: 769–786.

Garber KB, Visootsak J and Warren ST (2008) Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* 16: 666-672.

Gurling HM, Bolton PF, Vincent J, Melmer G, Rutter M (1997) Molecular and cytogenetic investigations of the fragile X region including the Frax A and Frax E CGG trinucleotide repeat sequences in families multiplex for autism and related phenotypes. *Hum Hered* 45:254-62.

Havlicova M, Propper L, Novotna D, Musova Z, Hrdlicka M, Sedlacek Z (2002) Genetic study of 20 patients with autism disorders. *Cas Lek Cesk* 141:381-7.

Hessl D, Glaser B, Dyer-Friedman J, Reiss AL (2006). Social behavior and cortisol reactivity in children with fragile X syndrome. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 47: 602–610.

Johnson CP, Myers SM; American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities (2007) *Pediatrics* Nov 120(5):1183-215.

Kielinen M, Rantala H, Timonen E, Linna SL, Moilanen I (2004) Associated medical disorders and disabilities in children with autistic disorders: a population-based study. *Autism* 8:49-60.



Lahiri KM and Nurnberger JI Jr (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.

Marco EJ & Skuse DH (2006) Autism-lessons from the X chromosome. *SCAN* 1, 183 – 193.

McConachie H and Diggle T (2007) Parent implemented early intervention for young children with autism spectrum disorder: a systematic review. *J Eval Clin Practice* 13:120-129.

O'Connel CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA *et al.* (2002) Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet* 61: 13-20.

Otsuka S, Sakamoto Y, Siomi H, Itakura M *et al.* (2009) Fragile X carrier screening and *FMR1* allele distribution in the Japanese population. *Brain Dev* 29: 9.

Pembrey, M.E., Barnicoat, A.J., Carmichael, B., Bobrow, M., Turner, G. (2001). An assessment of screening strategies for fragile X syndrome in the UK. *Health technology Assessment*, 5, 1–95.

Pereira AM, Vagner MB, Riesgo RS (2008). Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J Pediatr* 84: 487–494.

Reddy, K.S. (2005). Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Medical Genetics*, 6, 3.

Rogers SJ, Wehner DE, Hagerman R (2001) The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome idiopathic autism and other developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr* 22: 409-417.

Schopler E, Reihler RJ, Rothen Renner BR (1986). The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism. Irvington Publishers Inc, New York.

Steiner CE, Guerreiro MM, Marques-de-Faria AP, Lopes-Cender I (2005) Laboratorial diagnosis of Fragile-X Syndrome. *Arq Neuropsiquiatr* 63 (3-A): 564-570.

Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol* 2002;1: 352–358.

Zhang A, Shen CH, Ma AY, Ke Y, Idrissi AE (2009) Altered expression of autism-associated genes in the brain of Fragile X mouse model. *Bioch Biophysical Res Comunic* 379: 920-923.

Table 1. Incidence of Fragile X Syndrome in an Autism Spectrum Disorder sample.

Author	Year	Country	Sample Number	Result (%)
Gurling <i>et al</i>	1997	UK	25	12
Havlovicová <i>et al</i>	2002	Czech Republic	20	5
Estécio <i>et al</i>	2002	Brazil	30	11.1
Kielinen <i>et al</i>	2004	Finland	187	2.1
Reddy	2005	EUA	316	2.2
Steiner <i>et al</i>	2005	Brazil	82	1.5

Table 2. Population with idiopathic Autism Spectrum Disorder under investigation

Clinical diagnosis	N (%)
Autism	40 (29.4)
Asperger's syndrome	12 (8.8)
PDD-NOS	66 (48.6)
Like-autistic behavior	18 (13.2)

PDD-NOS: Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified

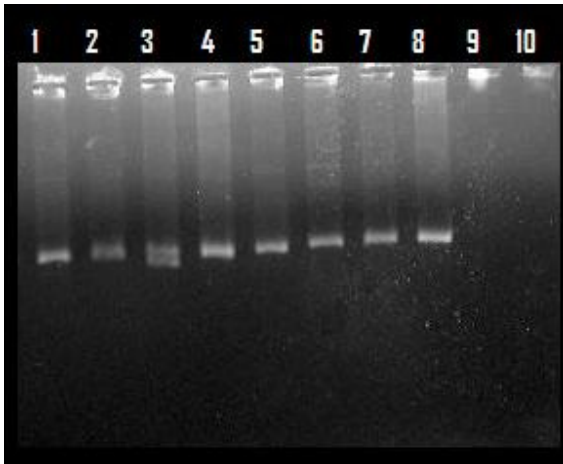


Figure 1. PCR technique showing picture of agarose gel. Lanes 1 and 2 represent inconclusive females. Lane 3 represents a heterozygous female. Lanes 4-8 are normal males for FXS and lanes 9-10 are FXS males.

**CAPÍTULO VI**  
**DISCUSSÃO**

## 6. Discussão

Frequentemente as características clínicas da SXF são muito sutis, por isso a maioria dos familiares procuram ajuda médica devido aos atrasos motores, deficiência mental e sinais autistas por serem as manifestações clínicas mais evidentes.

Nossa amostra foi selecionada para incluir apenas autistas idiopáticos, ou seja, sem causa definida, segundo os laudos médicos das crianças encaminhadas pelas APAES. Desses, encontramos uma frequência de 3,1% dos meninos com resultado positivo para SXF. Outros grupos realizaram a mesma análise, e encontraram diferentes frequências, que podem ser explicadas pelo tamanho amostral e os critérios de inclusão utilizados (Tabela 1). Em uma revisão de Johnson *et al.* (2007), eles estimam que a prevalência de SXF em autistas idiopáticos seja de 2 a 8% na população em geral, visto que não há diferenças de incidência relativas às diferenças étnicas. Nossa frequência parece ser baixa, mas isto se deve ao fato de que todos os pacientes com diagnóstico prévio de SXF foram excluídos desta amostra.

Em nossa amostra foi possível identificar 28 (71,8%) meninas com apenas uma banda. Desta forma, não é possível afirmar se a paciente apresenta dois alelos com o mesmo tamanho, ou se um dos alelos apresenta uma pré-mutação ou mutação completa, e o resultado é chamado de inconclusivo. Steiner *et al.* (2005) realizaram um estudo com 82 crianças autistas, sendo 69 meninos e 13 meninas, encontrando 12 meninas (92,2%) com resultados inconclusivos, após a realização de *Southern Blot* todas apresentaram padrão normal.



Clifford *et al.* (2007) descreveram em seu estudo que 5% das meninas com pré-mutação apresentam critérios de diagnóstico para TEA. Esta é, portanto, uma importante limitação deste trabalho. A impossibilidade técnica da realização de *Southern Blot* nos nossos pacientes, principalmente devido à necessidade de radiação, impediu que se fizesse o diagnóstico de presença de mutação completa em meninas e da pré-mutação em meninos e meninas.

**Tabela 1. Frequências de SXF em amostras de TEA.**

Autor	Ano	País	Número amostral	Resultado (%)
Gurling <i>et al.</i>	1997	Inglaterra	25	12
Havlovicová <i>et al.</i>	2002	Rep. Tcheca	20	5
Estécio <i>et al.</i>	2002	Brasil	30	11,1
Kielinen <i>et al.</i>	2004	Finlândia	187	2,1
Reddy	2005	EUA	316	2,2
Steiner <i>et al.</i>	2005	Brasil	82	1,5

Apesar dos meninos encaminhados ao nosso grupo de pesquisa terem passado por uma avaliação de seus médicos particulares ou de instituições a eles vinculadas, e não serem diagnosticados como portadores da SXF, após um exame clínico detalhado apresentaram sinais clínicos característicos de SXF, o que sugere a presença de mutação completa e não pré-mutação, e também a necessidade de uma avaliação mais aprimorada do corpo clínico que tratava esses pacientes. No caso das meninas, o exame clínico não é suficiente para uma inferência diagnóstica.

Apenas cerca de 10% dos casos de TEA são devido a síndromes que tem o autismo como sintoma secundário ou a efeitos ambientais e teratogênicos já bem estabelecidos, os outros 90% ainda estão sem explicação (Lintas and Persico, 2008). Com o aumento do interesse em estudos com essa população, a tendência é que essa proporção tão alta de TEA idiopático diminua, principalmente pela difusão do conhecimento e da investigação mais detalhada desses pacientes.

Em virtude dos aspectos abordados, recomenda-se a testagem para SXF em todos os meninos com diagnóstico de TEA, e se possível nas meninas, também, visto que a frequência de pré-mutação nelas é o dobro da encontrada em homens: 1 para cada 113 – 441 mulheres e 1 em 813 – 1674 homens (Otsuka *et al.* , 2009).

Estudos têm demonstrado que devido a importância sináptica da proteína FMRP, que é encontrada em abundância nos neurônios e está envolvida em processos de maturação estrutural e funcional das sinapses, inclusive agindo como uma proteína de ligação ao RNA que interage com um conjunto de RNAs mensageiros, acredita-se que essa associação com outros RNAs influenciam a expressão de muitos outros genes também relacionados ao autismo, e explicaria porque 30% das crianças com SXF apresentam não apenas TEA, mas também epilepsia, retardo mental, transtornos obsessivos compulsivos, TDAH, entre outras manifestações psiquiátricas (Ceman *et al.* , 1999; Weiller & Greenough, 1999; Zhang *et al.* , 2009).

Apesar da limitação deste estudo pelo fato de ter não ter sido possível detectar a presença de mutação em meninas ou de pré-mutação em meninos e

meninas, ainda assim, o índice de 3,1% de mutação em meninos indica que a SXF é um importante fator na etiologia do autismo classificado como idiopático. É fundamental, portanto, o rastreio de todos os meninos com diagnóstico de TEA, uma vez que o quadro clínico dismorfológico da SXF não é suficiente para a identificação desta síndrome.

Depois de feita triagem e excluídos os pacientes com SXF da nossa amostra inicial, ficamos com um grupo selecionado, onde avaliamos a possível associação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e TEA. Estudos do tipo caso-controle têm investigado o papel de polimorfismos presentes no metabolismo do ácido fólico e homocisteína como possíveis fatores de risco para TEA. No ano de 2009, o resultado de um estudo realizado Índia, composto de 138 casos e 138 controles, sugeriu que o polimorfismo C677T no gene *MTHFR* pode aumentar a susceptibilidade a TEA em crianças com pelo menos um alelo T (Mohammad *et al.*, 2009). Entretanto, outras pesquisas não confirmaram esta associação.

Um pequeno estudo realizado por Pasca *et al.* (2008) com 39 indivíduos com TEA e 80 controles não encontraram associação entre *MTHFR* C677T e susceptibilidade a TEA. James *et al.* (2006) realizaram um estudo caso-controle e analisaram muitos polimorfismos em genes ligados ao metabolismo do ácido fólico e homocisteína em pacientes com TEA, entre eles os polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*, e não encontraram nenhuma associação quando os polimorfismos foram testados individualmente. Entretanto, quando analisados conjuntamente,

observou-se que o heterozigoto composto C677T/A1298C apresentou um aumento de risco limítrofe para TEA em 1,78 vezes (IC=0,97-3,26).

No presente estudo, também não encontramos nenhuma associação entre MTHFR e TEA ( $p=0,72$ ). A frequência do alelo T foi similar em casos (0,38) e controles (0,35) e está de acordo com as frequências de outros estudos que avaliaram euro-descendentes. Arruda *et al.* (1998) avaliaram a prevalência deste polimorfismo entre diversos grupos étnicos no Brasil e relataram que a frequência do alelo T é de 0,37 em euro-descendentes. Recente estudo brasileiro avaliando uma população do sul do Brasil encontrou a mesma frequência de 37% (Brandalize *et al.*, 2009). Stevenson *et al.* (1997) e Yanamandra *et al.* (2003) encontraram frequências de 0,35 para o alelo T em norte americanos brancos.

Goin-Kochel *et al.*(2009) analisaram crianças autistas e observaram uma associação entre ao menos um alelo T do gene *MTHFR* e alguns comportamentos característicos de TEA, incluindo evitação de olhar, movimentos corporais complexos e auto-agressão. No presente estudo, fizemos a mesma análise utilizando os critérios comportamentais descritos no ADI-R, e não encontramos nenhuma associação (tabela 8).

Na tabela 2 é possível observar um resumo de todos os trabalhos publicados até o momento envolvendo MTHFR e susceptibilidade a TEA.

**Tabela 2. Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* em diferentes estudos.**

Referências	Ano	País	Frequência alélica <i>MTHFR</i> C677T			
			Casos		Controles	
			C	T	C	T
Pasça <i>et al.</i>	2008	Romênia	0,72	0,28	0,75	0,25
Goin-Kochel <i>et al.</i> <sup>a</sup>	2009	EUA	0,65	0,35	-	-
Mohammad <i>et al.</i>	2009	Índia	0,84	0,16	0,93	0,07
James <i>et al.</i>	2008	EUA	0,62	0,38	0,67	0,33
Presente estudo	2009	Brasil	0,62	0,38	0,65	0,35

<sup>a</sup> Goin-Kochel *et al.* (2009) não é caso-controle.

Resultados inconsistentes são comuns quando se trata de doenças complexas visto que muitos fatores estão envolvidos: genéticos, ambientais e metabólicos. Definir um biomarcador específico para estas doenças é muito difícil, e por isso a relevância de estudos como o nosso, onde avaliamos a relação de um importante polimorfismo à susceptibilidade para TEA. Nossos achados inferem que *MTHFR* C677T não é um fator de risco para TEA, corroborando com estudos anteriores.

Diante dos nossos resultados ainda não é possível descartar nenhuma das hipóteses preconcebidas em estudos anteriores – suplementação vitamínica e hipometilação do DNA – pois não encontrar associação entre TEA e um dos polimorfismos do gene *MTHFR* não significa que outras variantes também não estejam relacionadas. Sendo o metabolismo do ácido fólico e homocisteína vias que envolvem muitas variáveis genéticas, está em nossa perspectiva ampliar a análise dessas outras variáveis, uma vez que esperamos que ocorram interações entre os sistemas.

**CAPÍTULO VII**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. Referências Bibliográficas

AACAP Official Action (1999) Practice parameters for the assesment and treatment of children, adolescents and adults with autism and other pervasive developmental disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38(12 suppl): 32S-54S.

Allen EG, Sherman S, Abramowitz A, Leslie M, Novak G, Rusin M, Scott E, Letz R (2005) Examination of the effect of the polymorphic CGG repeat in the FMR1 gene on cognitive performance. *Behav Genet* 35:435-45

American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR. 4<sup>th</sup>ed. American Psychiatric Association, Washington DC.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, Von Zuben PM, Soares MCP, Menezes SR, Bizzacchi JM, Costa FF (1998) Prevalence of the mutation C677T in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 78(4):332-335.

Baron-Cohen S, Wheelwright S, Skinner R, Martin J and Clubley E (2001) The autism-spectrum quotient (AQ): evidence from Asperger syndrome/high-functioning autism, males and females, scientists and mathematicians. *J Autism Dev Disord* 31: 5-17

Bailey LB (2000) New standard for dietary folate intake in pregnant women. *Am J Clin Nutr* 71 (suppl):1304S-07S.

Bailey Jr DB, Mesibov GB, Hatton DD, Clark RD, Roberts JE, Mayhew L (1998) Autistic behavior in young boys with fragile X syndrome. *J Autism Dev Disord* 28:499-508.

Barton M & Volkmar F (1998) How commonly are kwon medical conditions associated with autism? *J Autism Dev Disord* Aug 28(4): 273-8

- Borghgraef M, Steyaert J, Deroo S, Maes B, Fryns JP (2004) Preliminary findings in boys with fragile X premutation: is there a distinct behavioral phenotype? *In: International Fragile X Conference*, Washington, D.C.
- Bosa C e Callias M (2000) Autismo: breve revisão de diferentes abordagens. *Psicologia: Reflexão e Crítica* 13: 167-177.
- Botto LD and Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in congenital anomalies: A Huge Review. *Epidemiology* 151:862-872.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Félix TM, Roisenberg I, Schüler-Faccini L (2007) Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res* Jun 40(6): 787-91
- Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L (2009) Evaluation of C677T and A1298C Polymorphisms of the MTHFR Gene as Maternal Risk Factors for Down Syndrome and Congenital Heart Defects. *Am J Med Genet A* Oct 149A(10): 2080-7.
- Caronna EB, Milunsky JM, Tager-Flusberg H (2008) Autism: Clinical and research frontiers. *Arch. Dis. Child*, Feb 27.
- Cavalheira G, Vergani N, Brunoni D (2004) Genética do autismo. *Rev Bras Psiquiat* 26 (4): 270-2
- Ceman S, Brown V, Warren ST (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* 19:7925-32
- Centers for Disease Control and Prevention (2007) Prevalence of autism spectrum disorders - autism and developmental disabilities monitoring network, six sites, United States, 2000 56.(SS-1)



Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins RM, Taylor AK, Loesch DZ (2007) Autism Spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and permutation. *J Autism Dev Disord* 37: 738-747

Cohen S, Zhou Z, Greenberg ME (2008) Activating a repressor. *Science*, vol 320: 1172-73, May 30.

Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Scott E, Leslie M, Shubek L, Holmgreen P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman SL (2002) Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. *Am J Med Genet* 110:226-33

Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72:468-77

de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Halley DJ, Sandkuijl LA, Oostra BA, Tibben A, Niermeijer MF (1997) Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 61:660-7

Deth R, Muratore C, Benzecry J, Power-Charnitsky V, Waly M (2008) How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. *Neurotoxicology* 29: 190-201.

Eskes TK (1997) Folate and the fetus. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol* 71(2): 105-111.

Estécio M, Fett-Conte AC, Varella-Garcia M, Fridman C, Silva A.E (2002) Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 32:35-41

- Farzin F, Perry H, Hessel D, Loesch D, Cohen J, Bacalman S (2006) Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. *J Dev Behav Pediatr* 27: S137–44
- Farzin F, Perry H, Hessel D, Loesch D, Cohen J, Bacalman S, Gane L, Tassone F, Hagerman P, Hagerman R (2006) Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X permutation. *J Dev Behav Pediatr* 27:S137-44
- Félix TM, Leistner S, Giugliani R (2004) Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* Jul 70(7): 459-63.
- Florência G, Irene S, Verônica F (2006) Fragile-X mental retardation:molecular diagnosis in argentine patients. *J Bioch Mol Biology*, Vol 39, No. 6: 767
- Fombonne E (1998) The epidemiology of child and adolescent psychiatric disorders: recent developments and issues. *Epidemiol Psychiatr Soc* 7(3): 161-6.
- Fombonne E (1999) The epidemiology of autism: a review. *Psychol Medicine* 29: 769-786
- Fombonne E (2002) Epidemiological trends in rates of autism. *Mol Psychiatry* 7(Suppl 2): 4
- Freitag CM (2007) Genetics of autistic disorders review. *Mol Psychiatry* 12: 2-22
- Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. (1995). A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113.
- Garber KB, Visootsak J, Warren ST (2008) Fragile X Syndrome. *Eur J Hum Genet* 16(6): 666-72
- Ghidoni BBV (2007) Rett Syndrome. *Child Adolesc Psychiatric Clin N Am* 16: 723-743

Gillberg C (1993) Autism and related behaviours. *J Intellect Disabil Res* 37: 343-372

Gillberg C and Coleman M (2000) *The Biology of the Autistic Syndromes*. 3<sup>rd</sup> ed. Mac Keith Press, distributed by Cambridge University Press, London.

Goin-Kochel RP, Porter AE, Peters SU, Shinawi M, Sahoo T and Beaudt AL (2009). The MTHFR 677C>T polymorphism and behaviors in children with autism: exploratory genotype-phenotype correlations. *Autism Res* 2(2):98-108.

Gosh M, Shah AH, Dhir K, Merchant KF (2008) Behavior in children with Down Syndrome. *Indian J Pediatrics* Vol 75: 685-9.

Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7:195-200.

Gupta AR & State MW (2007) Recent advances in the genetics of autism. *Biol Psychiatry* 61: 429-437

Gurling HM, Bolton PF, Vincent J, Melmer G, Rutter M (1997) Molecular and cytogenetic investigations of the fragile X region including the Frax A and Frax E CGG trinucleotide repeat sequences in families multiplex for autism and related phenotypes. *Hum Hered* 45:254-62

Hagerman RJ, Hagerman PJ (2002) The fragile X permutation: into the phenotypic fold. *Current Opinion in Genetics & Development* 12:278-283

Hagerman RJ & Harris SW (2008) Autism profiles of males with Fragile X Syndrome. *Am J Ment Retard*. Nov 113 (6): 427 – 438.

Havlicova M, Propper L, Novotna D, Musova Z, Hrdlicka M, Sedlacek Z (2002) Genetic study of 20 patients with autism disorders. *Cas Lek Cesk* 141:381-7

- Hertz-Picciotto I, Croen LA, Hansen R, Jones CR, van de Water J, Pessah IN (2006) The CHARGE Study: An Epidemiologic Investigation of Genetic and Environmental Factors Contributing to Autism. *Environ Health Perspectives* 114 (7): 1119-1125
- Hessl D, Rivera S, Koldewyn K, Cordeiro L, Adams J, Tassone F, Hagerman PJ, Hagerman RJ (2007) Amygdala dysfunction in men with the fragile X premutation. *Brain* 130:404–416.
- James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH et al. (2006). Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141:947-956.
- Johnson CP, Myers SM, Council on Children With Disabilities (2007) Identification and Evaluation of children with autism spectrum disorders.
- Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 2: 217-250.
- Keller F and Persico A (2003) The neurobiological context of autism. *Mol Neurobiol* 28: 1-22.
- Kielinen M, Rantala H, Timonen E, Linna SL, Moilanen I (2004) Associated medical disorders and disabilities in children with autistic disorders: a population-based study. *Autism* 8:49-60
- Koukoui SD & Chaudhuri A (2007) Neuroanatomical, molecular genetic, and behavioral correlates of fragile X syndrome: Review. *Brain Res Rev* 53(1): 27-38
- Liao L, Park SK, Xu, T, Vanderklish P and Yates III JR (2008) Quantitative proteomic analysis of primary neurons reveals diverse changes in synaptic protein content in *fmr1* knockout mice. *PNAS* 40(105): 15281-15286.
- Lintas C and Persico AM (2008) Autistic phenotypes and genetic testing :state-of-the-art for the clinical geneticists. *Genet Med* 10: 4-12
- Lockyer L and Rutter M (1969) A five to fifteen year to follow up study of infantile psychosis: III. Psychological aspects. *Br J Psychiatry* 115: 865-882.

Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord.* 24(5):659-685.

Marco EJ & Skuse DH (2006) Autism-lessons from the X chromosome. *SCAN* 1, 183 – 193.

Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences* 26: 137-146.

Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares AR, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Rodríguez A et al. (2008). Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. *BMC Medical Genetics* 9:104.

McConachie H & Diggle T (2007) Parent implemented early intervention for young children with autism spectrum disorder: a systematic review. *J Eval Clin Practice* 13: 120-129.

Mercadante MT, Van der Gaag RJ, Schwartzman JS (2006) Non-autistic pervasive developmental disorders: Rett syndrome, disintegrative disorder and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *Rev Bras Psiquiatr* 28(Supl I):S12-20.

Mohammad NS, Jain JMN, Chintakind KP, Singh RP, Naik U and Akella RRD (2009). Aberrations in folate metabolic pathway and altered susceptibility to autism. *Psychiatric Genet* 19(4):171-176.

Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, Giarelli E, Grether JK, Levy SE, Mandell DS, Miller LA, Pinto-Martin J, Reaven J et al (2007) The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Health*: 28.

O'Connell CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA and Richie KL (2002) Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet* 61: 13–20.

Otsuka S, Sakamoto Y, Siomi H, Itakura M, Yamamoto K, Matumoto H, Sasaki T, Kato N, Nanba E (2009) Fragile X carrier screening and FMR1 allele distribution in the Japanese population. *Brain Dev*, doi:10.1016/j.braindev.2008.12.015.

Pasça SP, Dronca E, Kaucsár T, Craciun EC, Endreffy E, Ferencz BK et al. (2008) One Carbon metabolism disturbances and the C677T MTHFR gene polymorphism in children with autism spectrum disorders. *J Cell Mol Med* Aug 9.

Razin A (1998) CpG methylation, chromatine structure and gene silencing – a three-way connection. *EMBO J*, 17:4905-4908.

Reddy KS (2005) Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Medical Genetics* 6:3

Reis AHO, Ferreira ACS, Gomes KB, Aguiar MJB, Fonseca CG, Cardoso FE, Pardini VC, Carvalho MRS (2008) Frequency of FMR1 premutation in individuals with ataxia and/or tremor and/or parkinsonism. *Genet Mol Research* 7(1): 74-84.

Rogers EJ (2008). Has enhanced folate status during pregnancy altered natural selection and possibly Autism prevalence? A closer look at a possible link. *Med Hypotheses* 71(3):406-10.

Rogers SJ, Wehner DE, Hagerman R (2000) The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism and other developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr* 22:409-17.

Roseblatt DS and Fenton WA (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic & molecular bases of inherited diseases*. 8 ed McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York .

Rozen R (1997). Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost* 78(1):523-6.

Rutter M (1970) Autistic children: infancy to adulthood. *Semin Psychiatry* 2: 345-350.

Schanen NC (2006). Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 15:R128-R150.

Schultz ST, Klonoff-Cohen HS, Wingard DL, Akshoomoff NA, Macera CA, Ji M (2008) Acetaminophen (paracetamol) use, measles-mumps-rubella vaccination and autistic disorder: The results of parent survey. *Autism* 12: 293.

Sharp L and Little J (2004) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGe Review. *Am J Epidemiol* 159:423-443.

Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA (2005) Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med* 7:584-7

Steiner CE, Guerreiro MM, Marques-de-Faria AP, Lopes-Cender I (2005) Laboratorial diagnosis of Fragile-X Syndrome. *Arq Neuropsiquiatr* 63 (3-A): 564-570

Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ Jr (1997). Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between whites and blacks. (Letter) *Am J Hum Genet* 60: 229-230

Sykes NH and Lamb JA (2007) Autism: the quest for the genes. *Expert Rev Mol Med* Sep 3;9(24):1-15

Tassone F, Ruiqin P, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ (2008) A rapid polymerase chain reaction – based screening method for identification of all expanded alleles of the Fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diag Vol* 10 (1): 43-49

Treffert DA and Wallace GL (2002) Ilhas de Genialidade. *Scientific American Brasil*, Julho: 80-89

Tzeng CC, Tsai LP, Hwu WL, Lin SJ, Chao MC, Jong YJ, Chu SY, Chao WC, Lu CL (2005) Prevalence of the FMR1 mutation in Taiwan assessed by large-scale screening of newborn boys and analysis of DXS548-FRAXAC1 haplotype. *Am J Med Genet A* 133:37-43

Weiler IJ and Greenough WT (1999) Synaptic synthesis of the Fragile X protein: possible involvement in synapse maturation and elimination. *Am J Med Genet* 83:248-52

Williams JG, Higgins JP, Brayne CE (2006) Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch Dis Child* 91(1): 8-15.

Wing L and Potter D (2002) The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8: 151.

Yanamandra K, Bocchini JA Jr, Thurmon TF (2003) Absence of association of fetal MTHFR C677T polymorphism with prenatal Down syndrome pregnancies. (Letter) *Europ. J. Hum. Genet.* 11: 5.

Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernherg N, Boyle C, Murphy C (2003) Prevalence of Autism in a US metropolitan area. *JAMA* vol 289. No. 1.

Zhang A, Shen CH, Ma AY, Ke Y, Idrissi AE (2009) Altered expression of autism-associated genes in the brain of Fragile X mouse model. *Bioch Biophysical Res Comunic* 379: 920-923.



## **ANEXO I**

## **8. Anexo I**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### I. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

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

#### II. Procedimentos que serão utilizados:

Serão coletados do filho(a), da mãe e do pai de 5 a 10 ml de sangue. As amostras serão estudadas para análise genética relacionada com Autismo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras de sangue serão armazenadas no Serviço de Genética Médica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### III. Riscos e desconfortos potenciais:

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

#### IV. Benefícios esperados:

Este estudo poderá no futuro beneficiar as famílias dos afetados através de aconselhamento em que fatores de risco genético poderão ser identificados, contribuindo no diagnóstico e estimativa de risco de ocorrência de outros casos nestas famílias.

#### V. Procedimentos alternativos:

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

#### VI. Formas de acompanhamento e assistência:

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

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

Fui igualmente informado:

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

Os pesquisadores responsáveis por esse projeto de pesquisa são a Prof<sup>a</sup> Dra. Lavínia Schüler-Faccini (Fone: 51 2101-8008) e Dânae Longo (Fone: 51 3316-6727), tendo sido esse documento revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ .

Data \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ .

Nome ou assinatura do Paciente ou Responsável

---