

# Autismo: genética

## Autism: genetics

---

Abha R Gupta,<sup>1,2</sup> Matthew W State<sup>1,3</sup>

### Resumo

O autismo é um transtorno fortemente genético, com uma herdabilidade estimada de mais de 90%. Uma combinação de heterogeneidade fenotípica e o provável envolvimento de múltiplos loci que interagem entre si dificultam os esforços de descobertas de genes. Conseqüentemente, a etiologia genética dos transtornos relacionados ao autismo permanece, em grande parte, desconhecida. Nos últimos anos, a convergência entre tecnologias genômicas em rápido avanço, a finalização do projeto genoma humano e os crescentes e exitosos esforços em colaboração para aumentar o número de pacientes disponíveis para estudo conduziram às primeiras pistas sólidas sobre as origens biológicas desses transtornos. Este artigo revisará a literatura até nossos dias, resumindo os resultados de estudos de ligação genética, citogenéticos e de genes candidatos com um foco no progresso recente. Além disso, são consideradas as vias promissoras para pesquisas futuras.

**Descritores:** Transtorno autístico; Genética; Ligação (Genética); Citogenética; Associação

---

### Abstract

Autism is a strongly genetic disorder, with an estimated heritability of greater than 90%. A combination of phenotypic heterogeneity and the likely involvement of multiple interacting loci have hampered efforts at gene discovery. As a consequence, the genetic etiology of the spectrum of autism related disorders remains largely unknown. Over the past several years, the convergence of rapidly advancing genomic technologies, the completion of the human genome project, and increasingly successful collaborative efforts to increase the number of patients available for study have led to the first solid clues to the biological origins of these disorders. This paper will review the literature to date summarizing the results of linkage, cytogenetic, and candidate gene studies with a focus on recent progress. In addition, promising avenues for future research are considered.

**Keywords:** Autistic disorder; Genetics; Linkage (Genetics); Cytogenetics; Association

---

<sup>1</sup> Child Study Center, Yale University School of Medicine, New Haven

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Yale University School of Medicine, New Haven

<sup>3</sup> Department of Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven

Financiamento: Bolsas T32 MH18268 (Programa de Treinamento em Transtornos Neuropsiquiátricos Infantis) para ARG e NIH K23 RR16118 para MWS  
Conflito de interesses: Inexistente

### Correspondence

Matthew W. State  
Child Study Center  
230 South Frontage Road, Yale University  
CT 06520 New Haven,  
Tel: (203) 785-6066; Fax: (203) 785-7560  
E-mail: matthew.state@yale.edu

## Introdução

Entre os transtornos psiquiátricos, o autismo e os transtornos do espectro do autismo (TEAs) possuem as mais fortes evidências de terem bases genéticas, ainda que a busca dos genes específicos que contribuem para essas síndromes de desenvolvimento, que são freqüentemente devastadoras, tenha se mostrado extraordinariamente difícil. Recentemente, os avanços nas tecnologias genômicas, a finalização do seqüenciamento do genoma humano, a crescente disponibilidade de grandes conjuntos de amostras genéticas de indivíduos afetados e um renovado compromisso com a pesquisa da genética do autismo, tanto por parte das agências governamentais quanto das fundações privadas, fundiram-se para resultar num grande progresso. As primeiras evidências reproduzíveis que implicam regiões cromossômicas e genes específicos nos transtornos do espectro do autismo já foram apresentadas. Nos próximos anos, há poucas dúvidas de que os múltiplos alelos dos transtornos do espectro do autismo serão definidos e confirmados e que significativos avanços serão feitos para o entendimento de como essas anormalidades genéticas podem levar a comprometimentos globais de desenvolvimento.

### O autismo é um transtorno genético

Há muito se avalia que os genes desempenham um papel central na fisiopatologia do autismo e de suas condições relacionadas. Ainda que esses cálculos tenham sido feitos na ausência do conhecimento dos genes causadores da doença, os dados são mesmo assim convincentes. Como um todo, a herdabilidade, que é a proporção de variância fenotípica atribuível a causas genéticas, é calculada em aproximadamente 90%.<sup>1</sup>

Uma importante linha de evidências a esse respeito é a que se deriva da comparação do grau em que o diagnóstico do autismo é compartilhado entre gêmeos monozigóticos (MZ) e digizóticos (DZ). Como os MZ são geneticamente idênticos e os DZ partilham a mesma quantidade de DNA que qualquer par de irmãos, o achado de um índice maior de concordância (partilhando o diagnóstico) entre pares MZ sugeriria que os genes têm uma importante contribuição à etiologia de um transtorno. No caso dos TEAs, os índices observados de concordância para o autismo estritamente diagnosticado são de 60% em gêmeos MZ contra 0% em gêmeos DZ.<sup>1</sup> Poder-se-ia esperar que este último número se aproximasse do índice de recorrência de irmãos se a amostra contivesse um grupo maior. Para diagnósticos de espectro mais amplo, os índices de concordância são de 92% contra 10%,<sup>1</sup> que são índices altamente divergentes e sugerem um forte componente genético do risco.

No mesmo sentido, pode-se adivinhar uma estimativa aproximada da contribuição genética determinando o risco de se ter um transtorno se houver um parente afetado e comparar-se isso com o risco encontrado na população geral. Essa quantidade é conhecida como  $\tilde{\epsilon}_s$  ou mais especificamente como  $\tilde{\epsilon}_s$  se os irmãos forem o ponto de comparação. A atual melhor estimativa do índice de recorrência quando uma criança tem um irmão com autismo é de aproximadamente 2,2%.<sup>2</sup> Quando se compara isso com a prevalência do autismo na população geral, que aumentou nos últimos 40 anos de aproximadamente 4 em 10.000 para entre 10 e 13 por 10.000, ou de 0,13%,<sup>3</sup> o  $\tilde{\epsilon}_s$  resultante é de 20, dando grande apoio à contribuição genética.

É importante salientar que, apesar de que os dados de gêmeos e familiares indicam claramente os mecanismos genéticos na etiologia desses transtornos, os padrões de transmissão

observados não correspondem às expectativas Mendelianas. Em resumo, na maioria dos casos parece não haver uma correspondência direta e simples entre ter uma anormalidade genética única e ter autismo. De fato, os dados dão suporte à noção de que, na grande maioria dos indivíduos, os múltiplos *loci* interagem para levar a manifestações da síndrome. Mesmo que seja amplamente aceito que não há um gene único do autismo, é difícil prever o número de regiões genéticas, ou *loci*, que contribuem para ele. Estimou-se que aproximadamente 15 genes possam estar envolvidos.<sup>4</sup> No entanto, isso pode acabar sendo uma significativa subestimação do número total que pode levar ao desenvolvimento de um fenótipo autístico ou aumentar o risco disso. Essa complexidade genética parece ser a regra e não a exceção para a maioria das condições clínicas mais comuns. No entanto, a descoberta de genes no autismo pode representar um desafio ainda maior que em outras condições, tais como hipertensão ou diabetes, devido às particularidades do diagnóstico, particularmente nas fronteiras da síndrome, e atual ausência de qualquer marcador biológico que possa distinguir de forma confiável um indivíduo afetado de um não afetado.

Frente a esses obstáculos, os pesquisadores basearam-se em três abordagens para identificar os genes da doença nos TEAs: análise de ligação genética, análise citogenética e estudos de genes candidatos. Cada uma delas é descrita abaixo junto com uma revisão seletiva dos achados até o presente.

### Análise de ligação genética

Dada a atual incerteza com relação aos mecanismos genéticos ou celulares específicos subjacentes, muitos pesquisadores tentaram “uma clonagem posicional” por meio de análises de ligação do genoma completo. No fundo, os estudos de ligação genética simplesmente avaliam a transmissão de um segmento cromossômico de uma geração a outra dentro das famílias e procuram vincular a presença desse intervalo de DNA com a presença do fenótipo de interesse. Dada a suposição de que na maioria dos casos é improvável que uma contribuição genética para o autismo seja transmitida de uma forma Mendeliana simples (i.e. não é provável que seja simplesmente dominante, recessiva ou ligada ao cromossomo X), muitos pesquisadores optaram por abordagens “não-paramétricas” para a vinculação, que não se apóiam como primeira hipótese em um modo preciso de herança. Em estudos com pares de irmãos afetados, isso é feito avaliando se os irmãos autísticos compartilham alguma região do genoma mais freqüentemente do que seria esperado pelo acaso.

Em estudos de ligação genética, a estatística mais comum apresentada é o escore de logaritmo de chances (LOD), que representa o algoritmo da proporção de probabilidade de observar os presentes dados utilizando um modelo de ligação genética comparado a um modelo de recombinação livre (ou sem ligação genética). Utilizando os critérios mais amplamente aceitos para avaliar os estudos de ligação genética, um escore LOD de 3,6 em uma análise de pares de irmãos sugere que exista uma probabilidade de 5% de ver este resultado por acaso em um único estudo de todo o genoma e é uma evidência de uma ligação genética significativa.<sup>5</sup> Um escore LOD de 2,2 é considerado como uma evidência “sugestiva” de ligação e um escore LOD de 5,4 é considerado como ligação genética altamente significativa. Traduzindo esses limiares em uma forma mais tangível: poder-se-ia esperar ver um pico significativo (2,2) por acaso uma vez a cada análise do genoma, ou um pico significativo (3,6) por acaso no mínimo uma vez em

**Tabela 1 – Estudos genéticos no autismo<sup>50-62</sup>**

Cromossomo	Marcador	Escore LOD (ref)
1p13.2	D1S1675	2,63 (50)
1p13.2	D1S1675	2,15 (4)
1q21.3	D1S498	2,32 (50)
1q22	D1S2721	2,88 (51)
1q23.3	D1S484	3,58 (51)
1q42.2	D1S1656	3,06 (52)
2q31.1	D2S2188	4,80 (6)
2q31.1	D2S335	3,32 (7)
2q33.1	D2S116	2,86 (8)
3p24.1	D3S2432	3,32 (51)
3p25.3	D3S3691	2,22 (15)
3q22.1	D3S3045-D3S1763	3,10 (53)
3q26.32	D3S3715, D3S3037	4,81 (50)
4q23	D4S1647	2,87 (52)
4q27	D4S3250	2,73 (52)
4q32.3	D4S2368	2,82 (51)
5p13.1	D5S2494	2,55 (54)
5p13.1	D5S2494	2,54 (11)
6q14.3	D6S1270	2,61 (52)
6q16.3	D6S283	2,23 (55)
7q21.2	D7S1813	2,2 (56)
7q21.2	D7S1813	2,17 (57)
7q22.1	D7S477	3,55 (6)
7q32.1-34	D7S530-D7S684	3,55 (9)
7q33	D7S640	2,01 (58)
7q34-36.2	D7S1824-D7S3058	2,98 (59)
7q36.1	D7S483	3,7 (60)
9p22.2	D9S157	3,11 (6)
9q34.3	D9S1826	3,59 (6)
11p11.2-13	D11S1392-D11S1993	2,24 (11)
13q12.3	D13S217-D13S1229	2,3 (56)
13q22.1	D13S800	3,0 (56)
13q22.1	D13S800	2,54 (57)
13q32.1-32.3	D13S793-1271	2,86 (51)
15q12	GABRB3	4,71 (14)
15q21.2	CYP19	2,21 (6)
16p13.13	D16S3102	2,93 (6)
16p13.2	D16S407	2,22 (6)
17p11.2	D17S1298-D17S1299	2,22 (53)
17q11.2	D17S1800-D17S1294	8,0 (39)
17q11.2	D17S1294-D17S798	4,3 (16)
17q11.2	D17S1294	2,85 (15)
17q11.2	D17S1800	2,83 (11)
17q11.2	HTTINT2	2,34 (6)
17q21.2	D17S1299	2,26 (15)
17q21.32	D17S2180	4,1 (17)
17q24.3	D17S1290-D17S1301	2,84 (53)
19p13.11	D19S930	2,77 (15)
19p13.12	D19S714	2,53 (54)
19p13.12	D19S714	2,31 (52)
21q21.1	D21S1437	3,4 (60)
Xq21.33	DXS6789	2,54 (61)
Xq25	DXS1047	2,67 (54)
Xq28	F8C	2,1 (62)

Abreviaturas: LOD (Logaritmo de chances) - os resultados de análises de ligação genética genômicas (não sombreados) e focados (sombreados) são dados para intervalos que geram escores LOD  $\geq 2$ . Três grupos relatam vários loci adicionais com LOD  $\geq 2$ ; no entanto, somente loci cujos marcadores foram publicados foram expostos na tabela.<sup>5,15,53</sup>

cada 20 análises publicadas (isso, provavelmente, é uma subestimação, já que existe um viés em direção à publicação de dados positivos).

Até hoje, houve mais de uma dezena de estudos genômicos publicados na literatura sobre autismo. Apesar do crescente tamanho das amostras e da considerável sofisticação metodológica, tem havido uma incômoda ausência de acordo direto entre os estudos. De fato, até muito recentemente não havia instâncias relatadas em que foi identificada ligação genética em dois estudos distintos, precisamente nos mesmos marcadores genéticos ou entre marcadores sobrepostos no

genoma. Isso provavelmente reflete em parte a heterogeneidade fenotípica e genética antes discutida. Os pesquisadores têm tentado enfrentar essas dificuldades aumentando ainda mais os tamanhos de suas amostras por meio de esforços de colaboração internacional, focando-se na reprodução de intervalos genéticos específicos a partir de pesquisas individuais, combinando resultados de mais de um estudo e reavaliando os dados, e tentando identificar subgrupos mais homogêneos de pacientes que podem tornar o mapeamento genético mais poderoso.

Atualmente, apesar dos resultados conflitantes, achados promissores e padrões interessantes surgiram a partir desses estudos genômicos. Por exemplo, muitos pesquisadores identificaram regiões nos cromossomos 2 e 7, que apresentam sugestiva ou significativa ligação genética com o autismo. Três grupos relataram evidências implicando o cromossomo 2, achados que se fortalecem quando as amostras são estruturadas. Em um estudo com 152 pares de irmãos afetados (PIAs), um escore de logaritmo de chances multiponto (ELCM) de 3,74 foi calculado em 2q31.1. Quando se analisou o subconjunto de PIAs que preencheu critérios diagnósticos “estritos” ( $n = 127$ ), o ELCM aumentou para 4,80. Ressalte-se que os critérios “estritos” incluíram 84 PIAs em que um irmão preenchia critérios de TID que não fosse o autismo.<sup>6</sup> Uma análise genômica independente identificou uma ligação genética sugestiva dentro do mesmo grupo cromossômico<sup>7</sup> e um terceiro estudo mais focado também identificou uma sugestiva ligação genética quando os pacientes foram estratificados com base em certas características de linguagem (discutidas em maior detalhe abaixo).<sup>8</sup>

O cromossomo 7q é a região mais frequentemente implicada nos estudos genômicos. Em uma instância, um escore LOD de 3,55 foi relatado no grupo 7q32.1-34.<sup>9</sup> Apesar desse achado e de quatro análises genômicas que forneceram evidências adicionais de ligação genética no braço longo deste cromossomo, os resultados têm sido de difícil interpretação.<sup>10</sup> Nenhum trabalho reproduziu qualquer outro estudo precisamente na mesma região cromossômica. Além disso, no maior estudo genômico publicado até hoje (345 famílias multiplex), em essência não foi identificada evidência de ligação genética ao longo de toda a região, com um escore LOD máximo de 1,3 telômeros identificados no locus identificado acima.<sup>11</sup>

No entanto, o cromossomo 7q continua sendo uma área de intenso interesse por várias razões: primeiro, como observamos, múltiplos sinais sugestivos de ligação genética foram relatados nesse intervalo e, mesmo que estejam dispersos em uma grande área, não é incomum que os picos de ligação genética sejam amplos e variem segundo os estudos.<sup>12</sup> Uma segunda fonte de interesse foi a identificação de vários rearranjos de cromossomos envolvendo este intervalo de pacientes com TEA (Tabela 1). Finalmente, numerosas transcrições com expressão cerebral mapeiam o braço longo do cromossomo 7 e possuem funções conhecidas que poderiam plausivelmente estar envolvidas na fisiopatologia de TEAs. Estes incluem o *FOXP2* (*forkhead box P2*) no 7q31.1, que é mutado em um grave transtorno de fala e de linguagem,<sup>13</sup> e *EN2 engrailed*), discutido em detalhe abaixo, que produziu fortes evidências de associação com autismo em estudos recentes.

Como observamos, em um esforço para aumentar a homogeneidade genética dos indivíduos afetados, vários grupos possuem amostras estratificadas utilizando uma variedade de medidas fenotípicas. Dois grupos o fizeram utilizando os critérios de retardo de fala de expressões (PSD) após os 36 meses de idade. Um estudo com 95 famílias relatou um escore

máximo de ligação não-paramétrica multiponto (NPL) de 2,39 no 2q31.3. Quando um subconjunto de 49 famílias que preencheram o diagnóstico "restrito" de autismo e que tinham PSD foi analisado, o escore de logaritmo de chances aumentou para 3,32.<sup>7</sup> Um segundo grupo focou no braço longo do cromossomo 2 e encontrou um ELCM de 1,12 no 2q33 ao estudar 99 famílias. Isto, subsequente, aumentou para 2,86 em um subconjunto de 45 famílias com TEA.<sup>8</sup>

Esses exemplos sugerem que pode ser de considerável valia a divisão das amostras em subgrupos e identificar os denominados endofenótipos, ou seja, traços herdáveis mensuráveis que estão presentes no caminho entre o gene e a síndrome. Intuitivamente, essa é uma noção atraente: se o autismo não é uma entidade única, mas uma coleção de fenótipos superpostos, resultante da ação combinada de múltiplos alelos de risco, parece lógico que uma abordagem que analise em detalhe a apresentação clínica em seus componentes biologicamente relevantes poderia ser mais poderosa do que uma que se apóie nos critérios diagnósticos-padrão. Evidentemente, em qualquer momento em que se façam múltiplas comparações, elas estão sujeitas a um maior risco de obter falsos positivos. Conseqüentemente, é preciso ser cauteloso ao interpretar um resultado inicialmente negativo de uma ligação genética que melhora após múltiplas análises subsequentes, a não ser que estas tenham sido levadas em conta ao estabelecer-se um limiar estatístico apropriado.

Além dos cromossomos 2 e 7, as regiões nos cromossomos 1, 5 e 16 revelaram algumas evidências de ligação genética em intervalos sobrepostos em mais de um estudo (Tabela 1). Pelo contrário, é interessante notar que poucos dos estudos genômicos fornecem evidências de ligação genética no cromossomo 15q11-13, o sítio mais freqüente de anormalidades cromossômicas (além do sítio do cromossomo Frágil X) detectados no TEA. Um grupo utilizou um novo método estatístico conhecido como *análise de subgrupos ordenados* (ASO) e identificou evidências de ligação genética com o fenótipo "insistência na repetição". A abordagem aumentou o escore de logaritmo de chances da região 15q11-13 no *locus GABRB3* de 1,45 para 4,71, sob um modelo dominante de herança.<sup>14</sup> O *GABRB3*, que codifica o receptor de GABA, o principal neurotransmissor inibidor cerebral, foi estudado como um gene candidato para o autismo (ver abaixo), com resultados inconsistentes.

Talvez os mais animadores entre os achados recentes tenham focado sua atenção no cromossomo 17q. Um estudo com 345 famílias multiplex do banco de dados *Autism Genetic Resource Exchange* (AGRE) produziu um escore LOD mais alto, de 2,83 no 17q11.<sup>11</sup> Similarmente, um estudo com 158 famílias multiplex produziu um escore LOD mais alto, 2,9, no 17q11.2.<sup>15</sup> Dada a predominância masculina no autismo (proporção homens:mulheres = 4:1), foi levantada a hipótese de que as amostras estratificadas por gênero podem revelar os *loci* que predisõem os meninos a este transtorno. 257 famílias do AGRE foram subdivididas em grupos afetados com somente homens e os que continham apenas mulheres. As análises de ligação genética produziram um escore LOD de 3,2 no 17q11 no conjunto total de dados, que aumentou para 4,3 nas famílias somente com homens.<sup>16</sup> É de se salientar que esses resultados foram replicados nos mesmos marcadores em uma amostra independente de 91 famílias, com escore LOD de 4,1 no 17q11-21 no grupo afetado somente com homens.<sup>17</sup> Esse achado representou a primeira replicação formal de um achado de ligação genética de

autismo apresentado na literatura. Um gene candidato atraente no intervalo é o *SLC6A4*, que codifica o transportador de serotonina, envolvido na recaptação da serotonina da sinapse. Hiperserotonemia das plaquetas é encontrada em um terço dos indivíduos com autismo,<sup>18</sup> representando um dos mais antigos e confiáveis achados em psiquiatria biológica. De forma similar, o gene *ITGB3* (integrina beta-3) mapeado no 17q21 é uma molécula de adesão celular expressa neuronalmente que foi identificada como um *locus* de característica quantitativa (LCQ) para níveis de serotonina em homens,<sup>19</sup> sugerindo que ele também pode ser considerado como um forte gene candidato.

Caracteristicamente, maiores tamanhos de amostras possuem maior poder para detectar os genes da enfermidade do que amostras menores. Isso não é necessariamente verdadeiro em um transtorno genético complexo como o autismo, pois aumentar o tamanho da amostra pode servir para somente diluir a presença de cada um dos vários genes da enfermidade. Esse problema tem sido enfrentado pelo uso da probabilidade posterior de ligação genética (PPL), um método estatístico desenhado para analisar conjuntos de dados heterogêneos. As 345 famílias AGRE foram subdivididas em seis classes de acordo com o diagnóstico de autismo ou de outro TID e a presença de retardo de expressões orais após 36 meses. A estatística de ligação genética é calculada e atualizada quando os subconjuntos são analisados seqüencialmente, incluindo a heterogeneidade dentro e através dos subconjuntos. A maior probabilidade de ligação genética, 55% (> 2% favorece a ligação genética), foi calculada para 1q23-24, uma região que não foi detectada pelo estudo original com essas famílias. Para efetuar a comparação, quando os subconjuntos foram agrupados, tratando as famílias como um grupo homogêneo como no estudo original, a probabilidade diminuiu para 1,7% nesse *locus*. Foi calculada também uma probabilidade de ligação genética de 15% em 17q11.<sup>20</sup>

Certamente, a escassez de achados altamente significativos e a dificuldade de replicar a ligação genética nos marcadores individuais têm sido um desapontamento para aqueles que procuram identificar os alelos de risco para o autismo. Dado o crescente número de pesquisas genômicas, pode-se esperar que múltiplas regiões produzam escores de logaritmo de chances entre 2 e 3,6 simplesmente por acaso. Por outro lado, estudos recentes têm começado a apontar repetidamente um pequeno número de intervalos cromossômicos e pelo menos uma replicação formal já foi confirmada. Esses achados se somaram à crescente disponibilidade de amostras de autismo e conjuntos de dados genômicos, aos custos decrescentes de genotipagem de alta resolução e aos resultados promissores de outras abordagens de descoberta de genes, discutidos abaixo, e são todas razões para considerável otimismo.

#### Análise citogenética

Avaliava-se, durante um certo período, que as crianças com retardo de desenvolvimento e/ou autismo continham anormalidades cromossômicas em maior freqüência do que a população com desenvolvimento normal. Por exemplo, uma recente revisão mostrou que 78 de 1.826 cariótipos (4,3%) em crianças com autismo eram anormais. Mesmo quando aquelas com cromossomo X Frágil foram excluídas, 54 (3,0%) eram anormais.<sup>21</sup> Foram encontradas anormalidades em cada um dos cromossomos e existe uma sobreposição em somente poucos intervalos (Tabela 1). Esses achados dão suporte à noção de que nenhuma variante genética ou rearranjo cromossômico

único tem probabilidade de ser responsável por uma significativa proporção de pacientes com autismo. No entanto, o estudo sobre as anormalidades cromossômicas pode ser significativo, tanto para propósitos clínicos como de pesquisa.

Do ponto de vista clínico, a análise cromossômica (e outros testes genéticos) em pacientes com TEA pode apontar para uma síndrome conhecida, como a síndrome do cromossomo X Frágil ou de Angelman, ou para a presença de uma transposição ou outro rearranjo cromossômico que podem requerer aconselhamento genético. Certamente, o achado de características sindrômicas ou de dismorfologia não-específica em exame sugeriria que a citogenética padrão deve ser realizada. Como discutido mais em detalhe abaixo, a alta incidência relativa de mutações do cromossomo X Frágil em pacientes diagnosticados com TEA sugere que o teste da ocorrência dessa síndrome deva ser a rotina.

À medida que as tecnologias genômicas avançam, a questão que surge é se serão necessários mais estudos cromossômicos com maior resolução. Por exemplo, os estudos moleculares dos rearranjos subteloméricos demonstram uma maior prevalência desses entre os pacientes com retardo mental, com um índice médio de 4,6% nos vários estudos.<sup>22</sup> Os achados em pacientes com TEA têm sido mais equívocos. Um estudo que examinou 10 crianças com autismo identificou uma deleção única em 2q37.<sup>23</sup> No entanto, outra busca por anormalidades subteloméricas não encontrou nenhuma entre 50 crianças com TEA.<sup>24</sup> Um terceiro estudo, o maior até hoje, também não encontrou rearranjos em 71 pacientes.<sup>25</sup> Hoje em dia, os estudos são muito pequenos para determinar definitivamente se os estudos citogenéticos moleculares desse tipo devem ser uma parte rotineira de um trabalho inicial com TEA. No entanto, tendo em vista os achados em pacientes com retardo mental, é claro que uma criança que apresenta uma clara dismorfologia ou um retardo significativo deve ser estudada dessa forma.

Do ponto de vista da pesquisa, as anormalidades cromossômicas oferecem uma grande perspectiva para a rápida identificação de regiões candidatas para a descoberta de genes. Esse é particularmente o caso das transposições equilibradas e inversões cromossômicas em que dois “pontos de ruptura” diferentes interrompem a arquitetura cromossômica normal. Da mesma forma, pequenas deleções podem apontar para intervalos cromossômicos que mereçam maior estudo. O valor desses tipos de achados tem sido repetidamente demonstrado em relação aos transtornos de desenvolvimento. Inicialmente, foi identificado o gene da síndrome de Angelman como o resultado de uma rara transposição que interrompe o gene *UBE3A*.<sup>26</sup> Obviamente, o gene do cromossomo X Frágil foi inicialmente localizado como resultado de reveladores achados citogenéticos.

Mais recentemente, as anormalidades cromossômicas têm levado à identificação da família de genes *NLGN* (neurologina) como fortes candidatas para o envolvimento no retardo do desenvolvimento e no autismo. Baseado na observação inicial de que três das oito meninas com deleções em Xp22.3 tinham características autísticas,<sup>27</sup> um grupo de pesquisa escolheu estudar 158 indivíduos com TEA para rastrear mutações em genes dentro desse intervalo.<sup>28</sup> Uma mutação *frameshift* em *NLGN4* foi identificada em dois irmãos afetados, um com autismo e outro com transtorno de Asperger, bem como em sua mãe, que não estava afetada. Previa-se que essa substituição levaria ao significativo truncamento da proteína resultante, que está envolvida na sinaptogênese. O achado repre-

sentou a primeira identificação de uma mutação claramente funcional que segregou em pacientes com autismo sem outros achados físicos. O *NLGN3* foi também rastreado nessa amostra e foi encontrada uma mutação pontual em um aminoácido altamente conservado em uma segunda família que incluiu dois irmãos afetados (um com autismo e outro com transtorno de Asperger) e sua mãe não-afetada.<sup>28</sup> Logo após a publicação desses achados, uma segunda mutação *frameshift* em *NLGN4* foi identificada por um grupo de pesquisas independente, que realizou uma análise de ligação genética em 13 membros afetados de um grande pedigree: dois com autismo, um com TID-SOE e o resto com retardo mental.<sup>29</sup> Esses resultados representam uma replicação independente dos achados iniciais e sugerem que uma mutação única nesse gene pode levar a um retardo no desenvolvimento somente e/ou a fenótipos do espectro do autismo.

Apesar de que esses resultados, particularmente em relação ao *NLGN4*, sejam bastante entusiastas e forneçam uma grande perspectiva para a pesquisa sobre as conseqüências moleculares de uma mutação relacionada ao autismo, a frequência em que os *NLGNs* podem contribuir para o autismo idiopático parece ser baixa, como seria de se esperar com base nos achados iniciais. Não foram descobertas mutações em *NLGN3* e *NLGN4* em um total de 292 pacientes em dois estudos.<sup>30-31</sup> Quatro mutações “missenses” (de sentido alterado) em *NLGN4* foram encontradas em 148 pacientes,<sup>32</sup> embora as mutações não tivessem segregado claramente em TEA quando os familiares dos quatro casos foram rastreados. Além disso, a presença de um homólogo de *NLGN4* no cromossomo Y levou a questionar se a perda de uma cópia, observada nos pacientes acima descritos, realmente resulta na ausência desse produto gênico em homens.

O sítio mais freqüente de anormalidades cromossômicas encontrado em pacientes autísticos sem características sindrômicas envolve a região 15q11-13. A presença de duplicações de segmentos de DNA torna essa região vulnerável a rearranjos. A deleção da cópia herdada da mãe leva à síndrome de Angelman, ao passo que a deleção da cópia herdada do pai leva à síndrome de Prader-Willi, devido aos genes impressos que se expressam a partir de somente um ou de outro cromossomo. A duplicação do cromossomo materno, mas não do paterno, nessa região foi relatada numerosas vezes em TEAs.<sup>33</sup> Vários genes candidatos são mapeados nesse intervalo, mas mutações claras ainda não foram identificadas e nenhuma associação de alelos comuns foi demonstrada de forma conclusiva.

Como observamos, as anormalidades no cromossomo 7q também foram encontradas em numerosos casos de TEA. A combinação de dados de ligação genética, a presença de *loci* relacionados à linguagem e o fato de que múltiplos genes candidatos intrigantes são mapeados nesse intervalo têm atraído considerável interesse de pesquisadores de autismo. Achou-se que uma transposição de herança materna entre os cromossomos 7 e 13, t(7;13)(q31.3;q21)mat interrompeu o gene *RAY1*, um supressor da tumorigenicidade.<sup>34</sup> Em um segundo caso, encontrou-se que uma transposição equilibrada em dois gêmeos monozigóticos concordantes para o autismo interrompeu a nova transcrição *AUTS2*<sup>35</sup> em 7q11.2, que é altamente expressa no cérebro. No entanto, não foram encontradas mutações em quaisquer dos genes em pacientes em pacientes de TEA citogeneticamente normais.

Além de *RAY1* e *AUTS2*, encontrou-se que outros rearranjos em indivíduos com TEA interrompem os seguintes genes:

*PAX3* (gene da família BOX emparelhado 3) em 2q36.1, *MMP16* (metaloproteinase, neurobeaquina 16) em 8q21.3, *NBEA* (neurobeaquina) em 13q13.3, *GRPR* (receptor de peptídeo liberador de gastrina) em Xp22.2 e *A2BP1* (proteína 1 ligante da ataxina 2) em 16p13.2 (revisados em <sup>21</sup>). Além disso, não foram ainda relatadas associações de alelos comuns desses genes nem mutações funcionais raras em uma população maior em indivíduos afetados. A atenção voltou-se às crianças com a síndrome de deleção 22q11 (síndrome de DiGeorge, síndrome Velo-cardio-facial), algumas das quais possuem déficits de habilidades sociais. Um estudo relatou que um terço de 32 indivíduos com a síndrome de deleção 22q11 preencheu critérios para TEA.<sup>36</sup> Não foi identificada uma transcrição específica nesse intervalo que contribuísse para esses achados.

### Genes candidatos

Os estudos de genes candidatos são divididos *grosso modo* em dois tipos, os que buscam determinar se uma variante comum de um gene atribui um risco maior para o fenótipo de autismo (estudos de associação de genes candidatos) e os que buscam determinar se mutações raras, funcionais, poderiam estar presentes em um gene de grande efeito no autismo ou nas condições relacionadas (rastreamento de mutações). Ultimamente, os pesquisadores têm combinado ambas análises, especialmente ao estudarem os genes candidatos implicados pela sua localização dentro de um intervalo de ligação genética, uma região de interrupção devido a uma ou mais anormalidades cromossômicas, ou implicados em uma síndrome relacionada como o transtorno de Rett.

Mais de 100 genes foram avaliados quanto à associação com TEA, com múltiplos resultados positivos; no entanto, a replicação têm sido a exceção e não a regra. À medida que o uso das estratégias de associação, que são essencialmente a versão do geneticista de um estudo de caso-controle, tem crescido em popularidade, a propensão de resultados falso-positivos, ou pelo menos de achados não replicáveis, tem sido amplamente observada.<sup>37</sup> As razões para essa observação são motivo de debate e estão além do escopo desta discussão. No entanto, à luz das dificuldades generalizadas não somente em relação ao autismo, mas no caso de múltiplos transtornos clínicos, é claro que a replicação verdadeira em uma amostra independente, implicando o mesmo alelo no mesmo *locus*, é o padrão segundo o qual os estudos de variações comuns têm que ser realizados.

Com relação ao autismo, o *SLC6A4* é um gene candidato com um histórico longo e venerável. Como se observou, a transcrição codifica o transportador de serotonina, que medeia a recaptação de serotonina da sinapse. O interesse nesse gene e em seus produtos protéicos deriva de um papel plausível da serotonina nos comportamentos repetitivos observados em pacientes, bem como no achado altamente confiável de um maior nível de serotonina plaquetária em um substancial subconjunto de indivíduos autistas.

Dois polimorfismos de número variável de repetições em série (VNTR), um no promotor (alelos HTTLPR-s curto e HTTLPR-l longo) e outro no segundo intron, são conhecidos por alterar a expressão do transportador e presumivelmente o nível de serotonina na sinapse, e têm sido o tema de múltiplos estudos.<sup>38</sup> Os resultados têm sido contraditórios. Alguns grupos têm relatado excessiva transmissão do alelo curto, ao passo que outros relataram excessiva transmissão do alelo longo ou uma maior associação aos polimorfismos de um único par

de bases (SNPs) na região. Outros, ainda, não encontraram nenhuma associação significativa de *SLC6A4* com o TEA.

No entanto, é interessante que essa transcrição não diminuiu, parcialmente porque o gene evoluiu recentemente de um candidato biológico plausível a um gene implicado por múltiplos esforços de clonagem posicional. Como se observou, a evidência a favor de um gene do autismo no cromossomo 17q tem sido bastante forte, especialmente com relação a um alelo de risco específico por sexo. Em uma análise de ligação genética envolvendo 341 famílias, um escore LOD de 5,8 foi calculado em 17q11.2 com um modelo recessivo de transmissão. Esse escore aumentou para 8,0 nas 202 famílias que somente tinham pacientes masculinos e diminuiu para 0,06 nas 138 famílias que continham pacientes femininos.<sup>39</sup> Somente evidência nominal de associação foi encontrada quando dois SNPs foram avaliados e os pesquisadores concluíram que eles não poderiam ser responsáveis pelo pico de ligação genética observado. Como resultado, escolheram rastrear a mutação no promotor e nos exons codificadores nas 120 famílias com os mais altos escores LODs específicos de famílias. Quatro variações de seqüências que modificaram aminoácidos altamente conservados foram identificadas. Em cada caso, os dados de segregação foram inconclusivos, mas, em geral, deram apoio a uma relação entre o alelo e o status afetado. Além disso, análises subseqüentes sugeriram que as variações de código foram associadas à maior gravidade de comportamentos rígidos e compulsivos. Esses dados sugerem que múltiplas variantes raras de *SLC6A4* podem contribuir para o TEA.<sup>39</sup> No entanto, o estudo intensivo desse intervalo em busca de uma variante comum que poderia ser responsável pelos sinais de ligação genética replicados continua.

Outros sistemas neurotransmissores têm sido investigados no autismo. Estudos sobre os genes de receptores GABA-A em 15q11-13 foram brevemente descritos acima; não foi encontrada associação consistente com variações seqüenciais. O mesmo é verdade para os genes que codificam os receptores D2, D3 e D5; tirosina hidroxilase; e dopamina beta hidroxilase (revisados em <sup>40</sup>). Os genes do receptor de glutamato, *GRIK2* em 6q21<sup>41</sup> e *GRM8* em 7q31-33,<sup>42</sup> têm sido associados ao autismo em estudos únicos e necessitam de mais pesquisas. O *SLC25A12*, que codifica o transportador de aspartato/glutamato mitocondrial, recebeu atenção pois está localizado em 2q31.1, um *locus* para o qual foram calculados altos escores LOD por dois estudos de ligação genética genômica (*genome-wide*). A associação entre dois SNPs no gene e TEA foi relatada em dois estudos independentes.<sup>43-44</sup>

Há uma longa lista de genes, muitos no cromossomo 7, que eram considerados como candidatos posicionais e/ou funcionais promissores, mas não foram associados de forma conclusiva ao TEA até agora. Alguns que merecem menção incluem: *HOXA1* em 7p15.2 e *HOXB1* em 17q21.32 (*homeobox*), que regulam o desenvolvimento do metencéfalo; *DLX6* (*distal-less homeobox*) em 7q21.3, que regula o desenvolvimento do cérebro anterior; *RELN* (*reelin*) em 7q22.1, que está envolvido na migração neuronal; o *FOXP2* (*forkhead box P2*) em 7q31.1, que está envolvido no transtorno de fala e linguagem; o *NRCAM* em 7q31.1, uma molécula de adesão celular neuronal; o *WNT2* (sítio de integração 2 do MMTV *wingless-type*) em 7q31.2 está envolvido no desenvolvimento do SNC e interage com o DVL1, de que os ratos *knockout* possuem menor interação social; o *AVPR1A* (receptor 1A de arginina vasopressina) em 12q14.2, que influencia o comportamento de afiliação em ratos transgênicos; e a ADA

(adenosina deaminase) em 20q13.12, que está envolvida na edição do mRNA.

Finalmente, e mais recentemente, os resultados mais animadores foram relatados em relação ao *EN2 engrailed* em 7q36.3.<sup>45-46</sup> O *EN2* é um gene *homeobox* que regula o desenvolvimento do cerebelo. Ele atraiu a atenção pelo fato de que as anormalidades do cerebelo encontram-se entre os achados mais consistentes dos estudos patológicos e de neuroimagem em TEA. Os ratos que expressam o *EN2* mutante ou falta de proteínas exibem uma patologia cerebelar similar aos achados pós-morte em algumas amostras de TEA. Seu locus cromossômico também tem sido um foco de atenção com base nos estudos de ligação genética (revisados em <sup>47</sup>). Portanto, o *EN2* é tanto um gene candidato funcional quanto posicional.

Inicialmente, quatro SNPs foram analisados, dois no intron único do *EN2* e um em cada um dos exons dos flancos. Foi encontrada uma significativa associação entre dois SNPs intrônicos e TEA em 167 famílias AGRE.<sup>45</sup> Um estudo subsequente analisou os quatro SNPs e um adicional, 14, abrangendo o gene por inteiro. Foi também detectada uma significativa associação com dois SNPs intrônicos em 222 famílias diferentes AGRE e em 129 famílias NIMH.<sup>46</sup> Portanto, a associação foi replicada em estudos populacionais múltiplos independentes. O conjunto total de 518 famílias (2,336 indivíduos) é um dos maiores estudos de associação realizados em TEA. O valor p do haplótipo (alelo) que contém os dois SNPs do conjunto total foi de 0,00000035, fornecendo forte evidência de que o *EN2* é um gene da suscetibilidade para o TEA. Além disso, dada a alta frequência do haplótipo na amostra (aproximadamente 67%), o risco atribuível da população foi calculado em 40%, i.e. as variações de seqüências em *EN2* podem influenciar até 40% dos casos de TEA.

Previu-se que os dois SNPs intrônicos recaiam nos sites de vinculação consensuais dos fatores de transcrição. No entanto, são os alelos não-associados que abolem a ligação aos fatores.<sup>46</sup> Portanto, o alelo de risco preciso ainda deve ser determinado, mas esse importante estudo deve atrair mais interesse e energia na investigação do *EN2*.

#### Direções futuras

Seja ao descrever as análises de ligação genética, os estudos citogenéticos ou as estratégias de associação, a discussão precedente destaca tanto os obstáculos com que se deparam os pesquisadores da genética do autismo quanto o tremendo avanço do último período. Levou um certo tempo, mas a área está para cumprir com a promessa de identificar os múltiplos genes do autismo. Além dos tipos de abordagens metodológicas já observados acima, tais como a tentativa amplamente disseminada de identificar endofenótipos úteis, vários outros desenvolvimentos recentes têm dado uma notável contribuição aos avanços recentes e continuarão a estimular o progresso nessa área.

*A disponibilidade de biomateriais:* talvez o avanço isolado mais importante na última década foi o que teve o menor impulso tecnológico; é a disponibilidade do DNA e de linhas celulares de pacientes bem caracterizados. Basta olhar para o número de artigos que agradecem ao *Autism Genetic Resource Exchange* para ter uma idéia do impacto que têm na área a ampla disseminação de dados fenotípicos e amostras biológicas de alta qualidade. Esse esforço por parte da fundação privada *Cure Autism Now* para criar um banco de DNA e de fenótipos livremente disponível, inclusive por Internet, uniu-se ao *National Institute of Mental Health*, nos EUA, com o

resultado de que talentosos pesquisadores de fora da área são capazes agora de testar facilmente novas hipóteses em conjuntos amostrais aos quais não teriam possibilidade de acessar no passado. Por outro lado, grupos com longa dedicação à genética do autismo têm podido aumentar os números de indivíduos incluídos em seus estudos ou utilizar essas amostras públicas para conjuntos de replicações antes, ambos os problemas críticos no esforço de encontrar os genes que contribuem para aumentos relativamente pequenos de risco. Similarmente, os pesquisadores foram agrupados para formar consórcios nacionais e internacionais que estão aumentando a ordem de magnitude do tamanho das amostras. Aliado ao forte comprometimento com o financiamento da pesquisa nos EUA por parte de organizações como a *National Association for Autism Research* (NAAR) e a *Autism Speaks*, que se soma ao do governo federal, o atual otimismo é bem justificado.

*O avanço das tecnologias genômica:* um segundo contribuinte para a aceleração na pesquisa genética de alta qualidade foi o desenvolvimento de tecnologias de alto rendimento e baixo custo, especialmente na área de genotipagem. O esteio, tanto dos estudos de ligação genética como dos de associação, é a avaliação de marcadores polimórficos de DNA, conhecida como genotipagem. Progressos recentes em tecnologias de micro-arranjo (em que muitos milhares de pontos de DNA podem ser dispostos em um único slide microscópico) permitem, atualmente, que os pesquisadores investiguem centenas de milhares de SNPs em uma simples reação de hibridização e com custo comparativamente baixo. Essa capacidade permite que pequenos laboratórios realizem análises de ligação genética genômicas de forma rápida e abriu as portas para um novo tipo de análise, conhecida como associação genômica global.

Como observado acima, o estudo de associação caso-controle comum envolveu a especificação de uma hipótese sobre um gene ou um conjunto de genes que se acredita exercerem um papel no autismo, que são então testados para determinar se um polimorfismo do DNA no ou próximo do(s) gene(s), é mais comum em indivíduos afetados em comparação aos não-afetados. Por razões que estão além do escopo desta revisão, para obterem êxito, tais estudos precisam escolher um marcador, que é bem próximo a qualquer alteração genética que esteja levando à doença ou a um aumento do risco. Com o recente desenvolvimento de plataformas de genotipagem com base em micro-arranjos que contêm 300-500.000 marcadores, há cobertura mais do que suficiente do genoma para buscar uma associação sem ter que escolher *a priori* um único gene ou conjunto de genes. A potência desse tipo de abordagem foi recentemente demonstrada em vários estudos que relataram a identificação de um gene da degeneração macular relacionado à idade.<sup>48</sup> Há uma grande animação na área sobre alavancar esses métodos para realizar clonagem posicional no autismo e em transtornos relacionados.

*Avanços em tecnologias citogenéticas:* de forma similar, a tecnologia de micro-arranjo está transformando a identificação de deleções ou duplicações cromossômicas, um método hoje conhecido como análise do número de cópias. Há várias novas técnicas disponíveis para realizar isso; uma que é amplamente utilizada é conhecida como hibridização genômica comparativa, baseada em matrizes ou aCGH. Esse método utiliza o DNA de pacientes e o DNA de controles rotulados com diferentes cores, por meio de uma etiqueta fluorescente. Quantidades iguais de materiais de pacientes e de controles são hibridizados nas regiões conhecidas do genoma humano

que estão pré-arranjadas em um slide. Se o paciente e o controle tiverem números de cópias iguais em um *locus* dado, as cores se misturam de forma homogênea. Se o paciente perdeu (deletou) um *locus*, somente a cor do controle é visualizada. Ao contrário, se o paciente possui cópias extras em um *locus* (duplicação), a cor do paciente predomina.

Com os micro-arranjos hoje disponíveis, esse tipo de análise pode identificar alterações no número de cópias menores do que 50.000 pares de bases, o que é aproximadamente 100 vezes mais sensível do que a citogenética de alta resolução padrão - e a resolução ainda está aumentando a um ritmo rápido. A técnica já foi utilizada para identificar muito mais deleções e duplicações no genoma humano do que se imaginava anteriormente.<sup>49</sup> No entanto, à medida que essas tecnologias foram desenvolvidas, tornou-se mais claro que há uma variação estrutural muito maior no genoma humano normal do que se suspeitava. Conseqüentemente, não é possível extrair uma conclusão simples de que, por exemplo, uma pequena região perdida de um cromossomo em um paciente com autismo está relacionada ao aparecimento de sintomas, mesmo que o intervalo contenha um gene candidato interessante. De fato, houve muitas instâncias de perdas de número de cópias em importantes genes com expressão cerebral que foram encontradas em indivíduos aparentemente normais.

Apesar de se ter que enfrentar essas complexidades inesperadas, a capacidade de identificar alterações cromossômicas microscópicas contém um elemento tremendamente promissor. É provável que em certas instâncias, deleções ou duplicações anteriormente ocultas apontem para um gene com grande efeito no autismo que seja relevante somente para um pequeno número de pacientes, como foi o caso do *NLGN*. Parece também crescentemente provável que as variações no número de cópias podem contribuir para o risco da doença de uma forma mais complexa, analogamente aos outros tipos de variação genômica, tais como os SNPs, que às vezes alteram sutilmente a função protéica. Será desafiador e animador explorar essas possibilidades.

### Conclusões

Após várias décadas de progressos hesitantes, toda a área da genética do autismo está se movimentando a um ritmo notável. Nos últimos anos, foi identificada uma mutação genética específica no *NLGN4* como sendo responsável por casos de retardo mental e/ou comprometimentos gerais de desenvolvimento; o *EN2* surgiu como um forte candidato para a associação com o fenótipo do autismo e uma região de ligação genética no cromossomo 17q foi confirmada em amostras independentes utilizando critérios estatísticos rigorosos. Esse é somente um punhado de recentes e animadoras descobertas na área, que oferecem a perspectiva de amplos caminhos para um avanço real. Obviamente, a identificação de alelos de risco ou mutações de causas raras é somente um importante passo para desvendar a biologia dos TEAs e é um esforço que irá requerer as contribuições combinadas de uma variedade de áreas, incluindo geneticistas, pesquisadores clínicos, neurobiólogos do desenvolvimento e profissionais de neuroimagem. Ainda que o objetivo final de alavancar uma compreensão da fisiopatologia para desenvolver novos tratamentos e para revelar estratégias de prevenção ainda esteja no horizonte, sabemos claramente hoje que começamos a dar os primeiros passos nessa direção.

### Referências

- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med*. 1995;25(1):63-78.
- Fombonne E. Epidemiological studies of pervasive developmental disorders. In: Volkmar FR, Paul R, Klin A, Cohen D, editors. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc; 2005. Volume 1, Section 1, Chapter 2, p. 42-69.
- Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L, MacLean JE. Genetics of autism: overview and new directions. *J Autism Dev Disord*. 1998;28(5):351-68.
- Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, Kalaydjieva L, McCague P, Dimiceli S, Pitts T, Nguyen L, Yang J, Harper C, Thorpe D, Vermeer S, Young H, Hebert J, Lin A, Ferguson J, Chiotti C, Wiese-Slater S, Rogers T, Salmon B, Nicholas P, Petersen PB, Pingree C, McMahon W, Wong DL, Cavalli-Sforza LL, Kraemer HC, Myers RM. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet*. 1999;65(2):493-507.
- Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*. 1995;11(3):241-7.
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). A genomewide screen for autism: strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q, and 16p. *Am J Hum Genet*. 2001;69(3):570-81.
- 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*. 2001;68(6):1514-20. Erratum in: *Am Hum Genet*. 2001;69(2):470.
- Shao Y, Raiford KL, Wolpert CM, Cope HA, Ravan SA, Ashley-Koch AA, Abramson RK, Wright HH, DeLong RG, Gilbert JR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. Phenotypic homogeneity provides increased support for linkage on chromosome 2 in autistic disorder. *Am J Hum Genet*. 2002;70(4):1058-61.
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. *Hum Mol Genet*. 1998;7(3):571-8.
- Wassink TH, Brzutowicz LM, Bartlett CW, Szatmari P. The search for autism disease genes. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2004;10(4):272-83.
- Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PKE, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J, Cantor RM, Geschwind DH, Gilliam TC. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet*. 2003;73(4):886-97.
- Rutter M. Genetic influences and autism. In: Volkmar FR, Paul R, Klin A, Cohen D, editors. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc; 2005. Volume 1, Section 3, Chapter 16, p. 425-52.
- Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Kadem F, Monaco AP. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*. 2001;413(6855):519-23.
- Shao Y, Cuccaro ML, Hauser ER, Raiford KL, Menold MM, Wolpert CM, Ravan SA, Elston L, Decena K, Donnelly SL, Abramson RK, Wright HH, DeLong GR, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. Fine mapping of autistic disorder to chromosome 15q11-q13 by use of phenotypic subtypes. *Am J Hum Genet*. 2003;72(3):539-48.
- McCauley JL, Li C, Jiang L, Olson LM, Crockett G, Gainer K, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS. Genome-wide and ordered-subset linkage analyses provide support for autism loci on 17q and 19p with evidence of phenotypic and interlocus genetic correlates. *BMC Med Genet*. 2005;6:1.
- 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*. 2004;75(6):1117-23.
- Cantor RM, Kono N, Duvall JA, Alvarez-Retuerto A, Stone JL, Alarcon M, Nelson SF, Geschwind DH. Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21. *Am J Hum Genet*. 2005;76(6):1050-6.
- Leventhal BL, Cook EH Jr, Morford M, Ravitz A, Freedman DX. Relationships of whole blood serotonin and plasma norepinephrine within families. *J Autism Dev Disord*. 1990;20(4):499-511.



19. Weiss LA, Veenstra-VanderWeele J, Newman DL, Kim SJ, Dytch H, McPeck MS, Cheng S, Ober C, Cook EH Jr, Abney M. Genome-wide association study identifies ITGB3 as a QTL for whole blood serotonin. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(11):949-54.
20. Bartlett CW, Goedken R, Vieland VJ. Effects of updating linkage evidence across subsets of data: reanalysis of the autism genetic resource exchange data set. *Am J Hum Genet.* 2005;76(4):688-95.
21. Veenstra-VanderWeele J, Christian SI, Cook EH Jr. Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:379-405.
22. Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2003;117(1):15-24.
23. Wolff DJ, Clifton K, Karr C, Charles J. Pilot assessment of the subtelomeric regions of children with autism: detection of a 2q deletion. *Genet Med.* 2002;4(1):10-4.
24. Keller K, Williams C, Wharton P, Paulk M, Bent-Williams A, Gray B, Ward A, Stalker H, Wallace M, Carter R, Zori R. Routine cytogenetic and FISH studies for 17p11/15q11 duplications and subtelomeric rearrangement studies in children with autism spectrum disorders. *Am J Med Genet Part A.* 2003;117(2):105-11.
25. Battaglia A, Bonaglia MC. The yield of subtelomeric FISH analysis in the evaluation of autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2006;142(1):8-12.
26. Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman Syndrome. *Nat Genet.* 1997;15(1):70-3. Erratum in: *Nat Genet.* 1997;15(4):411.
27. Thomas NS, Sharp AJ, Browne CE, Skuse D, Hardie C, Dennis NR. Xp deletions associated with autism in three females. *Hum Genet.* 1999;104(1):43-8.
28. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet.* 2003;34(1):27-9.
29. Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lomonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelémy C, Moraine C, Briault S. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet.* 2004;74(3):552-7.
30. Gauthier J, Bonnel A, St-Onge J, Karemera L, Laurent S, Mottron L, Frombonne E, Joobor R, Rouleau GA. NLGN3/NLGN4 gene mutations are not responsible for autism in the Quebec population. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatric Genet.* 2005;132(1):74-5.
31. Vincent JB, Kolozsvari D, Roberts WS, Bolton PE, Gurling HM, Scherer SW. Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: no mutations in 196 autism probands. *Am J Med Genet part B Neuropsychiatric Genet.* 2004;129(1):82-4.
32. Yan J, Oliveira G, Coutinho A, Yang C, Feng J, Katz C, Sram J, Bockholt A, Jones IR, Craddock N, Cook EH Jr, Vicente A, Sommer SS. Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Mol Psychiatry.* 2005;10(4):329-32.
33. Cook EH Jr, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):928-34.
34. Vincent JB, Herbrick JA, Gurling HM, Bolton PF, Roberts W, Scherer SW. Identification of a novel gene on chromosome 7q31 that is interrupted by a translocation breakpoint in an autistic individual. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):510-4.
35. Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, Cortes F, de la Barra F, Yu D, Haider ST, Trask BJ, Green ED, Raskind WH, Distèche CM, Wijsman E, Dawson G, Storm DR, Schellenberg GD, Villacres EC. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics.* 2002;80(2):129-34.
36. Niklasson L, Rasmussen P, Oskarsdottir S, Gillberg C. Neuropsychiatric disorders in the 22q11 deletion syndrome. *Genet Med.* 2001;3(1):79-84.
37. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med.* 2002;4(2):45-61.
38. Bacchelli E, Maestrini E. Autism spectrum disorders: molecular genetic advances. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2006;142(1):13-23.
39. 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.* 2005;77(2):265-79.
40. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics.* 2004;113(5):e472-86.
41. Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry.* 2002;7(3):302-10.
42. Serajee FJ, Zhong H, Nabi R, Huq AH. The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism. *J Med Genet.* 2003;40(4):e42.
43. Ramoz N, Reichert JG, Smith CJ, Silverman JM, Beshalova IN, Davis KL, Buxbaum JD. Linkage and association of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene with autism. *Am J Psychiatry.* 2004;161(4):662-9.
44. Segurado R, Conroy J, Meally E, Fitzgerald M, Gill M, Gallagher L. Confirmation of association between autism and the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene on chromosome 2q31. *Am J Psychiatry.* 2005;162(11):2182-4.
45. Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH. Association of the homeobox transcription factor, engrailed 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry.* 2004;9(5):474-84.
46. Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, Diccico-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the homeobox transcription factor gene engrailed 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet.* 2005;77(5):851-68.
47. Bartlett CW, Gharani N, Millonig JH, Brzustowicz LM. Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int J Devl Neuroscience.* 2005;23(2-3):221-34.
48. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308(5720):385-9.
49. Eichler EE. Widening the spectrum of human genetic variation. *Nat Genet.* 2006;38(1):9-11.
50. Auranen M, Vanhala R, Varilo T, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Sinsheimer JS, Peltonen L, Jarvela I. A genome-wide screen for autism-spectrum disorders; evidence for a major susceptibility locus on chromosome 3q25-27. *Am J Hum Genet.* 2002;71(4):777-90.
51. Ylisaukko-oja T, Nieminen-von Wendt T, Kempas E, Sarenius S, Varilo T, von Wendt L, Peltonen L, Jarvela I. Genome-wide scan for loci of Asperger syndrome. *Mol Psychiatry.* 2004;9(2):161-8.
52. 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.* 2004;9(2):144-50.
53. Alarcon M, Yonan AL, Gilliam TC, Cantor RM, Geschwind DH. Quantitative genome scan and Ordered-Subsets Analysis of autism endophenotypes support language QTLs. *Mol Psychiatry.* 2005;10(8):747-57.
54. Liu J, Nyholt DR, Magnussen P, Parano E, Pavone P, Geschwind D, Lord C, Iversen P, Hoh J, the Autism Genetic Resource Exchange Consortium, Ott J, Gilliam TC. A genome-wide screen for autism susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 2001;69(2):327-40.
55. Philippe A, Martinez M, Guillaud-Bataille M, Gillberg C, Rastam M, Sponheim E, Coleman M, Zappella M, Aschauer H, Van Maldergem L, Penet C, Feingold J, Brice A, Leboyer M. Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study. *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):805-12.
56. Barrett S, Beck JC, Bernier R, Bisson E, Braun TA, Casavant TL, Childress D, Folstein SE, Garcia M, Gardiner MB, Gilman S, Haines JL, Hopkins K, Landa R, Meyer NH, Mullane JA, Nishimura DY, Palmer P, Piven J, Purdy J, Santangelo SL, Searby C, Sheffield V, Singleton J, Slager S. An autosomal genomic screen for autism.

- Collaborative linkage study of autism. *Am J Med Genet.* 1999;88(6):609-15. Erratum in: *Am J Med Genet.* 2001;105(8):805. Corrected and republished in: *Am J Med Genet.* 2001;105(8):609-15.
57. Bradford Y, Haines J, Hutcheson H, Gardiner M, Braun T, Sheffield V, Cassavant T, Huang W, Wang K, Vieland V, Folstein S, Santangelo S, Piven J. Incorporating language phenotypes strengthens evidence of linkage to autism. *Am J Med Genet.* 2001;105:539-47.
  58. Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, Zaeem L, Basu S, Donnelly SL, Ravan SA, Powell CM, Qumsiyeh MB, Aylsworth AS, Vance JM, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, DeLong GR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics.* 1999;61:227-36.
  59. Alarcon M, Cantor RM, Liu J, Gilliam TC, Geschwind DH. Evidence for a language quantitative trait locus on chromosome 7q in multiplex autism families. *Am J Hum Genet.* 2002;70(1):60-71.
  60. Molloy CA, Keddache M, Martin LJ. Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression. *Mol Psychiatry.* 2005;10(8):741-6.
  61. Shao Y, Wolpert CM, Raiford KL, Menold MM, Donnelly SL, Ravan SA. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder. *Am J Med Genet.* 2002;114(1):99-105.
  62. Vincent JB, Melmer G, Bolton PF, Hodgkinson S, Holmes D, Curtis D, Gurling HMD. Genetic linkage analysis of the X chromosome in autism, with emphasis on the fragile X region. *Psychiatr Genet.* 2005;15:83-90.