

“RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO EM INDIVÍDUOS COM AUTISMO”

Sara Cecília Carneiro Peixoto

Afiliação: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Lugar das Antas Medelo 4820 – 511 Fafe

Correio electrónico: sara_fafe87@hotmail.com

RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO EM INDIVÍDUOS COM AUTISMO

Sara Peixoto^{1,2}, J Ferrão¹, G Oliveira², IM Carreira¹

1. Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
2. Hospital Pediátrico de Coimbra.

Palavras-Chave: autismo; perturbações do espectro do autismo; genótipo; fenótipo; variação do número de cópias; *SHANK3*; 22q13.3; 15q11-q13; 16q11.2; MLPA.

Resumo

Introdução: O autismo é uma perturbação global do neurodesenvolvimento que, na maioria dos casos se manifesta, durante os dois primeiros anos e se prolonga por toda a vida, variando semiologicamente com a idade. Estudos epidemiológicos demonstram um importante papel de factores genéticos no autismo sendo que até hoje, não foram ainda definidos genes específicos fortemente associados à doença, mas estão identificadas determinadas regiões de susceptibilidade, em alguns cromossomas, nomeadamente 15q11-q13, 16p11.2 e 22q11.2, entre outras. Dados recentes revelam, também, variações estruturais submicroscópicas do número de cópias - copy number variants (CNV) de uma determinada região cromossómica, em que a deleção ou duplicação pode ter um papel na doença e parece ser um factor de risco para o autismo, sobretudo nas formas esporádicas.

Com este projecto pretendemos conhecer mais acerca da etiologia do autismo, de forma a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e terapêutica.

População e Métodos: Uma população de 150 crianças, acompanhadas na Unidade de Neurodesenvolvimento e Autismo do Hospital Pediátrico de Coimbra, com diagnóstico de Perturbação do Espectro de Autismo (PEA) com base na observação clínica e aplicação das

escalas consideradas *Gold Standard* para o diagnóstico de autismo: *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) e *Autism Diagnostic Observation Schedule* (ADOS), foi submetida, no Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra a uma pesquisa de alterações genéticas em regiões dos cromossomas 15, 16 e 22, utilizando a *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) com os Kits P343-B1 de 54 sondas e ME028 de 25 sondas, após a análise por citogenética convencional.

Resultados: No grupo de 150 crianças em estudo de diagnóstico clínico de autismo (ADOS e ADI-R positivas), foram encontrados 10 casos com alteração numa das regiões abrangidas, 6 deles através da aplicação do Kit de sondas P-343 Autism-1 (3 duplicações, 2 triplicações e uma deleção) e 4 com alterações mais proximais, apenas detectadas pelo Kit de sondas ME028 (2 duplicações e 2 deleções). Quatro das crianças apresentam uma duplicação da região crítica do cromossoma 15, 15q11.2-q13.1. As duas meninas com alteração apresentam uma triplicação da mesma região. Foram ainda encontradas 3 microdeleções de diferentes regiões do cromossoma 15 e, por fim, um menino com uma duplicação do gene *SHANK3* da região 22q13.33, uma alteração de baixa frequência na população.

Conclusão: Várias alterações genéticas têm sido identificadas em casos com perturbações do neurodesenvolvimento (Uher R, 2009). Efectivamente, o diagnóstico etiológico de perturbações do espectro do autismo (PEA) tem evoluído muito positivamente com o desenvolvimento de testes de diagnóstico no ramo da biologia/citogenética molecular.

Com este estudo foi possível estabelecer alguma relação entre o genótipo e o fenótipo de crianças com autismo, sendo de realçar a diferença clínica entre as deleções e as duplicações. Foram observadas ainda algumas situações familiares em que não foi possível atribuir um fenótipo ao genótipo o que implica uma futura estratégia de avaliação de todo o genoma, nomeadamente com *Array Comparative Genomic Hybridization* (array CGH) de modo a identificar novos genes.

Keywords: autism; autism spectrum disorders; genotype; phenotype; copy number variants; SHANK3; 22q13.3; 15q11-q13; 16q11.2; Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Abstract

Introduction: Autism is a global neurodevelopmental disorder which, in the vast majority of cases, manifests during the first two years and continues throughout life, presenting a range of symptomatic variations with age. Epidemiological studies show an important role of genetic factors in autism, but no specific genes have as yet been defined in strong association with this disease, however several susceptible regions of some chromosomes were identified, more specifically in 15q11-q13, 16p11.2 and 22q11.2, to name a few. Recent studies also reveal submicroscopic structural variations in copy number, known as copy number variants (CNV) of a specific chromosomal region, where a deletion or duplication could possibly have a role in the disease and seem to be a risk factor for autism, especially in the sporadic forms.

The aim of this project is to learn more about the etiology of autism, in order to develop new strategies of diagnosis and treatment.

Methods: A sample of 150 children, monitored at the Neurodevelopmental and Autistic Unit of the Pediatric Hospital in Coimbra, with the diagnosis of Autism Spectrum Disorders (ASD) based on clinical observations and implementation of gold standard for diagnosis of autism: Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) and Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS), underwent a study, in the Cytogenetic Laboratory of the Faculty of Medicine of Coimbra's University, to search for genetic alterations in regions of chromosomes 15, 16 and 22, using a ligation-dependent probe amplification (MLPA), with

the 54 probes Kit, P343-B1, and the 25 probes Kit, ME028, after conventional cytogenetic analysis.

Results: In the group of 150 children with clinical diagnosis of autism (ADOS and ADI-R positive), 10 cases presented alterations in one of the covered regions, 6 of them with the use of the P-343 Autism 1 probes Kit (3 duplications, 2 triplications and 1 deletion) and 4 with more proximal alterations, only detected by ME028 probes Kit (2 duplications and 2 deletions). 4 of the children present a duplication of the critical region of chromosome 15, 15q11.2-q13.1. Two of the female subjects with alterations present a triplication of the same region. Three microdeletions of different regions of chromosome 15 were also found and finally, one of the male subjects presented with a duplication in the SHANK3 gene of region 22q13.33 which is a rare variation in the sample.

Conclusion: Several genetic alterations have been identified in cases of neurodevelopment disorders (Uher R, 2009). Indeed, the etiological diagnostic of Autism Spectrum Disorder (ASD) has evolved quite positively with the development of diagnostic tests in the field of molecular biology/cytogenetic.

Due to this study it was possible to establish some relationship between the genotype and the phenotype of children with autism, becoming more relevant the clinical difference between deletions and duplications. It was also observed some familiar situations where it was not possible to associate a phenotype to the genotype, which implies a future evaluation strategy of the whole genome, for example using Array Comparative Genomic Hybridization (array CGH) in order to identify new critical regions.

Introdução

O autismo é uma perturbação global do neurodesenvolvimento que, maioritariamente, se manifesta durante os dois primeiros anos e se prolonga pela vida, variando semiologicamente com a idade. Pertence a uma larga família de distúrbios pervasivos do desenvolvimento infantil que inclui também o Síndrome de Asperger (SAsp) e o transtorno pervasivo de desenvolvimento não especificado (PDD-NOS). Colectivamente, constituem as Perturbações do Espectro do Autismo (PEA) e caracterizam-se clinicamente por dificuldades de comunicação e interacção social, defeitos de linguagem verbal e não-verbal e por comportamentos repetitivos e estereotipados (American Psychiatric Association, 1994).

Estudos epidemiológicos relatam que os casos de crianças com autismo têm vindo a aumentar, desde 1996. A prevalência nos EUA tem sido referida como sendo um caso em 150 a 116 crianças (Hughes JR, 2009 e Kogan MD et al., 2008) com predominância do sexo masculino, numa proporção de 4 para 1 (Fombonne E, 2003). Em Portugal, um estudo publicado em 2007 relata uma prevalência de 9,2/10 000 casos, em Portugal Continental, e 15,6/10 000, nos Açores (Oliveira G et al., 2007). As taxas referidas variam significativamente, pelo mundo, provavelmente devido aos diferentes métodos e critérios utilizados no diagnóstico clínico de autismo e às características genéticas e factores ambientais inerentes a cada população.

Nos anos 40 e 50, acreditava-se que a causa do autismo residia nos problemas de interacção dos pais com a criança. Mais tarde, a investigação científica baseada em estudos de gémeos e nas doenças genéticas associadas ao autismo (Síndrome de X Frágil, esclerose tuberosa, fenilcetonúria, neurofibromatose e outras anomalias cromossómicas), mostrou a existência de causas orgânicas multifactoriais, que reflectem a grande diversidade fenotípica das pessoas com autismo.

Estudos epidemiológicos demonstram a importância de factores genéticos no autismo, nomeadamente a existência de uma taxa de concordância em gémeos monozigóticos de 60 a 90%, em contraste com apenas 3 a 10% em dizigóticos (Faras H et al., 2010 e Kumar RA e Christian SL, 2009). Presentemente, não foram ainda definidos genes específicos fortemente associados ao autismo, mas estão identificadas determinadas regiões de susceptibilidade, em alguns cromossomas. A frequência de desequilíbrios cromossómicos microscopicamente visíveis, na base do autismo, é elevada e estimada em cerca de 10% (Marshall CR et al., 2008; Sebat J et al., 2007 e Szatmari P et al., 2007), sendo a anomalia mais frequente a duplicação de 15q11-q13 de origem materna, em 1 a 3% dos casos (Veenstra-Vanderweele J et al., 2004 e Vorstman JA et al., 2006). Com as anomalias estruturais cromossómicas como passo inicial para identificar os *loci* candidatos a responsáveis pelo autismo, várias mutações foram relatadas no cromossoma 22, nomeadamente no braço longo (22q11.2-q13.3), onde se localiza o gene *SHANK3*, em dois genes de neuroligina (*NLGN3* e *NLGN4*), no cromossoma X e no gene da neurexina no cromossoma 2p16 (El-Fishawy P e State MW, 2010; Freitag CM et al., 2010; Jamain S et al., 2003; Kumar RA e Christian SL, 2009; Mukaddes NM e Herguner S., 2007; Ramelli GP et al., 2008; Sykes NH et al., 2009).

Dados recentes revelam que variações estruturais submicroscópicas do número de cópias - copy number variants (CNVs) de uma região cromossómica por deleção ou duplicação podem ter um papel na doença e parecem ser um factor de risco para o autismo, sobretudo nas formas esporádicas (Abrahams BS e Geschwind DH, 2008; Sebat J et al., 2007 e Szatmari P et al., 2007). Estes CNVs podem ser herdados, e / ou surgir *de novo*, atingindo preferencialmente os cromossomas: 1q21, 2p16.3, 3p25-26, 7q36.2, 15q11-13, 16p11.2 e 22q11.2 (Freitag CM et al., 2010).

No respeitante ao cromossoma 15, muitos rearranjos submicroscópicos com deleções ou duplicações foram identificados num subgrupo de indivíduos com PEA. A instabilidade

genómica proximal deste cromossoma é mediada pela repetição de elementos de DNA, originando cinco pontos de quebra frequentes (break points – BP) (Figura 2) envolvidos nestas alterações (Depienne C et al., 2009; Pujana MA et al., 2002). As deleções envolvem, frequentemente, um dos pontos proximais BP1 ou BP2, que partilham o mesmo ponto distal, BP3, enquanto as duplicações podem estender-se mais distalmente, até BP4/BP5 (Lee JÁ e Lupski JR, 2006) (Figura 2). Duplicações 15q proximais, contendo as regiões críticas do Síndrome de Prader-Willi e Angelman (SPW/SA), têm sido relatadas em vários pacientes com autismo, constituindo as alterações cromossómicas maioritariamente descritas nesta população (Garber K, 2007; Roussignol G et al., 2005; Tabuchi K et al., 2007).

Recentemente, foram identificadas microdeleções do braço curto do cromossoma 16p11.2 observadas em até 1% dos pacientes com autismo (Marshall CR et al., 2008; Kumar RA et al., 2008; Weiss LA et al., 2008). A microduplicação desta região foi também observada em percentagem de indivíduos semelhante, embora a associação com autismo seja menos convincente pela sua maior frequência nos grupos controlo.

Este trabalho tem como objectivo seleccionar os elementos clínicos e laboratoriais de um grupo de crianças com autismo, apresentando alterações nas regiões genéticas mais recentemente descritas na literatura, nomeadamente dos cromossomas 15q11-q13, 16p11.2 e do gene *SHANK3* em 22q13 (El-Fishawy P e State MW, 2010; Freitag CM et al., 2010; Kumar RA e Christian SL, 2009), através da utilização da técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) com os Kits P343-B1 e ME028, que apresentam sondas para estas regiões. Posteriormente, proceder-se-á à avaliação clínica de cada um destes casos, por forma a comparar e avaliar diferenças que poderão reflectir distintas regiões envolvidas.

Pouco se sabe nesta área, nomeadamente no respeitante à associação destes genótipos com fenótipos mais característicos.

Com este projecto pretendemos conhecer melhor a etiologia do autismo, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e terapêutica.

População e Métodos

Avaliação Clínica

Para este estudo foi avaliada uma população de 150 crianças, acompanhadas na Unidade de Neurodesenvolvimento e Autismo do Hospital Pediátrico de Coimbra, com diagnóstico de autismo, tendo por base a observação clínica de uma equipa multidisciplinar coordenada por um Pediatra com diferenciação em neurodesenvolvimento. Para tal recorreu-se a escalas de diagnóstico consideradas *Gold Standard* para o efeito como seja a *Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R)* (Lord C et al., 1994) e a *Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS)* (Lord C et al., 2000), bem como a *Childhood Autism Rating Scale (CARS)* (Russell PS et al., 2010). Esta última permite classificar o grau de autismo em ligeiro a moderado (cotação entre 30-37) e severo (38-60). Considerou-se diagnóstico de autismo, usando este termo como sinónimo de perturbação do espectro do autismo (PEA), os casos em que a ADI-R e a ADOS apresentavam, em simultâneo, cotações positivas para o efeito. Foi colhida uma amostra de sangue de cada uma das crianças para posterior avaliação laboratorial descrita abaixo. De seguida, seleccionámos apenas as crianças com alterações cromossómicas, procedendo à análise dos dados clínicos relativamente à história da doença actual (autismo), aos antecedentes pessoais, tendo em conta especificamente as aquisições do neurodesenvolvimento, à história pré e perinatal, bem como à história familiar. Foi realizado o exame físico com avaliação morfológica e somática (pesquisa de dismorfismos e sinais de síndromes neurocutâneos), recolha de medidas antropométricas, pesquisa de défices sensoriais de relevo clínico (visual ou auditivo), exame neurológico clássico e pesquisa de epilepsia (dois ou mais episódios críticos em apirexia). Outras avaliações adicionais incluem a idade de marcha, das primeiras palavras e primeiras frases, bem como a avaliação do quociente de desenvolvimento global (QDG) nas crianças entre os 2 e os 6 anos, pela escala

de Griffiths (Ivens J e Martin N, 2002), ou o quociente de inteligência global (QIG) para crianças entre os 6 e os 16 anos pela WISC-III (Russell PS et al., 2010). Foram, ainda, estudados laboratorialmente os progenitores das crianças com a alteração cromossómica, sempre que possível.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Nas 150 crianças deste estudo foi realizado o cariótipo por citogenética convencional com um padrão de bandas ≥ 550 . Posteriormente, procedeu-se à aplicação da técnica de MLPA para os Kits P343-B1 e ME028 seguindo os protocolos dos fornecedores (*MRC – Holland*). O kit P343-B1 contém 54 sondas de MLPA para três das regiões implicadas no autismo: 15q11-13 (sondas para os genes SNRPN-HB2-85, UBE3A, ATP10A, GABRB3, OCA2, APBA2, NDNL2, TJP1, TRPM1, KLF13, CHRNA7, SCG5), a região de microdelecção 16p11 (sondas para LAT, SPN, MAS, MVP, SEZ6L2, HIRIP3, DOC2A, MAPK3, CD2BP2) e o gene *SHANK3* de 22q13. Numa segunda fase, foi aplicado ao DNA das crianças sem alteração com este Kit, um outro (ME028 PWS/AS) que contém 25 sondas específicas para as regiões críticas dos Síndromes de Prader Willi e Angelman, bem como 5 sondas para avaliar o estado de metilação, permitindo assim o estudo da variação do número de genes mais proximais não abrangidos pelo *Kit P343-B1*, como o *NIPAI* e *TUBGCP5*.

Os produtos de amplificação foram identificados e quantificados por electroforese capilar num sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems*, Japão) e realizámos a análise dos resultados através dos *softwares GeneMapper v4.1* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA) e *Coffalyser* (*MRC-Holland*, Amesterdão, Holanda). Os rácios limiares de delecção e duplicação foram fixados em 0,7 e 1,3 respectivamente.

Resultados

O estudo do cariótipo convencional detectou duplicações em 4 casos (II, IV, V, VI) (Figura 1 e Tabela I). No que respeita aos resultados laboratoriais obtidos pela aplicação da técnica de MLPA, foram confirmados/encontrados 10 casos com alteração numa das regiões em estudo, 6 deles através da aplicação do Kit de sondas P-343 Autism-1 e, 4 casos com alterações mais proximais, apenas detectadas pelo Kit de sondas ME028 (Figura 3 e Tabela I).

Duas crianças apresentaram duplicação da região crítica dos síndromes de Prader-willi/Angelman em 15q11.2-q13.1, outras duas uma triplicação desta mesma região e duas com duplicação da região mais proximal 15q11.2(NIPA1,TUBGCP5) sendo uma delas em mosaico (Figura 3).

De referir, ainda, 3 microdelecções de diferentes regiões do cromossoma 15 e, por fim, um caso com uma duplicação do gene *SHANK3* da região 22q13.33.

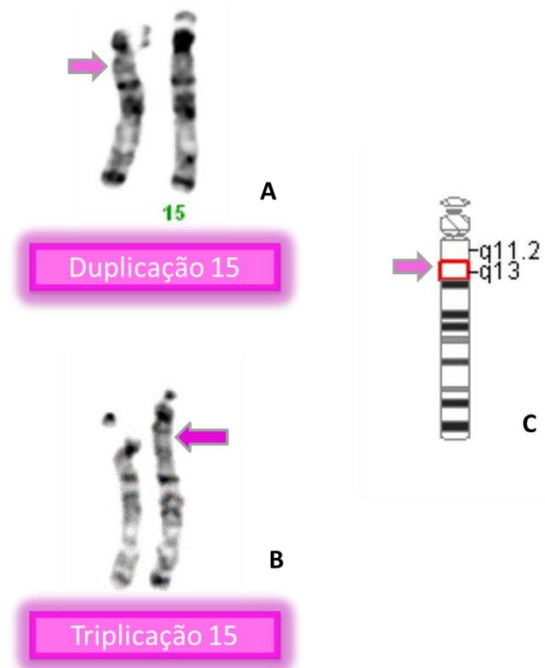


Figura 1: Duplicação(A) e Triplicação(B) detectadas pela citogenética convencional. (C) Ideograma do cromossoma 15

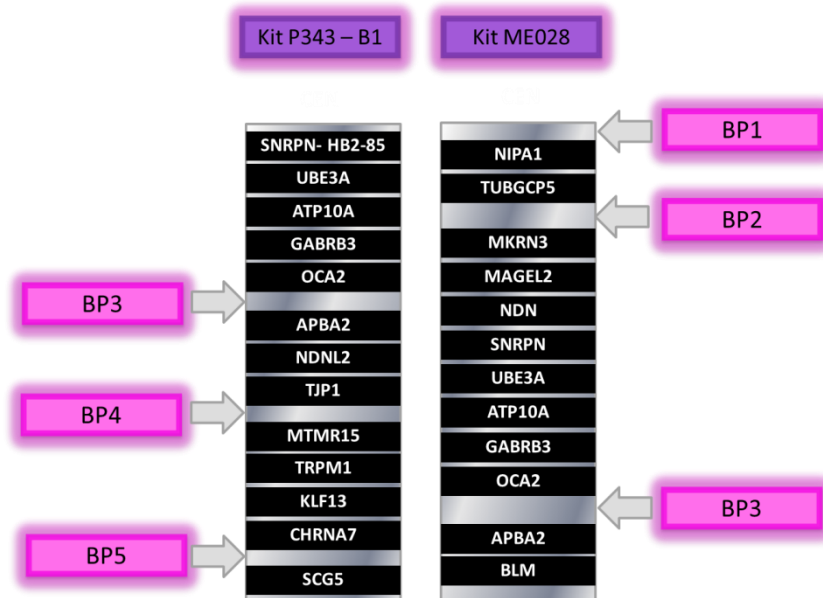


Figura 2: Representação esquemática dos genes estudados pelos dois Kits de sondas e dos pontos de quebra no cromossoma 15.

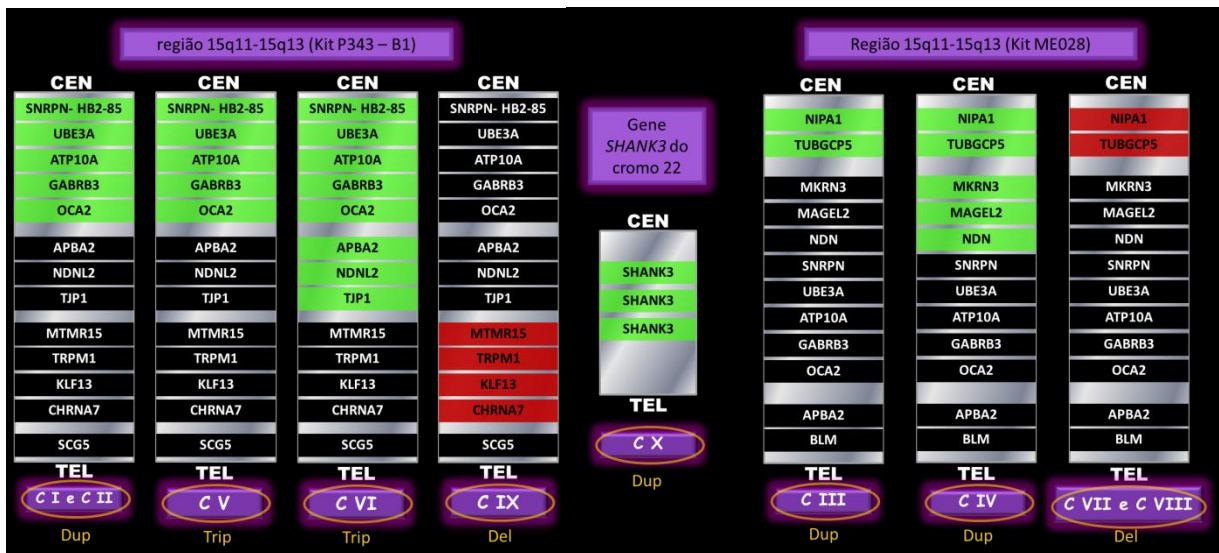


Figura 3: Representação esquemática da extensão das alterações detectadas nos casos estudados e dos genes envolvidos.

CEN-centrómero; TEL-telômero; Dup-duplicação; Trip-triplicação; C-Caso.

Nas tabelas I, II e III constam os dados clínicos e resultados laboratoriais das 10 crianças.

Foi possível estudar os progenitores de cinco crianças, sendo a origem familiar da alteração atribuída a 4: materna nos casos III, IV e VIII e paterna no IX. Apenas na criança VI a alteração foi observada *de novo*.

Os casos I e II, que correspondem a uma duplicação da mesma região do cromossoma 15 [15q11.2-q13.1(SNRPN,UBE3A,ATP10A,GABRB3,OCA2)x3] (Figura 3), apresentam ambos autismo severo, mas com diferentes níveis de cognição. No primeiro caso, temos um menino adoptado, com atraso de desenvolvimento psicomotor global, desde o primeiro ano, que apresenta actualmente uma deficiência intelectual ligeira. Já no rapaz do caso II não foi referido inicialmente atraso global de desenvolvimento mas actualmente apresenta deficiência cognitiva severa, sem aquisição de linguagem. É, ainda, de referir que, apesar de não ter sido possível o estudo dos progenitores destes dois casos, as histórias familiares indiciam uma possível hereditariedade das alterações.

Os casos III e IV, também com duplicações do cromossoma 15, mas de regiões mais proximais que as duas anteriores (Figura 3), correspondem a situações de autismo ligeiro ou atípico, respectivamente, sendo que a duplicação mais proximal (caso III) cursa sem deficiência cognitiva e com normal desenvolvimento motor e de linguagem, mas o caso IV apresenta défice intelectual ligeiro.

No que se refere aos casos de triplicação, ambos apresentam autismo ligeiro a moderado, mas com níveis de deficiência intelectual distintos em ambos os casos, que variam de ligeiro, no caso V, a severo, no caso VI, coincidente com um maior número de genes triplicados (Figura 3). Em ambas as meninas existe estrabismo e atraso de desenvolvimento motor, não observado nos casos de duplicação acima referidos. Uma delas (caso VI) apresenta também epilepsia, e a outra (caso V) hipotonia, ao exame neurológico.

No que se refere aos casos de microdelecção (VII e VIII) (Figura 3) correspondem a deleções de genes proximais que se traduzem por níveis de desenvolvimento e cognição muito semelhantes, ambos com clínica de autismo ligeiro e deficiência mental muito ligeira ou mesmo inexistente. No caso VIII a alteração é de origem materna e a progenitora está reportada como tendo dificuldades de aprendizagem (Tabela I). No caso IX, as regiões delectadas são diferentes das anteriores, há um número maior de genes envolvido, mas a clínica é em tudo semelhante aos dois casos prévios. Neste caso, a deleção foi herdada do pai, no entanto este não apresenta qualquer alteração clínica ao contrário do probando, apresentando a avó paterna patologia psiquiátrica (depressão).

Por último, foi, ainda, encontrada uma única duplicação do gene *SHANK3* da região 22q13.33 associado a autismo ligeiro sendo desconhecido o nível cognitivo e sem outras alterações significativas, à excepção de *Clumsy*, ao exame neurológico clássico.

Relativamente à história pré-natal a maioria dos casos não revelou alterações, nascendo de gestações de termo, sem incidentes perinatais. Relativamente aos marcos precoces do desenvolvimento, metade das crianças andou tardiamente, depois dos 18 meses, o que denuncia uma alteração precoce no neurodesenvolvimento. Já o crescimento em estatura, ponderal e craniano não revelou alterações.

Relação genótipo-fenótipo em indivíduos com autismo

Fevereiro de 2011

Tabela I: Características clínicas dos probandos com alterações nos resultados laboratoriais.

Nome/Sexo	Idade(A)	Diagnóstico	Cognição	HF	Cariótipo	Genótipo P343	Genótipo ME028	Origem da Alteração
I G.B.C./M	6A	ADI-R/ADOS + Autismo Severo	Deficiência Intelectual Ligeira (QDG:54)*	Adoptado Mãe biológica com depressão	46,XY	m1pa 15q11.2- q13.1(SNRPN,UBE3A,ATP 10A,GABRB3,OCA2)x3	-	Desc
II A.D.V.D.A./M	17A	ADI-R/ADOS + CARS: 44,5 Autismo Severo	Deficiência Intelectual Severa/Profunda (QIG:29)**	Irmão com autismo	46,XY,ish dup(15)(q11.2q11.2)(SNRPN ,UBE3A)x3	m1pa 15q11.2- q13.1(SNRPN,UBE3A,ATP 10A,GABRB3,OCA2)x3	-	Mae e Pai Desc
III M.N.P./M	6A	ADI-R/ADOS + CARS: 35 Autismo Ligeiro	Sem Deficiência Intelectual (QDG: 102)*	Pai toxicodependente Irmão com problemas de socialização	46,XY	m1pa (P343)x2	m1pa 15q11.2(NIPA1,TUBGCP5)x3mat	Mat
IV P.A.A.F.S./M	12A	ADI-R/ADOS + CARS: 30 Autismo Ligeiro	Deficiência Intelectual Ligeira (QDG:58)*	Avô paterno esquizofrênico Avó materna alcoólica Tio paterno toxicodependente	mos 47,XY,+r,ish r(15)(D15Z4+,SNRPN,UBE3A)[69]/r(15)(D15Z4++,SNRPN, UBE3A-)[2]/46,XY[105]	m1pa (P343)x2	m1pa 15q11.2(NIPA1,TUBGCP5,MKRN 3,MAGEL2,NDN)x3mat	Mat
V C.R.G.C./F	9A	ADI-R/ADOS + CARS: 37 Autismo Moderado	Deficiência Intelectual Ligeira/ Moderada (QDG:39)*	irrelevante	46,XX,dup(15)(q11.2q11.2)(S NRPN,D15S10)x3	m1pa 15q11.2- q13.1(SNRPN,UBE3A,ATP 10A,GABRB3,OCA2)x4	-	Desc
VI V.V.C.F./F	10A	ADI-R/ADOS + CARS: 32 Autismo Ligeiro	Deficiência Intelectual Severa/Profunda (QDG:29)*	irrelevante	46,XX,add(15)(q11.2).ish trp(15)(q11.2)(SNRPN,UBE3 A)x4	m1pa 15q11.2- q13.1(SNRPN,UBE3A,ATP 10A,GABRB3,OCA2,APB A2,NDNL2,TJP1)x4dn	-	de novo
VII T.A.C./M	7A	ADI-R/ADOS + Autismo Ligeiro	Sem Deficiência Intelectual (QDG: 97)*	irrelevante	46,XY	m1pa (P343)x2	m1pa 15q11.2(NIPA1,TUBGCP5)x1	Desc
VIII N.A.F.S./M	8A	ADI-R/ADOS + CARS: 30 Autismo Ligeiro	Deficiência Intelectual (QDG:71)*	Mãe com dificuldades de aprendizagem	46,XY	m1pa (P343)x2	m1pa 15q11.2(NIPA1,TUBGCP5)x1mat	Mat
IX P.J.A.F./M	14A	ADI-R/ADOS + CARS: 30 Autismo Ligeiro	Deficiência Intelectual Ligeira (QDG:61)*	Pai com alterações no genótipo mas sem clínica Avó paterna com depressões	46,XY	m1pa 15q13.2- q13.3(MTMR15,TRPM1,K LF13,CHRNA7)x1pat	-	Pat
X J.P.P.M./M	5A	ADI-R/ADOS + CARS: 31 Autismo Ligeiro	Desc	irrelevante	46,XY	m1pa 22q13.33(SHANK3)x3	-	Desc

* Griffiths; ** WISC 3; e - sem alteração; A-Anos; ADI-R: Autism Diagnostic Interview Revised; ADOS: Autism Diagnostic Observation Schedule; CARS: Childhood Autism Rating Scale; Desc-Desconhecido; F-Feminino; HF-História Familiar; M-Masculino; Mat-Materno; Pat-Paterno; QDG – Quociente de Desenvolvimento Global; QIG - Quociente de inteligência global.

Tabela II: Exame clínico objectivo dos 10 casos com alterações.

Caso	Crescimento actual	EN Clássico	Dismorfismos/manchas cutâneas/adeno-meqálias	Défices Sensoriais (visual/auditivo)
I	Pe:P95	Normal	Não	Não
	E: P50			
	PC:P95			
II	Pe:P75	Normal	Não	Não
	E:P75			
	PC: >P50			
III	Pe:P90	Normal	Não	Não
	E:P75			
	PC:>P50			
IV	Pe:P75/90	Normal	Não	estrabismo
	E: P90			
V	PC: P90	Hipotonia	Não	miopia estrabismo
	Pe:P25			
	E: P25			
VI	PC: P50	Desc	Desc	estrabismo
	Pe:P75			
	E:P50			
VII	PC:P50	Normal	Não	Não
	Pe: P50			
	E: P50			
VIII	PC: P75	Normal	Não	Não
	Pe:P95			
	E: P95			
IX	PC:>P50	Clumsy	Não	Não
	Pe:P50			
	E:P50			
X	PC: >P95	Clumsy	Não	Não
	Pe:P95			
	E:P90			

Desc - Desconhecido;E-Estatura; EN-Exame Neurológico; PC-Perímetro Craniano; P-Percentil; Pe-Peso

Tabela III: História pré, perinatal e de neurodesenvolvimento

Caso	História Pré-natal	A.D.P.M. G 1º ano	Marcha (meses)	1 ^{as} Pal. (meses)	1 ^{as} frases (meses)	Epilepsia
I	Parto/IG: Eutócico/? Pn: 3380g IA:10	Sim	16	12	48	Não
	Parto/IG: Fórceps/38S Pn: 3350g; En:52cm; PC:35cm IA:10	Não*	12	12	Não tem	Não
II	Parto: Ventosa/39S Pn: 3450g; En:50cm; PC:35,5cm IA:10	Não*	12	24	36	Não
	Parto:Cesariana/ 40 S Pn: 3460g; En:50,5cm; PC:35cm IA:10	Sim	18	14	36	Não
III	Parto: Ventosa/39 S Pn: 2485g; En:47cm; PC:32,5cm IA:10	Sim	24	20	36	Não
	Parto:Eutócico/? Pn: 2840g; En:50cm; Parto :Eutócico/35S Pn: 2510g; En:45cm; PC:33cm IA:10	Sim	24	60	Não tem	Sim
IV	Parto:Cesariana/ 38 S Gravidez de risco por abortos prévios(2) Pn: 3470g; En:49cm; PC:36cm; IA:10	sim	15	40	60	Não
	Desc	Sim	19	30	42	Não
V	Parto: Cesariana/ 41S Pn: 4610g; En:51cm; PC:37cm IA:10	Não*	12	12	36	Não

* só notado no 2ºano – houve regressão; Desc - Desconhecido; IA-Índice de Apgar ao 5ºmin; Pal-Palavras; PC-Perímetro Craniano ao nascimento; ADPMG - Atraso Desenvolvimento Psicomotor Global; Pn-Peso nascimento; En-comprimento nascimento; IG- Idade Gestacional; S-semanas gravidez

Discussão

Várias alterações genéticas têm sido identificadas em indivíduos com perturbações do neurodesenvolvimento (Uher R, 2009), algumas delas, atribuídas à elevada penetrância de alterações de Copy Number Variants (CNVs) frequentes na população saudável. Efectivamente, o diagnóstico etiológico de perturbações do espectro do autismo (PEA) tem evoluído muito positivamente com o desenvolvimento de testes de diagnóstico no ramo da biologia/citogenética molecular.

Das 150 crianças avaliadas neste estudo, apenas 4 revelaram alterações detectáveis pela citogenética convencional, número que aumentou para 10 uma vez que esta técnica apenas permite detectar alterações ≥ 3 -5 Mb. Com a aplicação da técnica de MLPA, foi possível não só redefinir as alterações encontradas na citogenética, por exemplo a duplicação identificada no caso V foi reclassificada para triplicação, como permitiu identificar 6 novos casos.

Destas dez crianças com alteração apenas uma apresentou uma duplicação no gene *SHANK3* do 22q13.33, o que está de acordo com a sua menor frequência na população. Todas as outras apresentaram variações localizadas no cromossoma 15 (quatro duplicações, duas triplicações e três deleções), o que está relacionado com a já conhecida instabilidade genómica da região relatada em estudos anteriores. Nenhum caso de deleção ou duplicação da região 16p11.2 foi encontrado na nossa amostra, apesar da sua frequência relativa de até 1% ser mencionada noutros estudos (Bijlsma EK et al., 2009).

Nos casos I, II, III e IV, encontramos duplicações de regiões específicas do cromossoma 15 que atingem os vários pontos de quebra (Figura 3). Duas das crianças (caso I e II) apresentam uma duplicação que atinge BP2-BP3 (Figura 2), envolvendo a região crítica do Síndrome de Prader Willi e Angelman, que é sujeita a *imprinting* genómico e referida

como a alteração cromossómica mais frequente em indivíduos com PEA (Depienne C et al., 2009). Vários estudos defendem que a maioria dos casos com esta alteração está associada a uma transmissão materna ou aparecimento *de novo*, enquanto a herança paterna geralmente leva a fenótipo normal (Browne CE et al., 1997; Cook EH et al., 1997; Depienne C et al., 2009; Schroer RJ et al., 1998). Neste estudo não foi possível a avaliação genética de ambos os progenitores destas duas crianças (casos I e II), no entanto as histórias familiares com algum quadro sugestivo de atraso de desenvolvimento (caso II) e problemas do foro psiquiátrico (caso I), indiciam uma possível hereditariedade das alterações. No caso II temos a confirmação de que a mãe não tem a duplicação. Podemos, então, pensar numa duplicação *de novo* ou numa herança paterna (uma vez que não foi possível o estudo do pai). No entanto, este menino tem um irmão com autismo que não apresenta a alteração genética no cromossoma 15, o que contraria, em parte, a hipótese hereditária pelo menos nesta região deste cromossoma. Pensamos ser pertinente a realização de um estudo mais abrangente do genoma, nomeadamente por *array CGH*, na tentativa de encontrar uma outra alteração genómica em ambos que justifique o quadro. É ainda de referir a hipótese de estarmos perante qualquer outro factor epigenético que possa ter acompanhado ambas as crianças ao longo do seu neurodesenvolvimento. Gardener H et al., (2009) refere inúmeros factores ambientais apontados como possíveis responsáveis pelo autismo, no entanto as opiniões são muito controversas. Vários são os factores fortemente associados com o risco aumentado de PEA, nomeadamente as idades materna e paterna avançadas, hemorragia materna durante a gestação, diabetes gestacional e a toma de medicação no período pré-natal, tais como anti-psicóticos ou hormonas, o que não se terá verificado neste caso em concreto. Há, ainda, quem defenda que determinadas doenças psiquiátricas dos pais, como depressões, estarão associadas a comportamentos repetitivos na criança, assim como a ansiedade estará relacionada com problemas de socialização (Hughes JR, 2009; Mazefsky CA et al., 2008;

Wallace AE et al., 2008). Nestes dois primeiros casos (I e II) encontramos uma mesma alteração genética em que ambos apresentam autismo severo, mas com diferentes níveis de cognição. Segundo Bolton PF et al. (2001) e Depienne C et al. (2009) os doentes com duplicação da região crítica (BP2-BP3), como acontece nestes dois casos, têm fenótipo frequentemente anormal, que inclui atraso de desenvolvimento, afectando particularmente a fala e a linguagem, diferentes graus de atraso mental, dificuldades de coordenação motora e dismorfismos ligeiros, que não se verificam em nenhum dos casos apresentados.

O caso III, também com duplicação, mas mais proximal (BP1-BP2), corresponde, por sua vez, a uma situação de autismo ligeiro, e cursa sem deficiência mental e com normal desenvolvimento motor e de linguagem. Bolton PF et al. (2001) defende que o fenótipo desta alteração é altamente variável, mesmo entre membros da mesma família portadores de rearranjos idênticos, podendo oscilar entre autismo, perturbações do desenvolvimento, ligeiros problemas de socializações ou dificuldades de aprendizagem, manifestações psiquiátricas, ou mesmo fenótipo normal, também demonstrado por outros autores (Depienne C et al., 2009; Browne CE et al., 1997). A alteração nesta criança está também presente na mãe, que é saudável e, seria interessante o estudo de um irmão que tem problemas marcantes de socialização. Neste terceiro caso temos uma família que comprova a diversidade relatada nos estudos referidos.

O caso IV apresenta uma duplicação igualmente em genes proximais, mas de maior dimensão que a anterior (Figura 3). No entanto, corresponde a um mosaicismo com diferentes linhas celulares. Esta criança apresenta autismo ligeiro, tal como o caso III, bem como deficiência intelectual ligeira.

O fenótipo mais ligeiro destes dois últimos casos (III e IV), quando comparado com o dos dois primeiros, poderá indicar que a severidade está associada a um maior número de genes alterados envolvidos. No que se refere ao caso IV, seria de esperar um fenótipo ainda

mais ligeiro, visto tratar-se de um mosaicismos com uma linha celular normal, abranger um número de genes reduzido e tratar-se de uma alteração, no que respeita ao cromossoma 15, herdada da mãe, que não apresenta qualquer tipo de alteração clínica.

No que se refere aos casos de triplicação, os dois únicos casos são do sexo feminino, apresentam autismo ligeiro a moderado com níveis de deficiência mental distintos em ambos os casos, ligeira no caso V mas severa no caso VI, esta última sendo coincidente com um maior número de genes triplicados, sendo o ponto de quebra distal correspondente a BP4 (Figuras 2 e 3). Coloca-se, então, a hipótese de que os genes APBA2, NDNL2 e TJP1 triplicados apenas no caso VI poderão ser responsáveis pela maior severidade da deficiência mental. Em ambas as meninas é notório o atraso de desenvolvimento motor (idade de marcha 24 meses), não observado nos casos de duplicação acima referidos, o que nos leva a pensar que o maior número de cópias poderá estar relacionado com uma maior severidade do atraso no que se refere ao desenvolvimento motor. Ambas apresentam défices sensoriais relacionados com a visão e uma delas (caso VI) apresenta, inclusivamente, epilepsia, frequentemente associada com o autismo. Quanto à epilepsia existe, ainda, alguma controvérsia, havendo estudos que relatam uma maior frequência de anomalias no electroencefalograma (EEG) de crianças com autismo, na ordem dos 20 a 50% (Combi R et al., 2010; Tuchman R, 2006), e com epilepsia, entre 10 e 15% (Combi R et al., 2010; Smalley SL, 1997). Há ainda sugestões que em cerca de um terço das crianças com epilepsia há um risco aumentado de desenvolver PEA e, relatos de casos que demonstram que a epilepsia pode afectar directamente a cognição e o comportamento (Combi R et al., 2010; Tuchman R, 2006).

No que se refere aos casos das microdelecções (VII e VIII), correspondem a deleções de genes proximais (NIPA1, TUBGCP5) que se traduzem por níveis de desenvolvimento e cognição muito semelhantes, ambos com clínica de autismo ligeiro e deficiência mental muito ténue ou mesmo inexistente, assim como atraso de desenvolvimento motor e de linguagem

denotados desde o primeiro ano. Estes fenótipos ligeiros, à semelhança do que acontece também com os casos III e IV, que envolvem duplicações da mesma região, vêm reafirmar a ideia de que as alterações ocorridas nesta região, que não inclui a região crítica dos SPW e SA, são mais frequentemente variantes do normal e, geralmente, sem efeito clínico significativo. Podem manifestar-se de forma ainda mais ligeira, à semelhança da mãe do caso VIII que, apesar de também ela apresentar a mesma deleção do filho, fenotipicamente refere apenas dificuldades de aprendizagem denotadas na infância, mas que em nada perturbaram a sua vida adulta. Esta condição tem sido repetidamente descrita com variabilidade fenotípica significativa. Perdas e ganhos do número de cópias desta região têm sido identificados por *array* em controlos com uma frequência na população de 1% (Depienne C et al., 2009; Seleme MC et al., 2007).

O caso IX corresponde também a uma deleção, mas diferente das anteriores, uma vez que são outros os pontos de quebra envolvidos (BP4-BP5) (Figuras 2 e 3) e é maior o número de genes envolvido (MTMR15, TRPM1, KLF13, CHRNA7). A clínica apresentada é em tudo semelhante aos dois casos anteriores, ao contrário do que seria de esperar, dada a diferença genética. Neste caso, a deleção foi herdada do pai e, à semelhança do que aconteceu noutros estudos descritos, também este não apresenta qualquer alteração clínica, ao contrário do probando, o que traduz a elevada frequência de deleções herdadas de pais saudáveis, mais do que *de novo* (Ben-Shachar S et al., 2009; Sebat J et al., 2004). A grande variedade e heterogeneidade de expressão fenotípica para a referida deleção de 1,6Mb é notável, inclui desde fenótipo normal (o que acontece com o pai do probando), atraso mental com Quociente de Inteligência (QI) borderline e autismo (demonstrado pelo probando), epilepsia, transtorno bipolar e esquizofrenia, sem excluir outros distúrbios psiquiátricos que podem também ocorrer. As depressões frequentemente associadas a esta deleção, poderão apontar no sentido de também a avó desta criança apresentar a deleção do filho e do neto, o que possivelmente

justificaria o seu carácter depressivo. A deleção poderá, ainda, estar presente em indivíduos bem integrados na sociedade, ainda que com défices cognitivos subtis. Além disso, o atraso mental nas crianças afectadas, geralmente, não é severo, podendo, muitas vezes, permitir viver de forma independente.

Na nossa amostra não foi encontrado nenhum caso de duplicação BP4-BP5, o que vai de encontro à sua menor frequência avançada por vários estudos já realizados (Ben-Shachar S et al., 2009; Sharp AJ et al., 2008; Miller DT et al., 2009; Helbig I et al., 2009). Se as duplicações desta região causam anomalias fenotípicas, a penetrância é certamente menor do que a das deleções, daí a sua menor frequência.

Ao contrário do que se tem sugerido em relação a outras doenças, em que se defende que a perda de material genético estará associada a uma clínica mais severa, neste estudo os casos de deleção descritos apresentam um fenótipo mais frustre quando comparados com os casos de duplicação e triplicação, estes últimos com clínica ainda mais severa associada ao maior número de cópias.

As alterações aqui apresentadas, que envolvem as várias regiões do cromossoma 15, desempenham um papel significativo na patogénese de diferentes condições que afectam predominantemente o cérebro, como PEA, deficiência mental que varia de ligeira a severa, patologia psiquiátrica, como esquizofrenia e doença bipolar, epilepsia ou alterações ao EEG, mas o resultado variável da alteração fenotípica é susceptível de ser determinado e conjugado com outros factores. À semelhança do que acontece para os vários síndromes de microduplicação já referidos atrás, também para os de microdeleção várias hipóteses têm sido propostas para explicar o amplo espectro de fenótipos. Além da penetrância incompleta e da contribuição de genes contíguos, outro mecanismo molecular poderá ser a presença de uma mutação recessiva mascarada ou polimorfismo funcional num dos genes do alelo remanescente. A possibilidade de diferenças da expressão fenotípica entre os diversos

membros da família com a deleção, causadas por defeitos de *imprinting*, à semelhança do que acontece nos Síndromes de Prader Willi e Angelman, seria uma outra hipótese explicativa, mas que parece improvável nos defeitos que atingem BP1-BP2 e BP4-BP5, uma vez que nenhum dos genes destas regiões foi descrito como possuidor de *imprinting* (Genomic Imprinting Website: www.geneimprint.com/site/genes-by-species, September 2008). Uma outra alternativa é a hipotética capacidade de alguns indivíduos superarem uma ou mais deficiências causadas por haploinsuficiência de genes específicos, durante o desenvolvimento pré ou pós-natal, consistente com o facto de alguns indivíduos apresentarem desenvolvimento normal desde o nascimento, enquanto outros têm problemas de aprendizagem durante a infância, mas sem impacto na vida adulta, o que é reforçado pelo facto de alguns dos pais apresentarem a alteração dos filhos e, ao mesmo tempo, uma boa integração social. A somar a todas estas possíveis explicações genéticas, são de realçar também todas as hipóteses ambientais já referidas, que poderão também desempenhar um papel fulcral ao longo do desenvolvimento da criança.

Neste sentido, tem sido significativa a contribuição crescente do desenvolvimento científico, com o surgimento recente de técnicas do estudo do genoma completo como a *array CGH*, que tem permitido, nos últimos anos, a identificação de novas alterações genéticas em pacientes com PEA e atraso do desenvolvimento, assim como a criação de uma cada vez maior base de dados com as diferentes variações do número de cópias presentes na população, frequentemente não associadas a patologia. É um método de grande poder de resolução que poderá vir a fornecer um grande contributo para o conhecimento da etiologia destas patologias (Edelmann L e Hirschhorn K, 2009; Manning M e Hudgins L, 2010).

Por último, foi encontrada uma única duplicação do gene *SHANK3* da região 22q13.33, associada a autismo ligeiro. Este único caso encontrado remete-nos para uma alteração rara que ocorrerá na maioria das vezes *de novo*, embora no caso não tenha sido

possível o estudo dos pais. No entanto, o facto de não existir qualquer dado relevante na história familiar aponta para uma alteração *de novo* ou herdada de pais não afectados. A frequência de mutações do *SHANK3* foi estimada em 0,5 a 1% dos indivíduos com PEA (Freitag CM et al., 2010), sendo que estudos recentes têm também relatado deleções do gene *SHANK3* em indivíduos saudáveis (Kolevzon A et al., 2010).

O estudo do autismo é desafiante devido à sua grande variedade de manifestações comportamentais de gravidade variável. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, particularmente com o array CGH que permite uma abordagem de todo o genoma, certamente que haverá um contributo para uma maior compreensão da sua etiologia.

É de realçar, a importância do acompanhamento das crianças com autismo por profissionais devidamente especializados no âmbito do neurodesenvolvimento, bem como o acompanhamento e aconselhamento das famílias, permitindo-lhes o acesso ao diagnóstico tão precoce quanto possível, no sentido de diminuir a ansiedade e culpabilidade muitas vezes apresentada. O estudo genético dos progenitores revela-se também de enorme importância no sentido de permitir aos jovens casais o acesso ao diagnóstico pré-natal e/ou toda a informação acerca dos riscos de uma nova concepção.

Ainda muito trabalho adicional há a realizar, quer no campo da genética, com a aplicação das várias técnicas, no sentido de uma descoberta mais concreta, quer no estudo da influência ambiental, no sentido de acompanhar e perceber as transformações de cada criança que permitam um diagnóstico etiológico preciso e uma perspectiva de tratamento futuro.

Agradecimentos

Agradeço a toda a equipa do Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela colaboração e ajuda na execução de técnicas laboratoriais, em especial ao Dr. José Ferrão pelo acompanhamento permanente e apoio prestado.

A toda a equipa da Unidade de Neurodesenvolvimento e Autismo do Hospital Pediátrico de Coimbra pela disponibilidade e ajuda na recolha dos dados clínicos, fica também o meu agradecimento.

Agradeço à Professora Doutora Isabel Carreira e à Professora Doutora Guiomar Oliveira, tutora e co-tutora deste trabalho, pela disponibilidade e apoio prestados.

Agradeço, ainda, ao meu namorado pelo apoio, ajuda e crítica externa ao longo da elaboração do trabalho.

Por fim, dedico a minha Tese de Mestrado à minha família pelo apoio incondicional ao longo do curso e da vida.

Bibliografia

- Abrahams BS, Geschwind DH (2008) Advances in autism genetics: on the threshold of a new Neurobiology. *Nat Rev Genet* 9(5): 341–355.
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edn.
- Ben-Shachar S, Lanpher B, German JR, Qasaymeh M, Potocki L, Nagamani SCS, et al (2009) Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *J Med Genet*. 2009 June ; 46(6): 382–388.
- Bijlsma EK, Gijbbers ACJ, Schuurs-Hoeijmakers JHM, Haeringen AV, Anderlid BM, Lundin J, et al (2009) Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: Deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *European Journal of Medical Genetics* 52: 77–87.
- Bolton PF, Dennis NR, Browne CE, Thomas NS, Veltman MW, Thompson RJ, et al. (2001) The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet* 105:675-85.
- Browne CE, Dennis NR, Maher E, Long FL, Nicholson JC, Sillibourne J, et al. (1997): Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61:1342-52.
- Combi R, Redaelli S, Beghi M, Clerici M, Cornaggia CM, Dalprà L (2010) Clinical and genetic evaluation of a family showing both autism and epilepsy. *Brain Res Bull* 29;82(1-2):25-8.

- Cook EH, Jr., Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, et al. (1997) Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* 60:928-34.
- Chubykin AA, Liu X, Comoletti D, Tsigelny I, Taylor P, Sudhof TC. (2005) Dissection of synapse induction by neuroligins: effect of a neuroligin mutation associated with autism. *J. Biol. Chem.* 280, 22365–22374.
- Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, Bouteiller D, Gennetier A, Delorme R, et al (2009) Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biological psychiatry*; 66:349-359.
- Edelmann L, Hirschhorn K (2009) Clinical Utility of Array CGH for the Detection of Chromosomal Imbalances Associated with Mental Retardation and Multiple Congenital Anomalies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1151: 157–166.
- El-Fishawy P, State MW (2010) The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *Psychiatr Clin North Am*; 33(1):83-105.
- Faras H, Ateeqi N, Tidmarsh L (2010) Autism spectrum disorders. *Ann Saudi Med.* 2010 Jul–Aug; 30(4): 295–300.
- Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, et al (2006) High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci. Lett.* 409, 10–13.
- Fombonne E (2003) Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord*; 33(4):365-82.
- Freitag CM, Staal W, Klauck SM, Duketis E, Waltes R (2010) Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19:169–178.

- Garber K (2007) Neuroscience. Autism's cause may reside in abnormalities at the synapse. *Science*, 317:190-191.
- Gardener H, Spiegelman D, Buka SL (2009) Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry* 195(1):7-14.
- Geschwind DH (2009) Advances in Autism. *Annu. Rev. Med.* 60:367–80.
- Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, et al (2009) 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet* 2009;41:160–2.
- Hughes JR (2009) Update on autism: A review of 1300 reports published in 2008. *Epilepsy Behavior* 16(4):569-89.
- Ivens J, Martin N (2002) A common metric for the Griffiths Scales. *Arch Dis Child* 87:109-110.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, et al (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29.
- Kogan MD, Strickland BB, Blumberg SJ, Singh GK, Perrin JM, van Dyck PC (2008) A national profile of the health care experiences and family impact of autism spectrum disorder among children in the United States, 2005–2006. *Pediatrics* 122:1149–58.
- Kolevzon A, Caia G, Sooryaa L, Takahashia N, Grodberga D, Kajiwaraa Y, et al (2010) Analysis of a purported *SHANK3* mutation in a boy with autism: Clinical impact of rare variant research in neurodevelopmental disabilities. *Brain Res*:10.1016.
- Kumar RA, Christian SL (2009) Genetics of autism spectrum disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 9(3):188-97.
- Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, et al. (2008) Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* 17: 628–38.

- Lee JA, Lupski JR (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 52:103-21.
- Losh M, Sullivan PF, FRANZCP, Trembath D, Piven J (2008) Current Developments in the Genetics of Autism: From Phenome to Genome. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(9): 829–837.
- Lord C, Risi S, Lambrecht L et al (2000) The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord* 30: 205-223.
- Lord C, Rutter ML, Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 24: 659–685.
- Manning M, Hudgins L (2010) Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2010:12(11):742–745.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, et al. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82:477– 488.
- Mazefsky CA, Williams DL, Minshew NJ (2008) Variability in adaptive behavior in autism: evidence for the importance of family history. *J Abnorm Child Psychol* 36(4):591-9.
- Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, Bridgemohan C, et al (2009) Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet* 2009;46:242–8.
- Mukaddes NM, Herguner S. (2007) Autistic disorder and 22q11.2 duplication. *The World Journal of Biological Psychiatry* 8(2): 127_130.

- Oliveira G, Ataíde A, Marques C, Miguel TS, Coutinho AM, Mota-Vieira L, et al (2007) Epidemiology of autism spectrum disorder in Portugal: prevalence, clinical characterization, and medical conditions. *Dev Med Child Neurol* 49(10):726-33.
- Pujana MA, Nadal M, Guitart M, Armengol L, Gratacos M, Estivill X (2002): Human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons. *Eur J Hum Genet* 10:26-35.
- Ramelli GP, Silacci C, Ferrarini A, Claudio C, Visconti P, Pescia G (2008) Microduplication 22q11.2 in a child with autism spectrum disorder: clinical and genetic study. *Dev Med Child Neurol* 50: 953–955.
- Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, et al (2005) Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J Neurosci*, 25:3560-3570.
- Russell PS, Daniel A, Russell S, Mammen P, Abel JS, Raj LE, et al (2010) Diagnostic accuracy, reliability and validity of Childhood Autism Rating Scale in India. *World J Pediatr* 6(2):141-7.
- Schroer RJ, Phelan MC, Michaelis RC, Crawford EC, Skinner SA, Cuccaro M, et al. (1998): Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *Am J Med Genet* 76:327-36.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, et al (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316:445– 449.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004;305:525–8.
- Seleme MC, Shaikh TH, Lincicum M, Sathanoori M, Surti U, Hakonarson H, et al. (2007) Chromosome 15q11.2 copy number variants (CNV): population frequency and

clinical implications. Presented at the annual meeting of The American Society of Human Genetics.

- Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, et al (2008) A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*;40:322–8.
- Smalley SL (1997) Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* 60(6):1276-82.
- Sykes NH, Toma C, Wilson N, Volpi EV, Sousa I, et al (2009) Copy number variation and association analysis of SHANK3 as a candidate gene for autism in the IMGSAC collection. *Eur J Hum Gen* 17, 1347 – 1353.
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, et al (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Gen* 39, 319 – 328.
- Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, et al (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science*, 318:71-76.
- Tuchman R (2006) Autism and epilepsy: what has regression got to do with it? *Epilepsy Curr*. 6(4):107-11.
- Uher R (2009) The role of genetic variation in the causation of mental illness: an evolution-informed framework. *Mol. Psychiatry* 14, 1072-1082.
- Veenstra-Vanderweele J, Christian SL, Cook EH. Jr. (2004). Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet* 5, 379–405.
- Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, et al (2006) Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 11: 1, 18–28.

- Vorstman JAS, Morcus MEJ, Duijff SN, Klaassen PWJ, Heineman-de-Boer JA, Beemer FA, et al (2006) The 22q11.2 Deletion in Children: High Rate of Autistic Disorders and Early Onset of Psychotic Symptoms. *J. AM. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, 45:9:1104-1113.
- Wallace AE, Anderson GM, Dubrow R (2008) Obstetric and parental psychiatric variables as potential predictors of autism severity. *J Autism Dev Disord* 38(8):1542-54.
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, et al. (2008) Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 358: 667–75.