

Dante Bruno Avanso Rosan

Investigação de mutações nos genes sinápticos *SHANK2* e
SHANK3 em Transtornos do Espectro do Autismo

São José do Rio Preto
2015

Dante Bruno Avanso Rosan

Investigação de mutações nos genes sinápticos *SHANK2* e
SHANK3 em Transtornos do Espectro do Autismo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte

São José do Rio Preto
2015

Rosan, Dante Bruno Avanzo.
Investigação de mutações nos genes sinápticos *SHANK2* e
SHANK3 em Transtornos do Espectro do Autismo /Dante Bruno
Avanzo Rosan. - São José do Rio Preto, 2015.
f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Agnes Cristina Fett Conte
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética Humana. 2. Autismo. 3. Sináapse. 4. família *SHANK*. I.
Fett-Conte, Agnes Cristina. III. Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV.
Título.

CDU -

Dante Bruno Avanso Rosan

Investigação de mutações nos genes sinápticos *SHANK2* e
SHANK3 em Transtornos do Espectro do Autismo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Agnes Cristina Fett-Conte
UNESP-São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Ana Elizabete Silva
UNESP-São José do Rio Preto

Dr^ª. Karina GriesiOliveira
USP-São Paulo

São José do Rio Preto
25 de fevereiro de 2015

Este trabalho foi realizado em parte no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e em parte no Centro de Estudos do Genoma Humano-USP/SP, com auxílio na forma de bolsa de estudos CNPq e Auxílio a pesquisa – Regular FAPESP, processo n° 2013/14919-6.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Marcelo Rosan e
Adriana F. Avanzo Rosan, por sempre estarem do meu
lado e apoiarem minhas escolhas.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar presente na minha vida e em minhas escolhas.

Á toda minha família, em especial meus pais Marcelo e Adriana por nunca deixarem faltar amor, carinho, apoio e compreensão em minha vida.

Á minha orientadora Porfa. Dra. Agnes Cristina Fett-Conte pela oportunidade, paciência e confiança, por suas orientações e contribuições na formação e desenvolvimento do meu raciocínio científico e principalmente no modo crítico de encarar a Ciência e a vida sempre de frente.

Ás instituições envolvidas neste estudo, IBILCE / UNESP, FAMPER e USP, todos os profissionais envolvidos, e principalmente aos pacientes e suas famílias por sua colaboração para o desenvolvimento do projeto e na minha formação como pessoa.

Á minha coorientadora Profa. Dra. Ana Luiza por me ensinar a respeitar nossos pacientes e me apaixonar pelo Laboratório, por todos os seus ensinamentos e puxões de orelha. Á minha companheira de pesquisa e melhor amiga Patrícia, por estar sempre pronta e solicita a me ensinar, ajudar e socorrer, no laboratório ou fora dele.

As minhas amigas e companheiras do Laboratório de Genética da FAMERP, Fernanda, Paula Curi, Camila, Andréia, Brasilina, Carla, Cristina, Paula Abdala e Valéria, por me acolherem como uma segunda família, pelas conversas e ensinamentos.

Á Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno, por abrir as portas do seu laboratório de Diagnóstico Molecular de Doenças do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (USP/SP). Aos colegas da Sala 200, incríveis pesquisadores, pela paciência, solidariedade e conhecimento compartilhado.

Ao meu irmão por escolha Luiz. Aos amigos de Universidade Gabriela, Isabella, Lara, Luiz Felipe Coxinha, Nayara e Paula. Aos amigos da Casa do Tatrone, Tayrone, Ge, Lukinha, Skeeter, Bitoca e Gui. Aos meus companheiros da OnT, Tiago Mazel, Eduardo Lyra, Caio Kuchiki, Guilherme Bozo, Luiz Gariba e Luiz xLipe. Sem vocês, nada faria sentido.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e Dra. Karina Griesi Oliveira, por aceitarem o convite para avaliar, contribuir e enriquecer este trabalho.

Ao Centro Universitário de Rio Preto, Unirp e a Profa. Dra. Lilian Castiglione, por iniciarem meus conhecimentos científicos.

Ao programa de Pós Graduação em Genética –IBILCE / UNESP, assim como todos os professores, alunos e funcionários que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

“Faça. Ou não faça. Tentativa não há.”
Mestre Yoda

RESUMO

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) são doenças neuropsiquiátricas complexas, com etiologia e manifestações clínicas muito variáveis. Tais manifestações são observadas antes dos três anos de vida. A prevalência é alta na população, com uma proporção de quatro homens afetados para cada mulher afetada. Em apenas 10-25% dos casos um fator etiológico é observado, genético ou ambiental, dependendo da composição da casuística e das técnicas laboratoriais utilizadas. Há descrições de centenas de genes e regiões genômicas associadas com a predisposição, por apresentarem mutações e variações no número de cópias (CNVs) e a maior parte tem expressão no sistema nervoso central, principalmente em sinapses. Entre os genes candidatos, se destacam o *SHANK2* e o *SHANK3*, ainda não estudados em casuísticas brasileiras. No *SHANK2*, localizado em 11q13.2, já foram descritas mutações em sete de seus 25 éxons, enquanto no *SHANK3*, localizado em 22q13 e com 23 éxons, também há descrições de mutações em vários éxons, mas especialmente em três. Muitas mutações nestes dois genes foram observadas em autistas, mas não em indivíduos controles, o que sugere seu envolvimento na etiologia da doença. Este estudo investigou mutações nos éxons 11, 13 e 22 do gene *SHANK2* e nos éxons 2, 6 e 22 do *SHANK3*, que são os mais frequentemente envolvidos nos achados em TEA. O estudo dos seis éxons foi realizado por sequenciamento direto, em 200 afetados e os resultados foram comparados a um banco de dados com os de 566 controles saudáveis. Onze alterações, seis no gene *SHANK2*, uma delas ainda não descrita, e cinco no gene *SHANK3*, todas não descritas anteriormente. Nenhum paciente apresentou mais de uma alteração em *SHANK2* ou *SHANK3*, ou nos dois genes. Os resultados mostraram que mutações nos genes *SHANK2* e *SHANK3* são frequentes na população brasileira com TEA e estão relacionadas com a etiologia destas doenças. Entretanto, a relevância clínica de cada uma das alterações encontradas deve ser investigada. Este estudo pode contribuir para o esclarecimento da etiologia destas doenças, e no Aconselhamento Genético das famílias.

Palavras-chave: Autismo, Sinapse, família SHANK.

ABSTRACT

The Autism Spectrum Disorders (ASD) are complex neuropsychiatric diseases, with widely etiology and clinical manifestations. Such manifestations are observed before three years of life. The prevalence is high in the population, with a ratio of four affected men for each affected woman. In only 10-25% of cases an etiological factor is observed, genetic or environmental, depending of the composition of samples and laboratory techniques used. There are descriptions of hundreds of genes and genomic regions associated with predisposition, they present mutations and copy number variations (CNVs) and most have expression in the central nervous system, especially at synapses. Among the candidate genes, we highlight the *SHANK2* and the *SHANK3*, not yet studied in Brazilian subjects. In *SHANK2*, located in 11q13.2, mutations have been described in seven of its 25 exons, while in *SHANK3* located at 22q13 with 23 exons, there are descriptions of mutations in several exons, but especially three. Many mutations in these two genes were observed in autistic patients, but not in healthy controls, suggesting an involvement in the etiology of the disease. This study investigated mutations in exons 11, 13 and 22 of *SHANK2* gene and exons 2, 6 and 22 of *SHANK3*, which are most often involved in ASD findings. The study of six exons was performed by direct sequencing, in 200 affected and the results were compared to a genome bank with 566 healthy controls. Eleven alterations were found, six on *SHANK2* gene, one not yet described, and five in *SHANK3* gene, all not previously described. No patient had more than one alteration in *SHANK2* or *SHANK3*, or both genes. The results showed that mutations in *SHANK2* and *SHANK3* gene are frequent in the Brazilian population with ASD and are related to the etiology of these diseases. However, the clinical relevance of each of the alterations found should be investigated. This study may help to clarify the etiology of these diseases, and genetic counseling of families.

Keywords: Autism, Synaptic, SHANK family.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Proteínas Shank em uma sinapse glutamatérgica. Atuam como proteínas suporte, necessárias para a formação e funcionamento das sinapses neurais. Formam uma matriz para moléculas pós-sinápticas, como a HOMER e GKAP, que interagem com PSD-95, Neurexinas e com receptores de neurotransmissão como o NMDARs (*N*-methyl-d-aspartate receptors) e o mGluRs (metabotropic glutamate receptors). Adaptado de STATE (2010). 19
- Figura 2.** Fluxograma de execução do estudo quanto à avaliação, seleção e conduta. 27
- Figura 3.** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 6% correspondente a análise da amplificação do gene FMR1. Marcação com Ladder de 100pb na coluna (L) confirma o tamanho esperado das bandas de controle interno (223pb) e de expansão da trinca CGG (600pb), que caracteriza a ausência da mutação nos quatro indivíduos do sexo masculino (colunas 1-4)..... 30
- Figura 4.** Electroferograma representativo do sequenciamento do exon 11 do gene SHANK2. A região do SNP descrito como *rs11237599* está circulado em vermelho. O primeiro fragmento de um indivíduo normal; o segundo apresenta alelos em heterozigose e o terceiro apresenta a alteração C/T em homozigose. 38
- Figura 5.** Electroferograma representativo do sequenciamento do exon 11 do gene SHANK2 do caso f-7455-1. A região do SNP descrito como *rs113262375* G/A está circulado em vermelho. 39
- Figura 6.** Electroferograma representativo do sequenciamento do exon 13 do gene SHANK2. As regiões circulas representam os SNPs descritos como *rs146580493* G/A (à esquerda) e *rs149996975* C/T (à direita). 40
- Figura 7.** Electroferograma representativo do sequenciamento do exon 13 do gene SHANK2 onde pode ser observado o SNV na posição 11:70666765 C/T. Dentro da marcação em vermelho, o primeiro fragmento é demonstrativo da sequência normal, enquanto o segundo apresenta os alelos com a troca em heterozigose. 40
- Figura 8.** Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 22 do gene SHANK2. A região do SNV descrito como *rs117843717* G/A está circulado em vermelho. 41

- Figura 9.** Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 2 do gene SHANK3. A região do SNV encontrado na posição 22:50675139 A/G está circulada em vermelho. 41
- Figura 10.** Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene SHANK3. A região do SNV encontrado na posição 22:50721646 C/T está circulada em vermelho. 42
- Figura 11.** Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene SHANK3. A região do SNV encontrado na posição 22:50721985 C/T está circulada em vermelho. 42
- Figura 12.** Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene SHANK3. A região do SNV encontrado na posição 22:50722009 C/G está circulada em vermelho. 43
- Figura 13.** Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene SHANK3. A região do SNV encontrado na posição 22:50722049 C/G está circulada em vermelho. 43

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Sequência dos <i>primers</i> , Eag-L e Eag-U utilizados na amplificação para análise de mutação do gene FMR1.....	29
Quadro 1.	Sequência dos primers do SHANK2 e tamanho esperado dos produtos.....	31
Quadro 2.	Sequência dos primers do SHANK3 com cauda M13 (vermelho) e tamanho esperado dos produtos. Os primers do éxon 2 e 22 são os mesmos de DURAND et al.(2007).....	31
Quadro 3.	Alterações encontradas nos genes SHANK2 e SHANK3.....	37

LISTA DE ABREVIATURASE SÍMBOLOS

ADI-R	<i>Autism Diagnostic Interview-Revised</i>
APA	Associação Americana de Psiquiatria
BAP	<i>Broad Autism Phenotype</i>
CARS	<i>Childhood-Autism Rating Scale</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNVs	do inglês <i>copy number variations</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>desoxirribonucleic acid</i>
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DSM-5	5ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação
DSM-IV	4º Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria
EDTA	ácido etinoadaminotetracético
et al.	e outros
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FRAXA	Síndrome do Cromossomo X Frágil
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
PBS	Tampão salino fosfato, do inglês <i>phosphate buffer solution</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>

SNPs	do inglês <i>Single Nucleotide polymorphisms</i>
SNVs	do inglês <i>Single Nucleotide Variations</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEA	Transtornos do Espectro do Autismo
PB	pares de base
U/L	unidades por litro
mL	mililitros
mg/mL	miligramas por mililitros
μ L	microlitros
mM	mili molar
ng/ μ L	nanogramas por microlitros
$^{\circ}$ C	graus Celsius
RPM	rotações por minuto

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	23
Geral:	23
Específicos:.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3. 1 Casuística.....	25
3.2. Métodos	26
3.2.1 Extração de DNA de leucócitos.....	27
3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase para FRAXA	28
3.2.3 Amplificação das regiões selecionadas	30
3.2.4 Sequenciamento automático	34
3.2.4.1 Reação de sequenciamento	35
3.2.5Análise dos resultados moleculares	35
4. RESULTADOS	37
4.1 Gene <i>SHANK2</i>	37
4.2 Gene <i>SHANK3</i>	41
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS	52
8. APÊNDICES	60
8.1 Apêndice A: Artigo à ser submetido a revista BMC Psychiatry (FI: 2,23) intitulado - Identification of mutations in the shank2 synaptic gene in brazilians patients with autism spectrum disorder.....	60
8.2 Apêndice B: Artigo à ser submetido a revista BMC Psychiatry (FI: 2,23) intitulado - new mutations of the <i>shank3</i> synaptic gene in brazilian patients with austism spectrum disorder	69

1. INTRODUÇÃO

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA), também atualmente denominados “autismo”, são definidos como afecções neuropsiquiátricas comuns na população (prevalência de cerca de 1%), caracterizadas por deficiência na interação social e comunicação, acompanhada por comportamentos estereotipados e interesses restritos (GUILMATRE et al., 2013; LEBLOND et al., 2014).

As características comportamentais dos afetados são observadas antes dos três anos de idade e são muito variáveis, com diferentes níveis de gravidade, o que justifica a definição de espectro, tanto que na 5ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria (APA), a denominação TEA extinguiu os cinco diagnósticos anteriores, Autismo, Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (PDD-NOS), Transtorno Desintegrativo da Infância e Síndrome de Asperger, cujos quadros clínicos eram de difícil diferenciação (APA - DSM-5).

Não estão descritas causas que expliquem todos os casos de TEA e a maioria é idiopática, motivo pelo qual estes transtornos são considerados como doenças complexas. Além disso, o grau de gravidade varia muito entre os afetados, inclusive, entre os que apresentam o mesmo fator etiológico. Os aspectos genéticos e clínicos dos TEA são altamente heterogêneos. Uma série de estudos recentes tem avançado significativamente sobre a compreensão destas doenças do ponto de vista da genética humana e da neuropatologia. Estes estudos destacam o período de desenvolvimento fetal, os processos de estrutura da cromatina, a função sináptica e sinalização neurônio-glia como fundamentais. Os esforços recentes têm se concentrado na integração sistemática dos achados de vários níveis de dados genômicos e fisiopatológicos em busca de convergências (CHEN et al., 2015).

Em cerca de 10 a 25% dos casos a afecção pode ser relacionada a um fator etiológico, que pode ser uma condição médica, como uma síndrome ou uma lesão no sistema nervoso central, entretanto, a frequência de esclarecimento das causas depende da seleção da casuística e das técnicas de investigação clínico/laboratoriais utilizadas (FERNELL; ERIKSSON; GILLBERG, 2013). Muitos fatores ambientais estão envolvidos na etiologia e têm sido relacionados ao aumento da prevalência, especialmente na última década. Fatores genéticos também estão fortemente

vinculados à etiologia dos TEA (CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM – 2, 2013).

Características comportamentais relacionadas ao autismo são altamente herdáveis. Irmãos de crianças afetadas estão 10 a 20 vezes mais propensos a receber um diagnóstico de autismo (OZONOFF et al., 2011). Parentes próximos apresentam alterações comportamentais vinculadas às características diagnósticas de autismo em frequências significativamente maiores do que em controles (BERNIER et al., 2012). Pais de indivíduos com TEA apresentam uma tendência maior de manifestar características autísticas, reforçando a hipóteses da influência de múltiplas variações genéticas transmitidas juntas ao longo das gerações (ROBINSON et al., 2014). O fenótipo mais amplo em parentes, em termos de gravidade menor, é conhecido como *Broad Autism Phenotype* (BAP). De acordo com este conceito, familiares de autistas podem ter personalidade mais rígida, indiferente e com alta sensibilidade para críticas (MOHAMMADI et al., 2012).

Realmente, os estudos genômicos e neurocomportamentais têm reforçado a herança multifatorial dos TEA na maioria dos casos, com a participação de muitas alterações genéticas, algumas de forma mais decisiva, e do ambiente, o que poderia explicar o BAP, ou seja, a variação fenotípica (MOHAMMADI et al., 2012).

As doenças genéticas mais frequentemente relacionadas aos TEA são a Síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA) e a Esclerose Tuberosa, além de várias cromossomopatias, como a Síndrome de Down (HWANG; CHEN, 2010). A frequência de achados cromossômicos anormais em diferentes casuísticas, com envolvimento de todos os pares cromossômicos, varia de 4 a 5,8% dos afetados (MARSHALL et al., 2008; BOCCUTO et al., 2013). Este fato justifica a realização do exame o cariótipo em todos os casos, como parte do protocolo de investigação laboratorial (SHEN et al., 2010; HANTASH et al., 2011). Também, microduplicações e microdeleções em regiões genômicas específicas têm sido fortemente consideradas patogênicas, o que justifica também a investigação por CGH-array (*Arrays comparative genomic hybridization*) (DURAND et al., 2012; BOCCUTO et al., 2013; KHARBANDA, TOLMIE, JOSS, 2015).

O número de genes com evidências de envolvimento na predisposição aos TEA cresce de forma significativa na literatura, com centenas de genes candidatos já descritos, o que tem levado alguns autores a propor que o sequenciamento de todo o genoma é a única estratégia eficaz para delineamento dos genes de susceptibilidade envolvidos em cada caso em particular, tanto em investigações científicas, quanto clínicas (YUEN et al., 2015). A maioria dos genes descritos se

expressa durante o desenvolvimento cerebral e no cérebro adulto, ou seja, participam do desenvolvimento ou funcionamento dos processos neuronais, como os que codificam proteínas envolvidas em sinapses. Entre os principais e mais citados estão os genes da família *SHANK*, que codificam proteínas de suporte localizadas na densidade pós-sináptica das sinapses glutamatérgicas (PERCHE et al., 2010; LEBLOND et al., 2014). A Figura 1 ilustra as proteínas Shank em interação com outras proteínas em uma sinapse glutamatérgica.

Os genes *SHANK2* e *SHANK3* são descritos como candidatos ao autismo pela associação significativa de mutações com o fenótipo comportamental e com déficits intelectuais, estes últimos muito frequentes em autistas. Entretanto, a relevância clínica ainda não está determinada (SATO et al., 2012). Além disso, a triagem de mutações na família *SHANK* é difícil porque os genes são complexos, com múltiplas transcrições alternativas e regiões extremamente ricas em CG (PHELAN; MCDERMID, 2012).

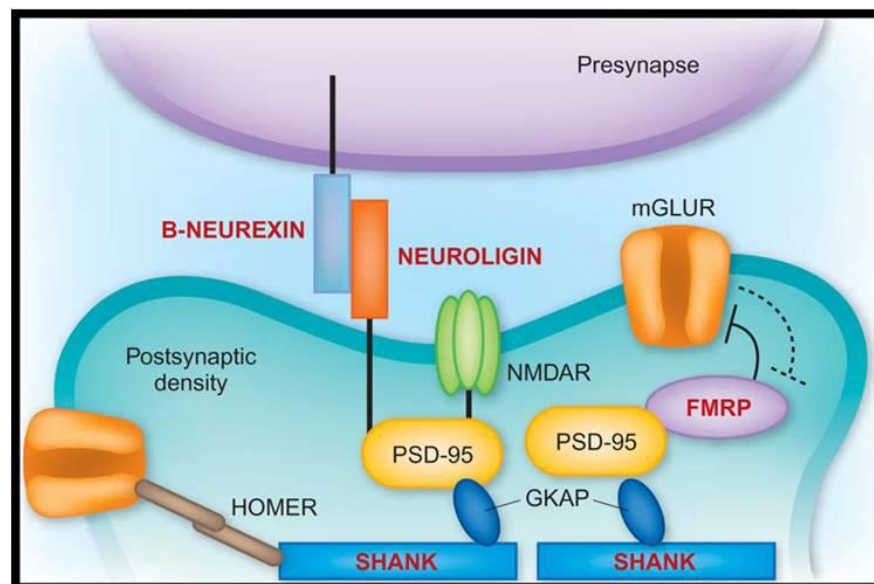


Figura 1. Proteínas Shank em uma sinapse glutamatérgica. Atuam como proteínas suporte, necessárias para a formação e funcionamento das sinapses neurais. Formam uma matriz para moléculas pós-sinápticas, como a HOMER e GKAP, que interagem com PSD-95, Neurexinas e com receptores de neurotransmissão como o NMDARs (*N*-methyl-d-aspartate receptors) e o mGluRs (metabotropic glutamate receptors). Adaptado de STATE (2010).

O gene *SHANK2*, localizado em 11q13.2, é composto por 25 éxons e codifica uma proteína de suporte que atua nas sinapses excitatórias, na região pós-sináptica, garantindo sua formação e estabilidade (LEBLOND et al., 2012). Mutações em *SHANK2* relacionadas aos TEA começaram a receber destaque da literatura há pouco tempo, a partir de 2010 (BERKEL et al., 2012; PEYKOV

et al., 2015). Berkel et al. (2010) e Leblond et al. (2012) identificaram em autistas, mutações nos éxons 11 (R405W; R443C), 13 (P587S) e 22 (R841X) que não foram observadas em indivíduos normais.

O gene *SHANK3* está localizado na região 22q13.3, possui 22 éxons (SARASUA et al., 2011; UCHINO, WAGA, 2012) e é expresso predominantemente no córtex cerebral e no cerebelo, codificando uma proteína que também atua na região pós-sináptica (HAMDAN et al., 2011; GONG et al., 2012). A proteína Shank3 conecta receptores de glutamato à via da actina do citoesqueleto como uma cadeia de elementos intermediários. Estudos genéticos têm demonstrado a forte associação de mutações em *SHANK3* com susceptibilidade às doenças psiquiátricas, entretanto, pouco se sabe sobre as consequências neuronais dessas mutações (DURAND et al., 2012; JONSSON et al., 2015).

A perda da região 22q13.3 determina a Síndrome da Deleção 22q13.3, também denominada Síndrome de Phelan-McDermid ou Monossomia 22q13. As características comportamentais dos afetados incluem problemas de comunicação, déficit intelectual grave ou moderado, atraso da fala, do desenvolvimento global e comportamento autístico (PHELAN; MCDERMID, 2012; DENAYER et al., 2012). A haploinsuficiência de *SHANK3* pode causar uma forma monogênica de autismo em uma frequência suficiente para ser considerada em testes diagnósticos (DURAND et al., 2007; MOESSNER et al., 2007). Além disso, parece ser o responsável pelas características neurológicas da síndrome (BONAGLIA et al., 2011; SARASUA et al., 2011; WAGA et al., 2011). É possível que a perda de uma cópia deste gene deixe o sistema nervoso mais vulnerável às degenerações a longo prazo e menos capaz de se recuperar após eventos psiquiátricos e somáticos (DENAYER et al., 2012).

Mutações no gene *SHANK3* identificadas em autismo parecem afetar o desenvolvimento e a morfologia das espinhas dendríticas, reduzindo a transmissão sináptica em neurônios maduros (FRECHE et al., 2012; GONG et al., 2012). Uma mutação *missense* no éxon 2 (L68P) só foi observada em afetados, quando comparados com controles sem alterações comportamentais (DURAND et al., 2007; GAUTHIER et al., 2009). Também, além da haploinsuficiência do gene, a presença de cópias extras já foi associada com a Síndrome de Asperger (DURAND et al., 2012) e deleções que envolvem apenas *SHANK3* vêm sendo associadas com fenótipos autísticos mais graves, quanto maior o tamanho da mesma (SARASUA et al., 2011).

Estima-se que SNPs, (polimorfismos de nucleotídeo único) sejam responsáveis por 20-60% da variação de risco em autismo, embora o efeito individual de qualquer SNP seja relativo (GAUGLER et al., 2014). Além de SNPs, *Copy Number Variations* (CNVs), caracterizadas como micro deleções ou duplicações, e SNVs (*Single Nucleotide Variations* – variações com frequências menores do que 1%), vêm sendo descritas como envolvidas no fenótipo autístico e outras afecções neuropsiquiátricas (DOHERTY; OWEN, 2014).

A hipótese científica testada neste estudo foi de que mutações nos genes *SHANK2* e *SHANK3*, que estão entre os genes mais importantes relacionados ao espectro do autismo, são frequentes na população brasileira com TEA e estão relacionadas com a etiologia destas doenças.

Objetivo

2. OBJETIVOS

Geral:

Realizar a investigação de alterações em éxons específicos dos genes *SHANK2* e *SHANK3* em indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo idiopático.

Específicos:

1. Avaliar a presença de alterações nos éxons 11, 13 e 22 do gene *SHANK2* em indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo idiopático;
2. Estudar a presença de alterações nos éxons 2, 6 e 22 do gene *SHANK3* em indivíduos com estes transtornos;
3. Em caso de achados, avaliar a presença dos mesmos em um grupo controle constituído de indivíduos sem alterações de comportamento.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (nº: 3306/2010), foram estudadas e incluídas nos resultados aqui apresentados, amostras de sangue periférico de 200 pacientes com TEA idiopático, 165 (82,5%) homens e 35 mulheres (17,5%), com idades que variaram de três a 44 anos (Média=14,57 e Desvio Padrão=8,3), com diagnóstico conclusivo de Transtorno do Espectro do Autismo, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV), feito por psiquiatras e por outros especialistas em autismo, membros de equipes interdisciplinares. Sempre que possível, uma entrevista com base no *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) e *Childhood-Autism Rating Scale* (CARS) foi aplicada, conforme referido por Moreira et. al (2014). Em alguns casos, o diagnóstico foi realizado também com base nos novos critérios inclusos no DSM-5 (DSM-5).

Os pacientes foram provenientes da Escola Municipal do Autista Maria Lúcia de Oliveira (EMA) de São José do Rio Preto-SP, da Associação dos Amigos dos Autistas (AMA) de Ribeirão Preto-SP, do Ambulatório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP (AG), do Recanto Tia Marlene de Votuporanga-SP (RTM), da Associação para o Desenvolvimento dos Autistas em Campinas (ADACAMP) de Campinas-SP, da UNESP (Serviço de Fonoaudiologia) de Marília-SP, e da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Catanduva-SP.

Para atender aos critérios de inclusão e exclusão, os indivíduos foram avaliados por geneticistas clínicos e por médicos de diferentes especialidades, para a investigação de possíveis síndromes ou outros tipos de afecções associadas a fatores genéticos e ambientais, para a presença de anormalidades cromossômicas e da Síndrome do Cromossomo X-Frágil nos meninos. Só foram incluídos neste estudo os que apresentaram resultados negativos. Não foram excluídos pacientes com deficiência intelectual, epilepsia ou dismorfias sem causa conhecida ou presumida.

No total, foram inicialmente estudados muitos pacientes, que somados os de todas as instituições e aqueles encaminhados diretamente ao Ambulatório de Genética, ultrapassam 400. Entretanto, a avaliação inicial dos casos já excluiu um número alto deles, porém não anotado, de indivíduos com suspeita de etiologia relacionada a agentes ambientais, entre os quais aqueles com

hipótese diagnóstica de encefalopatia crônica não progressiva, síndrome do álcool fetal, embriopatia rubeólica, entre outros. Daqueles sem diagnóstico etiológico prévio conhecido ou presumido, seis casos foram excluídos por apresentarem afecções gênicas, dois com Esclerose Tuberosa, um com síndrome de Rett, um com síndrome de Williams, um com síndrome de Van der Woude e um com síndrome de Angelman; dois também foram excluídos por apresentarem alterações cromossômicas e cinco outros por apresentarem mutação completa no gene *FMRI*.

Todos os casos que apresentaram alterações foram individualmente convocados para sessão de Aconselhamento Genético e as famílias foram esclarecidas quanto ao evento biológico, origem e riscos de recorrência, e receberam suporte psicológico, conforme protocolo rotineiramente utilizado no Serviço de Genética (HB-FAMERP/FUNFARME). Quanto àqueles com alterações nos genes *SHANK*, as famílias já haviam sido esclarecidas no processo de triagem dos casos sobre os objetivos do estudo, sobre os achados da literatura, o caráter multifatorial da doença, assim como efeito aditivo de alterações dos genes, o que foi reforçado no Aconselhamento Genético. Todas souberam interpretar tais alterações como potencialmente e possivelmente, mas não isoladamente, envolvidas na etiologia da doença do filho.

Os controles consistiram de 566 indivíduos, não relacionados e aparentemente saudáveis, sem história de TEA ou outras doenças psiquiátricas em três gerações considerando-se a do estudado, seguindo critérios padronizados. Eles constam em um banco de dados cujo acesso foi gentilmente permitido pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH/USP-SP).

Na época da apresentação do projeto desta pesquisa, a nomenclatura das regiões estudadas seguiu os critérios do *Human GRCh37 (Genome Reference Consortium/ human - GRCh37)*, que estava sendo utilizada desde 2009. Neste documento, entretanto, foi utilizada a versão mais recente do mesmo, intitulada *GRCh38*, disponível a partir de dezembro de 2013, onde o éxon 22 do gene *SHANK3* passou a ser referido como éxon 21. Na nova versão houve uma adequação na nomenclatura dos éxons.

3.2. Métodos

Todos os indivíduos do grupo de estudo foram triados quanto à presença de cromossomopatias e os meninos quanto à presença da mutação no gene *FMRI*, responsável pela Síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA). Para isto, respectivamente, foi realizado o estudo

citogenético convencional, em 20 metáfases obtidas de culturas de linfócitos, submetidas ao bandamento GTG, conforme protocolo de rotina do Laboratório de Genética FAMERP/FUNFARME, e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com *primers* específicos para as regiões alvo. Os indivíduos com alterações nestas investigações citadas, por terem a etiologia esclarecida, como anteriormente mencionado, não foram selecionados para avaliação molecular dos genes propostos.

O fluxograma relacionado à triagem dos indivíduos, considerando-se os critérios de inclusão e exclusão, está apresentado na Figura 2.

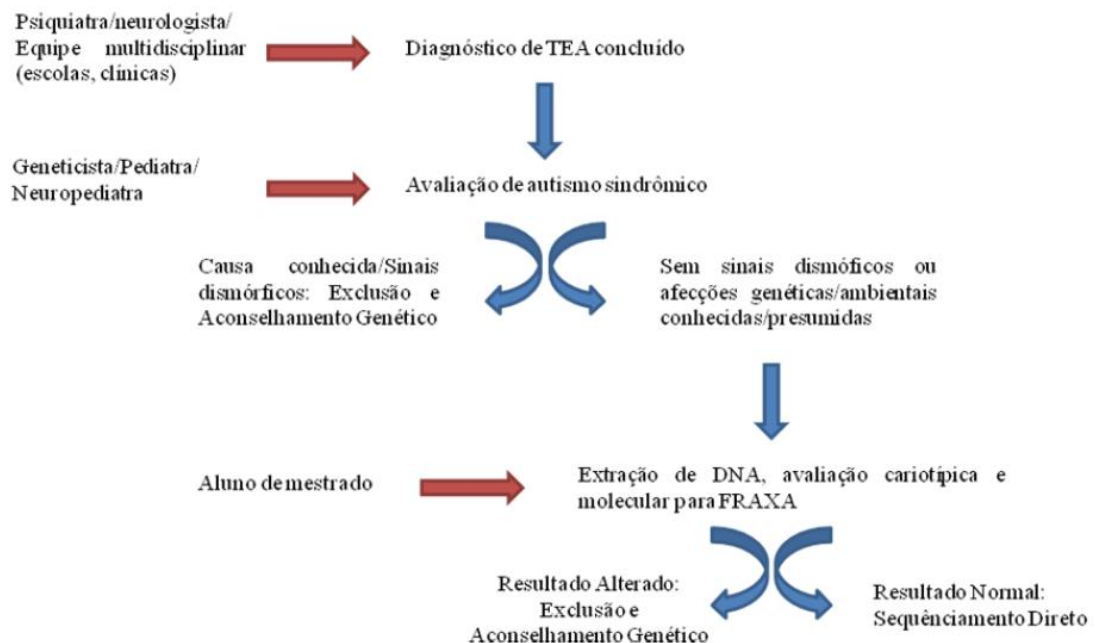


Figura 2. Fluxograma de execução do estudo quanto à avaliação, seleção e conduta.

3.2.1 Extração de DNA de leucócitos

O DNA de cada indivíduo foi obtido a partir de leucócitos de sangue venoso periférico segundo a técnica descrita por Miller et al.(1988), com modificações.

Em um tubo de polipropileno de 15mL foram adicionados 3,5mL de FICOLL PAQUE e 5mL de sangue periférico pela parede do mesmo. O material foi centrifugado por 30 minutos a 3.500rpm. O anel de leucócitos foi transferido com pipeta Pasteur descartável para outro tubo e o volume de 15mL foi completado com tampão PBS 1X. Nova centrifugação foi realizada durante 12 minutos a 3.500 rpm. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur descartável deixando no tubo 1 mL no qual o “pellet” foi suspenso. Novamente o volume foi completado para 15 mL com PBS 1X e repetiu-se a centrifugação durante 12 minutos a 3.500rpm. O sobrenadante foi recolhido com pipeta descartável, o “pellet” de leucócitos foi novamente suspenso e em seguida foram adicionados 3 mL de Lysis Buffer, 0,2mL de SDS 10%, 50µl de proteinase K (20mg/mL) e 40µl de RNase (20mg/mL). O material foi agitado e incubado à 37°C overnight.

No dia seguinte, ao volume total foi acrescentado 1,0mL de NaCl 6M saturado. O tubo foi agitado vigorosamente até formar espuma e colocado no gelo por 20 minutos. O material foi novamente agitado e centrifugado a 3.500rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno de 15mL e completado com 10mL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. O tubo foi invertido delicadamente até a visualização do DNA precipitado. O DNA foi colocado em um microtubo de 1,5mL com 500µl de etanol 70% gelado. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por três minutos. Em seguida, o etanol 70% foi descartado e o tubo deixado em repouso por 20 minutos. O DNA foi diluído em água ultrapura e incubado a 37°C por três a quatro dias para diluição. Após este período, o material foi estocado a -20°C. A estimativa da concentração foi realizada pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop (ND 1000–*Spectrophotometer*).

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase para FRAXA

A amplificação e determinação no número de repetições CGG e detecção da mutação completa do gene *FMRI* foi realizada segundo a técnica de Haddad et al. (1996), com algumas modificações. Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte solução com volume final igual a 23µL:

H ₂ O ultrapura.....	10,5µL
Tampão (sem MgCl ₂).....	2,5µL
MgCl ₂	1,0µL
DMSO (100%).....	2,5µL
<i>Work Solution</i>	1,0µL
dNTP (1,25 mM) – 75% 7deaza dGTP.....	4,0µL
DNA (50 ng/µL).....	2,0µL

O método de *Hot Start* foi utilizado: a solução descrita abaixo, contendo a enzima Taq Polymerase, foi adicionada no volume de 2,0µL por amostra após um único ciclo de 98°C durante 10 min.

H ₂ O ultrapura.....	1,48µL
Tampão (sem MgCl ₂).....	0,2µL
Taq (5U/µL).....	0,32µL

Foi utilizado uma *work solution* contendo três *primers* (Eag-U, Eag-L, f) nas concentrações de 7,5µM, 5µM, 2µM/ 85,5µL de H₂O, respectivamente, para amplificação da região de interesse. As sequências de bases dos *primers* (*reverse 1*), Eag-L (*reverse 2*) e Eag-U (*foward*), estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers*, Eag-L e Eag-U utilizados na amplificação para análise de mutação do gene FMR1.

Primer	Sequência 5' 3' Amplicon (Pb)	
F	AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA	30
Eag-L	CGCTGCGGGTGTAACACTGAAACCACGTC	30
Eag-U	CGACCTGTCACCGCCCTTCAGCCTTCC	27

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C por dois minutos, ciclo de 35 repetições com desnaturação inicial durante um minuto a 65°C, anelamento

durante dois minutos a 72°C, extensão de 90 segundos a 94°C e extensão final de um ciclo durante 10 minutos a 72°C.

Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% sob corrente constante de 100V durante 40 minutos. O gel foi revelado em solução de nitrato de prata (Figura 3). Os indivíduos foram classificados de acordo com o tamanho do fragmento originado.

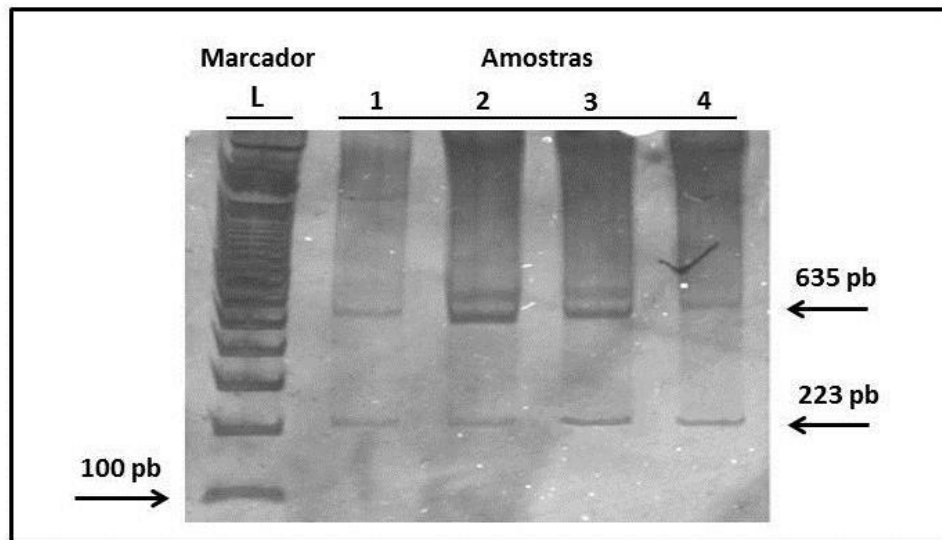


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 6% correspondente a análise da amplificação do gene FMR1. Marcação com Ladder de 100pb na coluna (L) confirma o tamanho esperado das bandas de controle interno (223pb) e de expansão da trinca CGG (600pb), que caracteriza a ausência da mutação nos quatro indivíduos do sexo masculino (colunas 1-4).

3.2.3 Amplificação das regiões selecionadas

A amplificação das regiões selecionadas foi realizada segundo a técnica de SAIKI et al. (1998), com algumas modificações.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foram processadas em termociclador SelectCycler (98 tubos). Em todos os experimentos um dos tubos não recebeu DNA (controle de contaminação).

Foram utilizados 10 pares de *primers* que amplificam os éxons 11, 13 e 22 do gene *SHANK2* e os éxons 2, 6 e 21 do gene *SHANK3*, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes. O desenho dos *primers* foi realizado com a utilização do programa PRIMER3 (ROZEN; SKALETSKY,

2000). As sequências de bases dos *primers* e o tamanho esperado dos produtos estão apresentados nos Quadros 1 e 2.

<i>Primer</i>	<i>Primers 5' a 3'</i>		Tamanho do amplicon (pb)
Éxon 11	<i>SHANK2E11F</i>	ACGACACAGATGCACTCACC	462
	<i>SHANK2E11R</i>	GGCTTCCTGCTCAACTTCTG	
Éxon 13	<i>SHANK2E13F</i>	CCCACTCGTCTTGTTCAACC	236
	<i>SHANK2E13R</i>	AGATAGGCCTGCAGGATCG	
Éxon 22	<i>SHANK2E22F</i>	TCTCACCCCTAGGCTCTCTGG	172
	<i>SHANK2E22R</i>	GCAACTTCTGTGGGGGAGT	

Quadro 1. Sequência dos primers do SHANK2 e tamanho esperado dos produtos.

<i>Primer</i>	Primers 5' a 3' com cauda M13		Tamanho do amplicon (pb)
Éxon 2	<i>SHANK3E2F</i>	GACCTGAGCTCACGAGCCCGCT	320
	<i>SHANK3E2R</i>	CTGCCGTGCCCTTCACTGGTC	
Éxon 6	<i>SHANK3E6F</i>	GCCTGGTGTGGATACTGAGG	273
	<i>SHANK3E6R</i>	CCCTACAGACAGAGCCAGGA	
Éxon 22	<i>SHANK3E22F1</i>	TGTAAAACGACGGCCAGTAAAGGCTGGCCTCTGTGGGAGG	856
	<i>SHANK3E22R1</i>	CAGGAAACAGCTATGACCACGGACAGGAACACAGTGGAG	
	<i>SHANK3E22F2</i>	TGTAAAACGACGGCCAGTCAAGAGCCCCCTGGTGAAGCA	500
	<i>SHANK3E22R2</i>	CAGGAAACAGCTATGACCGCTCTCGGGCAGCCAGGGCAA	
	<i>SHANK3E22F3</i>	TGTAAAACGACGGCCAGTTGCCCTGAAGCCGTTGGTCAG	315
	<i>SHANK3E22R3</i>	CAGGAAACAGCTATGACCACCTTCTCTGCCTCCCTGCGA	
	<i>SHANK3E22F4</i>	TGTAAAACGACGGCCAGTCCTGTTTGTGGATGTACAGGCC	714
	<i>SHANK3E22R4</i>	CAGGAAACAGCTATGACCACCGTGGAGATGGTGCTTGTG	
	<i>SHANK3E22F5</i>	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCAGGGAAGCCCAGCAGTGA	666
	<i>SHANK3E22R5</i>	CAGGAAACAGCTATGACCAGAACAGACAAGAGGAATGAC	

Quadro 2. Sequência dos primers do SHANK3 com cauda M13 (vermelho) e tamanho esperado dos produtos. Os primers do éxon 2 e 22 são os mesmos de DURAND et al. (2007).

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (100 Volts por 30 minutos), juntamente com um marcador de 100pb (Ladder Gibco DNA 100pb), o que permitiu observar a amplificação esperada.

A reação de amplificação dos éxons do gene *SHANK2* obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C durante dois minutos, ciclo de 30 repetições com desnaturação inicial durante trinta segundos a 95°C, anelamento durante 40 segundos a 60°C, extensão de 40 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante dez minutos a 72°C. A solução com volume final de 20µL foi preparada conforme descrito:

H ₂ O ultrapura.....	8,9µL
10X Buffer CG.....	2,0µL
<i>Primer Forward</i> (10 pM).....	0,4µL
<i>Primer Reverse</i> (10 pM).....	0,4µL
Taq DNA Polimerase 5U.....	0,3µL
Betaine.....	4,0µL
dNTP (2,5mM).....	2,0µL
DNA (50ng/µL).....	2,0µL

A reação de amplificação do éxon 2 do gene *SHANK3* obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C durante dois minutos, ciclo de 30 repetições com desnaturação inicial durante trinta segundos a 95°C, anelamento durante 40 segundos a 68°C, extensão de 40 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante dez minutos a 72°C. A solução com volume final de 20µL foi preparada conforme descrito:

H ₂ O ultrapura.....	8,9µL
10X Buffer CG.....	2,0µL
<i>Primer Forward</i> (10 pM).....	0,4µL
<i>Primer Reverse</i> (10 pM).....	0,4µL
Taq DNA Polimerase 5U.....	0,3µL
Betaine.....	4,0µL
dNTP (2,5mM).....	2,0µL

DNA (50ng/ μ L)..... 2,0 μ L

A reação de amplificação do éxon 6 do gene *SHANK3* obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C durante dois minutos, ciclo de 30 repetições com desnaturação inicial durante trinta segundos a 95°C, anelamento durante 40 segundos a 61°C, extensão de 40 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante dez minutos a 72°C. A solução com volume final de 20 μ L foi preparada conforme segue abaixo:

H ₂ O ultrapura.....	7,7 μ L
10X Buffer CG.....	2,0 μ L
<i>Primer</i> Forward (10 pM).....	0,5 μ L
<i>Primer</i> Reverse (10 pM).....	0,5 μ L
Platinum® Taq Polimerase 5U.....	0,3 μ L
Betaine.....	4,0 μ L
dNTP (2,5mM).....	2,0 μ L
MgCl ₂	1,0 μ L
DNA (50ng/ μ L).....	2,0 μ L

A reação de amplificação do primer 1 do éxon 22 do gene *SHANK3* obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C durante dois minutos, ciclo de 30 repetições com desnaturação inicial durante trinta segundos a 95°C, anelamento durante 40 segundos a 56°C, extensão de 40 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante dez minutos a 72°C. A solução com volume final de 20 μ L foi preparada da seguinte maneira:

H ₂ O ultrapura.....	12,3 μ L
10X Buffer CG.....	2,0 μ L
<i>Primer</i> Forward (10 pM).....	0,4 μ L
<i>Primer</i> Reverse (10 pM).....	0,4 μ L

Platinum® Taq Polimerase 5U.....	0,3 µL
DMSO (100%).....	0,6 µL
dNTP (2,5 mM).....	2,0 µL
DNA (50 ng/ µL).....	2,0 µL

A reação de amplificação dos *primers* 2 e 5 do éxon 22 do gene *SHANK3* obedeceu às seguintes condições: ativação a 95°C durante dois minutos, ciclo de 30 repetições com desnaturação inicial durante trinta segundos a 95°C, anelamento durante 40 segundos com touchdown de 70°C - 60°C, extensão de 40 segundos a 72°C e extensão final de um ciclo durante dez minutos a 72°C. A solução com volume final de 20µL foi preparada da seguinte maneira:

H ₂ O ultrapura.....	8,9µL
10X Buffer CG.....	2,0µL
<i>Primer Forward</i> (10 pM).....	0,4µL
<i>Primer Reverse</i> (10 pM).....	0,4µL
Taq DNA Polimerase 5U.....	0,3µL
Betaine.....	4,0µL
dNTP (2,5mM).....	2,0µL
DNA (50ng/µL).....	2,0µL

A reação de amplificação dos *primers* 3 e 4 do éxon 22 do gene *SHANK3* obedeceu às mesmas condições dos *primers* do gene *SHANK2*.

3.2.4 Sequenciamento automático

As amostras amplificadas foram submetidas ao sequenciamento automático em sequenciador ABI Prism 377 (*Applied Biosystems Inc*), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria

Rita dos Santos e Passos Bueno, do Laboratório de Diagnóstico Molecular de Doenças do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (USP/SP).

3.2.4.1 Reação de sequenciamento

As amostras foram submetidas à reação de amplificação com 2µL de *Big Dye Terminator* e 3,2pmol de *primer*. A reação compreendeu uma primeira etapa de dois segundos a 96°C para desnaturação da cadeia de DNA, 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos para anelamento em temperatura de 50°C e quatro minutos a 60°C, para extensão das cadeias. Para cada amostra, foi realizada uma reação com o *primer sense (right)* e uma reação com o *anti-sense (left)*.

3.2.5 Análise dos resultados moleculares

Após a amplificação e sequenciamento de todas as amostras, os resultados foram analisados pelo software *Sequencher 5.2.4*. Todos os achados foram retestados para confirmação e foram comparados com os do grupo controle e com bancos de dados do genoma humano (NCBI, *1000 Genomes* e NHLBI/ESP databases).

Resultados

4. RESULTADOS

A análise das regiões sequenciadas revelou 11 alterações nos genes *SHANK2* e *SHANK3* conforme mostrado no Quadro 3.

Alterações encontradas nos genes SHANK2 e SHANK3							
Gene	Éxon	Alteração	Posição	Rs (reference SNP)	Nº de indivíduos com TEA (n=200)	Nº de indivíduos controle (566)	P=
<i>SHANK2</i>	11	SNP - C/T	11:70820660	rs11237599	37 (18,5%)	184 (32,6%)	0,0002
<i>SHANK2</i>	11	SNP - G/A	11:70666673	rs113262375	2 (1%)	17 (3%)	1,0
<i>SHANK2</i>	13	SNP - C/T	11:70644619	rs146580493	5 (2,5%)	6 (1,1%)	0,1666
<i>SHANK2</i>	13	SNP - C/T	11:70644619	rs149996975	3 (1,5%)	5 (0,8%)	0,4367
<i>SHANK2</i>	13	SNV - C/T	11:70666765	-	1 (0,5%)	0 (0%)	-
<i>SHANK2</i>	22	SNV - G/A	11:70336479	rs117843717	1 (0,5%)	2 (0,3%)	0,4543
<i>SHANK3</i>	2	SNV - A/G	22:50675139	-	1 (0,5%)	0 (0%)	-
<i>SHANK3</i>	21	SNV - C/T	22:50721646	-	1 (0,5%)	0 (0%)	-
<i>SHANK3</i>	21	SNV - C/T	22:50721985	-	1 (0,5%)	0 (0%)	-
<i>SHANK3</i>	21	SNV - C/G	22:50722009	-	1 (0,5%)	0 (0%)	-
<i>SHANK3</i>	21	SNV - C/G	22:50722049	-	1 (0,5%)	0 (0%)	-

Quadro 3. Alterações encontradas nos genes SHANK2 e SHANK3

4.1 Gene *SHANK2*

A análise das sequências investigadas revelou seis alterações no gene *SHANK2*, cinco previamente descritas e uma ainda não descrita.

Éxon 11

No éxon 11 foi encontrado um SNP *missense* (rs11237599) C/T na posição 11:70820660 em 37 (18,5%) indivíduos com TEA (Figura 4), 36 em heterozigose e uma em homozigose. Este SNP foi observado em 184 (32,6%) indivíduos do grupo controle, todos em heterozigose. Essas frequências diferiram estatisticamente ($p=0,0002$).



Figura 4. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 11 do gene SHANK2. A região do SNP descrito como *rs11237599* está circulado em vermelho. O primeiro fragmento de um indivíduo normal; o segundo apresenta alelos em heterozigose e o terceiro apresenta a alteração C/T em homozigose.

Na posição 11:70666673 do mesmo éxon, dois indivíduos com autismo (1%) apresentaram um SNP *missense* (rs113262375) G/A, que foi observado em 17 (3%) dos controles (Figura 5), todos em heterozigose. Não houve diferença estatística entre estas frequências ($p=1,0$).

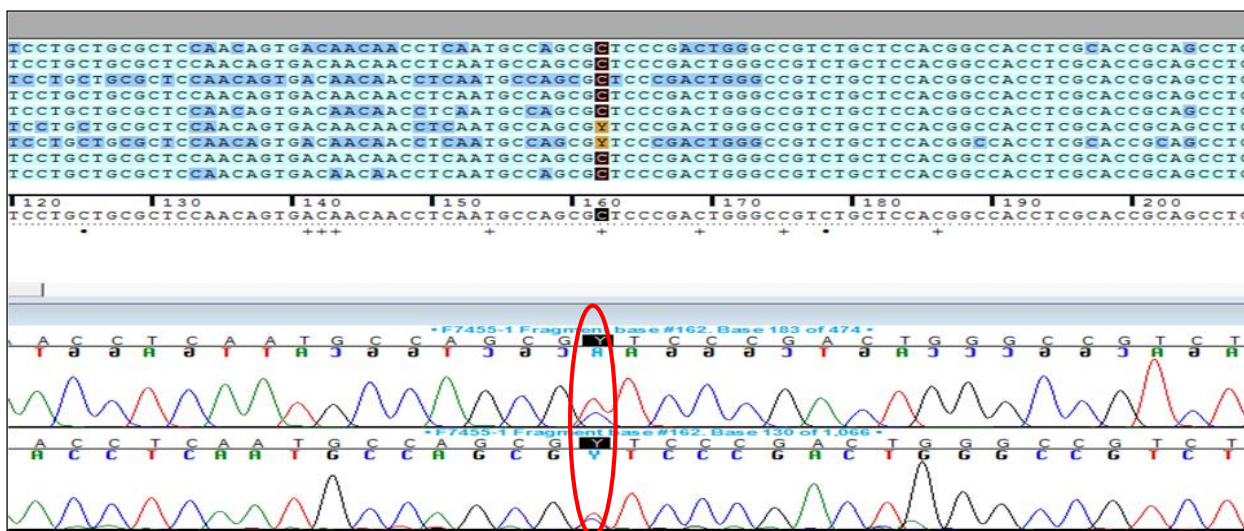


Figura 5. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 11 do gene SHANK2 do caso f-7455-1. A região do SNP descrito como rs113262375 G/A está circulado em vermelho.

Éxon 13

No éxon 13 foram encontrados dois polimorfismos em heterozigose. Um deles, o SNP *missense* rs146580493 G/A na posição 11:70644619 foi encontrado em cinco indivíduos com autismo (2,5%) e em seis (1,1%) controles, o que não diferiu estatisticamente. ($p=0,1666$). O outro, o SNP *missense* rs149996975 C/T na posição 11:70644619 foi observado em três (1,5%) afetados e em cinco (0,8%) controles. Não houve diferença significativa entre as frequências encontradas ($p=0,4367$). Dois casos apresentaram os dois SNPs em heterozigose, o que não foi observado nos controles (Figura 6).

Também no éxon 13 foi observada em uma paciente do sexo feminino (0,5%) com autismo uma alteração na posição 11:70666765 C/T em heterozigose, que não foi encontrada no grupo controle (Figura 7). Esta mutação (SNV) não consta nos bancos de dados consultados (NCBI, *1000 Genomes* e NHLBI/ESP databases).

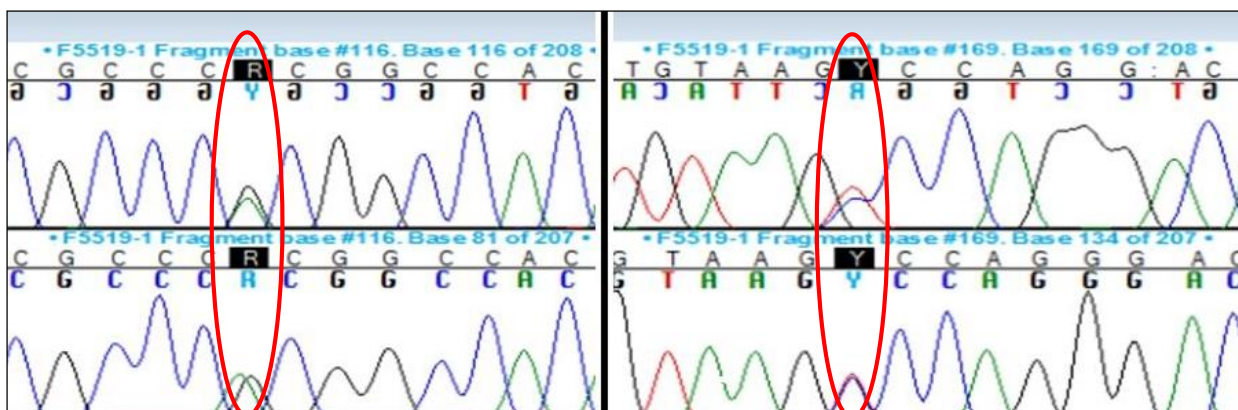


Figura 6. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 13 do gene *SHANK2*. As regiões circuladas representam os SNPs descritos como rs146580493 G/A (à esquerda) e rs149996975 C/T (à direita).

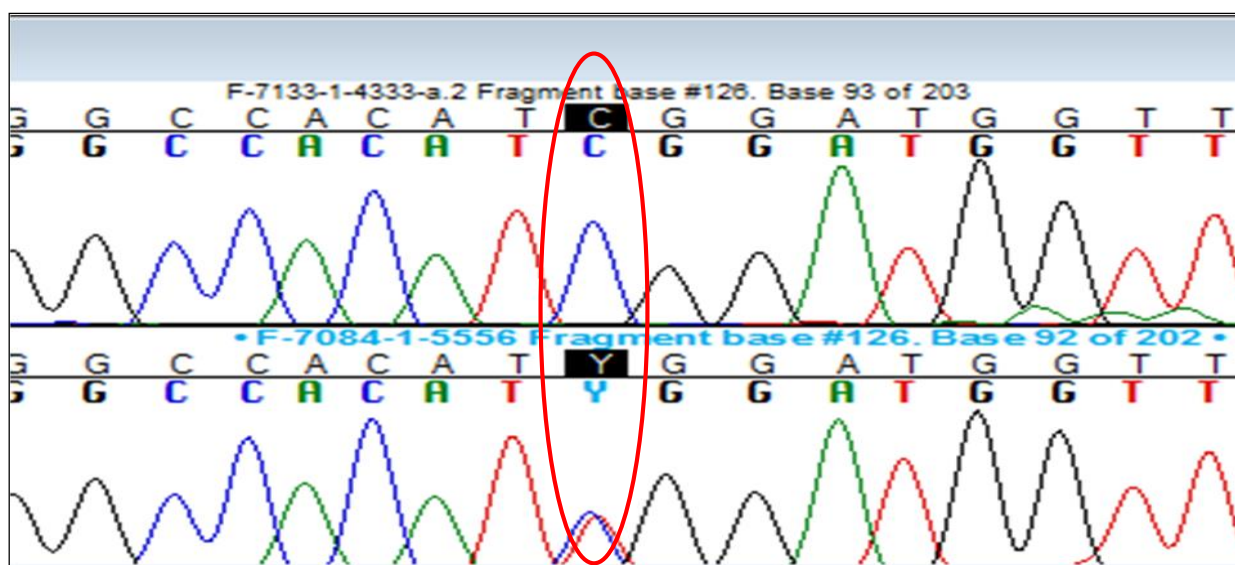


Figura 7. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 13 do gene *SHANK2* onde pode ser observado o SNV na posição 11:70666765 C/T. Dentro da marcação em vermelho, o primeiro fragmento é demonstrativo da sequência normal, enquanto o segundo apresenta os alelos com a troca em heterozigose.

Éxon 22

No éxon 22, um indivíduo com autismo (0,5%) apresentou o SNV *missense* rs117843717 G/A em heterozigose, localizado na posição 11:70336479 (Figura 8). A frequência no grupo controle foi de 0,3% e não diferiu estatisticamente ($p=0,4543$).

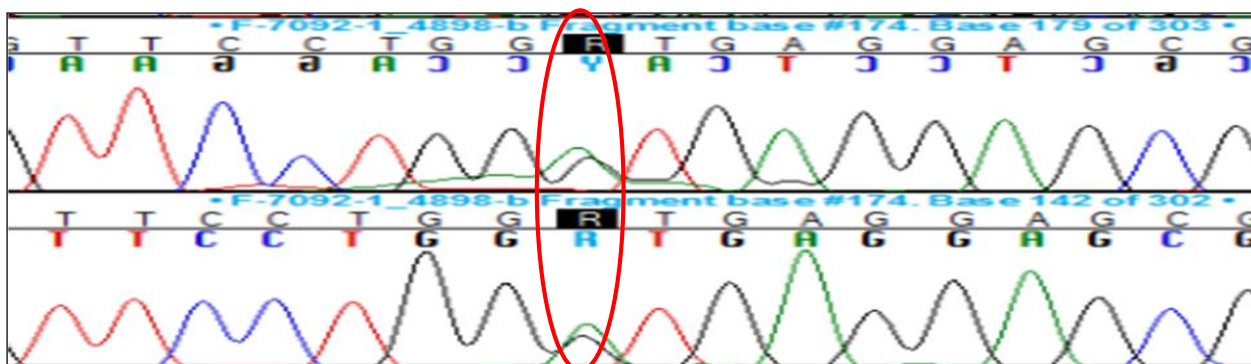


Figura 8. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 22 do gene *SHANK2*. A região do SNV descrito como rs117843717 G/A está circulado em vermelho.

4.2 Gene *SHANK3*

A análise das sequências investigadas revelou cinco alterações no gene *SHANK3*, todas ainda não descritas na literatura.

Éxon 2

No éxon 2 do gene *SHANK3*, um paciente (0,5%) apresentou um SNV em heterozigose A/G na posição 22:50675139 (Figura 9). Esta alteração não foi encontrada no grupo controle e em nenhum dos bancos de dados consultados.

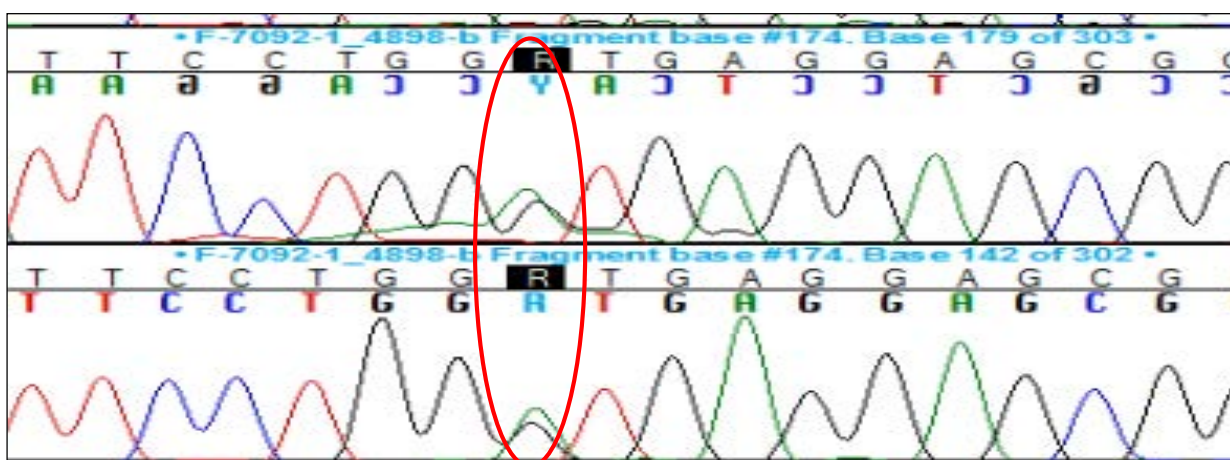


Figura 9. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 2 do gene *SHANK3*. A região do SNV encontrado na posição 22:50675139 A/G está circulado em vermelho.

Éxon 6

Todos os indivíduos apresentaram seqüências normais, ou seja, não foram encontradas alterações neste éxon.

Éxon 21

Quatro alterações ainda não descritas na literatura foram observadas no éxon 21 de quatro indivíduos autistas (0,5% - cada alteração), que não foram encontradas nos indivíduos do grupo controle. As alterações foram observadas nas posições 22:50721646 C/T (Figura 10), 22:50721985 C/T (Figura 11), 22:50722009 C/G (Figura 12) e 22:50722049 C/G (Figura 13).

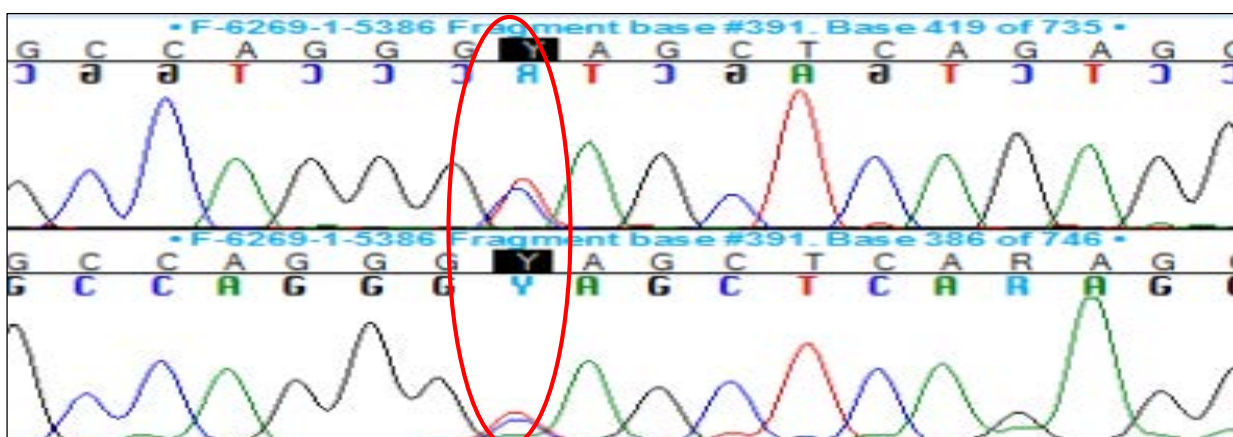


Figura 10. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene *SHANK3*. A região do SNV encontrado na posição 22:50721646 C/T está circulado em vermelho.

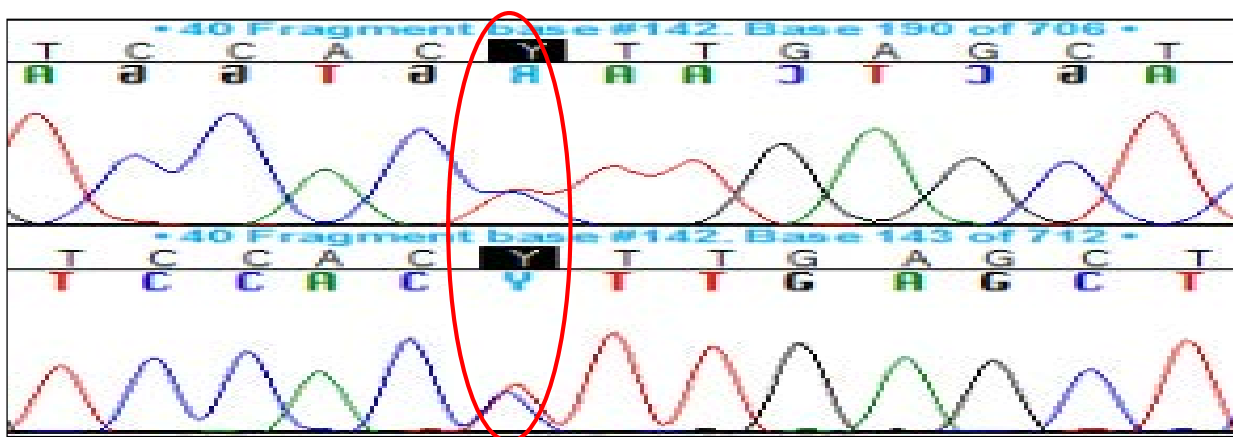


Figura 11. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene *SHANK3*. A região do SNV encontrado na posição 22:50721985 C/T está circulado em vermelho.

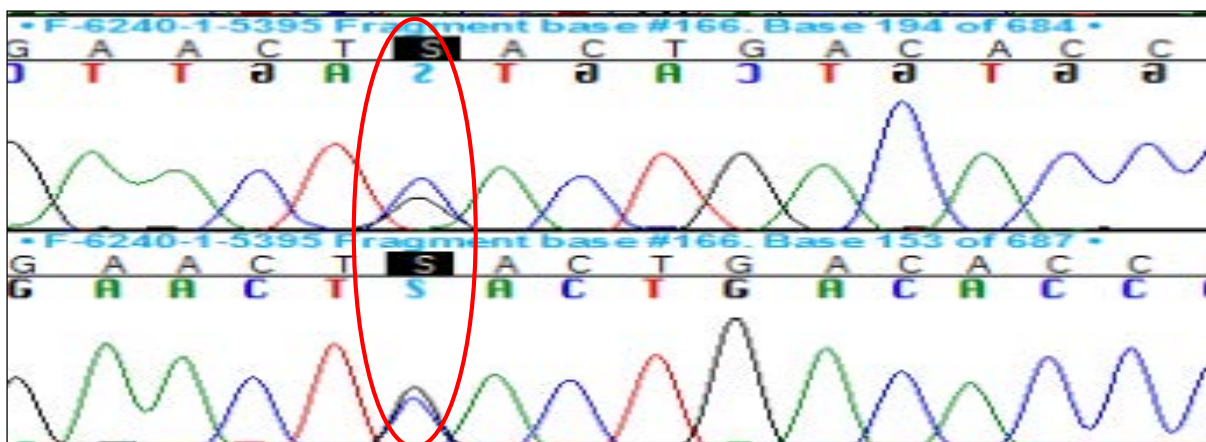


Figura 12. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene *SHANK3*. A região do SNV encontrado na posição 22:50722009 C/G está circulado em vermelho.

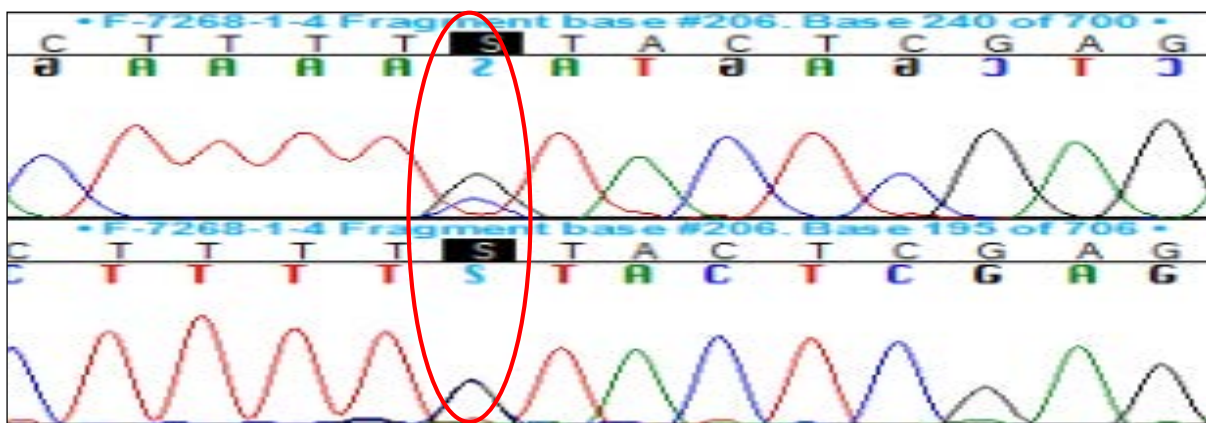


Figura 13. Electroferograma representativo do sequenciamento do éxon 21 do gene *SHANK3*. A região do SNV encontrado na posição 22:50722049 C/G está circulado em vermelho.

Nenhum paciente apresentou mais de um SNV em *SHANK2* ou *SHANK3*, ou nos dois genes.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) atualmente são nominados de forma genérica de "autismo". São doenças neuropsiquiátricas de alta prevalência na população (cerca de 1%), sem distinção de etnias, mais comuns em homens (4:1), com sinais e sintomas percebidos antes dos três anos de idade, e com muita heterogeneidade clínica, ou seja, muita variação em termos de gravidade de sinais e sintomas (GUILMATRE et al., 2013; LAI et al., 2014; LEBLOND et al., 2014). A variabilidade do fenótipo comportamental parece estar relacionada com mecanismos moleculares genéticos e ambientais envolvidos na etiologia de cada caso em particular (TORDJMAN et al., 2014).

Além dos TEA serem considerados um paradigma das doenças neurocomportamentais, a etiologia é um dos maiores desafios científicos atuais, dada a extrema complexidade. Só pode ser determinada em um número pequeno de casos, e isso depende da seleção da casuística e das técnicas laboratoriais utilizadas (KIN, LEVENTHAL, 2015).

Fatores genéticos estão fortemente ligados à etiologia do autismo, envolvendo alterações em vários genes que atuam no cérebro e agem promovendo um efeito aditivo maior ou menor (CHILIAN et al., 2013). Há evidências que reforçam a possibilidade de que variações genéticas raras e altamente penetrantes estejam relacionadas com o desenvolvimento destes transtornos (SOORYA et al., 2013). Alterações alélicas raras são dominantes em autismo, no entanto, mesmo alterações (variantes) comuns são propostas como tendo algum impacto nestes transtornos, contribuindo para o aumento do risco do desenvolvimento dos mesmos (MURDOCH et al., 2013; GAUGLER et al., 2014).

Um grande número de mutações relacionadas com a predisposição aos TEA tem sido descrito em genes sinápticos, como os da família SHANK, particularmente em alguns éxons, o que motivou este estudo.

SHANK1, *SHANK2* e *SHANK3* codificam proteínas de suporte localizadas na densidade pós-sináptica de sinapses glutamatérgicas. *SHANK2* e *SHANK3* exercem efeitos positivos sobre a indução e maturação das espinhas dendríticas, enquanto *SHANK1* induz o alargamento dendrítico. Assim, são fundamentais para o desenvolvimento e funcionamento cerebral normal. Então, é esperado que mutações nestes genes estejam associadas com TEA, mas a sua prevalência e relevância clínica ainda não foram determinadas (LEBLOND et al., 2014). Até mesmo

manifestações comportamentais em indivíduos com TEA tendem a ser diferentes, dependendo de qual gene *SHANK* é mutado, e mesmo em indivíduos que apresentam a mesma alteração, mas isso também não está bem explicado (GUILMATRE et al., 2014).

No presente estudo foram observadas onze alterações em *SHANK2* e *SHANK3*, cinco delas SNPs correspondendo a polimorfismos já descritos em populações normais. Mesmo as cinco alterações encontradas correspondendo a variações polimórficas na população, a contribuição para o fenótipo autístico, inclusive como efeito aditivo, como exaustivamente proposto na literatura, não pode ser descartada (CHILIAN et al., 2013; BEDFORD et al. 2014; MERIKANGAS et al. 2014).

Também, no presente estudo seis novas alterações, uma em *SHANK2* e cinco em *SHANK3*, não observadas em controles e não descritas em bancos genômicos, foram encontradas em seis (3%) pacientes com TEA, corroborando a importância destes genes no fenótipo autístico.

Deve ser considerado o fato de que foram estudados apenas seis éxons, o que significa que mutações nestes genes podem ser mais frequentes em brasileiros e/ou que os éxons estudados, com exceção do éxon 6 do *SHANK3*, podem estar mais fortemente relacionados com a etiologia.

SHANK2 está localizado em 11q13.3, tem 621,8 kb e contém 25 éxons (LAI et al., 2014), mas aqui foram investigados os éxons 11, 13 e 22. Existem muitos estudos que investigam *SHANK2* em TEA. A maioria sugere que mutações deletérias neste gene contribuem para a etiologia dos TEA, o que não foi corroborado apenas por LIU et al. (2013), em um estudo de 285 pacientes que não detectou alterações em *SHANK2*, questionando um papel “maior” do mesmo no fenótipo autístico de chineses. Entretanto, deve ser considerado que mutações no gene *SHANK2* são raras, sendo observadas em cerca de 0,17% dos pacientes com TEA ou deficiência intelectual (LEBLOND et al., 2014). Inclusive, os éxons 11, 13 e 22 estão entre aqueles com maior número de descrições de mutações (LEBLOND et al., 2012), motivo pelo qual foram selecionados para o presente estudo.

Os resultados obtidos corroboram os da literatura, que afirmam a raridade das mutações de *SHANK2* em TEA, uma vez que uma mutação ainda não descrita foi observada em um paciente, ou seja, em 0,5% da casuística. A alteração detectada no éxon 13 (posição 11:70666765 C/T), por ser nova e não observada em controles normais, inclusive, considerando-se que o número de indivíduos controle utilizado neste estudo foi cerca de três vezes maior que o da casuística, pode ser sugerida como de provável envolvimento com a predisposição ao autismo. O fato de serem

raras não diminui a importância das mutações em *SHANK2* na etiopatologia da doença do indivíduo que a possui, o que pode ser sugerido para o caso aqui estudado.

Não foi investigado se a alteração encontrada é *de novo*. Entretanto, mesmo se herdada, sua importância pode ser sugerida, especialmente se for em considerada a hipótese da ação de genes de efeito aditivo e as amplas variações fenotípicas relacionadas ao BAP e encontradas em familiares não autistas (SASSON et al., 2014).

Alguns autores apontam a importância de algumas alterações observadas mesmo em indivíduos normais como auxiliares no diagnóstico diferencial de TEA (MEFFORD et al., 2012). No entanto, os SNPs/SNVs encontrados no éxon 11 (rs11237599 e rs113262375), 13 (rs146580493 e rs149996975) e 22 (rs117843717) do gene *SHANK2* foram descritos na população normal, mas ainda não foram relacionados com TEA ou outra doença. Apesar de SNPs no éxon 13 do gene *SHANK2* sozinhos não apresentarem um poder estatístico significativo neste estudo, ambos foram encontrados juntos em dois indivíduos com autismo, o que merece ser melhor investigado.

Por outro lado, a frequência de alterações no gene *SHANK3* encontrada em autistas é sempre maior do que em *SHANK2*, estimada em cerca de 2,12% (DURAND et al., 2007; LEBLOND et al., 2014). Embora aparentemente baixa, tal frequência sobressai quando se considera o fato de existirem centenas de genes propostos como candidatos ao autismo (De RUBEIS et al., 2014). Mutações no gene *SHANK3* identificadas em autismo parecem afetar o desenvolvimento e a morfologia das espinhas dendríticas, reduzindo a transmissão sináptica em neurônios maduros (FRECHE et al., 2012; GONG et al., 2012).

Neste estudo, cinco novos SNVs foram encontrados no gene *SHANK3* no grupo de indivíduos com TEA, o que corresponde a 2,5% e corrobora as descrições anteriores; uma no éxon 2 (22:50675139 A/G) e quatro no éxon 21 (22:50721646 C/T, 22:50721985 C/T, 22:50722009 C/G e 22:50722049 C/G). Pode ser proposto um possível efeito deletério destes SNVs, que não foram detectados em controles e em banco de dados. A investigação sobre possíveis consequências na estrutura proteica e se são *de novo* ou herdadas pode auxiliar no esclarecimento desta hipótese.

Portanto, TEA, como as demais doenças neuropsiquiátricas, corresponde a um espectro de afecções complexas e altamente heterogêneas. A ausência de segregação mendeliana clássica reforça os modelos que propõem o envolvimento de muitos genes, uns mais dominantes e outros com algum efeito pequeno e aditivo, mas sempre complexo. Muitas evidências sugerem que variantes genéticas em *SHANK2* e *SHANK3*, mesmo aquelas comuns na população, quando

adicionadas a outros mecanismos biológicos presentes em cada caso m particular, conferem risco para autismo.

Assim os resultados do presente estudo corroboram a hipótese científica testada, de que mutações nos genes *SHANK2* e *SHANK3* são frequentes na população brasileira com TEA e estão relacionadas com a etiologia destas doenças. Entretanto, devem ser realizados estudos sobre a relevância clínica de cada uma das alterações encontradas.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Mutações nos éxons 11, 13 e 22 do gene *SHANK2* e nos éxons 2 e 21 do gene *SHANK3* são frequentes em indivíduos brasileiros com autismo. Mutações no éxon 6 do gene *SHANK3* parecem ser mais raras ou não ocorrem nestes indivíduos. Os achados corroboram os da literatura e revelam novas mutações possivelmente relacionadas à etiopatogenia dos Transtornos do Espectro Autístico.

Referência

7. REFERÊNCIAS

APA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION). DSM-IV - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Retardation. 4th ed. Washington (DC): American Psychiatric Press; (1994).

BEDFORD, R.; PICKLES, A.; GLIGA, T.; ELSABBAGH, M.; CHARMAN, T.; JOHNSON, M. H.; BASIS TEAM. Additive effects of social and non-social attention during infancy relate to later autism spectrum disorder. **Developmental Science**. v.17, n.4, p. 612-620, Jul 2014.

BEHURA, S. K.; SEVERSON, D. W. Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes. **Biol Rev Camb Philos Soc**. v.88, n.1, p. 49-61, Feb 2013.

BERNIER, R.; GERDTS, J.; MUNSON, J.; DAWSON, G.; ESTES, A. Evidence for broader autism phenotype characteristics in parents from multiple-incidence autism families. **Autism Research**, v.5, n.1, p. 13-20, Feb 2012.

BHARDWAJ A: Investigating the role of site specific synonymous variation in disease association studies. **Mitochondrion**, 2014, Epub 2014 Jan 14.

BOCCUTO, L.; LAURI, M.; SARASUA, S. M.; SKINNER, C. D.; BUCCELLA, D.; DWIVEDI, A.; ORTESCHI, D.; COLLINS, J. S.; ZOLLINO, M.; VISCONTI, P.; DUPONT, B.; TIZIANO, D.; SCHROER, R. J.; NERI, G.; STEVENSON, R. E.; GURRIERI, F.; SCHWARTZ, C. E. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. **Eur J Hum Genet**. v.21, n.3, p. 306-310, Mar 2013.

BONAGLIA, M. C. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid syndrome. **PLoS Genetics**, v. 7, n.7, e. 1002173, 2011.

CHAMARY, J. V.; HURST, L. D. Biased codon usage near intron-exon junctions: selection on splicing enhancers, splice-site recognition or something else? **Trends Genet**. v.21, n.5, p. 256-259, May 2005.

CHEN, J. A.; PENAGARIKANO, O.; BELGARD, T. G.; SWARUP, V.; GESCHWIND, D. H. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. **Annual Review Pathology**, v.10, p.111-44, Jan 2015.

CHILIAN B, ABDOLLAHPOUR H, BIERHALS T, HALTRICH I, FEKETE G, NAGEL I, ROSENBERGER G, KUTSCHE K: Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. **Clinical Genetics**, 2013, Epub 2013 Feb 21.

CHU D, KAZANA E, BELLANGER N, SINGH T, TUIITE MF, VON DER HAAR T: Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs. **EMBO Journal**, 2014, Epub 2013 Dec 19.

CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM.(1) *The Lancet*. v. 381, p. 1371-1379. (2013).

CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM.(2) *Nature Genetics*. v. 45, n. 9, p. 984-994. (2013).

DENAYER, A. Neuropsychopathology in 7 Patients with the 22q13 Deletion Syndrome: Presence of Bipolar Disorder and Progressive Loss of Skills. ***Molecular Syndromology***, v. 3, n.1, p. 14-20, 2012.

DE RUBEIS, S.; PASCIUTO, E.; LI K, W.; FERNANDEZ, E.; DI MARINO, D.; BUZZI, A. CYFIP1 coordinates mRNA translation and cytoskeleton remodeling to ensure proper dendritic spine formation. *Neuron*, Vol. 79, No. 6, pp. 1169–1182. 2013.

DOHERTY, J. L.; OWEN, M. J. Genomic insights into the overlap between psychiatric disorders: implications for research and clinical practice. ***Genome Medicine***. v. 6, n. 4, doi: 10.1186/gm546, 2014.

DSM- 5. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Retardation. 5th ed. Washington (DC): American Psychiatric Press APA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION). Disponível em <<http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx>> Acesso em: 10 novembro 2014.

DURAND, C. M.; Perroy, J.; Loll, F.; Perrais, D.; Fagni, L.; Bourgeron, T.; Montcouquiol, M.; Sans, N. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. ***Molecular Psychiatry***, v. 17, n.1, p. 71-84, 2012.

FERNELL, E.; ERIKSSON M. A.; GILLBERG C. Early diagnosis of autism and impact on prognosis: a narrative review. ***Journal of Clinical Epidemiology***, v. 5, p. 33-43, 2013

FRECHE, D.; Lee, C. Y.; Rouach, N.; Holcman, D. Synaptic transmission in neurological disorders dissected by a quantitative approach. ***Communicative & Integrative Biology***, v. 5, n. 5, p. 448-452, 2012.

GAUGLER, T.; KLEI, L.; SANDERS, S. J.; BODEA, C. A.; GOLDBERG, A. P.; LEE., A. B.; MAHAJAN, M.; MANAA, D.; PAWITAN, Y.; REICHERT, J.; RIPKE, S.; SKLAR, P.; SVANTESSON, O.; REICHENBERG, A.; HULTMAN, C. M.; DEVLIN, B.; ROEDER, K.; BUXBAUM, J. D. Most genetic risk for autism resides with common variation. ***Nature Genetics***. v. 46, n. 8, p.881–885, Aug 2014.

GAUTHIER, J. SPIEGELMAN, D.; PITON, A.; LAFRENIÈRE, R. G.; LAURENT, S.; ST-ONGE, J.; LAPOINTE, L.; HAMDAN, F. F.; COSSETTE, P.; MOTTTRON, L.; FOMBONNE, E.; JOOBER, R.; MARINEAU, C.; DRAPEAU, P.; ROULEAU, G. A. Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. ***American Journal of Medical Genetics Part B***, v.150B, n 3, p. 421–424, 2009.

GINGOLD, H, PILPEL Y. Determinants of translation efficiency and accuracy. **Molecular systems biology**, 2011, 7: 481.

GONG, X.; JIANG, Y. W.; ZHANG, X.; AN, Y.; ZHANG, J.; WU, Y.; WANG, J.; SUN, Y.; LIU, Y.; GAO, X.; SHEN, Y.; WU, X.; QIU, Z.; JIN, L.; WU, B. L.; WANG, H. High proportion of 22q13 deletions and SHANK3 mutations in Chinese patients with intellectual disability. **PLoS Genetics**, v. 7, n.4, p. 34739, 2012.

GUILMATRE A, HUGUET G, DELORME R, BOURGERON T: The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. **Developmental Neurobiology** 2013: 74: 113-122.

HADDAD, L. A.; MINGRONI-NETTO, R. C.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PENNA, S. D. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Human Genetics**, v. 97, n. 6, p. 808-812, 1996.

HANTASH, F. M.; GOOS, D. M.; CROSSLEY, B.; ANDERSON, B.; ZHANG, K.; SUN, W.; STROM, C. M. *FMRI* premutation carrier frequency in patients undergoing routine population-based carrier screening: insights into the prevalence of fragile X syndrome, fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, and fragile X-associated primary ovarian insufficiency in the United States. **Genetics Medical**, v. 13, n. 1, p. 39-45, 2011.

HWANG, S. J.; CHEN, Y. S. Congenital rubella syndrome with autistic disorder. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 73, n. 2, p. 104-107, 2010.

KIM, Y. S.; LEVENTHAL, B. L. Genetic epidemiology and insights into interactive genetic and environmental effects in autism spectrum disorders. **Biol Psychiatry**. v. 77, n. 1, p. 66-77, Jan 2015.

KHARBANDA, M.; TOLMIE, J.; JOSS., S. How to use... microarray comparative genomic hybridisation to investigate developmental disorders. **Archives of Disease in Childhood - Education and Practice**, v. 100, n.1, p.24-29, Feb 2015.

JONSSON, L.; ZETTERGREN, A.; PETTERSSON, E.; HOVEY, D.; ANCKARSATER, H.; WESTBERG, L.; LICHTENSTEIN, P.; LUNDSTROM, S.; MELKE, J. Association study between autistic-like traits and polymorphisms in the autism candidate regions RELN, CNTNAP2, SHANK3, and CDH9/10. **Molecular Autism**, v.5, n.55, Dec 2015.

LAI MC, LOMBARDO MV, ECKER C, CHAKRABARTI B, SUCKLING J, BULLMORE ET, HAPPÉ F, MRC AIMS CONSORTIUM, MURPHY DG, BARON-COHEN S: Neuroanatomy of Individual Differences in Language in Adult Males with Autism. **Cerebral Cortex** 2014, [Epub ahead of print].

LEBLOND, C.S.; HEINRICH, J.; DELORME, R.; PROEPPER. C, BETANCUR. C.; HUGUET, G.; KONYUKH, M.; CHASTE, P.; EY, E.; RASTAM, M.; ANCKARSÄTER, H.; NYGREN, G.; GILLBERG, I. C.; MELKE, J.; TORO. R.; REGNAULT, B.; FAUCHEREAU, F.; MERCATI,

O.; LEMIERE, N.; SKUSE, D.; POOT, M.; HOLT, R.; MONACO, A. P.; JÄRVELÄ, I.; KANTOJÄRVI, K.; VANHALA, R.; CURRAN, S.; COLLIER, D. A.; BOLTON, P.; CHIOCCHETTI, A.; KLAUCK, S. M.; POUSTKA, F.; FREITAG, C. M.; WALTES, R.; KOPP, M.; DUKETIS, E.; BACCHELLI, E.; MINOPOLI, F.; RUTA, L.; BATTAGLIA, A.; MAZZONE, L.; MAESTRINI, E.; SEQUEIRA, A. F.; OLIVEIRA, B.; VICENTE, A.; OLIVEIRA, G.; PINTO, D.; SCHERER, S. W.; ZELENKA, D.; DELEPINE, M.; LATHROP, M.; BONNEAU, D.; GUINCHAT, V.; DEVILLARD, F.; ASSOULINE, B.; MOUREN, M. C.; LEBOYER, M.; GILLBERG, C.; BOECKERS, T. M.; BOURGERON, T. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. **PLoS Genet**, v. 8, n.2, p.e1002521, 2012.

LEBLOND, C. S.; NAVA, C.; POLGE, A.; GAUTHIER, J.; HUGUET, G.; LUMBROSO, S.; GIULIANO, F.; STORDEUR, C.; DEPIENNE, C.; MOUZAT, K.; PINTO, D.; HOWE, J.; LEMIERE, N.; DURAND, C. M.; GUIBERT, J.; EV, E.; TORO, R.; PEYRE, H.; MATHIEU, A.; AMSELLEM, F.; RASTAM, M.; GILLBERG, I. C.; RAPPOLD, G. A.; HOLT, R.; MONACO, A. P.; MAESTRINE, E.; GALAN, P.; HERON, D.; JACQUETTE, A.; AFENJAR, A.; RASTETTER, A.; BRICE, A.; DEVILLARD, F.; ASSOULINE, B.; LAFFARGUE, F.; CHIESA, J.; RIVIER, F.; BONNEAU, D.; REGNAULT, B.; ZELENKA, D.; DELEPINE, M.; LATHROP, M.; SANLAVILLE, D.; SCHLUTH-BOLARD, C.; EDERY, P.; PERRIN, L.; MARSHALL, C. R.; NOOR, A.; VINCENT, J. B.; LIONEL, A.C.; FEUK, L.; SKAUG, J.; SHAGO, M.; MOESSNER, R.; PINTO, D.; REN, Y.; THIRUVAHINDRAPDURAM, B.; FIEBIG, A.; SCHREIBER, S.; FRIEDMAN, J.; KETELAARS, C. E.; VOS, Y. J.; FICICIOGLU, C.; KIRKPATRICK, S.; NICOLSON, R.; SLOMAN, L.; SUMMERS, A.; GIBBONS, C. A.; TEEBI, A.; CHITAYAT, D.; WEKSBERG, R.; THOMPSON, A.; VARDY, C.; CROSBIE, V.; LUSCOMBE, S.; BAATJES, R.; ZWAIGENBAUM, L.; ROBERTS, W.; FERNANDEZ, B.; SZATMARI, P.; SCHERER, S. W.; Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. **American journal of human genetics**, v. 82, n.2, p. 477-488, 2008.

LIU Y, DU Y, LIU W, YANG C, LIU Y, WANG H, GONG X: Lack of association between NLGN3, NLGN4, SHANK2 and SHANK3 gene variants and autism spectrum disorder in a Chinese population. **PLoS One**, 2014, Epub 2013 Feb 26.

MERIKANGAS, A.K.; SEGURADO, R.; HERON, E. A.; ANNEY, R. J.; PATERSON, A. D.; COOK, E. H.; PINTO, D.; SCHERER, S. W.; SZATMARI, P.; GILL, M.; CORVIN, A. P.; GALLAGHER, L. The phenotypic manifestations of rare genic CNVs in autism spectrum disorder. **Mol Psychiatry**, 2014, [Epub ahead of print].

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MOESSNER, R. MARSHALL, C. R.; SUTCLIFFE, J. S.; SKAUG, J.; PINTO, D.; VINCENT, J.; ZWAIGENBAUM, L.; FERNANDEZ, B.; ROBERTS, W.; SZATMARI, P.; SCHERER, S. W. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 6, p. 1289-1297, 2007.

MOHAMMADI, M. R.; ZARAFSHAN, H.; GHASEMPOUR, S. Broader Autism Phenotype in Iranian Parents of Children with Autism Spectrum Disorders vs. Normal Children. **Iranian Journal of Psychiatry**, v. 7, n. 4, p. 157-163, 2012.

MOREIRA, D. P.; GRIESI-OLIVEIRA, K.; BOSSOLANI-MARTINS, A. L.; LORENÇO, N. C.; TAKAHASHI, V. N.; da ROCHA, K. M.; MOREIRA, E. S.; VADASZ, E.; MEIRA, J. G.; BERTOLA, D.; HALLORAN, E. O.; MAGALHÃES, T. R.; FETT-CONTE, A. C.; PASSOS-BUENO, M. R. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in Autism Spectrum Disorder Brazilian Individuals with and without Epilepsy. **PLoS One**, v. 9, n. 9, Sep 2014.

MURDOCH JD, STATE MW: Recent developments in the genetics of autism spectrum disorders. **Current opinion in genetics & development**, 2013, 23:310-315.

OZONOFF, S.; YOUNG, G. S.; CARTER, A.; MESSINGER, D.; YIRMIYA, N.; ZWAIGENBAUM, L.; BRYSON, S.; CARVER, L. J.; CONSTANTINO, J. N.; DOBKINS, K.; HUTMAN, T.; IVERSON, J. M.; LANDA, R.; ROGERS, S. J.; SIGMAN, M.; STONE, W. L. Recurrence risk for autism spectrum disorders: A Baby Siblings Research Consortium study. **Pediatrics**, v. 128, n. 3, p.488–495, Sep 2011.

PERCHE, O.; LAUMONNIER, F.; BAALA, L.; ARDOUREL, M. Y.; MENUET, A.; ROBIN, V.; MORTAUD, S.; MONTÉCOT-DUBOURG, C.; RICHARD, O.; PICHON, J.; BRIAULT, S. Autism, genetics and synaptic function alterations. **Pathologie-Biologie**, v. 58, n. 3, p. 381-386, 2010.

PEYKOV, S.; BERKEL, S.; SCHOEN, M.; WEISS, K.; DEGENHARDT, F.; STROHMAIER, J.; WEISS, B.; PROEPPEL, C.; SCHRATT, G.; NOTHEN, M. N.; BOECKERS, T. M.; RIETSCHEL, M.; RAPPOLD, G. A. Identification and functional characterization of rare SHANK2 variants in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, p. 1–10, Jan 2015.

PHELAN, K.; MCDERMID, H. E. The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). **Molecular Syndromology**. v. 2, n. 3-5, p. 186-201, 2012.

ROBINSON, E.B.; SAMOCHA, K. E.; KOSMICKI, J. A.; MCGRATH, L.; NEALE, B. M.; PERLIS, R. H.; DALY, M. J. Autism spectrum disorder severity reflects the average contribution of de novo and familial influences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 111, n. 42, p. 15161- 15165, Oct 2014.

SASSON, I. E.; VITINS, A. P.; MAINIGI, M. A.; MOLEY, K. H.; SIMMONS, R. A. Pre-gestational vs gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice. 2014 [Epub ahead of print].

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIQUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan 1988.

SANDIN, S.; LICHTENSTEIN, P.; KUJA-HALKOLA, R.; LARSSON, H.; HULTMAN, C. M.; REICHENBERG, A. The familial risk of autism. **Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 17, p. 1770-1777, May 2014.

SARASUA, S. M.; DWIVEDI, A.; BOCCUTO, L.; ROLLINS, J. D.; CHEN, C. F.; ROGERS, R. C.; PHELAN, K.; DUPONT, B. R.; COLLINS, J. S. Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermid syndrome (22q13 deletion syndrome). **Journal of medical genetics**, v. 48, n. 11, p. 761-766, 2011.

SHEN, Y.; DIES, K.A.; HOLM, I. A.; BRIDGEMOHAN, C.; SOBEIH, M. M.; CARONNA, E. B.; MILLER, K. J.; FRAZIER, J. A.; SILVERSTEIN, I.; PICKER, J.; WEISSMAN, L.; RAFFALLI, P.; JESTE, S.; DEMMER, L. A.; PETERS, H.K.; BREWSTER, S. J.; KOWALCZYK, S. J.; ROSEN-SHEIDLEY, B.; MCGOWAN, C.; DUDA, A. W. 3RD, LINCOLN, S. A.; LOWE, K. R.; SCHONWALD, A.; ROBBINS, M.; HISAMA, F.; WOLFF, R.; BECKER, R.; NASIR, R.; URION, D. K.; MILUNSKY, J.M.; RAPPAPORT, L.; GUSELLA, J. F.; WALSH, C. A.; WU, B. L.; MILLER, D. T. Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders, **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. 727-735, 2010.

SOORYA, L.; KOLEVZON, A.; ZWEIFACH, J.; LIM, T.; DOBRY, Y.; SCHWARTZ, L.; FRANK, Y.; WANG, A.T.; CAI, G.; PARKHOMENKO, E.; HALPERN, D.; GRODBERG, D.; ANGARITA, B.; WILLNER, J.P.; YANG, A.; CANITANO, R.; CHAPLIN, W.; BETANCUR, C.; BUXBAUM, J.D.; Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. **Molecular Autism**, 2013, 4:18.

STATE, M. W. Another piece of the autism puzzle. **Nature Genetics**, v. 42, n. 6, p. 478-479, 2010.

TABET, A. C.; SCHMEISSER, M. J.; BOECKERS, T. M.; COLERMAN, M.; SATO, D.; SZATMARI, P.; SCHERER, S. W.; ROULEAU, G. A. BETANCUR, C.; LEBOYER, M.; GILLBERG, C.; DELORME, R.; BOURGERON, T. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. **Plos Genetics**, v.10, n. 9, Sep 2014.

TORDJMAN S, SOMOGYI E, COULON N, KERMARREC S, COHEN D, BRONSARD G, BONNOT O, WEISMANN-ARCACHE C, BOTBOL M, LAUTH B, GINCHAT V, ROUBERTOUX P, BARBUROTH M, KOVESS V, GEOFFRAY MM, XAVIER J: Gene × Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. **Frontiers in Psychiatri**, 2014, eCollection 2014.

WAGA, C.; OKAMOTO, N.; ONDO, Y.; FUKUMURA-KATO, R.; GOTO, Y.; KOHSAKA, S.; UCHINO, S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. **Psychiatric Genetics**, v. 21, n. 4, p. 208-211, 2011.

YUEN, R. K.; THIRUYAHINDRAPURAM, B.; WALKER, S.; TAMMIMIES, K.; HOANG, N.; CHRYSLER, C.; NALPATHAMKALAM, T.; PELLECCIA, G.; LIU, Y.; GAZZELLONE, M. J.; D'ABATE, L.; DENEALU, E.; HOWE, J. L.; LIU, R. S.; THOMPSON, A.; ZARREI, M.;

UDDIN, M.; MARSHALL, C. R.; RING, R. H.; ZWAIGENBAUM, L.; RAY, P. N.; WEKSBERG, R.; CARTER, M. T.; FERNANDEZ, B. A.; ROBERTS, W.; SZATMARI, P.; SCHERER, S. W. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. **Nature Medicine**, Jan 2015.

8. APÊNDICES

8.1 Apêndice A: Artigo à ser submetido a revista BMC Psychiatry (FI: 2,23) intitulado - Identification of mutations in the shank2 synaptic gene in brazilians patients with autism spectrum disorder

IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN THE *SHANK2* SYNAPTIC GENE IN BRAZILIANS PATIENTS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER

Dante Bruno Avanso Rosan^{1*}, Patrícia Pereira do Nascimento¹, Ana Luiza Bossolani Martins²,
Suzana Ezquina³, Maria Rita de Passos e Bueno³, Agnes Cristina Fett-Conte⁴

1. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP; São José do Rio Preto, SP, Brazil.
2. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS Campus Paranaíba; Paranaíba, MS, Brazil.
3. Universidade de São Paulo – USP/SP, São Paulo, SP, Brazil.
4. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

***Dante Bruno Avanso Rosan - Corresponding Author**

Institutional address: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/ UNESP; Rua Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil;
Email: danterosan@gmail.com

Patricia Pereira do Nascimento

Institutional address: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/ UNESP; Rua Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil;
Email: patyppn.bio@gmail.com

Ana Luiza Bossolani Martins

Institutional address: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; Avenida Pedro Pedrossian, n.º725, Bairro Universitário, 9.500-000 Paranaíba - MS; **Email:** anabossolani@gmail.com

Suzana Ezquina: Universidade de São Paulo, Avenida Professor Almeida Prado, 1280 - Butantã, 05508-900 São Paulo – SP; **Email:** sezquina@gmail.com

Maria Rita de Passos e Bueno: Universidade de São Paulo, Avenida Professor Almeida Prado, 1280 - Butantã, 05508-900 São Paulo – SP; **Email:** passos@ib.usp.br

Agnes Cristina Fett Conte

Institutional address: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; **Email:** genetica@famerp.br

Abstract

Background

Autism comprises a wide range of neuro-developmental disorders known as autism spectrum disorders (ASD), characterized by deficits in verbal and non-verbal communication, impaired social interactions, restricted interest, and stereotyped behavior. The behavioral phenotype seems to be related to variable molecular mechanisms, involving changes in several genes that act in the brain and promoting an additive effect. With a very complex etiology, a large number of mutations have been described in genes involved in the predisposition, especially those encoding proteins involved in synapses. Among them, the *SHANK2* gene is one of the most related to ASD, coding a synaptic scaffold protein, which is expressed at the developing post-synaptic density.

Method

We investigated the presence of alterations on exons 11, 13 and 22 of *SHANK2* gene by direct sequencing in 200 Brazilian individuals with ASD. The data were analyzed and compared to a group of normal individuals without neuropsychiatric disorders.

Results:

We found the single-nucleotide polymorphism (SNP) rs11237599 C/T and SNP rs113262375 G/A on exon 11, the SNP rs146580493 C>T and SNP rs149996975 C>T on exon 13, and the SNV rs117843717 G>A on exon 22. No significant differences in the frequency of these alterations were found when the cases and control subjects were compared. However, a not yet related in dbSNP heterozygous mutation was found in position 11:70789502 G/T on exon 13 of *SHANK2* gene in one patient but not in the control group.

Conclusions

Our findings in the Brazilian population can suggest an association of the new variation in position 11:70789502 G/T of *SHANK2* with ASD, but further investigations on larger samples sizes need to be done. Strong Evidences suggest that genetic variants in *SHANK2*, even those common in the population, when added to other biological mechanisms present in each particular case may to play an etiological role in autism. Thus, it cannot be excluded a role of the other polymorphisms that we found in the etiology of the behavioral phenotype of their carriers.

Keywords: autism, SHANK family, polymorphism

Background

Autism spectrum disorders (ASD), also currently called "autism" are defined as a common neuropsychiatric disorder with a prevalence of about 1%, characterized by impairments in social interaction, communication and behavior, with stereotypes and repetitions with restricted interests. These manifestations are usually observed before three years of age with varying levels of impairment throughout the development of the individual and occurs in all ethnic and social groups, which males being more frequently affected with a 4:1 ratio [1, 2, 3]. The behavioral phenotype is highly variable and seems to be related to the genetic molecular mechanisms involved in the etiology of each particular case [4].

The etiology of ASD is very complex and can only be determined in a few number of cases, and this depends on the casuistic selection and the laboratory techniques utilized. Genetic factors are strongly linked to the etiology of ASD, involving changes in several genes that act in the brain and act promoting an additive effect [6].

A large number of mutations related to predisposition have been described in synaptic genes as those of SHANK family. SHANK genes (*SHANK1*, *SHANK2* and *SHANK3*) code for scaffold proteins located at the post-synaptic density of glutamatergic synapses. *SHANK2* and *SHANK3* have a positive effect on the induction and maturation of dendritic spines, whereas *SHANK1* induces the enlargement of spine heads. Mutations in these genes have been associated with ASD, but their prevalence and clinical relevance remains to be determined [2]. Behavioral changes in individuals with ASD tend to differ depending on which SHANK gene is mutated however the reason remains unknown [3].

Few studies have investigated *SHANK2* in ASD, but all suggested that deleterious mutations contribute to etiology of disorder [1, 3]. *SHANK2* is located on chromosome 11q13.3, spans 621.8 kb and contains 25 exons coding a synaptic scaffold protein expressed at the developing post-synaptic density (PSD) [1]. We present the results of an investigation in exons 11, 13 and 22 in Brazilian individuals with ASD.

Methods

Subjects

The study was approved by the Ethics Research Committee of the School of Medicine in São José do Rio Preto. Written informed consent was obtained from all the patients or their legal guardians.

Were studied 200 individuals with idiopathic ASD of any age, sex and population with a conclusive diagnosis of Autism Spectrum Disorder according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV) criteria by psychiatrists members of interdisciplinary teams and autism specialists. Whenever possible, an interview based on Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) and Childhood-Autism Rating Scale (CARS) evaluation was applied, as previously reported Moreira et. al, 2014 [7].

The patients were evaluated by clinical geneticists to exclude possible associated syndromes and environmental etiologic factors. All they presented negative results for chromosomal abnormalities by conventional GTG-banding and the affected boys tested negative for Fragile X Syndrome. The control group was formed by 566 healthy Brazilian individuals without psychiatric disorders and no family history for at least three generations.

Molecular study

Blood samples from probands were obtained for genomic DNA isolation, which was extracted from whole peripheral blood samples by the Ficoll Paque method according Miller et al [8] to a concentration at least (50 ng/ μ L). The primers that were used in this study are shown in Table 1.

The polymerase chain reaction (PCR) for the three exons were performed in 20.0 μ L total volume, containing 8.9 μ L of ultrapure water, 2 μ L of reaction 10x Buffer, 2.0 μ L dNTP (1.25mM), 0.4 μ L of each primer (sense and anti-sense) (10pM), 4.0 μ L of Betaine, 0.3 μ L of Taq Polymerase and 2.0 μ L of DNA (50ng/ μ L). The amplification cycles included an initial denaturation at 95° (2 min), followed by 35 cycles at 95°C (30s), 60°C (30s), 72°C (40s), and a final extension at 72°C (10 min).

The amplified samples were purified with illustra™ ExoStar™ and subjected to the sequencing reaction with BigDye® Terminator protocol, with 2 μ L of Big Dye, 1 μ L of Buffer 5x, 1 μ L of primer (5pM), 2 μ L of purified samples and 4 μ L of ultrapure water. The DNA sequence data was analysis with Sequencher 5.2.4 software.

The obtained alterations were compared with the *SHANK2* reference sequence available in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), *1000 Genomes-A Deep Catalog of Human Genetic Variation* (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) and National Heart, Lung,

and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

To assess the differences in SNP/SNV prevalence between the two groups, ASD-affected individuals and control, we conducted Fisher's exact tests. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

We found the missense SNP (rs11237599) C/T in the position 11:70820660 on exon 11 in 37(18.5%) individuals with ASD, 36 heterozygotes and one homozygous. This SNP was observed in 184 (32.6%) of the control group individuals, all in heterozygosis. These frequencies differed statistically ($p=0.0002$). In the position 11:70666673 of the same exon, two autistic patients (1%) presented a missense SNP (rs113262375) G/A which appeared in 17 (3%) in the control subjects. No significant differences in the frequencies of this alteration when the cases and control subjects were compared ($p=1.0$).

Two polymorphisms in heterozygosis were found on exon 13. The missense SNP rs146580493 C/T on 11:70644619 was found in five autistic individuals (2.5%) and in six (1.1%) controls ($p=0.1666$). The missense SNP rs149996975 C/T on the position 11:70644619 was found in three (1.5%) patients and five (0.8%) controls ($p=0.4367$). Two of the patients showed both SNPs in heterozygosis. No significant difference in the frequencies of these alterations when the cases and control subjects were compared.

We found another alteration in the position 11:70666765 on exon 13 in heterozygosis in one female patient (0.5%) with autism but not in the control group. This mutation was not presented in the current NCBI, *1000 Genomes* and NHLBI/ESP databases.

In the exon 22, one patient (0.5%) presented the missense SNV rs117843717 G/A in heterozygosis located in 11:70336479. The frequency in control group was 0.3% (two patients) and not was differed statistically ($p=0.4543$).

Discussion

Rare variations dominate the allelic spectrum in autism, but also common variations are proposed as to have impact in this disorder [9] having been demonstrated to play an important role in the risk to autism [10].

Previous studies show that mutations in the SHANK family of synaptic genes were detected in patients with ASD and there are evidences for rare and highly penetrant genetic variant related to an etiological role in some neurodevelopmental disorders [11].

There is no great number of studies investigating *SHANK2* in ASD. Mutations in *SHANK2* gene are rare and are present in about 0.17% of patients with ASD and mild intellectual disability [2]. Although the majority of studies suggested that deleterious mutations contribute to etiology of disorder [12]. In a study of 285 patients. No alterations in *SHANK2* were found, questioning a major role of this gene in Chinese with ASD according LIU et al. (2013).

We describe a patient with ASD and a SNV on exon 13 of *SHANK2* not previously described (position 11:70666765). We do not know about the possible deleterious effect of this SNV, but as not was detected in Brazilian control subjects and normal people around the world, can be suggested that this SNV can be associated with the autism predisposition.

A lot of polymorphisms in other synaptic genes were described as related to ASD. Some authors point the importance of them as auxiliary in the differential diagnosis of these disorders [13]. However, the SNPs/SNVs that we found in exon 11 (rs11237599 and rs113262375), 13 (rs146580493 and rs149996975) and 22 (rs117843717) were previously described in normal populations according the databases, but no yet related with ASD or other diseases. Although SNPs on exon 13 of *SHANK2* alone have not presented with statistic significance, both were found together in two autistic individuals, what needs to be better investigate.

All detected variations were missense mutations. Synonymous mutations had been forgotten and considered as harmless, however, some studies have demonstrated functional consequences of these mutations due to decrease in transcription, translation and altered protein folding [14, 15]. It should also be noted that these synonymous variants also have downstream signaling consequences [16].

Thereby, synonymous codon changes may not always be neutral indicating their significance in disease association studies synonymous substitutions may affect protein-folding. Some studies suggests that variation data in association studies should be analyzed using site-specific codon usage values to infer the potential phenotypic impact of synonymous changes [17].

The evolutionary selection of codons whose properties are optimal for a cell generates the phenomenon of codon bias. Although recent studies have shown strong effects of codon usage changes on protein expression levels and cellular physiology, no translational control mechanism is known that links codon usage to protein expression levels [18].

The genetic background of neuropsychiatric disorders are complex and highly heterogeneous. The absence of classical Mendelian segregation reinforces the models that propose the involvement of many genes with a smaller and additive effect. According to literature, rare and also common polymorphism and variations can exert a substantial role in additive genetic effects and risks for ASD, together with the environment complex contribution, so our results cannot be underestimated.

Conclusion

Our findings in the Brazilian population can suggest an association of the new variation in position 11:70789502 G/T of *SHANK2* with ASD, but further investigations on larger samples sizes need to be done. Strong Evidences suggest that genetic variants in *SHANK2*, even those common in the population, when added to other biological mechanisms present in each particular case may to play an etiological role in autism. Thus, it cannot be excluded a role of the other polymorphisms that we found in the etiology of the behavioral phenotype of their carriers.

Competing interests

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Author's contributions

DBAR Conceptualized and designed the study, participated of data collection, carried out the molecular genetic studies, karyotype analysis, data analysis and statistical analysis, drafted the initial manuscript, reviewed the manuscript and approved the final manuscript as submitted. PPN participated of data collection, carried out the karyotype and molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. ALBM participated of data collection, carried out the karyotype and molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. SE analyzed the data and approved the final manuscript as submitted. MRPB participated at the support the implementation

of part of molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. ACFC conceptualized and designed the study, supervised data collection, participated in the investigation and review of the diagnoses, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

Acknowledgement

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) process number 2013/14919-6 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors would like to acknowledge all the participants in this study and families.

References

- 1- Lai MC, Lombardo MV, Ecker C, Chakrabarti B, Suckling J, Bullmore ET, Happé F, MRC AIMS Consortium, Murphy DG, Baron-Cohen S: **Neuroanatomy of Individual Differences in Language in Adult Males with Autism.** *Cerebral Cortex* 2014, [Epub ahead of print].
- 2- Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, Giuliano F, Stordeur C, Depienne C, Mouzat K, Pinto D, Howe J, Lemièrre N, Durand CM, Guibert J, Ey E, Toro R, Peyre H, Mathieu A, Amsellem F, Rastam M, Gillberg IC, Rappold GA, Holt R, Monaco AP, Maestrini E, Galan P, Heron D, Jacqueline A, Afenjar A. et al.: **Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments.** *PLoS Genetic* 2014; eCollection 2014.
- 3- Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T: **The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders.** *Developmental Neurobiology* 2013: **74**: 113-122.
- 4- Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, Kermarrec S, Cohen D, Bronsard G, Bonnot O, Weismann-Arcache C, Botbol M, Lauth B, Ginchat V, Roubertoux P, Barburoth M, Kovess V, Geoffroy MM, Xavier J: **Gene × Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms.** *Frontiers in Psychiatr* 2014, eCollection 2014.
- 5- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium: **Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs.** *Nature Genetics* 2013, Epub 2013 Aug 11.
- 6- Chilian B, Abdollahpour H, Bierhals T, Haltrich I, Fekete G, Nagel I, Rosenberger G, Kutsche K: **Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci.** *Clinical Genetics* 2013, Epub 2013 Feb 21.
- 7- Moreira DP, Griesi-Oliveira K, Bossolani-Martins AL, Lourenço NC, Takahashi VN, da Rocha KM, Moreira ES, Vadasz E, Meira JG, Bertola D, Halloran EO, Magalhães TR, Fett-Conte AC, Passos-Bueno MR: **Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy.** *PLoS One* 2014, eCollection 2014.
- 8- Miller S.A, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Research* 1988, **16**:1215.

- 9- Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, Mahajan M, Manaa D, Pawitan Y, Reichert J, Ripke S, Sandin S, Sklar P, Svantesson O, Reichenberg A, Hultman CM, Devlin B, Roeder K, Buxbaum JD: **Most genetic risk for autism resides with common variation.** *Nature Genetics* 2014, Epub 2014 Jul 20.
- 10- Murdoch JD, State MW: **Recent developments in the genetics of autism spectrum disorders.** *Current opinion in genetics & development* 2013, **23**:310-315.
- 11- Soorya L, Kolevzon A, Zweifach J, Lim T, Dobry Y, Schwartz L, Frank Y, Wang AT, Cai G, Parkhomenko E, Halpern D, Grodberg D, Angarita B, Willner JP, Yang A, Canitano R, Chaplin W, Betancur C, Buxbaum JD: **Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency.** *Molecular Autism* 2013, **4**:18.
- 12- Liu Y, Du Y, Liu W, Yang C, Liu Y, Wang H, Gong X: **Lack of association between NLGN3, NLGN4, SHANK2 and SHANK3 gene variants and autism spectrum disorder in a Chinese population.** *PLoS One* 2014, Epub 2013 Feb 26.
- 13- Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP: **Genomics, Intellectual Disability, and Autism.** *The New England Journal of Medicine* 2012, **366**:733-743.
- 14- Chamary JV, Hurst LD: **Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals.** *Genome biology* 2005, **9**, Epub 2005.
- 15- Gingold, H, Pilpel Y. **Determinants of translation efficiency and accuracy.** *Molecular systems biology* 2011, **7**: 481.
- 16- Nizialek EA, Peterson C, Mester JL, Downes-Kelly E, Eng C: **Germline and somatic KLLN alterations in breast cancer dysregulate G2 arrest.** *human molecular genetics* 2014, **22**: 2451-2461.
- 17- Bhardwaj A: **Investigating the role of site specific synonymous variation in disease association studies.** *Mitochondrion* 2014, Epub 2014 Jan 14.
- 18- Chu D, Kazana E, Bellanger N, Singh T, Tuite MF, von der Haar T: **Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs.** *EMBO Journal* 2014, Epub 2013 Dec 19.

Tables

Table 1. Primers sequences and amplicon size of *SHANK2* gene.

<i>Primer</i>	<i>Primers 5' - 3'</i>		<i>Amplicon size (base pairs)</i>
Éxon 11	<i>SHANK2E11F</i>	ACGACACAGATGCACTCACC	462
	<i>SHANK2E11R</i>	GGCTTCCTGCTCAACTTCTG	
Éxon 13	<i>SHANK2E13F</i>	CCCACTCGTCTTGTTCAACC	236
	<i>SHANK2E13R</i>	AGATAGGCCTGCAGGATCG	
Éxon 22	<i>SHANK2E22F</i>	TCTCACCCTAGGCTCTCTGG	172
	<i>SHANK2E22R</i>	GCAACTTCTGTGGGGGAGT	

8.2 Apêndice B: Artigo à ser submetido a revista BMC Psychiatry (FI: 2,23) intitulado - new mutations of the *shank3* synaptic gene in brazilian patients with austism spectrum disorder

NEW MUTATIONS OF THE *SHANK3* SYNAPTIC GENE IN BRAZILIAN PATIENTS WITH AUSTISM SPECTRUM DISORDER

Dante Bruno Avanso Rosan¹, Patrícia Pereira do Nascimento¹, Ana Luiza Bossolani Martins², Suzana Ezquina³, Maria Rita de Passos e Bueno³, Agnes Cristina Fett-Conte⁴

1. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP; São José do Rio Preto, SP, Brazil.
2. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS Campus Paranaíba; Paranaíba, MS, Brazil.
3. Universidade de São Paulo – USP/SP, São Paulo, SP, Brazil.
4. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Corresponding Author

***Dante Bruno Avanso Rosan**

Institutional address: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/ UNESP; Rua Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil;

Email: danterosan@gmail.com

Patricia Pereira do Nascimento

Institutional address: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/ UNESP; Rua Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil;

Email: patyppn.bio@gmail.com

Ana Luiza Bossolani Martins

Institutional address: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; Avenida Pedro Pedrossian, n.º725, Bairro Universitário, 9.500-000 Paranaíba - MS; **Email:** anabossolani@gmail.com

Suzana Ezquina

Institutional address: Universidade de São Paulo, Avenida Professor Almeida Prado, 1280 - Butantã, 05508-900 São Paulo – SP; **Email:** sezquina@gmail.com

Maria Rita de Passos e Bueno

Institutional address: Universidade de São Paulo, Avenida Professor Almeida Prado, 1280 - Butantã, 05508-900 São Paulo – SP; **Email:** passos@ib.usp.br

Agnes Cristina Fett-Conte

Institutional address: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; **Email:** genetica@famerp.br

Abstract

Background

Autism spectrum disorders (ASD), the most common neuropsychiatric disorders, are characterized by social impairment, impaired communication and early onset restricted/repetitive behavior. The etiology is very complex and the behavioral phenotype seems to be related to variable molecular mechanisms that involve changes in several genes that act on the brain with an additive effect. Some mutations in synaptic genes have been associated to predisposition with the *SHANK3* gene being one of the most commonly reported in ASD. This gene codes a synaptic scaffold protein, which is expressed in the developing postsynaptic density.

Method

The presence of alterations in exons 2, 6 and 21 of the *SHANK3* gene by direct sequencing was investigated in 200 Brazilian individuals with ASD. The data were analyzed and compared to a group of individuals without apparent neuropsychiatric disorders.

Results

Sequence analysis revealed five previously undescribed alterations in the *SHANK3* gene of five unrelated patients (2.5%), which were not found in the control group. One patient presented a heterozygous single nucleotide variation (SNV) at position 22:50675139 A/G on exon 2, and the other four presented different heterozygous SNVs (22:50721646 C/T, 22:50721985 C/T, 22:50722009 C/L and 22:50722049 C/L) all in exon 21.

Conclusions

Our findings suggest a possible association between these variations of exons 2 and 21 of the *SHANK3* gene with ASD in Brazilian subjects. Mutations in exon 6 of the *SHANK3* gene appear to be rarer or do not exist in these individuals. Our findings are in accordance with the literature and reveal new mutations, possibly related to the pathogenesis of ASD.

Keywords: Autism, Synaptic, SHANK family.

Background

According to DSM-5 [1], ‘autism’ or autism spectrum disorders (ASD) are severe neuropsychiatric disorders characterized by impairment in social communications, with restricted stereotypes and repetitive interests. The prevalence is about 1% of the population with males being affected four times more frequently than females [2, 3, 4]. The behavioral characteristics of ASD are observed before the age of three and there is a wide variety of clinical manifestations; the etiology is heterogeneous and complex.

The etiology of ASD can be determined or presumed in approximately 10-25% of cases depending on the selection of patients and the choice of laboratorial strategies. Genetic factors involving changes in several genes, which are mainly expressed in the brain and act with an additive effect resulting in the behavioral phenotype, are strongly linked to the etiology of ASD [5]. Many environmental factors are also involved in the etiology. [6]. The number of candidate genes suspected in predisposition to ASD has increased significantly in recent years and now runs into hundreds; this has led some authors to propose that the sequencing of the entire genome is the only effective strategy for identifying the genes involved in each particular case [7]. Most genes are expressed during brain development and in the adult brain, or participate in the development and functioning of neuronal processes, such as those encoding proteins involved in synapses. Among the most important are the SHANK family of genes (SHANK1, SHANK2 and SHANK3), which encode scaffolding proteins of the postsynaptic density of glutamatergic synapses [4]

SHANK2 and *SHANK3* have a positive effect on the induction and maturation of dendritic spines, whereas *SHANK1* induces the enlargement of spine heads. Mutations in these genes have been associated with ASD, but their prevalence and clinical relevance remains to be determined [3,4].

The *SHANK3* gene is located in the 22q13.3 region, has 22 exons [8,9] and is predominantly expressed in the cerebral cortex and cerebellum [10,11]. The *SHANK3* protein connects glutamate receptors to the actin cytoskeleton via a chain of intermediary elements. Genetic studies have demonstrated a strong association of *SHANK3* mutations to susceptibility for psychiatric diseases, however, little is known about the neural consequences of these mutations [12,13]. Mutations in the *SHANK3* gene identified in autism seem to affect the development and morphology of dendritic spines, thereby reducing synaptic transmission in mature neurons [14,15].

This study presents the results of an investigation of exons 2, 6 and 21 in Brazilian individuals with ASD.

Methods

Subjects

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto. Written informed consent was obtained from all patients or their legal guardians.

Two hundred individuals with idiopathic ASD were studied regardless of age, gender or racial background. In all cases diagnosis by psychiatrists, members of interdisciplinary teams and autism specialists, was conclusive according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV). Whenever possible, an interview based on Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) and Childhood-Autism Rating Scale (CARS) were applied as previously reported [16].

All patients were evaluated by clinical geneticists to exclude possible associated syndromes and environmental etiologic factors. Conventional GTG-banding was performed and all patients had negative results for chromosomal abnormalities. Male patients were tested and were negative for Fragile X Syndrome. A control group was formed of 566 Brazilian individuals without apparent psychiatric disorders and with no family history of psychiatric disorders for at least three generations.

Molecular study

Peripheral blood samples were collected from the probands. Genomic DNA was extracted at a concentration of at least (50 ng/ μ L) from the whole blood sample using the Ficoll Paque method according to Miller et al. [17]. The primers that were used in this study are shown in Table 1.

Polymerase chain reaction (PCR) for exon 2 was performed using 20.0 μ L total volume, containing 8.9 μ L of ultrapure water, 2 μ L of reaction 10x Buffer, 2.0 μ L deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP - 1.25 mM), 0.4 μ L of each primer (sense and antisense) (10 pM), 4.0 μ L of Betaine, 0.3 μ L of Taq polymerase and 2.0 μ L of DNA (50 ng/ μ L). The amplification process involved an initial denaturation at 95° (2 min), followed by 35 cycles at 95°C (30s), 68°C (30s), 72°C (40s), and a final extension at 72°C (10 min).

For exon 6, PCR was performed in 20.0 μ L total volume, containing 7.7 μ L of ultrapure water, 2 μ L of reaction 10x Buffer, 2.0 μ L dNTP (1.25mM), 0.5 μ L of each primer (sense and antisense) (10 pM), 4.0 μ L of Betaine, 0.3 μ L of Platinum® Taq polymerase, 1.0 μ L of MgCl₂ and

2.0 μL of DNA (50 ng/ μL). The amplification process involved an initial denaturation at 95° (2 min), followed by 35 cycles at 95°C (30s), 61°C (30s), 72°C (40s), and a final extension at 72°C (10 min).

Exon 22 was separated using five primers due to the large number of base pairs. For exon 22 the PCR protocol for primer 1 used 20.0 μL total volume, containing 12.3 μL of ultrapure water, 2 μL of reaction 10x Buffer, 2.0 μL dNTP (1.25mM), 0.4 μL of each primer (sense and anti-sense) (10 pM), 0.6 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.3 μL of Platinum® Taq polymerase and 2.0 μL of DNA (50 ng/ μL). The amplification process involved an initial denaturation at 95° (2 min), followed by 35 cycles at 95°C (30s), 51°C (30s), 72°C (40s), and a final extension at 72°C (10 min).

The PCR for exon 22 with primers 2 and 5 was performed in 20.0 μL total volume, containing 8.9 μL of ultrapure water, 2 μL of reaction 10x Buffer, 2.0 μL dNTP (1.25 mM), 0.4 μL of each primer (sense and antisense) (10 pM), 4.0 μL of Betaine, 0.3 μL of Taq polymerase and 2.0 μL of DNA (50 ng/ μL). The amplification process involved an initial denaturation at 95° (2 min), followed by 35 cycles at 95°C (30s), touchdown of 70-60°C (30s), 72°C (40s), and a final extension at 72°C (10 min).

For primers 3 and 4, the PCR protocol for exon 22 was performed in 20.0 μL total volume, containing 8.9 μL of ultrapure water, 2 μL of reaction 10x Buffer, 2.0 μL dNTP (1.25 mM), 0.4 μL of each primer (sense and antisense) (10 pM), 4.0 μL of Betaine, 0.3 μL of Taq polymerase and 2.0 μL of DNA (50 ng/ μL). The amplification process involved an initial denaturation at 95° (2 min), followed by 35 cycles at 95°C (30s), 60°C (30s), 72°C (40s), and a final extension at 72°C (10 min).

The amplification products were purified with illustra™ ExoStar™ and subjected to a sequencing reaction using the BigDye® Terminator protocol with 2 μL of Big Dye, 1 μL of Buffer 5x, 1 μL of primer (5 pM), 2 μL of purified samples and 4 μL of ultrapure water. The DNA sequence data was analysis with the Sequencher 5.2.4 software.

Any alterations identified were compared with the *SHANK3* reference sequences available in the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), 1000 Genomes-A Deep Catalog of Human Genetic Variation (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) and National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

Results

Sequence analysis revealed five previously undescribed alterations in the *SHANK3* gene of five of the 200 patients (2.5%) with no alterations being found in the control group. One patient presented a heterozygous single nucleotide variation (SNV) at position 22:50675139 A/G of exon 2. And four alterations of exon 21 were found in four other autistic individuals. These alterations were located at positions 22:50721646 C/T, 22:50721985 C/T, 22:50722009 C/L and 22:50722049 C/L. All the patients presented a normal sequence of exon 6.

Discussion

In addition to ASD being considered a paradigm of neurobehavioral disorders, the etiology is one of the current scientific challenges, given its extreme complexity.

Thus, a large number of mutations associated with predisposition to ASD have been described in synaptic genes, including in the SHANK family of genes, which motivated this study.

SHANK gene mutations have been detected across the whole spectrum of ASD with a gradient of severity in cognitive impairment [3]. Even behavioral manifestations in individuals with ASD tend to be different depending on which SHANK gene is mutated, but this is not well explained yet. Rare variations dominate the allelic spectrum in autism, but common variations are believed to have an impact in this disorder as well [18] as they seem to play an important role in the risk for autism [19]. A missense mutation in exon 2 (L68P) was observed only in affected individuals when compared to normal controls [20,21]. In addition to the haploinsufficiency of the gene, the presence of extra copies has been associated with Asperger syndrome [12] and deletions of *SHANK3* have been associated with more severe autistic phenotypes [12].

The number of studies investigating *SHANK3* is growing. Mutations in this gene are rare, present in about 2.17% of patients [3,20]. Although apparently low, this frequency is relatively high when one remembers that there are hundreds of possible candidate genes proposed in the susceptibility for autism [22]. In this study, five alterations not present in the controls and not yet listed in any genomic database were found in five (2.5%) patients with ASD, highlighting the importance of this gene in the autistic phenotype.

Also, it should be remembered that this study only investigated three exons; thus these mutations may be common in Brazilians or these exons, except for exon 6, may be involved in the etiology of ASD.

We do not know about the possible deleterious effects of these SNVs but, as they were not detected in Brazilian control subjects and are not found in apparently healthy people around the world, they may be associated with predisposition for autism. Research on possible effects on the protein structure may help to clarify this hypothesis. [23].

Conclusion

Mutations in exons 2 and 21 of the *SHANK3* gene are common in Brazilian individuals with autism. Mutations in exon 6 of the *SHANK3* gene appear to be rarer or do not exist in these individuals. These findings corroborate the literature but also other mutations that are possibly related to the pathogenesis of ASD were identified in this study.

Competing interests

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Author's contributions

DBAR Conceptualized and designed the study, participated in data collection, carried out molecular genetic studies, karyotype analysis, data analysis and statistical analysis, drafted the initial manuscript, reviewed the manuscript and approved the final manuscript as submitted. PPN participated in data collection, carried out karyotype and molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. ALBM participated in data collection, carried out karyotype and molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. SE analyzed the data and approved the final manuscript as submitted. MRPB participated by supporting the implementation of part of molecular analysis and approved the final manuscript as submitted. ACFC conceptualized and designed the study, supervised data collection, participated in the investigation, reviewed the diagnoses, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

Acknowledgement

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) process number 2013/14919-6 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors would like to thank all the participants in this study and their families.

References

- 1- DSM- 5. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Retardation. 5th ed. Washington (DC): American Psychiatric Press APA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION). Disponível em <<http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx>>: November 10 , 2014..
- 2- Lai MC, Lombardo MV, Ecker C, Chakrabarti B, Suckling J, Bullmore ET, Happé F, MRC AIMS Consortium, Murphy DG, Baron-Cohen S: **Neuroanatomy of Individual Differences in Language in Adult Males with Autism.** *Cerebral Cortex* 2014, [Epub ahead of print].
- 3- Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, Giuliano F, Stordeur C, Depienne C, Mouzat K, Pinto D, Howe J, Lemièrre N, Durand CM, Guibert J, Ey E, Toro R, Peyre H, Mathieu A, Amsellem F, Rastam M, Gillberg IC, Rappold GA, Holt R, Monaco AP, Maestrini E, Galan P, Heron D, Jacquette A, Afenjar A. et al.: **Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments.** *PLoS Genetic* 2014; eCollection 2014.
- 4- Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T: **The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders.** *Developmental Neurobiology* 2013; **74**: 113-122.
- 5- FERNELL, E.; ERIKSSON M. A.; GILLBERG C. **Early diagnosis of autism and impact on prognosis: a narrative review.** *Journal of Clinical Epidemiology*, 2013; . 5:33-43.
- 6- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium: **Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs.** *Nature Genetics* 2013, Epub 2013 Aug 11.
- 7- YUEN, R. K.; THIRUYAHINDRAPURAM, B.; WALKER, S.; TAMMIMIES, K.; HOANG, N.; CHRYSLER, C.; NALPATHAMKALAM, T.; PELLECCCHIA, G.; LIU, Y.; GAZZELLONE, M. J.; D'ABATE, L.; DENEALULT, E.; HOWE, J. L.; LIU, R. S.; THOMPSON, A.; ZARREI, M.; UDDIN, M.; MARSHALL, C. R.; RING, R. H.; ZWAIGENBAUM, L.; RAY, P. N.; WEKSBERG, R.; CARTER, M. T.; FERNANDEZ, B. A.; ROBERTS, W.; SZATMARI, P.; SCHERER, S. W. **Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder.** *Nature Medicine*, 2015. [Epub ahead of print].
- 8- SARASUA, S. M; DWIVEDI, A.; BOCCUTO, L.; ROLLINS, J. D.; CHEN, C. F.; ROGERS, R. C.; PHELAN, K.; DUPONT, B. R.; COLLINS, J. S. **Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermind syndrome (22q13 deletion syndrome).** *Journal of medical genetics*, 2011; 48.11:761-766.

- 9- WAGA, C.; OKAMOTO, N.; ONDO, Y.; FUKUMURA-KATO, R.; GOTO, Y.; KOHSAKA, S.; UCHINO, S. **Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development.** *Psychiatric Genetics*, 2011: 21.4:208-2011.
- 10- HWANG, S. J.; CHEN, Y. S. **Congenital rubella syndrome with autistic disorder.** *Journal of the Chinese Medical Association*, 2010:73.2:104-107.
- 11- GONG, X.; JIANG, Y. W.; ZHANG, X.; AN, Y.; ZHANG, J.; WU, Y.; WANG, J.; SUN, Y.; LIU, Y.; GAO, X.; SHEN, Y.; WU, X.; QIU, Z.; JIN, L.; WU, B. L.; WANG, H. **High proportion of 22q13 deletions and SHANK3 mutations in Chinese patients with intellectual disability.** *PLoS Genetics*, 2012:7.2:34739.
- 12- DURAND, C. M.; Perroy, J.; Loll, F.; Perrais, D.; Fagni, L.; Bourgeron, T.; Montcouquiol, M.; Sans, N. **SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism.** *Molecular Psychiatry*, 2012: 17.1:71-84.
- 13- JONSSON, L.; ZETTERGREN, A.; PETTERSSON, E.; HOVEY, D. ANCKARSATER, H.; WESTBERG, L.; LICHTENSTEIN, P.; LUNDSTROM, S.; MELKE, J. **Association study between autistic-like traits and polymorphisms in the autism candidate regions RELN, CNTNAP2, SHANK3, and CDH9/10.** *Molecular Autism*, 2015:5.55.
- 14- FRECHE, D.; Lee, C. Y.; Rouach, N.; Holcman, D. **Synaptic transmission in neurological disorders dissected by a quantitative approach.** *Communicative & Integrative Biology*, 2012: 5.5:448-452.
- 15- GONG, X.; JIANG, Y. W.; ZHANG, X.; AN, Y.; ZHANG, J.; WU, Y.; WANG, J.; SUN, Y.; LIU, Y.; GAO, X.; SHEN, Y.; WU, X.; QIU, Z.; JIN, L.; WU, B. L.; WANG, H. **High proportion of 22q13 deletions and SHANK3 mutations in Chinese patients with intellectual disability.** *PLoS Genetics*, 2012: 7.4:34739.
- 16- Moreira DP, Griesi-Oliveira K, Bossolani-Martins AL, Lourenço NC, Takahashi VN, da Rocha KM, Moreira ES, Vadasz E, Meira JG, Bertola D, Halloran EO, Magalhães TR, Fett-Conte AC, Passos-Bueno MR: **Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy.** *PLoS One* 2014, eCollection 2014.
- 17- Miller S.A, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Research* 1988, **16**:1215.
- 18- Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, Mahajan M, Manaa D, Pawitan Y, Reichert J, Ripke S, Sandin S, Sklar P, Svantesson O, Reichenberg A, Hultman CM, Devlin B: Roeder K, Buxbaum JD: **Most genetic risk for autism resides with common variation.** *Nature Genetics* 2014, Epub 2014 Jul 20.
- 19- Murdoch JD, State MW: **Recent developments in the genetics of autism spectrum disorders.** *Current opinion in genetics & development* 2013, **23**:310-315.
- 20- Durand, C.M.; Betancur, C.; Boecker, S. T. M.; Bockmann, J.; Chaste, P.; Fauchereau, F.; Nygren, G.; Rastam, M.; Gillberg, I. C.; Anckarsäter, H.; Sponheim, E.; Goubran-Botros, H.; Delorme, R.; Chabane, N.; Mouren-Simeoni, M. C.; de Mas, P.; Bieth, E.; Rogé, B.; Héron, D.; Burglen, L.; Gillberg, C.; Leboyer, M.; Bourgeron, T. **Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders.** *Nature Genetics* 2012: 39.1:7-25.
- 21- GAUTHIER, J. SPIEGELMAN, D.; PITON, A.; LAFRENIÈRE, R. G.; LAURENT, S.; ST-ONGE, J.; LAPOINTE, L.; HAMDAN, F. F.; COSSETTE, P.; MOTTRON, L.; FOMBONNE, E.; JOOBER, R.; MARINEAU, C.; DRAPEAU, P.; ROULEAU, G. A. **Novel**

- de novo SHANK3 mutation in autistic patients.** American Journal of Medical Genetics Part B, 2009:150B421–424.
- 22- DE RUBEIS, S.; PASCIUTO, E.; LI K, W.; FERNANDEZ, E.; DI MARINO, D.; BUZZI, A. **CYFIP1 coordinates mRNA translation and cytoskeleton remodeling to ensure proper dendritic spine formation.** *Neuron*, 2013: 79.6:1169–1182.
- 23- SASSON, I. E.; VITINS, A. P.; MAINIGI, M. A.; MOLEY, K. H.; SIMMONS, R. A. **Pre-gestational vs gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice.** 2014 [Epub ahead of print].

Tables

Table 1. Primers sequences and amplicon size of *SHANK3* gene.

<i>Primer</i>	Primers 5' a 3' com cauda M13		Tamanho do amplicon (pb)
Éxon 2	<i>SHANK3E2F</i>	GACCTGAGCTCACGAGCCCGCT	320
	<i>SHANK3E2R</i>	CTGCCGTGCCCTTCACTGGTC	
Éxon 6	<i>SHANK3E6F</i>	GCCTGGTGTGGATACTGAGG	273
	<i>SHANK3E6R</i>	CCCTACAGACAGAGCCAGGA	
Éxon 22	<i>SHANK3E22F1</i>	TGTA AACGACGGCCAGT AAGGCTGGCCTCTGTGGGAGG	856
	<i>SHANK3E22R1</i>	CAGGAAACAGCTATGACCACGGACAGGAACACAGTGGAG	
	<i>SHANK3E22F2</i>	TGTA AACGACGGCCAGT CAAGAGCCCCCTGGTGAAGCA	500
	<i>SHANK3E22R2</i>	CAGGAAACAGCTATGACC GCTCTCGGGCAGCCAGGGCAA	
	<i>SHANK3E22F3</i>	TGTA AACGACGGCCAGT TGCCCTGAAGCCGTTGGTCAG	315
	<i>SHANK3E22R3</i>	CAGGAAACAGCTATGACC ACCTTCTCTGCCTCCCTGCGA	
	<i>SHANK3E22F4</i>	TGTA AACGACGGCCAGT CCTGTTTGTGGATGTACAGGCC	714
	<i>SHANK3E22R4</i>	CAGGAAACAGCTATGACC ACCGTGGAGATGGTGCTTGTG	
	<i>SHANK3E22F5</i>	TGTA AACGACGGCCAGT CTCAGGGAAGCCCAGCAGTGA	666
	<i>SHANK3E22R5</i>	CAGGAAACAGCTATGACC AGAACAGACAAGAGGAATGAC	