

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Dissertação | Revisão Bibliográfica

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

**PERTURBAÇÕES DO ESPETRO DO AUTISMO:
FATORES DE RISCO E PROTETORES**

Mafalda Saraiva Santos

Orientador

Prof. Doutora Teresa Temudo

Porto, 2015

Título

Perturbações do Espetro do Autismo: Fatores de Risco e Protetores

Estudante

Nome Completo: Mafalda Alexandra Saraiva Santos

Estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina

Nº de aluno: 200905840

Correio eletrónico: mafalda.as.santos@gmail.com

Orientador

Nome Completo: Teresa Maria Pereira Padrão Temudo

Grau académico: Professor Auxiliar Convidado de Pediatria do MIM do ICBAS/HGSA-CHP

Título profissional: Assistente Graduada de Neuropediatria e Pediatria do HGSA-CHP

Afiliação

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar- Universidade do Porto

Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228, 4050-313 Porto, Portugal

AGRADECIMENTOS

- À Prof. Doutora Teresa Temudo pela orientação desta dissertação e por toda a ajuda que me proporcionou, tornando possível a conclusão e entrega da mesma.
- À minha família que mesmo longe sempre esteve presente, e que com mais ou menos dificuldade sempre me apoiou incondicionalmente.
- Ao Francisco que com a sua esperança e carinho tornou possível a conclusão deste trabalho, mesmo quando tudo parecia perdido.
- Aos colegas e amigos que fiz em Biomédicas e no Orfeão Universitário do Porto, que me apoiaram ao longo destes 6 anos, e que me deram força para a elaboração desta dissertação.
- Por fim, a Biomédicas, por me ter proporcionado momentos de aprendizagem, de partilha e de camaradagem. Aqui, fazendo jus ao lema da casa, foi-me ensinada a Medicina, a responsabilidade e o trabalho, mas também a alegria de viver em sociedade.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-HTT – Transportador da serotonina

ASD – Autism Spectrum Disorder

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

EN2 – Gene codificador da proteína *homeobox protein engrailed-2*

IGF – Insulin Growth Factor

LPS – Lipopolissacarídeo

NRXN-1 – gene codificador da proteína neuroxina-1

OR – Odds Ratio

OXTR – Recetor da citocina

PEA – Perturbação do Espectro do Autismo

QI – Quociente de inteligência

RELN – Gene codificador da proteína relina

RR – Risco relativo

SSRI – Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

UTR – Untranslated Region

VASPR – Vacina combinada contra o sarampo, a parotidite epidémica e a rubéola

RESUMO

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é um grupo de distúrbios complexos do neurodesenvolvimento que continua a representar uma incógnita para a sociedade atual. As crianças que vivem com esta patologia têm comprometimento da interação social, da comunicação verbal e não-verbal, apresentando comportamentos e interesses restritos e repetitivos, o que afeta não só as vidas dos próprios doentes mas também as dos seus cuidadores.

Nos últimos quarenta anos a prevalência da Perturbação do Espectro do Autismo tem vindo a aumentar consideravelmente, estimando-se atualmente que uma em cada sessenta e oito crianças manifeste algum tipo de PEA. Por apresentar um impacto tão grande na sociedade atual, a Perturbação do Espectro do Autismo sempre foi alvo de vários estudos, não só com o objetivo de descobrir tratamentos eficazes, mas também com o intuito de melhor perceber esta patologia e os fatores que a ela poderão estar ou não associados, podendo futuramente caminhar para a diminuição da sua prevalência.

Esta dissertação tem como objetivo sistematizar o conhecimento atual sobre possíveis fatores de risco e fatores protetores associados à Perturbação do Espectro do Autismo. Para isso foram analisados e comparados os vários estudos da literatura atual que incidem sobre este tema.

PALAVRAS-CHAVE

Perturbação do Espectro do Autismo; fatores de risco; fatores protetores; epidemiologia; genética; ambiente

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) represents a group of complex neurodevelopment disorders that are still a big "gap" in the grasp of modern society.

Children who live with this disease have important social deficits, difficulties transmitting verbal and non-verbal communication and manifest restricted and repetitive patterns of behavior and interests. This affects not only the children themselves but also the lives of their families and carers.

Over the last forty years the prevalence of ASD has been rising considerably, reaching an estimate of one in every sixty eight children suffering from ASD. This being so, and it representing such a great concern in modern society, Autism Spectrum Disorder has always been the subject of many studies, not only aiming for the discovery of a successful treatment but also with the goal of better understanding the disease and the factors that can or cannot be associated to it and which could lead to a significant break in its prevalence.

This dissertation aims to systematize the current knowledge about possible risk and protective factors associated with Autism Spectrum Disorder. To accomplish this goal, we've analyzed and compared the various studies that were developed about this subject and that are available in the current literature.

KEY WORDS

Autism Spectrum Disorder; risk factors; protective factors; epidemiology; genetics; environment

ÍNDICE

Introdução.....	1
A Perturbação do Espectro do Autismo.....	1
Epidemiologia.....	2
Diagnóstico e Tratamento.....	2
Viver com Perturbação do Espectro do Autismo.....	4
Objetivo	6
Material e metodologia.....	6
Resultados.....	7
Fatores de risco.....	7
Fatores genéticos	7
Epigenética.....	9
Fatores Pré-natais	9
Fatores Peri-natais	14
Fatores Pós-natais.....	16
Fatores protetores	17
Suplementação materna.....	17
Amamentação materna	18
Discussão	19
Conclusão.....	24
Bibliografia.....	25
Anexos	34

A PERTURBAÇÃO DO ESPETRO DO AUTISMO

Os distúrbios do neurodesenvolvimento desde sempre têm desafiado a medicina e as ciências da vida. Até ao ano de 2013, patologias como o Autismo e a Síndrome de Asperger eram abordadas pela comunidade científica como entidades heterogêneas, com características distintas, anexadas no grupo dos Transtornos Globais do Neurodesenvolvimento (1). Contudo, após a revisão dos seus critérios de diagnóstico, a Associação Psiquiátrica Americana englobou estas e outras patologias num grande grupo de distúrbios do neurodesenvolvimento, tidos como uma patologia única, o qual entitulou de "Perturbação do Espectro do Autismo" (PEA) (2). Deste grupo fazem parte quatro distúrbios essenciais (2):

1. Perturbação autista
2. Perturbação de Asperger
3. Perturbação desintegrativa da infância
4. Perturbação invasiva do desenvolvimento sem outra especificação

Esta nova classificação, publicada na quinta edição do livro *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, reflete as dificuldades no diagnóstico diferencial dos vários Transtornos Globais do Neurodesenvolvimento, assim como as constantes novidades que surgem na literatura atual, mostrando que há ainda muito por descobrir e por perceber no que a estes diz respeito. Com esta classificação, a Associação Psiquiátrica Americana assume que os quatro distúrbios que compõem a Perturbação do Espectro do Autismo são de facto a mesma entidade, correspondendo-lhe um *continuum* de sintomas e comportamentos atípicos que vão desde ligeiros a severos e que distinguem o tipo de patologia base do doente (2).

A Perturbação do Espectro do Autismo é portanto um grupo de distúrbios do neurodesenvolvimento, de base biológica, e que se caracteriza por um espectro da seguinte clínica: atipias e défices do comportamento social com resposta inapropriada a situações de interação (p.ex toque intrusivo e incapacidade de estabelecer contacto visual); dificuldades de comunicação verbal e não-verbal, sendo recorrente a ausência de uma linguagem perceptível e a preferência por monólogos; défices na criação de laços de amizade com os seus pares; manifestação de comportamentos repetitivos e atipias; recorrência do "jogo" individual e incapacidade de brincar ao "faz de conta" (2).

EPIDEMIOLOGIA

A prevalência da Perturbação do Espectro do Autismo tem vindo a aumentar consideravelmente desde o final do século XX. Estudos elaborados na década de 70 registam prevalências de cerca de 0.05% enquanto na década de 90, esta mesma prevalência quadriplica, atingia valores na ordem dos 0.2% (3). Esta tendência exponencial de aumento dos valores manteve-se até à atualidade sendo que, entre os 36 estudos conhecidos sobre este tema, há atualmente registos de prevalências que variam entre os 0.2% e os 2% em algumas localizações geográficas (4-7).

Analisando o último Relatório Comunitário sobre o Autismo, publicado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2014, conclui-se que entre as crianças de 8 anos, a prevalência destes distúrbios atinge valores que traduzem patologia em 1 em cada 68 crianças, correspondendo a uma percentagem de 1.5% (7). Entre estes valores podemos distinguir ainda uma maior afeção do sexo masculino, que apresenta um risco cinco vezes maior de manifestar Perturbação do Espectro do Autismo (7).

Em Portugal, um estudo conduzido por *Oliveira G et al* em 343.718 crianças, descreve uma prevalência de PEA de 1% em Portugal Continental e de 1,56% no arquipélago dos Açores (onde foram descritos vários casos de distúrbios da cadeia respiratória mitocroncrial), mostrando que também o nosso país é bastante afetado por esta patologia (8).

Apesar de os valores apresentados mundialmente serem já bastante elevados é exetável que num futuro próximo estes valores sofram alterações bastante significativas uma vez que, como anteriormente indicado, a classificação destes distúrbios foi recentemente alterada (2).

DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Na última edição do seu livro *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, a Associação Psiquiátrica Americana estabelece novos critérios que deverão ser respeitados no diagnóstico de uma Perturbação do Espectro do Autismo (2). Para poder afirmar que um doente apresenta este distúrbio é necessário que cumpra os seguintes critérios (para os critérios pormenorizados consultar a Tabela 1, em anexo):

A. Apresentar défices persistentes na comunicação e interação sociais, em vários contextos.

B. Apresentar padrões de comportamento, interesses e atividades repetitivas.

C. Apresentar sintomatologia num estadio precoce do desenvolvimento.

D. A sintomatologia apresentada causa importantes dificuldades sociais, ocupacionais e de outras áreas do funcionamento.

E. O distúrbio apresentado não pode ser explicado por uma défice cognitivo ou por um atraso global do desenvolvimento.

Estes critérios são ainda alvo de avaliação quanto à sua gravidade, sendo distinguidos três níveis de afeção: Nível 1 - Necessidade de suporte, Nível 2 - Necessidade substancial de suporte e Nível 3 - Necessidade muito substancial de suporte (ver tabela 2 em anexo). Esta distinção é feita pela Associação Psiquiátrica Americana através da análise das dificuldades de comunicação social manifestadas pelo doente e pela presença de padrões de comportamento restritos e repetitivos. (2)

Assim, todos os clínicos deverão estar instruídos sobre os novos critérios de diagnóstico e realizar o *screening* inicial das crianças em idade de desenvolvimento, questionando os pais e cuidadores sobre a existência de sintomatologia que possa sugerir uma Perturbação do Espetro do Autismo. Posteriormente, e em caso de dúvida, segundo as *guidelines* da Academia Americana de Psiquiatria da Criança e do Adolescente, atualizadas em 2014, deverá recorrer a instrumentos de avaliação e de diagnóstico diferencial, tais como *checklists* e questionários, que ajudarão no estabelecimento do diagnóstico (tabela 3 em anexo) (9). Entre estes instrumentos, o mais importante será a realização de entrevistas psiquiátricas com o doente e com a família, proceder à avaliação cognitiva do doente e realizar uma história clínica pormenorizada, com especial foco nos seus marcos do neurodesenvolvimento.

Para além destes procedimentos, e em casos muito sugestivos de PEA com outra sintomatologia associada, será também necessária a realização de alguns exames complementares de diagnóstico de forma a excluir patologias e fatores que poderão representar uma causa orgânica direta dos sintomas apresentados. Meningites, encefalites, hipotireoidismo, homocistinúria, traumatismos crânio-encefálicos, síndrome alcoólica fetal e anomalias cromossómicas estão entre as patologias mais importantes a excluir (9).

No que concerne ao tratamento da Perturbação do Espetro do Autismo, segundo as atuais *guidelines* da Academia Americana de Psiquiatria da Criança e do Adolescente, devem ser seguidos quatro passos essenciais:

1- Ajudar as famílias a obter educação baseada na evidência e realizar intervenções comportamentais como a Análise Aplicada do Comportamento / Intervenção Comportamental Precoce Intensiva (10), eficazes em crianças de idades mais baixas (11)

2- Questionar a família quanto ao uso de tratamentos complementares alternativos e realizar a sua implementação se assim desejado. A terapia cognitiva comportamental é uma das terapêuticas que se mostrou eficaz no controlo da ansiedade e da depressão (12).

3- Após o esgotamento de todas as alternativas, deverá ser oferecida ao doente medicação específica, para controlar as alterações comportamentais manifestadas e que ajudará também o doente na resposta às intervenções comportamentais implementadas (13).

4- Finalmente, é da competência do médico assistente o acompanhamento do doente a longo prazo, realizando a monitorização dos tratamentos efetuados e acompanhando a clínica do doente (9,14).

VIVER COM PERTURBAÇÃO DO ESPETRO DO AUTISMO

A Perturbação do Espectro do Autismo tem um impacto clínico, educacional e laboral muito importantes para o doente, e apresenta um prognóstico bastante limitado no que a estas diz respeito, necessitando de acompanhamento e de adaptação constantes.

No que concerne às capacidades educacionais das crianças com PEA, existem por parte das várias entidades de saúde pública planos de acompanhamento escolar bem estabelecidos, como por exemplo os planos de *e-learning* da Organização Mundial de Saúde (*Meeting Report 2013*) (15). Contudo, apesar de todas as preocupações manifestadas com a adequação dos objetivos a exigir a uma criança com este distúrbio e com as suas necessidades específicas, são escassos os dados da literatura atual que avaliam concretamente as suas capacidades de aprendizagem e as metas educacionais que conseguem alcançar (16). Um dos estudos que incide sobre esta problemática é o estudo caso-controlo de *Ashburner et al* que analisa a avaliação atribuída e a percepção dos professores e educadores sobre o sucesso escolar dos alunos com PEA face a alunos sem alterações do desenvolvimentos (e com Quocientes de Inteligência semelhantes). Para além das esperadas dificuldades emocionais e comportamentais descritas, tais como défice de atenção, ansiedade, depressão e agressividade, são registados valores de sucesso escolar diferentes entre os dois grupos. No grupo de controlo apenas 8% dos alunos não obtiveram sucesso escolar, enquanto que entre os alunos com PEA mais de metade foi considerado como tendo um aproveitamento escolar insuficiente (17).

Avaliando a eficácia das estratégias implementadas através da análise das capacidades sociais e laborais a longo prazo destes doentes, a literatura atual aponta para que, já em idades adultas, estes doentes continuem na sua maioria a manifestar as

mesmas dificuldades comportamentais, estereotípias e défices sociais que manifestavam na idade pediátrica, havendo recuperação destas funções no máximo em 25% dos doentes (18). O défice social é a alteração que mais se mantém na idade adulta (90%). No que toca à compreensão da linguagem e capacidade rudimentar de diálogo, os registos do estudo *follow-up* de *Ballaban-Gil et al* apontam que apenas um em cada quatro doentes será capaz desta atividade. Este dado é importante na análise e compreensão da baixa percentagem de doentes com atividade laboral estabelecida e remunerada (11%), tendo todos cargos não especializados. (19) Entre os preditores de um bom prognóstico nestes doentes encontra-se um Quociente de Inteligência moderadamente elevado, a capacidade de imitação motora, de compreensão da linguagem e uma idade mais baixa na altura do diagnóstico e início da terapêutica. Pelo contrário, a presença de epilepsia, défices cognitivos acentuados e síndromes genéticos estão associados a uma pior prognóstico (18).

Além do impacto social, educacional e laboral da Perturbação do Espectro do Autismo, existem também evidências de uma maior afeção clínica destes doentes, estando-lhe associado um maior risco de manifestar algumas co-morbilidades específicas (20), tais como alterações do sono, distúrbios gastrointestinais, imunológicos, psiquiátricos, genéticos e neurológicos (epilepsia) (21-44). Na tabela 4, em anexo, encontra-se informação mais pormenorizada sobre este tema.

Apesar do impacto no *self* é também na família, nos cuidadores e até mesmo na própria comunidade que encontramos igualmente evidências do impacto destes distúrbios. A nível económico, como supracitado, apenas 11% dos doentes em idade adulta apresentam contributo laboral para a sociedade, sendo que mais de metade dos doentes beneficiam de apoio social extraordinário, nomeadamente através do alojamento camarário, atribuição de subsídios sociais e gastos com saúde nove vezes superiores ao normal (19), colocando um maior peso sobre a sociedade e seio familiar onde se encontram inseridos.

Um outro dado bastante importante e por muitos desconhecido, alvo de grande preocupação clínica e social, é o facto de cerca de 50% dos doentes com PEA em idade adulta, por não se encontrarem satisfeitos com a sua condição, optarem por comportamentos danosos, chegando mesmo a recorrer à autoflagelação (19). A ideação suicida é também alarmante nestes doentes, atingindo valores vinte e oito vezes superiores àqueles encontrados na população sem patologia (14%)(45).

A mortalidade é também significativamente elevada face à população geral, apresentando taxas de mortalidade três a dez vezes superiores. Estas estão geralmente associadas às co-morbilidades já descritas, tendo a epilepsia e os distúrbios gastrointestinais e respiratórios um papel preponderante nesta taxa (46).

OBJETIVO

O objetivo principal desta dissertação é a revisão da bibliografia disponível em bases de dados científicas, revistas e jornais indexados, sistematizando o conhecimento atual sobre a Perturbação do Espectro do Autismo e os vários fatores que poderão estar a ela associados. Assim, pretende-se obter informação esclarecedora e suficiente, que permita estabelecer algumas conclusões sobre os de fatores de risco e fatores protetores que estarão ou não comprovadamente associados à Perturbação do Espectro do Autismo.

MATERIAL E METODOLOGIA

Para a elaboração desta dissertação recorreu-se à recolha de informação em bases de dados científicas e publicações em revistas ou jornais científicos, utilizando também como fonte bibliográfica importante a quinta edição do livro "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders" da Associação Psiquiátrica Americana.

Posteriormente foi feita uma leitura e análise dos vários estudos e informações que se encontram disponíveis na base de dados "onlinepubmed", e que respeitavam o tema da pesquisa ("Autism Spectrum Disorders" e "Factors"). De um total de 819 publicações que cumpriam os critérios de pesquisa, após a sua leitura e avaliação, apenas foram considerados pertinentes para o objetivo do estudo um total de 130 publicações.

Foram de seguida analisadas e comparadas as publicações seleccionadas, elaborando-se esta dissertação e as conclusões dela retiradas.

RESULTADOS

FATORES DE RISCO

FATORES GENÉTICOS

O primeiro estudo sobre este tema, realizado em 1977 por *Folstein e Rutter*, encontra uma concordância entre a influência genética e o autismo em 36% dos gêmeos monozigóticos estudados, face a 0% dos gêmeos dizigóticos, concluindo a existência de uma susceptibilidade genética (47). Já em 1995 a equipa de *Bailey et al*, duplicando a população de estudo regista 60% nos monozigóticos e de 0% nos dizigóticos (48). Entre os estudos familiares realizados, cerca de 20% dos irmãos de doentes com Perturbação do Espectro do Autismo apresentavam variações ligeiras sobre a sintomatologia *autistic-like* (49).

Foram propostas hipóteses simples, abordando a PEA como uma patologia autossómica recessiva e outras mais elaboradas, que abordavam esta patologia como um distúrbio genético complexo, mas nenhuma conseguiu até hoje comprovar o modelo de hereditariedade em que se sustentavam (50).

Analisando a literatura, com resultados que mostram uma concordância entre monozigóticos diferente de 100%, é provável que para além da genética também outros fatores tenham um papel etiológico importante neste distúrbio. Assim, após vários estudos conclui-se que "o Autismo, apesar de não ser um distúrbio exclusivamente genético, é em parte determinado por variações neste mecanismo", sendo hoje reconhecida como uma entidade complexa e ainda bastante desconhecida (49, 51, 52).

Em relação à possível hereditabilidade e susceptibilidade da PEA, esta é dividida em dois grupos: *simplex* e *multiplex*. O primeiro aborda as famílias em que apenas um indivíduo é afetado pela PEA, e baseia-se na hipótese de que esta patologia seja o resultado de mutações *de novo*, que explica 10% dos casos (53). O segundo, *multiplex*, aborda as famílias com vários casos de PEA, teorizando a existência de variações genéticas hereditárias, que associadas aumentam o risco de PEA. Atualmente, estima-se que o risco de recorrência de PEA, se o primeiro filho for afetado, se encontre entre os 7-19% (54,55), sendo o risco de uma segunda recorrência de cerca de 35% (56).

Numerosas regiões génicas têm sido identificadas como zonas de possível *linkage*, e de maior risco para a PEA (1p, 2q, 5q, 7q, 15q, 16p, 17q, 19p e Xq) (57). Contudo, apenas alguns destes *loci* aparecem simultaneamente nos vários estudos descritos, existindo a necessidade de definir critérios transversais à literatura indexada (51).

De entre os mais de 100 genes estudados, a região que atualmente se demonstra mais promissora é o braço longo do cromossoma 7, onde foram localizadas anomalias génicas com significância meta-analítica (58). Aqui encontramos o gene da relina (RELN), proteína reguladora do processo de migração e maturação neuronal no feto e moduladora da plasticidade sináptica no adulto (59), e o gene EN2, codificador da proteína *Homeobox protein engrailed-2*, responsável pelo controlo da formação de padrões durante o neurodesenvolvimento (60). O primeiro, foi alvo de estudo por parte da equipa de *Skaar et al*, que abordou 218 famílias quanto à presença de variações do gene RELN e a sua associação à Perturbação do Espectro do Autismo. Este estudo identificou uma associação estatisticamente significativa entre um dos seus marcadores (5'-UTR) e a PEA ($p=0.002$)(61). Apesar de a literatura indexada não ser consensual, com estudos prévios a registarem falta de evidência nesta associação (62-65), este estudo reconhece e ultrapassa as dificuldades estatísticas e disparidades apresentadas pelos seus predecessores, conseguindo apresentar resultados válidos e estatisticamente significativos (61), cujas conclusões foram comprovadas na meta-análise de *Wang Z et al* de 2014 (66). O gene EN2 tem sido alvo de uma investigação mais recente, sendo que *Choi et al* e *Viaggi et al* associam o aumento do fator de transcrição do gene EN2 aos genótipos dos indivíduos com PEA, evidenciando-o como um gene de susceptibilidade para o desenvolvimento deste distúrbio (60, 67).

Outro gene com bastante potencial etiológico é o 5-HTT, no cromossoma 17q, e que codifica o Transportador da Serotonina. Em 2015, *Mequid et al* registam alterações na serotonina plasmática em crianças com PEA ($p=0.001$), tendo também encontrado polimorfismos do gene 5-HTT ("alelo curto") em 10% das crianças com patologia (68), ausentes no grupo de controlo, associando estes genótipos a um maior risco de PEA. Outro estudo, associa a PEA e a sua hipersensibilidade táctil a valores de serotonina plasmática elevados, confirmando o papel de susceptibilidade das polimorfias do gene 5-HT na Perturbação do Espectro do Autismo através das alterações na homeostasia deste neurotransmissor (69). Esta conclusão é também retirada pela equipa de *Nyfeller et al*, ao estudar o gene 5-HTT e o gene da oxitocina (OXTR), comprovando a poligenicidade da PEA através do envolvimento do gene 5-HTT mas também do OXTR (70) que, em conjunto com o gene da Neuroxina-1 (NRXN1), está também em evidência na investigação científica atual, havendo registos positivos quanto ao seu papel na susceptibilidade da PEA (71,72).

Estes e muitos outros genes têm sido implicados no mecanismo de patogenicidade e de susceptibilidade da Perturbação do Espectro do Autismo (Ilustração 1, em anexo) (73), sendo a base de desenvolvimento de alguns biomarcadores para a patologia (74,75).

EPIGENÉTICA

A literatura atual, considerando a Perturbação do Espectro do Autismo um distúrbio complexo, com uma componente genética mas também com uma importante contribuição de outros fatores, deixa em aberto a hipótese de um mecanismo epigenético contributor (como o imprinting e ocorrência de epimutações).

Como anteriormente descrito, a PEA está associada a várias co-morbilidades, tais como a Síndrome de Rett e a Síndrome do X frágil, as quais possuem um mecanismo epigenético regulador bem conhecido. Através da perturbação da homeostasia neurológica e da resposta dinâmica dos neurónios a estímulos ambientais, estas síndromes manifestam-se com alterações fenotípicas como défices cognitivos e comportamentos anormais, *autistic-like* (76). Assim, é formulada a hipótese de que um mecanismo epigenético semelhante esteja na base para a etiologia da PEA (77,78).

FATORES PRÉ-NATAIS

A idade dos progenitores tem sido estudada como um dos possíveis fatores contribuintes para o desenvolvimento de Perturbação do Espectro do Autismo. Segundo a meta-análise de *Gardener et al*, a idade materna acima dos 30 anos está estatisticamente associada a um aumento de 27% no risco de PEA e de 106% quando esta ultrapassa os 40 anos de idade ($p=0,02$), sendo que por cada 5 anos, este risco aumenta 7%. (79) Outra meta-análise mais recente, de *Sandin et al*, retira conclusões semelhantes, com registos de risco relativo de PEA numa mãe com mais de 40 anos de 1.52 ($p<0.05$). Nas mães com menos de 20 anos, o risco decresce significativamente para 0.76 ($p<0.05$). A meta-regressão destes valores estabelece um maior risco da idade materna na descência masculina e nas crianças com diagnóstico tardio. (80) Esta associação deve-se ao maior risco de complicações obstétricas, e à maior incidência de anomalias cromossómicas e instabilidade nucleotídica nos oócitos mais antigos (79,81).

Outro fator materno que parece ter associação com a PEA é a sua naturalidade. *Lauritsen et al* associa às mães nascidas fora da Europa um risco relativo de 1.4 para a PEA (82), enquanto o estudo de *Hultman et al* associa valores semelhantes nas mães nascidas fora da América do Norte e da Europa (83). Estas hipóteses são teorizadas pela equipa de *Gilbert et al* que propõe a sua associação com a falta de imunização destas mulheres para as infeções mais comuns no país onde decorre o parto ou com um maior stress materno devido às dificuldades de residir num novo país e à sua adaptação ao mesmo (84). Contudo, até à atualidade nenhuma destas teorias foi comprovada, sendo necessária investigação em outras áreas geográficas, de forma a poder generalizar dados.

Também a idade paterna parece ser um fator de risco significativo para a PEA, apresentado um aumento de 3.6% no risco a cada 5 anos. Na meta-análise de *Gardener et al*, em semelhança à idade materna, um indivíduo que seja pai após os 40 anos tem um risco relativo de ter um filho com PEA de 1.44 ($p=0.004$). Este risco regride também para as idades mais jovens, apresentado uma diminuição de 26% abaixo dos 25 anos (79). Em 2014, a equipa de *Sampino et al*, usando um modelo animal com 3 gerações de ratos associou novamente um maior risco de PEA a idades paternas avançadas, mas também a avôs com idades mais avançadas (controlando a idade paterna) (85). Assim, a associação com o risco de PEA parece ser consequência de mutações *de novo* que se acumulam nas espermatogónias com o avançar dos anos, e que se podem transmitir ao longo das gerações (85,86).

Outro fator pré-natal em estudo é a exposição fetal a infeções virais como a rubéola, a *influenza* e o citomegalovirus. Pensa-se que estes vírus através da ativação do sistema imune materno, codifiquem alterações no desenvolvimento neurológico e comportamental, aumentando o risco de PEA. Vários estudos foram feitos adoptando modelos animais, como o de *Shi et al*, que através do estudo da *influenza* em roedores associa a exposição pré-natal e a resposta imune materna a comportamentos *autistic-like* na sua descendência (87). Já em 2015, a equipa de *Weir et al* obtem resultados significativos numa espécie filogeneticamente mais próxima ao humano - *Macaca mulatta*. Neste estudo, Macacos Rhesus expostos ao imunoestimulante poly I:C (simulador de infeções virais nas progenitoras), quando comparados com os casos-controlo, registavam alterações dendríticas, sugerindo que estas estarão associadas a um aumento da resposta imune materna, que por sua vez será um fator associado à PEA (88). Em estudos epidemiológicos humanos, *Mazina et al* encontra uma relação significativa entre a história de infeções maternas e o aumento de défices sociais e comportamentos repetitivos, *autistic-like* (89). Especificando algumas infeções, regista-se uma associação significativa entre o Citomegalovirus e a PEA (90). Também em 2015 de *Fang et al* abordam este tema, associando o risco de PEA a infeções genitais e bacterianas no terceiro trimestre ($p<0.05$) (91), risco que tinha sido já positivamente associado no estudo de *George et al*, de 2014, com um Odds Ratio (OR) de 5.2 ($p<0,05$) (92) e de *Langridge et al* (93).

Em relação às morbilidades maternas, o estudo meta-analítico de *Gardener et al* indica que a Diabetes gestacional está associada a um risco superior de descendência com PEA (OR=2.07, $p<0.05$) (79). Esta associação é também descrita nos estudos de *Lyall et al*, de 2012 (93), *Langridge et al* (94), de 2013 e de *Xiang et al*, de 2015, este último que ao estudar 3388 crianças com PEA conclui que existe uma associação duas vezes

superior de PEA em filhos de mães com diabetes gestacional antes das 26 semanas (95). Em relação à Diabetes Mellitus tipo 2 e à exposição a medicação antidiabética, estas não apresentaram até ao momento ter associação significativa com a PEA. (79,95,96)

Outra co-morbilidade materna em estudo é o hipotiroidismo, sendo que em 2014 é descrita por *George et al* uma associação positiva com o risco de PEA (OR=4.25, $p<0.05$) (92). No mesmo ano *Andersen et al* descreve também uma associação positiva com esta co-morbilidade, com um risco 1.34 vezes superior ($p<0.05$) em mães com diagnóstico e tratamento posteriores ao parto, teorizando uma etiologia por exposição fetal a baixos níveis de hormonas tiroideias (97). Quanto à hipotiroxinémia gestacional, *Román et al* registam um risco de PEA quatro vezes superior nestas mães ($p<0.05$)(98), havendo estudos prévios que relacionam esta baixa de tiroxina a um neurodesenvolvimento deficitário, alterações do comportamento e da linguagem (99-101).

As doenças imunes maternas são também alvo de estudo, encontrando-se uma modesta associação com o risco de PEA (OR=1.43, $p<0.05$) (102). Ao estudar várias patologias imunomediadas (tabela 4 em anexo), encontramos p.ex. um número significativo Alergia a derivados do Leite entre as progenitoras (102). *George et al* encontra também uma relação significativa entre as infeções respiratórias maternas/asma e o risco de PEA com um OR de 6.11 ($p<0.05$) (92), assim como *Langridge et al* (tabela 5 em anexo) (94).

Outras co-morbilidades tais como a Hipertensão, Pré-eclâmpsia e Obesidade materna foram também alvo de estudo, havendo uma modesta relação com o risco de PEA. Contudo não há dados significativos que sustentem estas associações (92, 94, 102, 103, 104). Também a história parental de distúrbios psiquiátricos é apresentada como um possível fator de risco, obtendo valores cerca de três vezes superiores aos da população em geral (*Larsson et al* - Psicose/esquizofrenia: RR=3.44, $p<0.05$; perturbações afetivas: RR=2.91, $p<0.05$) (105).

A exposição fetal a medicamentos é também um dos fatores em estudo quanto à sua associação com a PEA, nomeadamente a exposição a conhecidos teratogénicos, como o ácido valpróico, que está associada não só a malformações congénitas mas também a marcados défices cognitivos (106). A sua relação com o risco de PEA é alvo de vários estudos em modelos animais que, apesar de registarem atrasos do desenvolvimento, défices do comportamento social e motor e maior ansiedade na descendência de mães expostas a ácido valpróico, não confirmam esta associação (107-110). Os estudos epidemiológicos até à data apresentam populações de estudo muito pequenas, que vão desde os 4 aos 260 indivíduos (111-114). Apenas o estudo de *Christensen et al*, estudando uma população de 655615 crianças dinamarquesas, 508

expostas a ácido valpróico e 2136 expostas a outros anticonvulsivos conseguiu apresentar dados estatisticamente significativos. Neste estudo é descrito um OR de 2.9 ($p < 0.05$) no risco de PEA após exposição intra-uterina a ácido valpróico (115).

A exposição a talidomida, outro teratogéneo, apresentou também uma associação positiva com a PEA no estudo de *Strömland et al* (116). Contudo, não há outros estudos que abordem este fármaco, que se encontra em desuso devido à sua teratogenicidade, sendo apenas prescrito em raros casos de lepra e mieloma múltiplo (117).

O uso de misoprostol durante a gravidez demonstrou também estar associado a um maior risco de PEA nos estudos de *Bandim et al* e *Johansson et al* (118,119). Contudo, este risco apenas foi estabelecido através do diagnóstico de PEA em doentes afetados pelo síndrome de Moebius, pelo que estes mesmos estudos dizem ser “mais plausível a não existência de relação direta do uso de misoprostol com PEA, mas sim do síndrome de Moebius”, carecendo de mais investigação. Até à data, não há dados novos.

Também a exposição gestacional a Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (SSRI) não demonstrou ainda inequivocamente a sua relação com a PEA. Apesar de *Perrone-McGovern et al* associarem a exposição intra-uterina a SSRI com QIs mais baixos, não é encontrado um risco estatisticamente significativo na sua relação com a PEA (120), conclusões que são repetidas no estudo de *Hviid et al*, com um OR de 1.2 ($p < 0.05$) (121), e no estudo de *Sorensen et al* (122). Uma associação positiva com os SSRI foi descrita por *Rai et al* ao estudar 4429 crianças com patologia e 43277 controlos entre a população sueca (OR=2.34, $p < 0.05$) (123). Também *Gidaya et al* estudando a população dinamarquesa, num total de 5215 casos e 52150 controlos, encontrou uma associação duas vezes superior com estes fármacos (124). Valores semelhantes são apresentados por *Croen et al* (OR=2.2, $p < 0.05$) (125) e por *Harrington et al*, que descreve um risco três vezes superior especificamente em crianças do sexo masculino face ao grupo controlo (126). Estes último estudo associa o pico deste risco com o uso de SSRI no primeiro trimestre (OR=3.8, $p < 0.05$) e não encontra relação positiva com o uso de outros fármacos para o tratamento de doenças psiquiátricas (126).

O paracetamol é outro fármaco em estudo, teorizado por *Torres, Becker e Schultz* que propõem o seu envolvimento com o mecanismo da PEA (127, 128). Na análise ecológica desta hipótese, encontra-se uma correlação positiva e plausibilidade entre os indicadores de exposição a paracetamol e a prevalência de PEA (129). Contudo, não há ainda estudos epidemiológicos que nos permitam tirar conclusões sobre este tema.

O consumo de cocaína durante a gravidez é também alvo de estudo, devido aos seus efeitos na mãe e no feto, causando partos pré-termo, restrições do crescimento intra-uterino, descolamento da placenta e mesmo a morte fetal (130). Assim, esta droga é

descrita como associada a um maior risco de PEA nos estudos de *Harris et al* (131) e de *Davis et al*, que regista uma prevalência de 11,4% de PEA entre os expostos, cerca de dez vezes superior à população em geral (132).

Outro composto muito estudado quanto ao seu consumo gestacional é o etanol, nomeadamente na associação entre a Síndrome alcoólica fetal e a PEA. Dados de *Harris et al*, *Nanson*, *Aronson et al* e *Landgren et al* correlacionam a ingestão de grandes doses de álcool durante a gestação com este distúrbio (131,133-135). Em contrapartida, um estudo populacional mais recente, de *Eliassen et al*, ao avaliar 80522 pares mãe-criança, em que metade das mães teriam sido expostas a dose baixas a moderadas de etanol durante a gravidez, não encontrou uma relação significativa (136).

A exposição fetal ao fumo do tabaco, composto que causa complicações obstétricas e défices neurodesenvolvimentais no feto, não é ainda consensual (106). O estudo de *Hultman et al* descreve uma ligeira associação entre este e o risco de PEA (OR=1.4, $p<0.05$) (83), assim como o de *Larsson et al*, que com uma população de 4779 indivíduos descreve um risco duas vezes superior deste distúrbio entre as mães com hábitos tabágicos (137). Contudo outros estudos não encontram associação significativa entre estas duas variáveis, como o de *Tran et al* (com 20142 indivíduos)(138), *Kalkbrenner et al* (com 633989 indivíduos)(139), *Lee et al* (com 42941 indivíduos)(140) e a meta-análise de 2014 de *Rosen et al* (141).

A exposição a poluentes ambientais, tais como pesticidas, é outro dos alvos no estudo de fatores de risco da PEA. Nos estudos de *Cheslack-Postava et al*, *Eskenazi et al* e *Rauh et al*, é descrita uma associação positiva entre os organofosfatos e este risco, com OR que vão desde os 1.79 aos 5.39, em populações de estudo entre os 75 e as 531 crianças (142-144). Também mais recentemente *Roberts et al* descreve um maior risco de PEA nas mães com residência junto a campos agrícolas com aplicação de organocloreto (OR=6.1, $p<0.05$)(145) enquanto a equipa de *Shelton et al* descreve novamente um risco 60% superior em caso de residência materna junto a campos com organofosfatos (146).

A exposição a poluição atmosférica é até à data apontada como um importante fator de risco para a PEA, e um dos fatores que poderá justificar a sua complexidade. No estudo de *Volk et al*, as mães de crianças com PEA apresentavam uma probabilidade duas vezes maior de viver perto de auto-estradas (147). É também associada a residência próxima a áreas com muito tráfego com um OR de 1.98 de PEA ($p<0.05$)(148). Especificando os poluentes estudados, *Kalkbrenner et al* encontram maior risco com a exposição a cloreto de metileno, quinolina e estireno ($p<0.05$)(149) enquanto *Roberts et al*

associam este risco a uma exposição a diesel, chumbo, manganésio, mercúrio e também cloreto de metileno (OR=1,5-2, $p < 0.05$), associação mais significativa no sexo masculino (150). Estudos recentes, realizados nos EUA, voltam a correlacionar positivamente vários tóxicos de tráfego urbano e de emissões industriais com o risco de PEA. Entre eles o cianeto, cádmio, níquel, solventes aromáticos, formaldeído e chumbo. (151-153).

Em 2013 um grande estudo coorte de base populacional realizado em Taiwan através do follow-up a 10 anos de 49073 crianças, encontrou um risco 59% maior de PEA em ambientes carregados de Ozono, de 37% em Monóxido de Carbono, de 17% em Dióxido de Enxofre e de 340% em Dióxido de Azoto ($p < 0.05$). Este estudo, à semelhança dos anteriores, associa a exposição a poluição atmosférica em período de desenvolvimento (< 4 anos) com o risco de Perturbação de Espetro do Autismo (154).

Já em 2015, um estudo de *Raz et al*, associa novamente a poluição atmosférica, nomeadamente ambientes ricos em partículas com diâmetro menor que $2,5\mu\text{m}$, a um maior risco de PEA (OR=1.47, $p < 0.05$), e que é significativamente maior com a exposição no terceiro trimestre (155). Também de *Volk et al* tinham já relatado um maior risco de PEA em caso de exposição gestacional a Dióxido de Azoto (OR=1.81, $p < 0.05$), e a partículas de poluentes atmosféricos com diâmetro menor a $2,5\mu\text{m}$ (OR=2.08, $p < 0.05$) e com diâmetro menor a $10\mu\text{m}$ (OR=2.12, $p < 0.05$)(148). Por outro lado, um estudo de 2014 de *Gong et al*, falhou em encontrar uma relação estatisticamente significativa entre estas variáveis em 3426 pares de gémeos suecos (OR=1.01, $p < 0.05$)(156).

A exposição pré-concepcional dos pais é outro dos fatores estudados. Em 2012, *McCanlies et al* associam as mães das crianças com PEA a uma maior exposição ocupacional a laca, verniz, xileno, alcatrão e solventes industriais nos 3 meses anteriores à concepção (157), sendo que também o mercúrio, níquel, cádmio, cloreto de vinil e tricloroetileno haviam já sido apontados como mutagêneos associados a um maior risco de PEA (158). Contudo, todos estes estudos apresentam pequenas amostragens.

FATORES PERI-NATAIS

Na procura de mais fatores de risco para a Perturbação do Espetro do Autismo, alguns fatores peri-natais têm vindo também a ser estudados. Entre eles, um dos mais importantes é a ocorrência de complicações obstétricas.

No estudo de *Lyall et al*, de 2012, entre 66445 gestações foi encontrado um risco de PEA superior em progenitoras que sofreram pelo menos uma complicação peri-natal (OR=1.49, $p < 0.001$), risco este que se mostrou mais significativo com o aumento do número de complicações associadas (quatro ou mais complicações – OR=2.76, $p < 0.001$)

(93). Também o estudo de *Stein et al*, controlando variáveis confundidoras, regista um maior risco de PEA associado a complicações obstétricas inespecíficas (159). Dados semelhantes são obtidos pela equipa de *Perrone-McGovern et al*, ao registar maiores 'Autism Index scores' em filhos de progenitoras com história de complicações obstétricas (120).

Entre as complicações descritas no estudo de *Lyll et al*, encontram-se os abortos prévios (OR=1.26, $p<0.05$) e a toxemia gestacional (OR=1.36, $p<0.05$), para além da Diabetes Gestacional, previamente discutida (93). Estudos em diferentes países descrevem resultados semelhantes, tais como o de *Maimburg e Vaeth* que encontra um maior risco nas crianças escandinavas de baixo peso para a idade gestacional ou com malformações congénitas (160). Também na Finlândia, em 2014, um estudo semelhante associa este risco a um score de Apgar ao 1º minuto menor que 7 (OR=1.46, $p<0.05$), à necessidade de cuidados neonatais monitorizados (OR=1.4, $p<0.05$) ou à manifestação de hipertensão materna durante a gestação (OR=1.49, $p<0.05$) (161). Estes fatores de risco são novamente mencionados por *Guinchat et al*, que encontra associação estatisticamente significativa com o parto pré-termo, um score de Apgar ao 5º minuto menor que 7, baixo peso para a idade gestacional, malformações congénitas, apresentação pélvica, cesareana planeada e hiperbilirrubinémia (96). *Larsson et al* encontram associação positiva com o parto pré-termo, a apresentação pélvica e um score de Apgar ao 5º minuto menor que 7 (103). As equipas de *Hultman et al* e *Eaton et al* descrevem, em semelhança a *Maimburg e Vaeth* e *Guinchat et al*, novamente um risco de PEA duas vezes superior em neonatos de baixo peso para a idade gestacional (83,162), contudo, a meta-análise de *Kolevzon et al*, 2007 (163) e o estudo de *Larsson et al*, 2010 (103) não encontram significância nesta associação. *Hultman et al* descrevem ainda uma associação positiva com o parto por cesareana (OR=1.6), neonatos de baixo peso para a idade gestacional (OR=2.1), um score de Apgar ao 5º minuto menor que 7 (OR=3.2) e malformações congénitas (OR=1.8)(83).

Em modelos familiares, *Glasson et al*, comparando indivíduos com PEA e os seus irmãos (casos-controlo), descreve uma maior ocorrência de complicações obstétricas nos indivíduos-caso. Nestes é mais provável que tenha havido indução do parto (OR=1.4, $p<0.05$), tenha sido registado um score de Apgar ao 1º minuto menor que 7 (OR=1.64, $p<0.05$) e tenha havido um intervalo superior a 1 minuto entre o parto e a respiração espontânea do bebé (OR=1.81, $p<0.05$)(164). Já na Escócia, *Deb et al* não encontram diferenças significativas na ocorrência de complicações obstétricas entre indivíduos com PEA e os seus irmãos (165).

Um possível fator etiológico de PEA foi sugerido por Kanner nos anos 40 ao registrar uma maior distância emocional e falta de ternura nas mães destas crianças. Assim, teorizado que a falta de emoção e de atenção por parte dos progenitores seria causa de PEA (“Refrigerator mother theory”) (166). Esta teoria foi bem aceita pela sociedade de então, com vários autores conceituados a contribuir para o estudo desta hipótese, tais como Arieti, Mahler e Bettelheim, este último que chegou a criar “tratamentos” para a PEA baseados em estratégias educacionais parentais (167). Apenas em 1964 esta teoria foi questionada pela primeira vez pelo psicólogo Bernard Rimland (167). Com novas descobertas científicas a caracterizar a PEA não como um distúrbio psicogénico, mas como um distúrbio complexo de base genética, esta teoria foi perdendo seguidores (47-49). Apesar de tudo, há ainda investigadores que continuam a acreditar na ligação entre a PEA e a falta de expressão de afeto dos progenitores. Recentemente, em 2012, o psicólogo irlandês Tony Humphreys lançou um artigo no qual defendia esta associação. Contudo, este foi refutado pela Sociedade Irlandesa de Psicologia e pela comunidade científica internacional, e posteriormente retirado pelo autor (168).

Outro fator pós-natal que tem vindo a perder significância na literatura científica é a vacinação. A hipótese de que as crianças expostas à vacina VASPR (Sarampo, Parotidite e Rubéola) teriam maior risco de desenvolver PEA foi postulada em 1998 por *Wakefield et al* (169). Neste estudo, era descrito um mecanismo etiológico de PEA que correlacionava o aumento de proteínas encefalopáticas com uma maior fragilidade da parede intestinal provocada pela vacina (169). Esta teoria gerou polémica na comunidade científica, tendo sido consideradas as conclusões de Wakefield como não significativas (devido à baixa amostragem do estudo – 12 crianças) e até mesmo fraudulentas, pois apresentava casos de estudo em que a vacinação teria sido posterior ao diagnóstico de PEA (170). Este estudo foi posteriormente retirado pelos autores em 2010.

Vários estudos desde então apresentam dados que refutam as conclusões de Wakefield (171-178), com o mais recente a ser publicado em 2015. Após estudar uma população norte-americana de 95727 crianças e os seus irmãos, *Jain et al* concluem que não existe associação significativa entre a vacina VASPR e o risco de PEA (178).

A utilização do conservante timerosal foi também alvo de preocupação quanto à associação com a PEA devido à sua composição rica em mercúrio e à associação deste elemento com um maior risco de PEA (150,158). Contudo, a associação do timerosal com a PEA foi estatisticamente negada (171-174,176,177).

Apesar de toda a literatura que refuta o papel da vacinação no risco de PEA, muitos pais optam atualmente por não vacinar os seus filhos, com medo que esta associação seja verídica, situação que põe em risco a saúde destas crianças e que é associada ao aumento atual dos casos de sarampo (179).

FATORES PROTETORES

SUPLEMENTAÇÃO MATERNA

O ácido fólico desempenha um papel-chave na redução do risco de malformações do tubo neural, sendo muito importante a sua suplementação nas gestantes. Em 2011, *Schmidt et al* reportam que as mães de filhos com PEA apresentavam valores inferiores no cumprimento da suplementação com este ácido durante o período pré-concepcional e durante o primeiro mês de gestação (OR=0.62, $p<0.05$) (180), equacionando que esta suplementação poderia ser um fator protetor do risco de PEA. No ano seguinte, *Schmidt* reporta novamente dados semelhantes, associando uma ingestão diária de mais de 600 μ g de ácido fólico com uma diminuição do risco de PEA (OR=0.62, $p<0.05$)(181). *Surén et al*, ao seguir uma população de 85.176 crianças, reporta uma incidência duas vezes superior de PEA em mães que não tomaram este suplemento, face às gestantes que ingeriram diariamente uma dose igual ou superior a 400 μ g de ácido fólico no período pré-concepcional e nos primeiros dois meses de gestação (182), tornando credível a hipótese defendida por *Schmidt*.

A suplementação com Zinco e a hipótese de esta apresentar um poder protetor na PEA é um fator abordado mais recentemente, mas que apresenta já alguns dados promissores. Em 2015, *Kirsten et al* expõem 10 ratos Wistar a lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina cuja exposição gestacional se relaciona a défices de comunicação, socialização e comportamentos repetitivos na descendência (183-185), e posteriormente injetando 5 dos indivíduos com 2mg/kg de Sulfato de Zinco (LPS+Zn), regista valores séricos menores de Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e uma maior de interação social com a mãe nos indivíduos sujeitos a suplementação (183). Sabe-se que a proteína BDNF é encontrada em valores elevados nos doentes com PEA, sendo considerada como um possível biomarcador deste distúrbio (186,187), pelo que os autores concluem que “o tratamento com Zinco preveniu os traços *autistic-like* na descendência”, e que a suplementação materna com este mineral é um fator protetor de PEA, devendo ser administrado em caso de infeção materna. (183)

O déficit gestacional de Vitamina D, associado a restrições do crescimento intra-uterino, diminuição da densidade mineral óssea do feto, diabetes e sibilância crônica (106), é comum em crianças com PEA (188,189), e acompanha o aumento da incidência deste distúrbio nos últimos 20 anos, pelo que se coloca a hipótese de que o déficit desta vitamina estará diretamente relacionado com o risco de PEA (190,191). Testando esta hipótese, *Fernell et al* e *Whitehouse et al* não encontram relação significativa entre os valores maternos de Vitamina D e a PEA (192,193). Contudo, estes estudos possuíam amostragens casuísticas muito pequenas, respetivamente 29 casos e 3 casos, sendo estatisticamente pouco significativos.

Outro mineral cuja suplementação materna se encontra em estudo é o Ferro, sobre o qual é conhecida uma importante ação no desenvolvimento das estruturas cerebrais, sistemas neurotransmissores e mielinização neuronal (194). Sabe-se que cerca de 50% das grávidas manifestam déficit deste mineral (194), e que doentes com PEA tendem a apresentar valores séricos mais baixos (195), justificando o interesse sobre o estudo do Ferro e a sua associação com o risco de PEA. *Schmidt et al* estudaram esta mesma associação, tendo concluído que as progenitoras dos doentes com PEA apresentavam menores taxas de ingestão diárias de ferro (OR=0.63, $p<0.05$). Proporcionalmente, entre o quintil mais elevado de ingestão de ferro é descrito um menor risco de descendência com PEA (OR=0.49, $p<0.05$), formulando a hipótese de que esta suplementação gestacional será um fator protetor da PEA. A significância destes valores acentua-se quando associada à amamentação materna. (196).

AMAMENTAÇÃO MATERNA

Relacionando a PEA com um mecanismo de desmielinização neuronal por déficit de *Insulin-growth factor* (IGF) e assumindo a contribuição epigenética pós-natal, *Steinman e Mankuta* sugerem que a amamentação materna será um fator protetor da PEA, por compensar este mesmo déficit de IGF (197). *Shultz et al*, descrevem uma relação positiva com este fator, afirmando que “a amamentação materna é um fator protetor”. Isto porque, comparando as crianças amamentadas com leite materno durante mais de 6 meses e as que não foram amamentadas com leite materno, este último grupo mostrou um risco superior de manifestar PEA (OR=2.48, $p<0,05$)(198). Quando comparamos novamente o primeiro grupo com crianças que receberam alimentação com fórmula sem suplementos de ácido docosahexaónico e ácido araquidónico, o risco aumenta (OR=4,41, $p<0,05$)(198), pelo que se adivinha não só a amamentação materna como um fator protetor, como também a presença destes ácidos gordos essenciais na dieta do bebé.

DISCUSSÃO

A Perturbação do Espectro do Autismo é uma patologia que continua a fascinar a comunidade científica atual. Sobre este distúrbio, sabe-se que é devido a falhas no desenvolvimento do sistema nervoso, e que apesar de ter uma base genética comprovada, múltiplos fatores ambientais têm também um papel essencial no seu mecanismo patológico. Isto torna-a num distúrbio muito complexo e de difícil estudo, pelo que não é de estranhar que a atenção dos vários investigadores se disperse por um grande leque de problemas, mecanismos e fatores. Assim, ao analisar a literatura indexada, foi difícil retirar conclusões significativas sobre quais os fatores que teriam ou não um papel contribuinte para a PEA, podendo ser considerados fatores de risco ou fatores protetores.

Devido à grande extensão de fatores estudados até à data e à sua elevada dispersão, não foram abordados nesta revisão os seguintes fatores de risco por serem alvo de estudo por apenas um autor: estação ou mês de nascimento, stress pré-natal materno, exposição a perfumes/fragrâncias, défice de iodo (abordado independentemente do hipotireoidismo em apenas um estudo epidemiológico). As infeções virais pós natais também não foram abordadas por apenas constarem em estudos especulativos com modelos animais, e a anemia fetal, bastante comum em indivíduos com PEA, apesar de muito estudada como possível fator etiológico não tem até ao momento estudos epidemiológicos que a analisem como um fator de risco. No capítulo “Fatores de Risco – Fatores genéticos” não foi possível fazer uma análise extensiva e abordar individualmente todos os genes especulativamente associadas à PEA, tendo sido abordados de forma resumida os que se mostraram mais promissores até à data.

É de salientar que a PEA é um dos temas que atualmente mais interesse suscita nos investigadores, sendo que no ano de 2015, até ao mês de maio, mais de 1000 estudos foram publicados com as palavras-chave “Autism Spectrum Disorder”.

A falta de esclarecimento sobre os vários fatores associados à PEA e os resultados por vezes díspares registados, surgem essencialmente de limitações metodológicas. É assumida como uma das limitações desta revisão, e dos vários artigos analisados, a recente alteração da definição e dos critérios de diagnóstico de Perturbação do Espectro do Autismo, sendo que a maioria dos estudos publicados antes de 2013 apresenta conclusões não especificamente relacionadas com a PEA mas com entidades semelhantes, até então distinguidas como Autismo ou Síndrome de Asperger. Contudo, à luz dos novos critérios, que englobam ambas as patologias, as conclusões previamente sobre elas retiradas foram extrapoladas para a PEA.

Analisando os fatores genéticos estudados quanto à sua associação com a PEA, sabe-se que esta lista é extremamente extensa, englobando uma vários genes e *loci*. Este facto não é surpreendente, tendo em conta que mais de um terço dos cerca de 24000 genes humanos têm expressão no desenvolvimento neurológico. Nesta revisão, encontra-se uma associação significativa entre a história familiar de PEA e o risco de desenvolver este distúrbio, sendo o risco mais elevado em caso de patologia fraterna prévia (7-35%). Entre as regiões génicas associadas ao risco de PEA destacamos o gene RELN, o gene EN2, o gene 5-HTT, o gene OXTR e o gene NRXN1. Outros genes têm sido implicados no mecanismo de susceptibilidade da PEA (ilustração 1, em anexo) (73), contudo, apesar de existir evidência significativa do seu contributo, não há ainda referência a um mecanismo fisiopatológico bem estabelecido que os associe ao risco de PEA. Esta dificuldade está relacionada principalmente com a dificuldade de reprodutibilidade e a limitação de follow-up.

Sabe-se também que a epigenética terá uma importante contribuição para o desenvolvimento de PEA. Apesar de tudo, são ainda pouco conhecidos os fatores epigenéticos a ela associados, sendo esta uma área em desenvolvimento.

Quanto ao fatores ambientais com possível contribuição para o risco de PEA, estes foram divididos em três grupos: Fatores Pré-natais, Peri-natais e Pós-natais. No primeiro grupo são encontrados como estatisticamente significativos a idade dos progenitores, nomeadamente uma idade acima dos 30 anos, o que contribuirá para um aumento do risco de PEA na ordem dos 30%. Já a idade do avô, apesar de mencionada como significativa em um dos estudos abordados, deverá ser alvo de nova análise.

Ainda nos fatores pré-natais múltiplos estudos associam as infeções maternas ao aumento do risco de PEA. Devido à dispersão dos fatores estudados não associamos este distúrbio com nenhum patogéneo ou local anatómico específicos. Contudo, e apesar desta dispersão, conclui-se que a infeção materna durante a gestação, com ativação do sistema imune, está positivamente associada com o risco de PEA.

Referindo as comorbilidades maternas, foram encontradas como estatisticamente significativas apenas a Diabetes Gestacional, com um risco duas vezes superior. Apesar de os dados recolhidos não serem consensuais em relação a esta patologia, as investigações mais recentes, com maiores populações de estudo e os estudos meta-analíticos analisados permitem inferir esta conclusão. O hipotiroidismo/hipotiroxinémia gestacional e as doenças imunomediadas são também patologias que revelam interesse quanto à sua associação com o risco de PEA. Contudo, a diferença de metodologias

utilizadas não permite a formulação de uma conclusão dos estudos disponíveis, sendo necessária uma otimização das mesmas.

A exposição fetal a medicamentos não demonstrou estar significativamente associada a um maior risco de PEA. Apesar de alguns estudos o associarem positivamente ao consumo materno de fármacos como o ácido valpróico, a talidomida e o misoprostol, foram encontradas limitações a nível do número de indivíduos que constituíam as populações estudadas, do número de estudos registados e dos critérios de estudo utilizados, não sendo possível a extrapolação de conclusões. O fármaco que mostrou ter uma associação mais significativa com o risco de PEA foram os SSRI. Contudo, e apesar de haver dados promissores, não há ainda registos que permitam inequivocamente a sua associação com o risco de PEA, pelo que deverão ser alvo de mais estudo.

Em relação à exposição a drogas ilícitas, o consumo materno de cocaína é apresentado como positivamente associado ao risco de PEA, colocando-o em valores dez vezes superiores à população em geral. Contudo, são ainda poucos os estudos que abordam este fator, pelo que serão necessários mais dados para confirmar esta associação.

Também o consumo de etanol e a exposição ao fumo do tabaco durante a gestação não apresentam dados consensuais que permitam a extrapolação de uma conclusão sobre estes fatores, sendo necessária a realização de mais estudos alargados de base populacional tais como o de *Eliassen et al* (136). Apesar de tudo, a exposição ao fumo do tabaco apresenta dados mais indicadores de uma associação negativa com o risco de PEA.

Um dos fatores que mais positivamente se associa ao aumento do risco de Perturbação do Espectro do Autismo é a exposição a poluentes ambientais. Estudos populacionais e meta-análises confirmam que o contacto pré-natal com conhecidos pesticidas (organofosfatos e organocloreto), partículas de pequenas dimensões (<2,5µm) e a generalidade dos poluentes atmosféricos aumentam o risco de PEA entre cerca de 1.5 a 6 vezes, sendo os valores mais elevados associadas à exposição a pesticidas. A exposição laboral pré-concepcional dos progenitores a poluentes apesar de registar dados que a associam positivamente à PEA, falha por apresentar amostragens muito pequenas, que não permitem comprovar esta associação.

Analisando os fatores de risco peri-natais, muitas são as variáveis associadas a um maior risco de PEA. Entre elas, as complicações obstétricas. Quando analisadas enquanto complicações peri-natais inespecíficas, estes fatores aparecem em associação

bastante significativa com o aumento do risco de PEA, entre 1.5 a 2.8 vezes. O estudo familiar de *Glasson et al* comprova esta mesma associação, avaliando fratrias, onde se registaram valores mais elevados de complicações obstétricas entre os indivíduos com PEA. Já fazendo a análise individual destas variáveis, são apresentadas uma amálgama de complicações que perdem significância estatística devido à variabilidade de critérios, metodologias e variáveis utilizadas. As complicações obstétricas mais mencionadas na literatura indexada como associadas ao risco de PEA são: o baixo peso para a idade gestacional, as malformações congénitas, o parto pré-termo e um baixo score de Apgar ao 5º minuto (<7). Dizem-nos alguns autores que todas estas complicações poderão refletir um mecanismo-base comum, a hipóxia fetal. Assim, apesar de existir significância entre o risco de PEA e as complicações obstétricas, deverão ser realizados mais estudos que coloquem em evidência e como variável generalizada a hipóxia fetal.

Finalizando os fatores de risco, e analisando os fatores pós-natais conclui-se que nenhum dos fatores estudados apresenta associação positiva com o risco de PEA. Um destes fatores é a Vacinação com VASPR e a utilização do conservante timerosal. Estes que são temas muito polémicos na sociedade atual, com vários movimentos e associações parentais a recusarem a vacinação infantil por considerarem que esta se encontra associada a um maior risco e a uma causa etiológica direta de PEA. Contudo, não há na literatura científica atual qualquer conclusão validada que justifique esta associação, pelo que se conclui que a vacinação infantil não está positivamente associada à PEA.

Em relação aos possíveis fatores protetores da PEA, existem variáveis cujo controle é promissor na redução do risco deste distúrbio. Nomeadamente a suplementação materna com ácido fólico, zinco, vitamina D e Ferro. A primeira demonstrou ter significância estatística quando utilizada pelas gestantes em doses diárias superiores a 400µg. A suplementação com Zinco e com Ferro apesar de se demonstrarem promissoras nos modelos animais disponíveis, possuem ainda resultados diminutos pelo que carecem de mais investigação. Já a utilização pré-natal de Vitamina D, que apresenta estudos que não lhe atribuem uma associação com este risco, deverá também ser alvo de mais investigação antes de ser abandonada como fator protetor, nomeadamente com o estudo de maiores populações que permitirão a formulação de conclusões estatisticamente significativas.

A amamentação materna apresenta também estar associada a uma diminuição do risco de PEA. Contudo, será também importante investigar melhor este fator,

nomeadamente distinguindo o papel da suplementação dietética com os vários ácidos gordos essenciais presentes no leite materno.

Entre as limitações que não permitiram significância na extrapolação de conclusões encontram-se maioritariamente as diferenças metodológicas, a heterogenicidade das populações globalmente estudadas, a limitação no número de indivíduos e a dispersão de fatores e critérios abordados nos vários estudos. Apesar de ter sido possível associar positivamente alguns fatores de risco e fatores protetores à Perturbação do Espectro do Autismo, é importante que os estudos futuramente desenvolvidos se apoiem em populações de estudo mais alargadas, optando preferivelmente por estudos coorte de base populacional que utilizem critérios transversais aos vários autores e que tenham em consideração as possíveis variáveis confundidoras, das quais a mais importante será a análise prévia da susceptibilidade genética.

CONCLUSÃO

No final desta revisão conclui-se que apesar do interesse da comunidade científica no estudo da Perturbação do Espectro do Autismo este continua a ser um distúrbio com muitas incógnitas. A sua complexidade e a ausência de um mecanismo bem esclarecido que permita uma investigação criteriosa encontram-se entre as maiores limitações no estudo deste distúrbio.

Muitos são os fatores de risco e fatores protetores até ao momento estudados quanto à sua associação com o risco de PEA. Contudo, a maioria carece de uma maior e melhor investigação, não sendo possível evidenciar a sua relação com este risco.

Os fatores de risco que nesta revisão se mostraram positivamente associados à PEA são: a história familiar, a presença de alterações genéticas específicas, a idade parental avançada, a infeção gestacional materna, a diabetes gestacional, a poluição ambiental e a ocorrência de complicações obstétricas inespecíficas. São tidos como possíveis fatores de risco, carecendo de maior investigação, os seguintes: hipotiroidismo/hipotiroxínia gestacional, doenças maternas imunomediadas, exposição gestacional a fármacos, consumo gestacional de cocaína e de etanol e complicações obstétricas específicas como o baixo peso para a idade gestacional, as malformações congénitas, o parto pré-termo e um baixo score de Apgar ao 5º minuto. Apresentaram associação negativa com o risco de PEA os fatores pós-natais, nomeadamente a vacinação infantil.

Em relação aos fatores protetores, associa-se positivamente à diminuição do risco de PEA a suplementação materna com ácido fólico e como fatores possivelmente associados, carecendo de mais investigação, o zinco e o ferro. A amamentação materna é outro fator promissor nesta área, e que deverá ser alvo de mais estudo.

Finalizando, foram nesta revisão encontrados vários fatores moduladores do risco de Perturbação do Espectro do Autismo. Todos estes são fatores pré ou peri-natais, justificando a teoria de que o mecanismo patológico da PEA se desenvolve em período embrionário. Os fatores mais importantes encontrados são a susceptibilidade genética e a exposição gestacional à poluição atmosférica.

A PEA é uma patologia com crescente prevalência, atingindo os 2% em algumas populações, com associação a várias comorbidades e com grande peso social na família e na comunidade que acolhe estes doentes. Assim, espera-se que a investigação sobre este distúrbio mantenha a tendência atual de crescimento e que futuramente seja possível conhecer e controlar o risco ou até mesmo o mecanismo base deste distúrbio.

BIBLIOGRAFIA

- 1) American Psychiatric Association, 'Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders', 4th ed. Washington DC, *American Psychiatric Publishing*, 2005.
- 2) American Psychiatric Association, 'Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders', 5th ed. Washington DC, *American Psychiatric Publishing*, 2013.
- 3) Williams JG, Higgins JP, Brayne CE, 'Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders', *Archive of Disease in Childhood*, 2006; 91(8).
- 4) Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network - Centers for Disease Control and Prevention, 'Prevalence of autism spectrum disorders - autism and developmental disabilities monitoring network, 6 sites, United States, 2000', *MMWR Surveill Summ*, 2007, 56(1).
- 5) Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network - Centers for Disease Control and Prevention, 'Prevalence of autism spectrum disorders - autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2002', *MMWR Surveill Summ*, 2007, 56(12).
- 6) Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network - Centers for Disease Control and Prevention, 'Prevalence of autism spectrum disorders - autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008', *MMWR Surveill Summ*, 2012, 61(1).
- 7) Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network - Centers for Disease Control and Prevention, 'Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010', *MMWR Surveillance Summer*, 2014, 63(1).
- 8) Oliveira G et al, 'Epidemiology of autism spectrum disorder in Portugal: prevalence, clinical characterization, and medical conditions', *Developmental Medicine and Child Neurology*, 2007, 49(10):726-33
- 9) Volkmar F et al, 'Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder', *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 2014, 53(2):237-257
- 10) Lovaas OI et al, 'Teaching Developmentally Disabled Children: The ME Book'. Austin, TX: PROED; 1981.
- 11) Howlin P et al, 'Systematic review of early intensive behavioral interventions for children with autism', *American Journal on Intellectual and Development Disabilities*, 2009, (114):23-41
- 12) Wood JJ et al, 'Cognitive behavioral therapy for anxiety in children with autism spectrum disorders: a randomized controlled trial', *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 2009, (50):224-234
- 13) Scahill L et al, 'Effects of risperidone and parent training on adaptive functioning in children with pervasive developmental disorders and serious behavioral problems', *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 2012, (51):136-146.
- 14) Myers SM, Johnson CP, 'Management of children with autism spectrum disorders', *Pediatrics*, 2007, 120(5):1162-82.
- 15) World Health Organization, 'Autism spectrum disorders & other developmental disorders - From raising awareness to building capacity', *WHO document Production Service, Geneva, Switzerland*, 2013.
- 16) Keen D, Webster A, Ridley G, 'How well are children with autism spectrum disorder doing academically at school? - An overview of the literature', *Autism*, 2015, (Epub ahead of printing) - 1362361315580962
- 17) Ashburner J, Ziviani J, Rodger S, 'Surviving in the mainstream: Capacity of children with autism spectrum disorders to perform academically and regulate their emotions and behavior at school', *Research in Autism Spectrum Disorders*, 2010, 4(1):18-27
- 18) Helt M et al, 'Can children with autism recover? If so, how?', *Neuropsychology Review*, 2008, 18(4):339-366

- 19) Ballaban-Gil K, Rapin I, Tuchman R, Shinnar S. 'Longitudinal examination of the behavioral, language, and social changes in a population of adolescents and young adults with autistic disorder', *Pediatric neurology*, 1996, 15(3):217-23.
- 20) Ming X et al, 'Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders', *Journal of child neurology*, 2008, 23(1):6-13.
- 21) Stores G, 'Sleep and its Disorders in Children and Adolescents with a Neurodevelopmental Disorder: A Review and Clinical Guide', *Cambridge University Press*, 2014.
- 22) Krakowiak P et al, 'Sleep problems in children with autism spectrum disorders, developmental delays, and typical development: a population-based study', *Journal of Sleep Research*, 2008, 17(2):197-206
- 23) Sivertsen et al, 'Sleep problems in children with autism spectrum problems: a longitudinal population-based study', *Autism*, 2012, 16(2):139–150
- 24) Richdale A, 'Sleep problems in autism: prevalence, cause, and intervention', *Developmental Medicine & Child Neurology*, 1999, 41:60–66
- 25) Buie T et al, 'Evaluation, Diagnosis, and Treatment of Gastrointestinal Disorders in Individuals With ASDs: A Consensus Report', *Pediatrics*, 2010, 125 (Supplement 1):S1-S18.
- 26) Nikolov RN et al, 'Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2009, 39(3):405-413
- 27) Ming S and Pletcher B, 'Navigating the Medical Maze with a Child with Autism Spectrum Disorder: A Practical Guide', *Jessica Kingsley Publishers*, 2014.
- 28) Kuddo T e Nelson KB, 'How common are gastrointestinal disorders in children with autism?', *Current Opinion in Pediatrics*, 2003, 15(3):339-343.
- 29) Kohane IS et al, 'The Co-Morbidity Burden of Children and Young Adults with Autism Spectrum Disorders', *PLoS one*, 2012, 7(4):1-7
- 30) Onore C et al, 'The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism', *Brain, Behavior, and Immunity*, 2012, 26:383–392
- 31) Leyfer OT et al, 'Comorbid Psychiatric Disorders in Children with Autism: Interview Development and Rates of Disorders', *Journal of Autism and Developmental Disorder*, 2006, 36:849-861
- 32) Simonoff E et al, 'Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample', *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 2008, 47(8):921-929
- 33) Zafeiriou DI et al, 'Autism spectrum disorders: the quest for genetic syndromes', *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 2013, 162B(4):327-366
- 34) Muhle R et al, 'The Genetics of Autism', *Pediatrics*, 2004, 113(5):472-486
- 35) Schaefer B e Mendelsohn N, 'Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders', *Genetics in Medicine*, 2008, 10(1):4-12
- 36) Smalley SL, 'Autism and tuberous sclerosis', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 1998, 28(5):407-414
- 37) Moss J e Oliver C, 'Autism in genetic syndromes: Implications for assessment and intervention', *Cerebra Centre for Neurodevelopmental Disorders*, 2012.
- 38) Canitano R, 'Epilepsy in autism spectrum disorders', *European child & adolescent psychiatry*, 2007, 16(1):61-6.
- 39) Tuchman R et al, 'Autism and epilepsy: historical perspective', *Brain & development*, 2010, 32(9):709-18.
- 40) Amiet C et al, 'Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis', *Biological psychiatry*, 2008, 64(7):577-82.

- 41) Mendes JMG, 'Epilepsia no Autismo Idiopático', Tese de Mestrado em Medicina, *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*, 2014.
- 42) Bolton PF, et al, 'Epilepsy in autism: features and correlates', *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 2011, 198(4):289-94
- 43) Billstedt E et al, 'Autism after adolescence: population-based 13- to 22-year follow-up study of 120 individuals with autism diagnosed in childhood'. *Journal of autism and developmental disorders*, 2005, 35(3):351-60
- 44) Kurtz Z, et al. 'Epilepsy in young people: 23 year follow up of the British national child development study', *British Medical Journal*, 1998, 316(7128):339-42
- 45) Mayes SD et al, 'Suicide ideation and attempts in children with autism', *Research in Autism Spectrum Disorders*, 2013, 7(1):109-119
- 46) Bilder D et al, 'Excess Mortality and Causes of Death in Autism Spectrum Disorders: A Follow up of the 1980s Utah/UCLA Autism Epidemiologic Study', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2012, 25(1):1-9.
- 47) Folstein S e Rutter M, 'Genetic influences and infantile autism', 1977, *Nature*, 265:726–28
- 48) Bailey A et al, 'Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study', *Psychological Medicine*, 1995, 25:63–77
- 49) Piven J et al, 'Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families', *American Journal of Psychiatry*, 1997, 154:185–90
- 50) Ritvo ER et al, 'Evidence for autosomal recessive inheritance in 46 families with multiple incidences of autism', *American Journal of Psychiatry*, 1985, 142:187-192
- 51) Newschaffer et al, 'The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders', *Annual Review of Public Health*, 2007, 28:235-258
- 52) Le Couteur A et al, 'A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins', *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 1996, 37:785–801
- 53) Sebat J et al, 'Strong association of de novo copy number mutations with autism' *Science*, 2007, 316(5823):445-449
- 54) Grønberg TK et al, 'Recurrence of autism spectrum disorders in full- and half-siblings and trends over time: a population-based cohort study', *JAMA pediatrics*, 2013, 167(10):947-953
- 55) Ozonoff et al, 'Recurrence Risk for Autism Spectrum Disorders: A Baby Siblings Research Consortium Study', *Pediatrics*, 2011, 128(3):e1-e8
- 56) Miles JH et al, 'Autism Spectrum Disorders', *Gene Reviews - University of Washington, Seattle*, 2003.
- 57) Klauck SM, 'Genetics of autism spectrum disorder', *European Journal of Human Genetics*, 2006, 14:714–20
- 58) Trikalinos TA et al, 'A heterogeneity-based genome search meta-analysis for autism-spectrum disorders', *Molecular Psychiatry*, 2006, 11:29–36
- 59) D'Arcangelo G, 'Apoer2: a reelin receptor to remember', *Neuron*, 2005, 47(4): 471–473
- 60) Choi J et al, 'Autism associated gene, engrailed2, and flanking gene levels are altered in post-mortem cerebellum', *PLoS One*, 2014, 9(2)
- 61) Skaar DA et al, 'Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism', *Molecular Psychiatry*, 2005, 10(6): 563-571
- 62) Krebs MO et al, 'Absence of association between a polymorphic GGC repeat in the 50 untranslated region of the reelin gene and autism', *Molecular Psychiatry*, 2002, 7:801–804
- 63) Bonora E et al, 'Analysis of reelin as a candidate gene for autism'. *Molecular Psychiatry*, 2003, 8:885–892
- 64) Devlin B et al, 'Alleles of a reelin CGG repeat do not convey liability to autism in a sample from the CPEA network', *American Journal of Medical Genetics*, 2004, 126B: 46–50

- 65) Li J et al, 'Lack of evidence for an association between WNT2 and RELN polymorphisms and autism', *American Journal of Medical Genetics*, 2004, 126B:51–57
- 66) Wang Z et al, 'Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: an integrated meta-analysis', *American Journal of Medical Genetics*, 2014, 165B(2):192-200
- 67) Viaggi C et al, 'Serotonin abnormalities in Engrailed-2 knockout mice: New insight relevant for a model of Autism Spectrum Disorder', *Neurochemistry International*, 2015, S197-186(15):81-89
- 68) Mequid Na et al, 'A study of blood serotonin and serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR) polymorphism in Egyptian autistic children', *Advanced biomedical research*, 2015, 4:94
- 69) Schauder KB et al, 'Genetic Variation in Serotonin Transporter Modulates Tactile Hyperresponsiveness in ASD', *Research in Autism Spectrum Disorders*, 2015, 10:93-100
- 70) Nyffeler et al, 'Association study in siblings and case-controls of serotonin- and oxytocin-related genes with high functioning autism', *Journal of Molecular Psychiatry*, 2014, 2:1
- 71) LoParo D e Waldman ID, 'The oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with autism spectrum disorder: a meta-analysis', *Molecular Psychiatry*, 2014, 20(5):640-646
- 72) Kim HG et al, 'Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder', *American Journal of Human Genetics*, 2008, 82(1):199–207.
- 73) Abrahams BS e Geschwind DH, 'Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology', *Nature Reviews Genetics*, 9:341-355
- 74) Yang CJ et al, 'The combined role of serotonin and interleukin-6 as biomarker for autism', *Neuroscience*, 2015, 6:284-290
- 75) Pagan C et al, 'The serotonin-N-acetylserotonin-melatonin pathway as a biomarker for autism spectrum disorders', *Translational Psychiatry*, 2014, 4:e479
- 76) Ramocki MB e Zoghbi HY, 'Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes', *Nature*, 2008, 455(7215):912-8
- 77) Hagerman et al, 'Recent advances in fragile X: a model for autism and neurodegeneration'. *Current Opinion in Psychiatry*, 2005, 18(5): 490–496
- 78) Lopez-Rangel E e Lewis ME, 'Further evidence for pigenetic influence of MECP2 in Rett, autism and Angelman's syndromes', *Clinical Genetics*, 2006, 69:23–25
- 79) Gardener H et al, 'Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis', *British Journal of Psychiatry*, 2009, 195(1):7–14.
- 80) Sandin S et al, 'Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and meta-analysis', *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 2012, 51(5):477–486
- 81) Kolevson A et al, 'Prenatal and perinatal risk factors for autism: A review and integration of findings', *Archive of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 2007, 161:326–333.
- 82) Lauritsen MB et al, 'Effects of familial risk factors and place of birth on the risk of autism: a nationwide register-based study', *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 2005, 46:963–971
- 83) Hultman CM et al, 'Perinatal risk factors for infantile autism', *Epidemiology*, 2002, 13:417–442
- 84) Gilbert et al, 'Autism in immigrants: children born in Sweden to mothers born in Uganda', *Journal of intellectual disability research*, 1995, 39(2):141-144
- 85) Sampino S et al, 'Grand-paternal age and the development of autism-like symptoms in mice progeny', *Translational Psychiatry*, 2014, 4:1-7
- 86) Reichenberg et al, 'Advancing paternal age and autism', *Archive of Genetics in Psychiatry*, 2006, 63:1026–1032
- 87) Shi L at al, 'Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: the virus is not detected in the fetus', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2005, 23(2-3):299-305

- 88) Weir et al, 'Preliminary evidence of neuropathology in nonhuman primates prenatally exposed to maternal immune activation', *Brain, behavior and immunity*, 2015, S0889-1591(15)00080-X
- 89) Mazina et al, 'Epigenetics of autism-related impairment: copy number variation and maternal infection', *Journal of developmental and behavioral pediatrics*, 2015, 36(2):61-67
- 90) Engman et al, 'Prenatal acquired cytomegalovirus infection should be considered in children with autism', *Acta paediatrica*, 2015, [Epub ahead of print]
- 91) Fang et al, 'Prenatal Infection and Autism Spectrum Disorders in Childhood: A Population-Based Case-Control Study in Taiwan', *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 2015, [Epub ahead of print]
- 92) George B et al, 'CDC Kerala 13: Antenatal, natal and postnatal factors among children (2-6 y) with autism--a case control study', *Indian Journal of Pediatrics*, 2014, 81(Supp2):S133-S137
- 93) Lyall K et al, 'Pregnancy complications and obstetric suboptimality in association with autism spectrum disorders in children of the Nurses', Health Study II', *Autism Research*, 2012, 5: 21–30
- 94) Langridge AT et al, 'Maternal conditions and perinatal characteristics associated with autism spectrum disorder and intellectual disability', *PLoS one*, 2013, 8(1)
- 95) Xiang AH et al, 'Association of maternal diabetes with autism in offspring', *JAMA*, 2015, 313(14):1425-1434
- 96) Guinchat V et al, 'Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism', *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 2012, 91: 287–300
- 97) Andersen SL et al, 'Attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder in children born to mothers with thyroid dysfunction: a Danish nationwide cohort study', *BJOG*, 2014, 121(11):1365-1374
- 98) Román GC et al, 'Association of gestational maternal hypothyroxinemia and increased autism risk', *Annals of Neurology*, 2013, 74(5):733-742
- 99) Pop VJ et al, 'Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy', *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 1999, 50(2):149-155
- 100) Ghassabian A et al, 'Maternal thyroid function during pregnancy and behavioral problems in the offspring: the generation R stud', *Pediatric Research*, 2011, 69(5):454-459
- 101) Henrichs J et al, 'Maternal thyroid function during early pregnancy and cognitive functioning in early childhood: the generation R study', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2010, 95(9):4227-4234
- 102) Lyall K et al, 'Maternal immune-mediated conditions, autism spectrum disorders, and developmental delay', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2014, 44(7):1546-1555
- 103) Tanne JH, 'Maternal obesity and diabetes are linked to children's autism and similar disorders', *BMJ*, 2012, 344:e2768
- 104) Krakowiak P et al, 'Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders', 2012, *Pediatrics*, 129(5):e1121-1128
- 105) Larsson HJ et al, 'Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status', *American Journal of Epidemiology*, 2005, 161(10):916-925
- 106) Ornoy A et al, 'Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD)', *Reproductive Toxicology*, 2015, Epub ahead of print
- 107) Cheaha D et al, 'Characterization of in utero valproic acid mouse model of autism by local field potential in the hippocampus and the olfactory bulb', *Neuroscience research*, 2015, Epub ahead of print
- 108) Zhao G et al, 'Study of the serum levels of polyunsaturated fatty acids and the expression of related liver metabolic enzymes in a rat valproate-induced autism model', *International Journal of Developmental Neurosciences*, 2015, 44:14-21
- 109) Hara Y et al, 'Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model', *Behavioural Brain Research*, 2015, 289:39-47

- 110) Al-Amin MM et al, 'Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism', *Behavioural Brain Research*, 2015, 286:112-121
- 111) Christianson AL et al, 'Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs', *Developmental Medicine and Child Neurology*, 1994, 36:361–369
- 112) Williams G, 'Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association', *Developmental Medicine and Child Neurology*, 2001, 43: 202–206
- 113) Moore SJ et al, 'A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes', *Journal of Medical Genetics*, 2000, 37:489–497
- 114) Rasalam AD et al, 'Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder', *Developmental Medicine and Child Neurology*, 2005, 47:551–555
- 115) Christensen J et al, 'Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism', *JAMA*, 2013, 309:1696–1703
- 116) Stromland K et al, 'Autism in thalidomide embryopathy: a population study', *Developmental Medicine and Child Neurology*, 1994, 36:351–356
- 117) Ito T et al, 'Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity', *Science*, 2010, 327:1345–1350
- 118) Bandim JM et al, 'Autism and mobius sequence an exploratory study of children in northeastern Brazil', *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 2003, 61:181–185
- 119) Johansson M et al, 'Autistic spectrum disorders in mobius sequence: a comprehensive study of 25 individuals', *Developmental Medicine and Child Neurology*, 2001, 43: 338–345
- 120) Perrone-McGovern K et al, 'Prenatal and Perinatal Factors Related to Autism, IQ, and Adaptive Functioning', *The Journal of Genetic Psychology: Research and Theory on Human Development*, 2015, 176:1
- 121) Hviid A et al, 'Use of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors during Pregnancy and Risk of Autism', *New England Journal of Medicine*, 2013, 369:2406-15
- 122) Sorensen MJ et al, 'Antidepressant exposure in pregnancy and risk of autism spectrum disorders', *Clinical Epidemiology*, 2013, 5:449-459
- 123) Rai D et al, 'Parental depression, maternal antidepressant use during pregnancy, and risk of autism spectrum disorders: population based case–control study', *BMJ*, 2013, 346:2059
- 124) Gidaya NB et al, 'In utero exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and risk for autism spectrum disorder', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2014, 44:2558–2567
- 125) Croen LA et al, 'Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders', *Archive of Genetics in Psychiatry*, 2011, 68:1104–1112
- 126) Harrington RA et al, 'Prenatal SSRI use and offspring with autism spectrum disorder or developmental delay', *Pediatrics*, 2014, 133: e1241–e1248
- 127) Torres AR, 'Is fever suppression involved in the etiology of autism and neurodevelopmental disorders?' *BMC Pediatrics*, 2003, 3:9
- 128) Becker KG e Schultz ST, 'Similarities in features of autism and asthma and a possible link to acetaminophen use', *Medical Hypotheses*, 2010, 74:7–11
- 129) Bauer AZ e Kriebel D, 'Prenatal and perinatal analgesic exposure and autism: an ecological link', *Environmental Health*, 2013; 12: 41
- 130) Singer L et al, 'Neurodevelopmental effects of cocaine', *Clinical Perinatology*, 1993, 20:245–262
- 131) Harris SR et al, 'Autistic behaviors in offspring of mothers abusing alcohol and other drugs: a series of case reports', *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1996, 19:660–665
- 132) Davis E et al, 'Autism and developmental abnormalities in children with perinatal cocaine exposure', *Journal of the National Medical Association*, 1992, 84:315–319

- 133) Nanson JL, 'Autism in fetal alcohol syndrome: a report of six cases', *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1992, 16:558–565
- 134) Aronson M et al, 'Attention deficits and autistic spectrum problems in children exposed to alcohol during gestation: a follow-up study', *Developmental Medicine and Child Neurology*, 1997, 39:583–587
- 135) Landgren M et al, 'Prenatal alcohol exposure and neurodevelopmental disorders in children adopted from Eastern Europe', *Pediatrics*, 2010, 125:e1178–e1185
- 136) Eliassen M et al, 'Prenatal alcohol exposure and autistic spectrum disorders – a population-based prospective study of 80,552 children and their mothers', *International Journal of Epidemiology*, 2010, 39:1074–1081
- 137) Larsson M et al, 'Associations between indoor environmental factors and parental-reported autistic spectrum disorders in children 6–8 years of age', *Neurotoxicology*, 2009, 30:822–831
- 138) Tran PL et al, 'Smoking during pregnancy and risk of autism spectrum disorder in a Finnish national birth cohort', *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 2013, 27:266–274
- 139) Kalkbrenner AE, 'Maternal smoking during pregnancy and the prevalence of autism spectrum disorders, using data from the autism and developmental disabilities monitoring network', *Environmental Health Perspectives*, 2012, 120:1042–1048
- 140) Lee BK et al, 'Brief report: maternal smoking during pregnancy and autism spectrum disorders', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2012, 42: 2000–2005
- 141) Rosen BN, 'Maternal smoking and autism spectrum disorder: a meta-analysis', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2014
- 142) Cheslack-Postava K et al, 'Maternal serum persistent organic pollutants in the Finnish Prenatal Study of Autism: A pilot study', *Neurotoxicology Teratology*, 2013, 38:1-5
- 143) Eskenazi B et al, 'Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children', *Environmental Health Perspective*, 2007, 115(5):792-798
- 144) Rauh VA et al, 'Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide', *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2012, 109(20):7871-7876
- 145) Roberts EM et al, 'Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California central valley', *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115: 1482–1489
- 146) Shelton JF et al, 'Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the charge study', *Environmental Health Perspectives*, 2014, 122: 1103–1109
- 147) Volk HE et al, 'Residential proximity to freeways and autism in the CHARGE study', *Environmental Health Perspective*, 2011, 119:873–877
- 148) Volk HE et al, 'Traffic related air pollution, particulate matter, and autism', *Archive of Genetics Psychiatry*, 2012, pp. 1–7
- 149) Kalkbrenner AE et al, 'Perinatal exposure to hazardous air pollutants and autism spectrum disorders at age 8', *Epidemiology*, 2010, 21:631–641
- 150) Roberts AL et al, 'Perinatal air pollutant exposures and autism spectrum disorder in the children of nurses' health study II participants', *Environmental Health Perspective*, 2013, 121:978–984.
- 151) von Ehrenstein OS et al, 'In utero exposure to toxic air pollutants and risk of childhood autism', *Epidemiology*, 2014, 25(6):851-858
- 152) Windham GC et al, 'Autism spectrum disorders in relation to distribution of hazardous air pollutants in the San Francisco bay area', *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114:1438–1444.
- 153) Talbott E et al, 'The Association of National Air Toxics Assessment Exposures and the Risk of Childhood Autism Spectrum Disorder: A Case Control Study', *American Association for Aerosol Research*, 2014, Abstract Submission – University of Pittsburg

- 154) Jung CR et al, 'Air pollution and newly diagnostic autism spectrum disorders: a population based cohort study in Taiwan', *PLoS One*, 2013, 8:e75510
- 155) Raz R et al, 'Autism spectrum disorder and particulate matter air pollution before, during, and after pregnancy: a nested case-control analysis within the Nurses' Health Study II Cohort', *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(3):264-270
- 156) Gong T et al, 'Exposure to Air Pollution From Traffic and Neurodevelopmental Disorders in Swedish Twins', *Twin Research and Human Genetics*, 2014, 17(6):553-562
- 157) McCanlies EC et al, 'Parental occupational exposures and autism spectrum disorder', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2012, 42:2323-2334
- 158) Kinney DK et al, 'Environmental risk factors for autism: Do they help cause de novo genetic mutations that contribute to the disorder?', *Medical Hypotheses*, 2010, 74:102-106
- 159) Stein D et al, 'Obstetric complications in individuals diagnosed with autism and in healthy controls', *Comprehensive Psychiatry*, 2006, 47(1):69-75
- 160) Maimburg RD e Vaeth M, 'Perinatal risk factors and infantile autism', *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 2006, 114(4):257-364
- 161) Polo-Kantola P et al, 'Obstetric risk factors and autism spectrum disorders in Finland', *Journal of Pediatrics*, 2014, 164(2):358-365
- 162) Eaton WW et al, 'Obstetric complications and risk for severe psychopathology in childhood', *Journal of Autism Developmental Disorders*, 2001, 31(3):279-285
- 163) Kolevzon A et al, 'Prenatal and Perinatal Risk Factors for Autism: A Review and Integration of Findings', *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*; 2007, 161(4):326-333
- 164) Glasson EJ et al, 'Perinatal factors and the development of autism: a population study', *Archive of general psychiatry*, 2004, 61(6):618-627
- 165) Deb S et al, 'A comparison of obstetric and neonatal complications between children with autistic disorder and their siblings', *Journal of Intellectual Disability Research*, 1997, 41(1):81-86
- 166) Kanner L, 'Autistic disturbances of affective contact', *Nervous Child*, 1943, 2:217-250
- 167) Theodore M et al, 'Contemporary Directions in Psychopathology - Scientific Foundations of the DSM-V and ICD-11', *New York City: Guilford Press*, 2011, p.555.
- 168) "Controversial autism article should be retracted – Psychological Society of Ireland", *The Journal*, 2012-02-09, <http://jrnl.ie/350914>
- 169) Wakefield AJ et al, 'Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children', *The Lancet*, 1998, 351:637-641
- 170) Godlee F et al, 'Wakefield's article linking MMR vaccine and autism was fraudulent', *British Medical Journal*, 2011, 342:c7452
- 171) Madsen KM et al, 'A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism', *New England Journal of Medicine*, 2002, 347(19):1477-1482.
- 172) Fombonne E et al, 'Pervasive developmental disorders in Montreal, Quebec, Canada: prevalence and links with immunizations', *Pediatrics*, 2006, 118(1):e139-150
- 173) Doja A e Roberts W, 'Immunizations and autism: a review of the literature', *The Canadian Journal of neurological Sciences*, 2006, 33(4):341-346
- 174) Taylor B, 'Vaccines and the changing epidemiology of autism', *Child: Care Health and Development*, 2006, 32(5):511-519.
- 175) Brown NJ et al, 'Vaccination, seizures and vaccine damage', *Current opinion on neurology*, 2007, 20(2):181-187

- 176) Gerber P e Offit P, 'Vaccines and Autism: A Tale of Shifting Hypotheses', *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48(4): 456–461.
- 177) Taylor LE et al, 'Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies', *Vaccine*, 2014, 32(29):3623-3629
- 178) Jain A et al, 'Autism Occurrence by MMR Vaccine Status Among US Children With Older Siblings With and Without Autism', *JAMA*, 2015, 313(15): 1534-1540
- 179) Eaton L, 'Measles cases in England and Wales rise sharply in 2008', *British Medical Journal*, 2009, 338:b533
- 180) Schmidt RJ et al, 'Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism', *Epidemiology*, 2011, 22:476–485
- 181) Schmidt RJ et al, 'Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the charge (childhood autism risks from genetics and environment) case–control study', *American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 96:80–89
- 182) Surén P et al, 'Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children', *JAMA*, 2013, 309:570-577
- 183) Kirsten TB et al, 'Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure', *Life Sciences*, 2015, 130:12–17
- 184) Kirsten TB et al, 'Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring', *Neuroimmunomodulation*, 2010, 17:240–251.
- 185) Kirsten TB et al, 'Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide', *Journal of Neurosciences Research*, 2012, 90:1903–1912.
- 186) Correia CT et al, 'Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism', *Genes Brain and Behavior*, 2010, 9:841–848.
- 187) Miyazaki K et al, 'Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study', *Brain and Development*, 2004, 26
- 188) Kocovska E et al, 'Vitamin D in the general population of young adults with autism in the Faroe Islands', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2014, 44:2996–3005
- 189) Gong ZL et al, 'Serum 25-hydroxyvitamin D levels in Chinese children with autism spectrum disorders', *Neuroreport*, 2014, 25:23–27
- 190) Cannell JJ, 'Autism and vitamin D', *Medical Hypotheses*, 2008; (70). 750–759.
- 191) Cannell JJ, 'Autism, will vitamin D treat core symptoms?', *Medical Hypotheses*, 2013; (81). 195–198
- 192) Fernell E et al, 'Serum levels of 25-hydroxyvitamin D in mothers of Swedish and of Somali origin who have children with and without autism', *Acta paediatrica*, 2010, 99:743-747
- 193) Whitehouse AJ et al, 'Maternal vitamin D levels and the autism phenotype among offspring', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2013, 43:1495–1504
- 194) Georgieff MK et al, 'The Role of Iron in Neurodevelopment: Fetal Iron Deficiency and the Developing Hippocampus', *Biochemical Society Transactions*, 2008, 36(6): 1267–1271.
- 195) Hergüner S et al, 'Ferritin and iron levels in children with autistic disorder', *European Journal of Pediatrics*, 2012, 171(1):143-6
- 196) Schmidt RJ et al, 'Maternal intake of supplemental iron and risk of autism spectrum disorder', *American Journal of Epidemiology*, 2014, 180(9):890-900
- 197) Steinman G e Mankuta D, 'Breastfeeding as a possible deterrent to autism – A clinical perspective', *Medical Hypotheses*, 2013, 81:999–1001
- 198) Schultz ST et al, 'Breastfeeding, infant formula supplementation, and Autistic Disorder: the results of a parent survey', *International Breastfeeding Journal*, 2006, 1:16

ANEXOS

A) Persistent deficits in social communication and social interaction across multiple contexts, as manifested by the following, currently or by history:

1. Deficits in social-emotional reciprocity, ranging, for example, from abnormal social approach and failure of normal back-and-forth conversation; to reduced sharing of interests, emotions, or affect; to failure to initiate or respond to social interactions.
2. Deficits in nonverbal communicative behaviors used for social interaction, ranging, for example, from poorly integrated verbal and nonverbal communication; to abnormalities in eye contact and body language or deficits in understanding and use of gestures; to a total lack of facial expressions and nonverbal communication.
3. Deficits in developing, maintaining, and understand relationships, ranging, for example, from difficulties adjusting behavior to suit various social contexts; to difficulties in sharing imaginative play or in making friends; to absence of interest in peers.

B) Restricted, repetitive patterns of behavior, interests, or activities, as manifested by at least two of the following, currently or by history:

1. Stereotyped or repetitive motor movements, use of objects, or speech (e.g., simple motor stereotypes, lining up toys or flipping objects, echolalia, idiosyncratic phrases).
2. Insistence on sameness, inflexible adherence to routines, or ritualized patterns of verbal or nonverbal behavior (e.g., extreme distress at small changes, difficulties with transitions, rigid thinking patterns, greeting rituals, need to take same route or eat same food every day).
3. Highly restricted, fixated interests that are abnormal in intensity or focus (e.g., strong attachment to or preoccupation with unusual objects, excessively circumscribed or perseverative interests).
4. Hyper or hyporeactivity to sensory input or unusual interest in sensory aspects of the environment (e.g. apparent indifference to pain/temperature, adverse response to specific sounds or textures, excessive smelling or touching of objects, visual fascination with lights or movement).

- C) Symptoms must be present in the early developmental period (but may not become fully manifest until social demands exceed limited capacities, or may be masked by learned strategies in later life).
- D) Symptoms cause clinically significant impairment in social, occupational, or other important areas of current functioning.
- E) These disturbances are not better explained by intellectual disability (intellectual developmental disorder) or global developmental delay. Intellectual disability and autism spectrum disorder frequently co-occur; to make comorbid diagnoses of autism spectrum disorder and intellectual disability, social communication should be below that expected for general developmental level.

Tabela 1: Critérios de diagnóstico das Perturbações do Espectro do Autismo, definidas pela Associação Psiquiátrica Americana em 2013. (2)

Severity Level for ASD	Social Communication	Restricted interests & repetitive behaviours
Level 3 - 'Requiring very substantial support'	Severe deficits in verbal and nonverbal social communication skills cause severe impairments in functioning; very limited initiation of social interactions and minimal response to social overtures from others	Preoccupations, fixated rituals and/or repetitive behaviours markedly interfere with functioning in all spheres. Marked distress when rituals or routines are interrupted; very difficult to redirect from fixated interest or returns to it quickly.
Level 2 - 'Requiring substantial support'	Marked deficits in verbal and nonverbal social communication skills; social impairments apparent even with supports in place; limited initiation of social interactions and reduced or abnormal response to social overtures from others	RRBs and/or preoccupations or fixated interests appear frequently enough to be obvious to the casual observer and interfere with functioning in a variety of contexts. Distress or frustration is apparent when RRB's are interrupted; difficult to redirect from fixated interest
Level 1 - 'Requiring support'	Without supports in place, deficits in social communication cause noticeable impairments. Has difficulty initiating social interactions and demonstrates clear examples of atypical or unsuccessful responses to social overtures of others. May appear to have decreased interest in social interactions	Rituals and repetitive behaviours (RRB's) cause significant interference with functioning in one or more contexts. Resists attempts by others to interrupt RRB's or to be redirected from fixated interest.

Tabela 2: Graus de severidade das Perturbações do Espectro do Autismo, definidas pela Associação Psiquiátrica Americana em 2013. (2)

Scale (see legend)	Uses	Age Range	Method of Administration	Population Studied	Scale characteristics	Reference
ABC	screening	children	parent rated	AD	57 items, scale 1-4	Krug <i>et al.</i> , 1980 ⁴³
CARS	screening	children	clinician rated	AD	15 items, scale 1-4	Schopler <i>et al.</i> , 1980 ⁴⁴
M-CHAT	screening	toddlers	parent rated	AD	23 items, yes/no	Robins <i>et al.</i> , 2001 ⁴⁵
CSBS-DP-IT-Checklist	screening	toddlers	parent rated	AD	24 items	Wetherby <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁶
ASQ	screening	child/adult	parent rated	AD/AspD	40 items, yes/no	Berument <i>et al.</i> , 1999 ⁴⁷
AQ	screening	child/adult	self or parent rated	AspD	50 items, scale 0-3	Baron-Cohen <i>et al.</i> , 2001 ⁴⁸
CAST	screening	4-11 years	parent rated	AspD	37 items, yes/no	Scott <i>et al.</i> , 2002 ⁴⁹
ASDS	screening	5-18 years	parent or teacher rated	AspD	50 items, yes/no	Myles <i>et al.</i> , 2000 ⁵⁰
GADS	screening	3-22 years	parent or teacher rated	AspD	32 items, scale 0-3	Gilliam, 2001 ⁵¹
ASDI	screening	child/adult	interview + clinician rated	AspD	50 items, yes/no	Gillberg <i>et al.</i> , 2001 ⁵²
SRS	screening	4-18 years	parent or teacher rated	AspD	65 items, scale 1-4	Constantino <i>et al.</i> , 2003 ⁵³
ADI	diagnostic	child/adult	interview + clinician rated	AD/AspD	see text	Lord <i>et al.</i> , 2003 ⁵⁴
DISCO	diagnostic	child/adult	interview + clinician rated	AD/AspD	see text	Wing <i>et al.</i> , 2002 ⁵⁵
ADOS	diagnostic	child/adult	semi-structured interactive session	AD/AspD	see text	Lord <i>et al.</i> , 1994 ⁵⁶

Note: ABC = Autism Behavior Checklist; AD = autism disorder; ADI = Autism Diagnostic Interview—Revised; ADOS = Autism Diagnostic Observation Schedule; AQ = Autism Quotient; ASDI = Asperger Syndrome Diagnostic Interview; ASDS = Asperger Syndrome Diagnostic Scale; AspD = Asperger's disorder; ASQ = Autism Screening Questionnaire; CARS = Childhood Autism Rating Scale; CAST = Childhood Autism Screening Test; M-CHAT = Checklist for Autism in Toddlers; CSBS-DP-IT-Checklist = Communication and Symbolic Behavior Scales Developmental Profile Infant-Toddler Checklist; DISCO = Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders; GADS = Gilliam Asperger's Disorder Scale; Parent = primary caregiver; SRS = Social Responsiveness Scales.

^aNote that these instruments may need to be revised to provide evidence of validity for DSM-5 ASD and supplement but DO NOT REPLACE clinical diagnosis.

Tabela 3: Instrumentos de avaliação utilizados na detecção e estudo das Perturbações do Espectro do Autismo, definidos pela Academia Americana de Psiquiatria da Criança e do Adolescente em 2014. (9)

CO-MORBILIDADES ASSOCIADAS À PERTURBAÇÃO DO ESPETRO DO AUTISMO

Alterações do sono

Doentes com PEA manifestam várias alterações do seu padrão de sono tais como insónias, despertares noturnos, diminuição das horas de sono noturnas e despertar matinal precoce (21). A queixa mais indicada pelos pais e cuidadores é a insónia, que segundo *Krakowiak et al.*, afeta 53% das crianças com PEA, um valor 1.7 vezes superior ao grupo de controlo (22). Também a equipa de *Sivertsen et al.* colocando um foco na componente crónica desta patologia, concluiu que a ocorrência de insónia crónica é dez vezes maior nos doentes com PEA. Esta conclusão foi possível após ser estudada a taxa de remissão da insónia, que é de apenas 8.3% nos doentes com PEA, face a 52,4% no grupo de controlo (23). Quanto à incidência de parasónias, sonambulismo, discurso durante o sono, bruxismo, pesadelos e terrores noturnos, não há ainda consenso quanto à sua maior ou igual afeição destes doentes em relação à população em geral (24).

Distúrbios Gastro-intestinais

Estes distúrbios são extremamente reportados pelos pais e pelos pediatras das crianças com PEA (25) e parecem estar associados a uma maior severidade da PEA. Isto é o que nos dizem dados de estudos como o de *Nikolov et al.* que conclui que "entre as crianças com Perturbação do Espectro do Autismo, comparando as crianças com e sem distúrbios gastrointestinais, o primeiro grupo apresenta uma maior severidade a nível de sintomatologia ansiosa, irritabilidade e défice de sociabilização, apresentando também a longo prazo uma menor resposta à terapêutica instituída" (26). Assim, alguns autores defendem que a patologia gastrointestinal deveria fazer parte dos critérios de distinção de severidade da Perturbação do Espectro do Autismo (27), definidas pela Associação Psiquiátrica Americana em 2013 (tabela 2 em anexo).

No total, cerca de 23% da população com PEA apresenta algum tipo de distúrbio gastrointestinal (26), sendo os mais prevalentes a obstipação (9%), a diarreia (4%) e a apresentação de ambos (2%) (28). Entre as co-morbilidades mais encontradas destacam-se a Doença Inflamatória Intestinal, numa proporção de 0.83% para 0.54% na população em geral, e distúrbios intestinais não especificados numa percentagem que ultrapassa o dobro da encontrada na população sem PEA, 11.74% face a 4.5% (29). É contudo necessário ter em conta que estes doentes estão muitas vezes a cumprir tratamentos farmacológicos que influenciam a sua função gastrointestinal, tais como antagonistas dos recetores da dopamina que causam diarreia e obstipação e ansiolíticos que causam flatulência e irritação cólica (28). Também a própria PEA poderá ser a causa destes distúrbios, devido a comportamentos alimentares errados (25).

<p><u>Distúrbios Imunológicos</u></p>	<p>Há mais de 40 anos que é conhecida a relação entre a Perturbação do Espectro do Autismo e as anomalias do sistema imune. Contudo, apenas recentemente estudos sobre estas alterações obtiveram resultados que permitem relacionar as disfunções imunes com um possível mecanismo fisiopatológico destes distúrbios e a sua contribuição para o risco de PEA – a "Teoria Auto-imune" (30). Em 2012, <i>Kohane et al</i>, objetivou uma prevalência de Diabetes mellitus tipo I (DM1) de 0.79% nos doentes com PEA face a 0.34% na população em geral e uma prevalência de Doença inflamatória intestinal numa proporção de 0.83% para 0.54% (29). Estes valores aumentam significativamente com a idade, sendo que comparando crianças com PEA e jovens adultos com esta mesma perturbação, no segundo grupo a prevalência de DM1 quadriplica, atingindo valores superiores a 2%. (28)</p>
<p><u>Distúrbios Psiquiátricos</u></p>	<p>Doentes com PEA apresentam uma maior prevalência de co-morbilidades psiquiátricas em relação à população em geral, sendo que 70% dos doentes manifestam algum tipo de afeção (31). Entre estas destacam-se as fobias, encontradas em quase metade dos doentes (tripanofobia/agorafobia em 32% dos casos e fonofobia em 10%). No seu estudo coorte, <i>Leyfer et al</i> encontram uma prevalência também muito elevada de patologias psiquiátricas como os Distúrbios obsessivo-compulsivos, o Transtorno de défice de atenção e hiperatividade e a depressão, apresentando prevalências de 37%, 31% e 24%, correspondentemente. (31) A esquizofrenia é também uma patologia muito associada a estes distúrbios, apresentando-se com um valor dez vezes superior (2.43%) (28). A associação entre distúrbios é frequente, sendo que cerca de 30% dos doentes com PEA apresentam na sua história clínica pelo menos três destes diagnósticos psiquiátricos (31,32).</p>
<p><u>Síndromes genéticas</u></p>	<p>Sabe-se que algumas Síndromes genéticas estão associadas a distúrbios do neurodesenvolvimento, e que cerca de 10% dos doentes com PEA têm também uma síndrome genética associada (33). Contudo, apesar de esta correlação ser comumente aceite, ainda há muito por conhecer nesta área, nomeadamente a nível dos mecanismo fisiopatológicos envolvidos. O Síndrome do X frágil é um dos distúrbios mais regularmente associados à PEA, partilhando mesmo alguns sintomas com esta, tais como o défice social interativo e a dificuldade de comunicação. Entre 15-30% dos doentes com este síndrome apresentam associação diagnóstica com a PEA, e 3-8% dos doentes com PEA possuem</p>

	<p>também Síndrome do X frágil (34,35). A Esclerose tuberosa é outra patologia comumente associada à PEA, sendo que 40-45% dos indivíduos com esclerose tuberosa têm também PEA, e 1-4% dos doentes com PEA apresentam concomitantemente esta síndrome (36). Analisando estes números percebemos que estas e outras síndromes genéticas estão significativamente associadas à PEA. Síndromes como a Síndrome de Down, Angelmann, Prader-Willi, Tourette e Neurofibromatose estão também associadas a estes distúrbios (33-35), podendo mesmo apresentar uma clínica <i>autistic-like</i>, que em alguns casos culmina em erros de diagnóstico, como por exemplo na distinção entre Síndrome de Rett e Perturbação do Espectro do Autismo (cerca de 18% dos casos) (37).</p>
<u>Epilepsia</u>	<p>Vários estudos confirmam a existência de uma associação bem estabelecida entre a Perturbação do Espectro do Autismo e a ocorrência de epilepsia. A epilepsia é frequentemente descrita em associação com este distúrbio em cerca de 30% dos casos (38,39), existindo um pico na adolescência, e que excede a prevalência na população em geral (0.7%-1%) (40). Apesar de a prevalência encontrada nas diversas publicações disponíveis não ser unânime, verificando-se uma dispersão de dados entre os 5% e os 45% (41), todos estes valores continuam a ser superiores àqueles descritos na população em geral. O sexo masculino tem uma propensão 4 a 5 vezes maior de vir a desenvolver uma Perturbação do Espectro do Autismo contudo, quando associado à epilepsia é o sexo feminino que tende a ser mais afetado por esta co-morbilidade, sendo mesmo considerado como um fator de risco (42). <i>Billstredt</i> et al, seguindo por um período de 13 a 22 anos 120 indivíduos com PEA, concluiu 41% dos doentes mantinham ainda episódios de epilepsia à data do follow-up (43), pelo que o prognóstico adaptativo das crianças com PEA em associação com epilepsia não é favorável, requerendo estes indivíduos um maior suporte social e clínico mesmo na idade adulta (41,44).</p>
<u>Outros</u>	<p>Segundo o <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>, para além das co-morbilidades supracitadas, doentes com PEA apresentam também uma maior prevalência de patologia dermatológica (eczemas, dermatite de contacto), distúrbios respiratórios (asma e infeções), otites, cefaleias e enxaquecas (28).</p>

Tabela 4: Co-morbilidades associadas à Perturbação do Espectro do Autismo - síntese (21-44)

Condition	Matching factor adjusted ^a	Matching factor and maternal age adjusted ^b
Any autoimmune disease	1.43 (0.95, 2.14)	1.43 (0.96, 2.14)
Thyroid disease	0.99 (0.62, 1.60)	0.99 (0.61, 1.60)
Psoriasis	1.28 (0.47, 3.44)	1.27 (0.47, 3.43)
Rheumatoid arthritis	1.12 (0.42, 2.98)	1.11 (0.42, 2.97)
Asthma	1.00 (0.69, 1.44)	1.00 (0.69, 1.44)
Allergies	0.96 (0.70, 1.31)	0.97 (0.71, 1.32)
Food allergy	1.23 (0.71, 2.11)	1.23 (0.73, 2.06)
Dairy allergy	4.26 (1.12, 16.2)	4.31 (1.13, 16.5)
Fruit allergy	1.26 (0.59, 2.69)	1.27 (0.60, 2.70)
Nut allergy	1.41 (0.26, 7.61)	1.42 (0.27, 7.64)
Seafood	2.76 (0.88, 8.67)	2.73 (0.87, 8.57)
Environmental	1.14 (0.82, 1.60)	1.15 (0.82, 1.61)
Dust	0.73 (0.33, 1.60)	0.74 (0.33, 1.65)
Pets	0.50 (0.24, 1.01)	0.50 (0.25, 1.02)
Seasonal	1.09 (0.75, 1.58)	1.09 (0.75, 1.58)
Medication allergy	1.19 (0.85, 1.67)	1.20 (0.85, 1.68)
Eczema	1.44 (0.84, 2.48)	1.43 (0.84, 2.46)
Respiratory	0.89 (0.54, 1.49)	0.90 (0.54, 1.50)

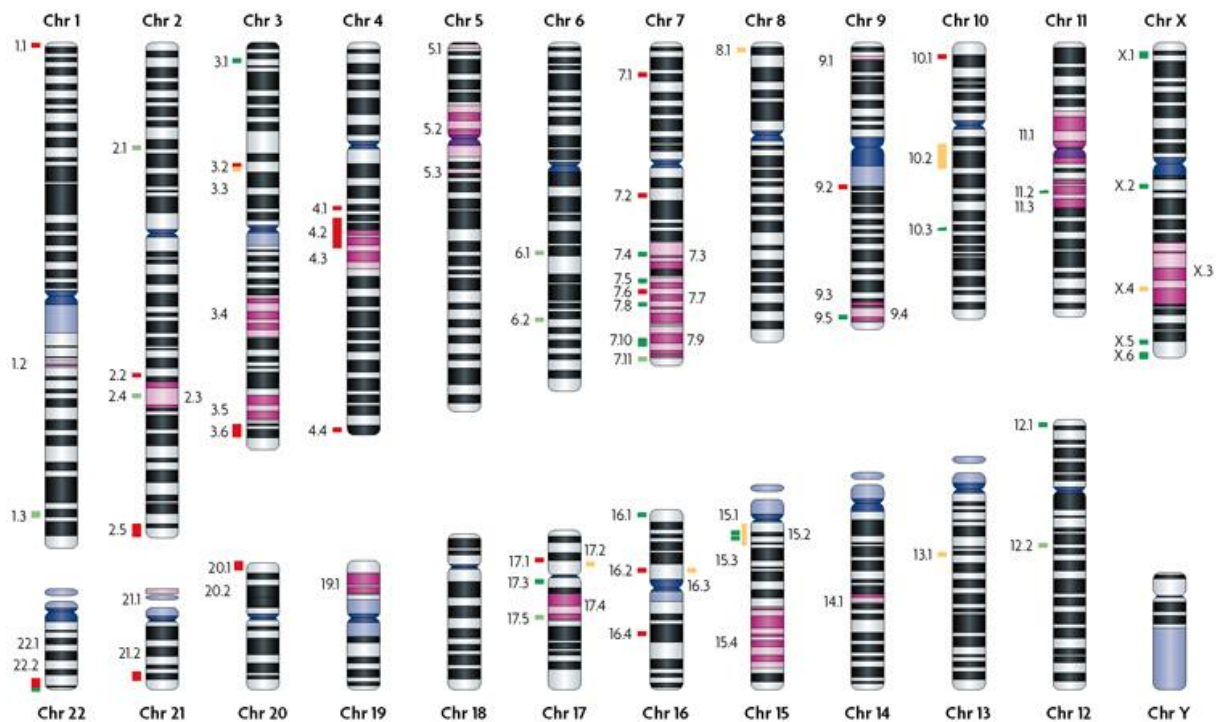
Items in bold indicate statistical significance

Tabela 5: Associação entre doenças imunes maternas e a Perturbação do Espectro do Autismo (99)

	Mild-moderate ID (N=4339)	Severe ID (N=237)	ASD with ID (N=727)	ASD without ID (N=452)
Maternal diabetes	1.27 (1.00, 1.61)	1.25 (0.46, 3.39)	1.03 (0.62, 1.69)	1.30 (0.69, 2.45)
Threatened abortion	0.86 (0.73, 1.02)	1.06 (0.56, 2.01)	1.46 (1.09, 1.96)	1.27 (0.87, 1.85)
Pregnancy hypertension	1.54 (1.40, 1.71)	1.35 (0.87, 2.08)	1.34 (1.05, 1.71)	0.73 (0.50, 1.07)
Asthma	1.32 (1.16, 1.51)	1.35 (0.76, 2.38)	0.99 (0.71, 1.38)	1.44 (1.00, 2.07)
Urinary Tract Infection	1.38 (1.20, 1.57)	1.48 (0.84, 2.62)	1.03 (0.69, 1.54)	0.93 (0.56, 1.57)
Placenta Praevia	1.64 (1.16, 2.31)	0.77 (0.11, 5.51)	0.87 (0.32, 2.33)	1.07 (0.34, 3.34)
Placenta Abruptio	1.65 (1.17, 2.31)	2.53 (0.81, 7.93)	1.76 (0.78, 3.94)	2.71 (1.21, 6.10)
Other APH	1.62 (1.37, 1.92)	0.99 (0.41, 2.41)	1.13 (0.72, 1.79)	0.90 (0.48, 1.69)

^aadjusted for birth year and sociodemographics.

Tabela 6: Comorbilidades maternas e complicações da gravidez associadas à Perturbação do Espectro do Autismo (93)



ID	Feature	Position	Refs	ID	Feature	Position	Refs	ID	Feature	Position	Refs
1.1	Loss	1p36	3	7.4	RELN	7q22	117-121	15.3	Gain	15q11-15q13	4
1.2	Linkage	1q21-1q23	116	7.5	MET	7q31	70,123	15.4	Linkage	15q22-15q26	5
1.3	DISC1	1q42	122	7.6	Loss	7q31	5	16.1	TSC2	16p13	110
2.1	NRXN1	2p16	5,34	7.7	Linkage	7q32-7q34	15	16.2	Loss	16p11	4,20,35,44
2.2	Loss	2q24	4	7.8	CADPS2	7q31	5,45	16.3	Gain	16p11	20,35,44
2.3	Linkage	2q24-2q31	57,58,112	7.9	Linkage	7q34-7q36	14,52,68	16.4	Loss	16q21	5
2.4	SLC25A12	2q24	124-126	7.10	CNTNAP2	7q35-7q36	37-40	17.1	Loss	17p12	5
2.5	Loss	2q37	4	7.11	EN2	7q36	129,130	17.2	Gain	17p12	107
3.1	OTXR	3p25	127,128	8.1	Gain	8p23	5	17.3	SLC6A4	17q11	131-134
3.2	Loss	3p14	4	9.1	Linkage	9p24	5	17.4	Linkage	17q11-17q21	51,54,135
3.3	Gain	3p14	4	9.2	Loss	9q12	5	17.5	ITGB3	17q21	136,137
3.4	Linkage	3q22	15	9.3	Linkage	9q33	5	19.1	Linkage	19p13	140
3.5	Linkage	3q25-3q27	138,139	9.4	Linkage	9q34	15	20.1	Loss	20p13	5
3.6	Loss	3q27-3q28	3	9.5	TSC1	9q34	110	20.2	Loss	20p13	5
4.1	Loss	4q21	3	10.1	Loss	10p14-10p15	4	21.1	Linkage	21q11	55
4.2	Loss	4q21-23	3	10.2	Gain	10q11-10q21	4	21.2	Loss	21q22	3
4.3	Linkage	4q22-4q25	15	10.3	PTEN	10q23	141	22.1	Loss	22q13	4
4.4	Loss	4q35	5	11.1	Linkage	11p12-11p13	5	22.2	SHANK3	22q13	21,22,142,143
5.1	Linkage	5p15	5	11.2	DHCR7	11q13	108	X.1	NLGN4X	Xp22	28
5.2	Linkage	5p13-5q11	140	11.3	Linkage	11q13-11q14	15	X.2	NLGN3	Xq13	28
5.3	Linkage	5q12	5	12.1	CACNA1C	12p13	24	X.3	Linkage	Xq21-Xq25	140
6.1	GRIK2	6q21	144-146	12.2	AVPR1A	12q14-12q15	147	X.4	Gain	Xq24	3
6.2	AH11	6q23	106	13.1	Gain	13q14	5	X.5	FMR1	Xq27	105,148
7.1	Loss	7p21	4	14.1	Linkage	14q23	149	X.6	MECP2	Xq28	109
7.2	Loss	7q11	3	15.1	UBE3A	15q11	102,103				
7.3	Linkage	7q22-7q32	52,111-113	15.2	GABRB3	15q12	25,114,115				

Ilustração 1:

(em cima) Ideograma de cromossomas e genes possivelmente associados à Perturbação do Espectro do Autismo (PEA): Vermelho e Amarelo = mutação de novo, Verde=genes moduladores do risco de PEA e Púrpura=linkage.

(em baixo) Tabela descritiva dos loci atualmente em investigação para a PEA.