

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE DNA ASSOCIADOS AOS DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO

STUDIES OF DNA POLYMORPHISM AND DEVELOPMENTAL DISORDERS

Ana Paula Pimentel Costa¹

Aline H. Correa Garcia²

Bruno Copreski³

Décio Brunoni⁴

¹Professora Curso de Ciências Biológicas, CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie

²Mestranda do Programa de PG Distúrbios do Desenvolvimento, CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie

³Graduando Curso de Ciências Biológicas, CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie

⁴Professor do Programa de PG Distúrbios do Desenvolvimento, CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie

RESUMO

A capacidade em detectar polimorfismos no nível do DNA vem modificando profundamente os estudos de genética humana. Um dos maiores impactos da detecção de polimorfismos do DNA tem sido o seu emprego para analisar marcadores para mapeamento, clonagem e identificação de genes causadores de doenças. O objetivo principal é identificar a variação de seqüência do DNA que cause ou contribua para um fenótipo específico. Contudo o desafio maior é identificar polimorfismos e empregá-los para esclarecer os componentes genéticos de doenças humanas complexas. Muitos estudos analisam polimorfismos de genes candidatos aos transtornos invasivos do desenvolvimento, particularmente relacionados ao transtorno autista.

Palavras-chave: autismo, polimorfismo de DNA, serotonina, gene 5HT2A, gene SLC6A4

ABSTRACT

Detection of DNA polymorphisms deeply changed the human genetic studies. Their use caused significant impact to assess markers for mapping, cloning and identification of disease genes. The objective is to identify a variation in DNA sequence that causes or contributes to a specific phenotype. The challenge is to identify polymorphisms and their use to understand the genetic components of complex human diseases. Many studies have analyzed polymorphisms of candidate genes for pervasive developmental disorders, particularly related to autism.

Key-words: autism, DNA polymorphism, serotonin, gene 5HT2A, gene SLC6A4

INTRODUÇÃO

Todos os seres humanos são praticamente idênticos no nível genético, e o conjunto completo de genes e outros aspectos da seqüência do nosso DNA são essencialmente os mesmos. A maior parte do DNA de qualquer indivíduo, por volta de 99,5%, é exatamente a mesma comparada com qualquer outro individuo (GOLDSTEIN e CAVALLERI, 2005). As diferenças na seqüência de DNA entre indivíduos são chamadas de polimorfismos. Polimorfismos são definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma freqüência maior que 1%, variantes de seqüência de DNA que estão presentes em uma freqüência menor que 1% na população são arbitrariamente chamados de mutação (SCHAFER e HAWKINS, 1998).

A capacidade em detectar polimorfismos no nível do DNA vem modificando profundamente os estudos de genética humana. Um dos maiores impactos da detecção de polimorfismos do DNA tem sido o seu emprego para analisar marcadores para mapeamento, clonagem e identificação de genes causadores de doenças (THE HAPMAP CONSORTIUM, 2007). O objetivo principal é identificar a variação de seqüência do DNA que cause ou contribua para um fenótipo específico. Contudo o desafio maior é identificar polimorfismos e empregá-los para esclarecer os componentes genéticos de doenças humanas complexas. As bases genéticas destas doenças são complexas pela combinação entre vários genes e o ambiente. As investigações

necessitam de um grande número de polimorfismos de DNA e de métodos que permitam analisar uma grande população com estes marcadores. O estudo e identificação sistemática de polimorfismos de DNA presentes no genoma humano geram subsídios importantes para a elucidação do componente genético da maioria dos fenótipos clínicos e não-clínicos (GOLDSTEIN e CAVALLERI, 2005).

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

Com exceção da Síndrome de Rett, as causas genéticas dos TID ainda necessitam ser elucidadas. Em 1999, as mutações do gene MECP2 (METHYL-CpG-BINDING PROTEIN 2) foram descritas em pacientes com Síndrome de Rett (AMYR et al, 1999). Estudos mais recentes indicam que cerca de 75% a 80% dos pacientes com a forma clássica de Síndrome de Rett contêm mutações nesse gene. O gene codifica a proteína MECP2, que opera como um repressor global da transcrição. Essa proteína atua em diferentes sítos e as diferentes mutações já identificadas poderiam ser responsáveis pelos vários padrões fenotípicos que têm sido observados (MERCADANTE et al, 2006).

Evidências têm sugerido que o autismo tem um grande componente genético de herança multifatorial complexa com modelo de interação *multiloci*. (CARVALHEIRA *et al*, 2004). Ainda não se sabe a identidade e o número de genes envolvidos com o autismo de causa idiopática. Existem por volta de 13 estudos publicados de triagens genômicas sobre o espectro autista (IMGSAC, 1998; BARRETT et al.,1999; PHILIPPE et al., 1999; BUXBAUM al., 2001; IMGSAC, 2001; LIU et al.,2001; AURANEN et al., 2002; SHAO et al.,2002; YONAN et al., 2003; BUXBAUM et al.,2004; YLISAUKKOOJA et al., 2004, THE AUTISM GENOME

PROJECT CONSORTIUM, 2007). Evidências sobre a localização dos possíveis genes candidatos podem ser encontrados em diversas regiões ao longo do genoma, mais especificamente nas regiões 2q, 7q, 11p e 17q. A relevância desses genes na origem do autismo é determinada pelo uso de métodos experimentais para estimar a atividade biológica, expressão e associações alélicas nas populações com autismo e em suas famílias. O intuito dessas pesquisas é obter uma evidência genética que suporte a relação de certos polimorfismos com a suscetibilidade ao autismo.

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

Polimorfismos de DNA

O desenvolvimento de técnicas para isolar, cortar e seqüenciar o DNA nas décadas de 1970 e 1980 geraram ferramentas poderosas para detectar, quantificar e investigar a variabilidade genética. A aplicação destas técnicas tem possibilitado uma observação detalhada da variação molecular tanto dentro como fora de regiões codantes (PIERCE, 2005).

Os primeiros polimorfismos de DNA foram detectados nos anos 1970 como polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*). A diferença dos tamanhos dos fragmentos deve-se a clivagem ou não do DNA em sítios específicos de reconhecimento de enzimas de restrição. Enzimas de restrição ou endonucleases de restrição são enzimas que cortam o DNA. As enzimas de restrição reconhecem e cortam em posições específicas ao longo da molécula de DNA, os chamados sítios de restrição. Cada enzima

tem seu próprio sítio de reconhecimento. Em geral, um sítio de restrição é formado por uma sequência específica de 4 a 6 pares de bases. As variações ou polimorfismos nas seqüências de DNA resultam em variações nestes sítios de restrição, o que pode acarretar o seu reconhecimento (se a seqüência do sítio estiver íntegra) ou não (se ocorreu alteração nesta seqüência) pela enzima de restrição. Como cada pessoa tem seqüências típicas de bases nitrogenadas, o número e os tamanhos dos fragmentos obtidos pelo corte enzimático acabam por caracterizar seu DNA.

Posteriormente, o desenvolvimento de novos métodos permitiu o aparecimento de uma segunda classe de RFLPs onde a variação do tamanho dos fragmentos de restrição deve-se a número variável de repetições em seqüência, ou em *tandem* (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*) (JEFFREY et al, 1985). Repetições em *tandem* são múltiplas seqüências repetidas de DNA, também chamadas de minisatélites. Outro tipo de polimorfismo de VNTRs foi descrito baseado em repetições constituídas por apenas dois pares de bases, chamadas de microsátélites ou STR (*short tandem repeats*) (WEBER e MAY, 1989). Os microsátélites estão presentes em muitas cópias no genoma e pelo seu tamanho diminuto, podem ser facilmente detectados pela reação da polimerase em cadeia (PCR - *Polymerase Chain Reaction*).

O princípio básico da PCR está na capacidade de, a partir de quantidades mínimas de DNA, multiplicar uma determinada seqüência, de modo que esta se torne majoritária na amostra. Para a realização da PCR, utiliza-se uma enzima termoestável (DNA polimerase). Esta enzima na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), que nada mais são do que pequenos fragmentos de DNA complementares às extremidades da região que se pretende amplificar, e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Esta técnica proposta por Kary Mullins em 1987 revolucionou a análise molecular do DNA.

Tanto os fragmentos obtidos após o corte enzimático como os produtos amplificados por PCR podem ser analisados através da técnica de eletroforese. A mistura de fragmentos de DNA é aplicada em um gel (agarose ou poliacrilamida) e submetida a um campo elétrico. Nessas condições, os fragmentos se movem a velocidades inversamente proporcionais ao seu tamanho, isto é, os fragmentos menores deslocam-se mais rapidamente que os maiores. Quando o campo

elétrico é desligado, fragmentos de mesmo tamanho estacionam juntos em determinada posição do gel, formando uma banda. Através da análise do padrão de bandas obtido é possível detectar a presença ou ausência do polimorfismo estudado.

Mais recentemente o seqüenciamento do DNA permitiu a detecção de diferenças em um único nucleotídeo na seqüência de DNA, chamados de polimorfismos de base única (SNP- Single Nucleotide Polymorphism). Os SNPs são numerosos e encontram-se fartamente distribuídos ao longo do genoma, mais de seis milhões de SNPs validados são atualmente conhecidos (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2007). Um polimorfismo de base única é a variação na seqüência de DNA que ocorre quando um único nucleotídeo (A, T, C, ou G) em uma determinada seqüência, difere entre indivíduos da mesma espécie ou entre os cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo. Por exemplo, ao analisar uma mesma região de uma seqüência de DNA em dois indivíduos, GGTAGCTAGG e GGTAGTTAGG, observamos que a única diferença é a alteração de uma única base, C e T. Deste modo, a diferença no tamanho dos fragmentos de restrição devido à clivagem ou não do DNA em um sítio específico, pode ser causada por um SNP, criando ou abolindo o sítio de reconhecimento da enzima. Os SNPs são os polimorfismos de DNA mais abundantes no genoma humano, e estão presentes numa freqüência alélica mínima de 1 a 5% na população (HINDS et al, 2005).

Utilização de polimorfismos de DNA em estudos genéticos

Existem milhões de polimorfismos no genoma humano, e assim vem crescendo exponencialmente o número de estudos genéticos na tentativa de associar o polimorfismo genético com uma doença ou a susceptibilidade a doença. Um dos métodos utilizados são os estudos genéticos de associação. Nestes estudos ao invés de estudar famílias onde se observa a segregação de uma doença em particular, são estudadas amostras de indivíduos afetados e não afetados dentro de uma população. A freqüência, na qual certos alelos estão presentes em cada um destes grupos, é testada para a associação com a doença. Muitos destes estudos têm sido realizados para detectar os possíveis genes candidatos e sua relevância na fisiopatologia do

autismo. Com base na informação biológica disponível atualmente sobre o autismo é possível selecionar genes candidatos e testar sua associação.

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

Uma categoria de genes que vem recebendo muita atenção engloba os genes responsáveis pela codificação das proteínas envolvidas no metabolismo do neurotransmissor cerebral serotonina (COOK e LEVENTAL, 1996). O interesse nestes genes deve-se as primeiras descobertas de hiperserotonemia em aproximadamente 30% dos indivíduos autistas (SCHAIN e FREEDMAN, 1961). Assim mutações em genes importantes para a função do sistema serotoninérgico, têm sido alvos de muitos estudos. A serotonina é essencial durante o desenvolvimento e se alterada pode contribuir para as anomalias estruturais no cérebro e para as características centrais de comportamento encontradas em autistas (ANDERSON, 2002). Whitaker-Azimitia (2001) relata que a serotonina trabalha na regulação do desenvolvimento cerebral antes de ser um neurotransmissor no cérebro maduro, e que o seu aumento durante o desenvolvimento é a causa provável de perdas dos terminais serotoninérgicos, que podem levar à alterações dos processos de desenvolvimento, e ocasionar diminuição do volume hipocampal, diminuição na árvore dendrítica e com isso perda de conexões com o córtex. É devido a estas alterações e as funções desempenhadas por essa substância no período embrionário e como neurotransmissor, cuja sinalização anormal pode contribuir para o comportamento autístico, que os genes que codificam proteínas participantes do sistema serotoninérgico, são candidatos para estudo em autistas. Alguns desses genes já vêm sendo estudados em indivíduos afetados, tanto para os genes que codificam o transportador da serotonina quanto os genes que codificam seus receptores.

Gene receptor da serotonina

O gene do receptor 5HT2A (HTR2A) está localizado no cromossomo 13q14-q21 (SPARKERS et al.,1991), que é a região de maior susceptibilidade para o autismo segundo Bartlett et al (2002)., sendo reconhecido por Veenstra-VanderWeele et al (2002) como um dos mais plausíveis candidatos para o autismo. Esse gene (5HTR2A) possui 3 éxons separados por 2 íntrons, e um comprimento total de mais de 20Kb (CHEN et al, 1992). O HTR2A possui dois polimorfismos de base única (SNPs), o -1438G/A e o 102 T/C, que foram associados com várias doenças psiquiátricas, e com TIDs (CHO et al,2007).

Para cada gene humano, podem-se reconhecer diferenças em suas seqüências de nucleotídeos, ou seja, polimorfismos. Assim, por exemplo, a seqüência do gene receptor da serotonina do tipo 2A (5HTR2A), no nucleotídeo 102, pode ser T ou C. Ocorre, portanto, um polimorfismo do códon da proteína (T102C) que não implica em uma troca de aminoácido, mas poderia afetar a expressão da proteína. Estudos recentes encontraram sujeitos normais com genótipo T102C/C102 para este polimorfismo, com cerca de 20% menos de expressão do alelo T na área 21 de Brodmann (POLESSKAYA & SOKOLOV, 2002). O genótipo que se associava com uma maior expressão da proteína nesta área temporal era o T/T, enquanto que os portadores do alelo C apresentavam uma menor expressão.

Estudos de associação anteriores foram realizados para investigar a relação entre dois polimorfismos de base única (SNPs) (-1438G/A ,102T/C) no HTR2A e vários distúrbios psiquiátricos, especialmente esquizofrenia, doença afetiva, bem como entre o autismo e estes SNPs (INAYAMA et al., 1996; MASSAT et al., 2000; VEENSTRA-VANDERWEELE et al., 2002). Li et al(2002), ao estudar o polimorfismo T102C do HTR2A encontrou uma freqüência significativamente menor do genótipo TT e uma freqüência maior do genótipo CC em indivíduos com hiperatividade e déficit de atenção, em relação aos controles. Cho et al (2007) não conseguiu identificar uma associação entre os dois SNPs do HTR2A e o distúrbio autista como observado em trabalhos anteriores (VEENSTRA-VANDERWEELE et al., 2002). Um estudo de Sugie et al (2003), mostrou algumas diferenças nas respostas a administração de da fluvoxamina em autistas, dependendo do polimorfismo do gene T102C do receptor 5HT2A (TT,TC ou CC) nesses indivíduos.

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

Gene transportador da serotonina

O gene do transportador da serotonina (SLC6A4) é um dos maiores moduladores da neurotransmissão serotoninérgica. O gene SLC6A4 está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q11.2) e contém 14 éxons compreendendo mais de 35 kb, com seus dois primeiros exons (1a e 1b) sendo alternativamente transcritos. Evidências tem sido encontradas entre o autismo e marcadores cobrindo a região 17q11.2 e o gene SLC6A4 (IMGSAC 2001; CANTOR et al 2005; McCAULEY et al 2004; STONE et al 2004; SUTCLIFFE et al 2005; YONAN et al 2003). Porém não foram encontradas de forma consistente mutações diretamente relacionadas com o autismo. Por outro lado, diferentes estudos sugerem associações entre o autismo e diferentes polimorfismos no gene SLC6A4. São três os polimorfismos mais extensivamente estudados dentro deste gene, a inserção-deleção de 44 pares de base na região promotora do gene, as VNTR (número variável de repetições em tandem) no intron 2 (12, 10 ou 9 repetições), e polimorfismos de base única (SNP) (COOK et al 1997; CONROY et al 2004; COUTINHO et al 2004; KIM et al 2002; KLAUCK et al 1997; McCAULEY et al 2004; MAESTRINI et al 1999; MULDER et al 2005; PERSICO et al 2002; TORDJMAN et al 2001; YIRMIYA et al 2001, DEVLIN et al, 2005, BRUNE et al, 2006).

Foi demonstrada que a variante longa do promotor era responsável por um aumento na eficiência da transcrição e uma maior taxa de recaptção da serotonina, em contraste com o alelo curto (Lesch et al, 1996; Greenberg et al, 1999; Nobile et al, 1999). O alelo com 12 repetições é a variante mais comum das VNTR e foi observada uma maior expressão em tecido cerebral embrionário em ratos (MACKENZIE e QUINN, 1999). Em outros trabalhos foi descrita uma transmissão preferencial da variante longa do promotor relacionada com o autismo (KLAUCK et al 1997, YIRMIYA et al 2001). O estudo de Tordjman et al (2001) descreveu a transmissão da variante curta do promotor em indivíduos severamente comprometidos, e também encontrou

evidência da transmissão da variante longa dentro do grupo geral analisado. Cook et al (1997) encontraram evidência do aumento da transmissão da variante curta em 86 trios autísticos. Em contraste existem vários trabalhos que não encontraram evidências da associação tanto da variante curta ou longa (MAESTRINI et al 1999, PERSICO et al 2002, BETANCUR et al, 2002, KIM et al, 2005). Foi encontrado um desequilíbrio de transmissão significativo na análise de vários SNPs no gene SLC6A4, localizados na região compreendida entre o promotor 1A e o intron 2 (KIM et al, 2002; CONROY et al , 2004)

Perspectivas futuras

Vários estudos têm procurado associar os polimorfismos dos genes SLC6A4 e 5HTR2A com doenças psiquiátricas ou TIDs, mas os resultados até agora, são inconsistentes, necessitando de um maior número de amostras, e uma melhor designação etiológica da população controle, ou dos traços analisados a serem associados ao polimorfismo em questão (WILLIAMS et al, 1996; GOLIMBET et al, 2002; CORREA et al, 2002; CHO et al,2007). Muitos destes estudos têm uma amostra de tamanho reduzido ou restrita a um grupo étnico específico para que seja rejeitada ou confirmada definitivamente a hipótese da associação (RAMOZ 2006). Assim é importante a realização de novos estudos onde com uma amostragem maior de diferentes grupos étnicos, pois o acúmulo maior de informações trará importantes subsídios para a melhor compreensão do tema. É sabido que a população brasileira constitui um dos grupos mais heterogêneos do mundo, como resultado de cruzamentos interétnicos entre europeus, africanos, ameríndios e asiáticos (ALVES-SILVA et al, 2000).

Neste ponto um estudo com a população brasileira notadamente miscigenada mostra-se extremamente vantajoso. Deve-se levar em conta que há pouquíssimos dados sobre esse tipo de estudo na população brasileira, o que evidencia a importância de um estudo nessa área. Além disso, esses dados serão importante fonte de comparação com trabalhos já realizados com populações européias, africanas e asiáticas. Estes polimorfismos podem explicar muito da nossa diversidade genética e trazer subsídios importantes para a melhor compreensão do tema e das pesquisas desenvolvidas na área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-SILVA J, SANTOS MDS, GUIMARÃES PEM, FERREIRA ACS, BANDELT HJ, PENA SDJ, *et al.* **The ancestry of Brazilian mtDNA lineages.** *Am J Hum Genet*, v. 67, p.444–61, 2000.

AMYR RE, VAN DEN VEYVER IB, WAN M, TRAN CQ, FRANCKE U, ZOGHBI HY. **Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.** *Nat Genet*, v. 23, p.185-8, 1999.

ANDERSON, G. **Genetics of childhood disorders: XLV. Autism, part 4: serotonin in autism.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, v.41, p.1513, 2002.

AURAREN M, VANHALA R, VARILO T, AYERS K, KEMPAS E, YLISAUKKO-OJA T, SINSHEIMER JS, PELTONEN L, JARVELA I. **A genomewide screen for autism-spectrum disorders: evidence for a major susceptibility locus in chromosome 3q25-27.** *Am J Hum Genet*, v. 71, p.777-790, 2002.

AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM, **Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements.** *Nat Genet*, v.39, n.3, p.319-28, 2007.

BARRETT S, BECK JC, BERNIER R, *et al.* **“An autosomal genomic screen for autism. Collaborative Linkage Study of Autism”.** *Am J Med Genet*, v.88, p.609–615, 1999.

BARTLETT CW, FLAX JF, LOGUE MW, VIELAND VJ, BASSETT AS, TALLAL P, BRZUSTOWICZ LM. **A major susceptibility locus for specific language impairment is located on 13q21.** *Am J Hum Genet*, v.71, n.1, p.45-55, 2002

BERUMENT S, RUTTER M, LORD, PICKLES A, Bailey A. **The autism screening questionnaire: diagnostic validity.** *Brish J Psych*, v. 175, p.444-451, 1999.

BETANCUR C, CORBEX M, SPIELEWOY C, PHILIPPE A, LAPLANCHE JL, LAUNAY JM, GILLBERG C, MOUREN-SIMÉONI MC, HAMON M, GIROS B, NOSTEN-BERTRAND M, LEBOYER M. **Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder.** Mol Psychiatry, v.7, n.1, p.67-71, 2002.

BRUNE CW, KIM SJ, SALT J, LEVENTHAL BL, LORD C, COOK EH JR. **5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism.** Am J Psychiatry, v. 163, n.12, p.2148-56, 2006.

BUXBAUM JD, SILVERMAN J, KEDDACHE M, SMITH CJ, HOLLANDER E, RAMOZ N, REICHERT JG. **Linkage analysis for autism in a subset families with obsessive-compulsive behaviors: evidence for an autism susceptibility gene on chromosome 1 and further support for susceptibility genes on chromosome 6 and 19.** Mol Psychiatry, v.9, n.2, p.144-50, 2004.

BUXBAUM JD, SILVERMAN JM, SMITH CJ, KILIFARSKI M, REICHERT J, HOLLANDER E, LAWLOR BA, FITZGERALD M, GREENBERG DA, DAVIS KL. **Evidence for a susceptibility gene for autism on chromosome 2 and for genetic heterogeneity.** Am J Hum Genet, v. 68, p.1514-1520, 2001.

CANTOR RM, KONO N, DUVALL JA, ALVAREZ-RETUERTO A, STONE JL, ALARCÓN M, NELSON SF, GESCHWIND DH. **Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21.** Am J Hum Genet, v.76, n.6, p.1050-1056, 2005.

CARVALHEIRA, G., VERGANI, N. E BRUNONI, D. **Genetics of autism.** Rev. Bras. Psiquiatr., v.26, p.270-272, 2004.

CHEN, K.; YANG, W.; GRIMSBY, J.; SHIH, J.C.. **The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron-exon gene.** Brain Research, v.14, p.20-26, 1992.

CHO H, YOON H J, PARK M, SIK L Y, KIM S A **Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT_{2A} receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios.** Brain Research, v.139, p. 34-41, 2007.

CLAYTON DG, WALKER NM, SMYTH DJ, PASK R, COOPER JD, MAIER LM, SMINK LJ, LAM AC, OVINGTON NR, STEVENS HE, NUTLAND S, HOWSON JM, FAHAM M, MOORHEAD M, JONES HB, FALKOWSKI M, HARDENBOL P, WILLIS TD, TODD JA. **Population structure, differential bias and genomic control in a large-scale, case-control association study.** Nat Genet, v. 37, n.11, p.1243-1246, 2005.

CONROY, J.; MEALLY, E.; KEARNEY, G.; FITZGERALD, M.; GILL, M.; GALLAGHER, L. **Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population.** Molec. Psychiat, v. 9, p.587-593, 2004.

COOK, E.H. and LEVENTHAL, B.L. **The serotonin system in autism.** Curr. Opin. Pediat, v.8, p.348-354, 1996.

COOK, E.H., JR.; COURCHESNE, R.; LORD, C.; COX, N. J.; YAN, S.; LINCOLN, A.; HAAS, R.; COURCHESNE, E.; LEVENTHAL, B. L. **Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder.** Molec. Psychiat, v.2, p. 247-250, 1997.

CORREA, H.; ROMANO, SILVA M.A.; BÓSON, W.; MACHADO, M.; LIMA, V.; JUAREZ, O. CASTRO; DE MARCO. **Estudo de associação entre o polimorfismo T102C do gene 5-HT2A e tentativas severas de suicídio em pacientes psiquiátricos.** Rev. Bras. Psiquiatr, v.24, n.2, p.44-46, 2002.

COUTINHO AM, OLIVEIRA G, MORGADINHO T, FESEL C, MACEDO TR, BENTO C, MARQUES C, ATAÍDE A, MIGUEL T, BORGES L, VICENTE AM. **Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism.** Mol Psychiatry, v.9, n.3, p.264-71, 2004

DA SILVA LR; VERGANI N; GALDIERI L; LONGHITANO SB; BRUNONI D; D'ALMEIDA V; PEREZ ABA. **Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil.** Am.J.Med.Genet, v.135, p.263-7, 2005.

DEVLIN B, COOK EH JR, COON H, DAWSON G, GRIGORENKO EL, MCMAHON W, MINSHEW N, PAULS D, SMITH M, SPENCE MA, RODIER PM, STODGELL C, SCHELLENBERG GD; CPEA **Genetics Network. Autism and the serotonin transporter: the long and short of it.** Mol Psychiatry, v.10, n.12, p.1110-1116, 2005.

DSM-IV - Critérios Diagnósticos. Traduzido por Batista, D. Porto Alegre: Artes Médicas. 1995
Disponível em <http://www.psiqweb.med.br/dsm/dsm.html>

GOLDSTEIN, D B., CAVALLERI G. L. **Understanding human diversity.** Nature, v. 437, p.1241-1242, 2005.

GOLIMBET, V.E.; ALFIMOVA, M.V.; MANANDYAN, K.K.; MITUSHINA, N.G.; ABRAMOVA, L.I.; KALEDA, V.G.; OLEICHIK, I.V.; YUROV, Y.; TRUBNIKOV, V.I. **5HTR2A gene polymorphism and personality traits in patients with major psychoses.** Eur. Psychiatry, v. 17, n.1, p. 24-28, 2002.

GREENBERG BD, TOLLIVER TJ, HUANG SJ, LI Q, BENDEL D, MURPHY DL. **Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets.** Am J Med Genet, v.88, n.1, p.83-87, 1999.

IMGSAC (Internacional Molecular Genetic Study of Autism Consortium). **A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q.** Human Molecular Genetics, v.7, p. 571-578, 1998.

IMGSAC (Internacional Molecular Genetic Study of Autism Consortium). **A Genomewide Screen for Autism: Strong Evidence for Linkage to Chromosomes 2q, 7q and 16p.** Am. J. Hum. Genet, v.69, p.570-581, 2001.

INAYAMA Y, YONEDA H, SAKAI T, ISHIDA T, NONOMURA Y, KONO Y, TAKAHATA R, KOH J, SAKAI J, TAKAI A, INADA Y, ASABA H. **Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia.** Am J Med Genet, v. 67, n.1, p.103-105, 1996.

JEFFREYS, A.J., WILSON, V., Thein, S.L. **Hypervariable “minisatellite” regions of human DNA.** Nature, v. 314, p. 67-73, 1985.

KIM SJ, BADNER J, CHEON KA, KIM BN, YOO HJ, KIM SJ, COOK E JR, LEVENTHAL BL, KIM YS. **Family-based association study of the serotonin transporter gene polymorphisms in Korean ADHD trios.** Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.139B, n.1, p.14-18, 2005.

KIM SJ, COX N, COURCHESNE R, LORD C, CORSELLO C, AKSHOOMOFF N, GUTER S, LEVENTHAL BL, COURCHESNE E, COOK EH JR. **Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder.** Mol Psychiatry, v.7, n.3, p.278-88, 2002.

KLAUCK, S.M., POUSTKA F, BENNER A, LESCH KP, POUSTKA A. **Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism?** Hum Mol Genet, v.6, p. 2233–2238, 1997.

LESCH K.P., BENDEL D., HEILS A., SABOL S.Z., GREENBERG B.D., PETRI S., BENJAMIN J., MULLER C.R., HAMER D.H., MURPHY D.L. **Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region.** Science, v. 274, p.1527-1531, 1996.

LI, J.; WANG, Y.; QIAN, Q.; WANG, B.; ZHOU, R.. **Association of 5-HT(2A) receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in children** Zhonghua Yi Xue Za Zhi, v.82, p.1173-1176, 2002.

LIU J, NYHOLT DR, MAGNUSSEN P, PARANO E, PAVONE P. **A genomewide screen for autism susceptibility loci.** Am J Hum Genet, v.69, p.327-340, 2001.

MACKENZIE A, QUINN J. **A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 96, n.26, p.15251-5, 1999

MAESTRINI, E.; LAI, C.; MARLOW, A.; MATTHEWS, N.; WALLACE, S.; BAILEY, A.; COOK, E. H.; WEEKS, D. E.; MONACO, A. P. **Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-**

aminobutyric acid receptor subunit beta-3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. Am. J. Med. Genet (Neuropsychiat. Genet.), v.88, p.492-496, 1999.

MARTELETO, M. R.F.; PEDROMÔNICO, M.R.M. **Validity of Autism Behavior Checklist (ABC): preliminary study.** Rev. Bras. Psiquiatr, v.27, p.295-301, 2005.

MASSAT, I., SOUERY, D., LIPP, O., BLAIRY, S., PAPADIMITRIOU, G., DIKEOS, D., ACKENHEIL, M., FUCHSHUBER, S., HILGER, C., KANEVA, R., MILANOVA, V., VERHEYEN, G., RAEYMAEKERS, P., STANER, L., ORUC, L., JAKOVLJEVIC, M., SERRETTI, A., MACCIARDI, F., VAN BROECKHOVEN, C., MENDLEWICZ, J. **A European multicenter association study of HTR2A receptor polymorphism in bipolar affective disorder.** Am. J. Med. Genet, v.96, n.2, p.136-140, 2000.

MCCAULEY JL, OLSON LM, DOWD M, AMIN T, STEELE A, BLAKELY RD, FOLSTEIN SE, HAINES JL, SUTCLIFFE JS. **Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism.** Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.15, n.127 B, p. 104-12, 2004.

MERCADANTE M T., VAN DER GAAG R. J., SCHWARTZMAN J. S. **Transtornos invasivos do desenvolvimento não-autísticos: síndrome de Rett, transtorno desintegrativo da infância e transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação.** Rev Bras Psiquiatr, v. 28, n. Supl I, p.12-20, 2006.

MILLER AS, DYKES DD, POLESKY HF. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acids Res, v.16, p. 1215, 1988.

MUHLE R., TRENTACOSTE S. V., RAPIN I. **The Genetics of Autism.** Pediatrics, v.113, p.472-486, 2004.

MULDER E.J., ANDERSON G.M., KEMA I.P., BRUGMAN A.M., KETELAARS C.E., DE BILDT A., et al. **Serotonin transporter intron 2 polymorphism associated with rigid-**

compulsive behaviors in Dutch individuals with pervasive developmental disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.133, p. 93–6, 2005.

MURPHY DG, DALY E, SCHMITZ N, TOAL F, MURPHY K, CURRAN S, ERLANDSSON K, EERSELS J, KERWIN R, ELL P, TRAVIS M. **Cortical serotonin 5-HT2A receptor binding and social communication in adults with Asperger's syndrome: an in vivo SPECT study.** Am J Psychiatry, v.163, n.5, p.934-936, 2006.

NOBILE M, BEGNI B, GIORDA R, FRIGERIO A, MARINO C, MOLTENI M, FERRARESE C, BATTAGLIA M. **Effects of serotonin transporter promoter genotype on platelet serotonin transporter functionality in depressed children and adolescents.** J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, v.38, n.11, p.1396-402, 1999.

PEREZ ABA, D'ALMEIDA V, VERGANI N, DE OLIVEIRA AC, LIMA FT, BRUNONI D. **Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlations with plasma homocysteine levels in spina bifida.** Am.J.Med.Genet, v.119, p.20-25,2003.

PERSICO, A. M.; MILITERNI, R.; BRAVACCIO, C.; SCHNEIDER, C.; MELMED, R.; CONCIATORI, M.; DAMIANI, V.; BALDI, A.; KELLER, F. **Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples.** Am. J. Med. Genet, v. 96, p. 123-127, 2000.

POLESSKAYA OO, SOKOLOV BP. **Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT2A receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics.** J Neurosci Res, v.67, n.6, p.812-22, 2002.

RAMOZ N, REICHERT JG, CORWIN TE, SMITH CJ, SILVERMAN JM, HOLLANDER E, BUXBAUM JD. **Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism.** Biol Psychiatry, v. 60, n.2, p.186-91, 2006.

ROPER H-H. **New Perspectives for the Elucidation of Genetic Disorders** Am. J. Hum. Genet, v.81,p.199–207, 2007.

SCHAFFER, A; HAWKINS J.R. **DNA variation and the future of human genetics**. Nature Biotechnology, v. 16, p.33-39,1998.

SHAIN RJ, FREEDMAN DX. **Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children**. J Pediatrics, v.58, p.315-320,1961.

SHAO Y, WOLPERT CM, RAIFORD KL, MENOLD MM, DONNELLY SL, RAVAN SA, BASS MP, MCCLAIN C, VON WENDT L, VANCE JM, ABRAMSON RH, WRIGHT HH, ASHLEY-KOCH A, GILBERT JR, DELONG RG, CUCCARO ML, PERICAK-VANCE MA. **Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder**. Am J Med Genet, v.8, n.114(1), p.99-105, 2002.

SPARKES RS, LAN N, KLISAK I, MOHANDAS T, DIEP A, KOJIS T, HEINZMANN C, SHIH JC. **Assignment of a serotonin 5HT-2 receptor gene (HTR2) to human chromosome 13q14-q21 and mouse chromosome 14**. Genomics, v.9,n.3, p.461-465, 1991.

STONE JL, MERRIMAN B, CANTOR RM, YONAN AL, GILLIAM TC, GESCHWIND DH, NELSON SF. **Evidence for sex-specific risk alleles in autism spectrum disorder**. Am J Hum Genet, v.75, n.6, p.1117-1123, 2004.

SUGIE Y, SUGIE H, FUKUDA T, ITO M, OHZEKI T. **Studies on the adverse effects of fluvoxamine treatment in children with autistic disorder: correlation with genetic polymorphism in serotonin related genes**. No To Hattatsu, v.35, n.3, p.233-237, 2003.

SUTCLIFFE JS, DELAHANTY RJ, PRASAD HC, MCCAULEY JL, HAN Q, JIANG L, LI C, FOLSTEIN SE, BLAKELY RD. **Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors**. Am J Hum Genet, v.77, n.2, p.265-279, 2005.

SYKES NH, LAMB JA. **Autism: the quest for the genes**. Expert Rev Mol Med, v.3, n.9(24), p.1-15, 2007.

THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. **A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs**. Nature, v.449, p. 851-861, 2007.

TORDJMAN S., GUTKNECHT L., CARLIER M., SPITZ E., ANTOINE C., SLAMA F., et al. **Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism.** Mol Psychiatry, v.6, p.434–439, 2001.

VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; KIM, S.J.; LORD, C.; COURCHESNE, R.; AKSHOOMOFF, N.; LEVENTHAL, B.L.; COURCHESNE, E.; COOK, E.H.JR. **Transmission disequilibrium studies of the serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (HTR_{2A}) in autism.** Am J Med Genet. v.8, n.114, p. 277-83, 2002.

VERGANI N. **Análise da frequência de mutações nos genes cistationina beta-sintase, metionina sintase e metionina sintase redutase em amostra de pacientes com defeitos de fechamento do tubo neural.** Dissertação de Mestrado. UNIFESP, 2002.

WEBER, J.L., MAY, P.E. **Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction.** Am. J.Hum. Genet, v. 44, p. 388-396, 1989.

WEIR, B.S., CARDON, L.R., ANDERSON, A.D., NIELSEN, D.M., HILL, W.G. **Measures of human population structure show heterogeneity among genomic regions.** Genome Research, v.15, p. 1468-1476, 2005.

WHITAKER-AZMITIA P. **Serotonin and brain development: role in human developmental diseases.** Brain Res Bull, v.56, p.479-485, 2001.

WILLIAMS, J.; SPURLOCK, G.; MCGUFFIN, P.; MALLET, J.; NÖTHEN, M.M.; GILL, M.; ASCHAUER, H.; NYLANDER, P.O.; MACCIARDI, F.; OWEN, M.J. **Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group.** Lancet, v.347, p.1274-1276, 1996.

YIRMIYA N, PILOWSKY T, NEMANOV L, ARBELLE S, FEINSILVER T, FRIED I, EBSTEIN RP. **Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism.** Am J Med Genet, v.105, n.4, p.381-386, 2001.

YLISAUKKO-OJA T, NIEMINEN-VON WENDT T, KEMPAS E, SARENIOUS S, VARILO T, VON WENDT L, PELTONEN L, JÄRVELÄ I. **Genome-wide scan for loci of Asperger syndrome.** Mol Psychiatry, v.9, n.2, p.161-168, 2004.

YONAN AL, PALMER AA, SMITH KC, FELDMAN I, LEE HK, YONAN JM, FISCHER SG, PAVLIDIS P, GILLIAM TC. **Bioinformatic analysis of autism positional candidate genes using biological databases and computational gene network prediction.** Genes Brain Behav, v.2, n.5, p.303-320, 2003.