



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ana Luiza Bossolani Martins

Análise citogenética em alta resolução de 2q37 e 22q13 e molecular
do gene *SHANK3* em Doenças do Espectro Autístico

São José do Rio Preto
2010

Ana Luiza Bossolani Martins

Análise citogenética em alta resolução de 2q37 e 22q13 e molecular
do gene *SHANK3* em Doenças do Espectro Autístico

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.

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

São José do Rio Preto
2010

Martins, Ana Luiza Bossolani

Análise citogenética em alta resolução de 2q37 e 22q13 e molecular do gene SHANK3 em Doenças do Espectro Autístico / Ana Luiza Bossolani Martins. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2010.

86 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Agnes Cristina Fett Conte

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Citogenética. 2. Autismo em crianças - Aspectos genéticos. 3. Crianças - Desvio do desenvolvimento - Aspectos genéticos. 4. Doenças do espectro autístico - Aspectos genéticos. 5. 2q37. 6. 22q13. 7. SHANK3. I. Fett-Conte, Agnes Cristina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

Ana Luiza Bossolani Martins

Análise citogenética em alta resolução de 2q37 e 22q13 e molecular do gene *SHANK3* em Doenças do Espectro Autístico.

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.

Banca Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Carina Tatiana Giunco
Fundação Padre Albino – Catanduva

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

São José do Rio Preto
24/fevereiro/2010

Agradecimentos

À Deus.

Aos meus pais, Maria Inês e José Manoel, e aos meus familiares, pelo incentivo ao ensino, por me ensinarem a lutar na dificuldade e a não desistir nunca diante de um sonho, como esse.

À minha orientadora, Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte, pela confiança depositada, aos ensinamentos científicos acumulados no decorrer da minha vida acadêmica, à paciência, o carinho e dedicação durante a realização desse trabalho, além da amizade formada entre nós.

A todas as famílias do grupo de estudos de pacientes pela participação, tempo disponível, pelo contato, essa parte com certeza de muita aprendizagem.

A Adriana Barbosa Gonçalves por transmitir sua experiência, seja ao lidar com as famílias envolvidas nesse projeto, seja durante os procedimentos laboratoriais, mas principalmente por seu dinamismo, atenção, pela confiança depositada em mim nesses últimos três anos, e por todos os bons momentos que passamos juntas nos finais de semana no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Genética Cristina Benitez Vendrame Goloni, Valéria Cristina Ferrarese da Silva, Brasilina Fátima Mafei, Andrea Borduchi e Paula Abdala com os quais eu aprendo lições de vida todos os dias.

A Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni pela orientação e disponibilidade durante a execução de parte desse estudo.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira por pelo auxílio e precisão durante a execução de parte desse estudo, e “por abrir as portas” do seu laboratório.

Ao técnico do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Tiago Henrique por todo auxílio, paciência e pela amizade formada entre nós.

A técnica do Laboratório de Virologia, Silvia Helena Pereira Nunes por realizar o processo final do sequenciamento de todos os indivíduos estudados e também por sua atenção.

A Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva por “abrir as portas do seu laboratório” e por toda a cooperação recebida nesse estudo.

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica pela atenção, pelo auxílio, pelo ambiente de cordialidade e respeito que tornaram esse trabalho agradável.

Aos amigos Camila Ive Ferreira Oliveira, Carlos Fabian Mendiburu e Paula Curi de Freitas por toda ajuda, paciência, carinho e companheirismo durante esses dois anos de trabalho.

Aos amigos Ana Paula da Silva Perez, Gustavo Cassiano Cappati, Leandro Pires Araújo, Vanessa Bellini Bardella, Lilian Nogueira, Fabiana Nakashima, Daniela Prudente Teixeira Nunes, Camila Vieira, Fernanda Castanheira, Natália Guelfi Furlani, Getúlio Minoru, Patricia Zazeri Leite, Felipe Micalli, Felipe Cavassan, Adriana Sicuto de Oliveira, que me ajudaram e estiveram ao meu lado nos meus melhores e nos meus piores dias.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.,

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, onde foi possível iniciar meus conhecimentos científicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas pelo apoio e incentivo a participação de eventos científicos durante esse período.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

“Seja responsável por aquilo que deseja se tornar.”
(Autor desconhecido)

RESUMO

As Doenças do Espectro Autístico incluem o Autismo, o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação e a Síndrome de Asperger. A etiologia é muito discutida, devido a sua variação e complexidade. São doenças que se manifestam nos três primeiros anos de vida, com uma variação clínica que inclui comportamento ritualístico, fala ausente ou pouco desenvolvida, além de problemas graves de relacionamento. Em 5 a 37 % dos casos são observadas em comorbidade com outras afecções. Em indivíduos com estas doenças já foram descritas alterações em todos os cromossomos e há genes propostos como candidatos de estarem envolvidos na etiopatogenia. Também, há relatos de casos com alterações subteloméricas, especialmente deleções, envolvendo as extremidades distais dos braços longos dos cromossomos 2 e 22. Mais recentemente foram observadas mutações no gene *SHANK3*, que está localizado em 22q13.3, na população com Doenças do Espectro Autístico. Este trabalho apresenta os resultados de um estudo citogenético e molecular realizado em 48 indivíduos com doenças do espectro autístico. Foram estudados o cariótipo por bandamento GTG convencional, as regiões 2q37 e 22q13 pela técnica de bandamento GTG em alta resolução, os éxons 8 e 22 do gene *SHANK3* por seqüenciamento direto. A análise cariotípica convencional e dos éxons 8 e 22 revelaram resultados normais. A análise em alta resolução de um indivíduo mostrou resultado com possível deleção em 2q37, que não foi confirmada por técnica complementar. O número restrito de pacientes estudados deve ser considerado, porém pode ser sugerido que alterações em 2q37, 22q13 e dos éxons 8 e 22 do gene *SHANK3*, sejam eventos mais raros do que se supunha em Doenças do Espectro Autístico e sua investigação pode ser indicada na triagem de pacientes e para o aconselhamento genético das famílias não seja justificada. Entretanto, essas investigações poderiam ser indicadas nessa população quando ela for selecionada quanto à presença de características dismórficas indicativas de

possíveis deleções envolvendo as regiões 2q37 e 22q13. Além de avaliação molecular do gene *SHANK3*, quando a região 22q13 estiver deletada.

Palavras-chave: doenças do espectro autístico, 2q37, 22q13, *SHANK3*.

ABSTRACT

The autism spectrum disorders including autism, Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified and Asperger syndrome. The etiology is much debated due to its variation and complexity. These are disorders that are manifested in the first three years of life, with a clinical variant that includes ritualistic behavior, speech absent or poorly developed, in addition to serious relationship. In 5 to 37% of cases are observed in association with other diseases. In individuals with these diseases have been described changes in all chromosomes and genes are proposed as candidates to be involved in pathogenesis. Also, there are reports of cases with subtelomeric changes, especially deletions involving the distal ends of the long arms of chromosomes 2 and 22. More recently, mutations were observed in the gene *SHANK3*, which is located on 22q13.3, in the population with autism spectrum disorders. This paper presents the results of a cytogenetic and molecular study performed in 48 individuals with autistic spectrum disorders. We studied the karyotype by GTG conventional regions 2q37 and 22q13 by GTG banding technique in high resolution, the exons 8 and 22 *SHANK3* gene by direct sequencing. The conventional karyotype analysis and exons 8 and 22 point normal results. The high resolution analysis of an individual with demonstrated results possible deletion in 2q37, which was not confirmed by complementary technique. The small number of patients should be considered, but may be suggested that changes in 2q37, 22q13 and exons 8 and 22 of the gene *SHANK3*, are more rare than previously thought on the autism spectrum disorders and their investigation may be indicated in screening of patients for genetic counseling of families is not justified. However, these investigations could be cited in this population when it is selected for the presence of dysmorphic features indicative of possible deletions involving regions 2q37 and 22q13. In addition to molecular analysis of gene *SHANK3*, when the region 22q13 is deleted.

Keywords: autistic spectrum disorders, 2q37, 22q13, *SHANK3*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regiões associadas com DEA, com seus respectivos genes candidatos.....	24
Figura 2	Sinapse excitatória mostrando a proteína shank (circulada em vermelho) com a neuroligina (circulada em rosa), ligada a neuroxina (circulada em azul) que participam da formação do complexo de densidade pós-sináptica (PSD).....	30
Figura 3	Diagrama do cromossomo 2 à esquerda e par de cromossomos 2 à direita, em bandamento GTG em alta resolução, com destaque da região 2q37 presente no par de homólogos.....	47
Figura 4	Metáfase em bandamento GTG em alta resolução. O ideograma do cromossomo 22 à esquerda e as setas indicam a região 22q13.3 presente no par de homólogos.....	47
Figura 5	(a) Esquema representativo das bandas GTG do cromossomo 2 à esquerda e par de cromossomos 2 normais à direita. As setas indicam 2q37 (b) Esquema representativo das bandas GTG do cromossomo 2 à esquerda, cromossomo 2 normal no centro e sugestivo de deleção em 2q37 do paciente (seta vermelha), à direita (c) Metáfase parcial submetida à técnica de FISH, com os quatro sinais normais em vermelho. As setas azuis e pretas indicam a região centromérica e a região 2q37, respectivamente.....	48
Figura 6	Perfil eletroforético em gel de agarose 2% correspondente a amplificação do éxon 8 do gene <i>SHANK3</i> nas colunas 2-7 e 9-11. Marcação com Ladder de 100pb na coluna 1, ausência de amplificação na coluna 8 e controle negativo na coluna 12.....	49
Figura 7	Perfil eletroforético em gel de agarose 2% correspondente a amplificação do éxon 22-ponto1 do gene <i>SHANK3</i> nas colunas de 2-4 e 6-13. Marcação com Ladder de 100pb na coluna 1, ausência de amplificação na coluna 5 e controle negativo na coluna 14.....	49

Figura 8	Perfil eletroforético em gel de agarose 2% correspondente a 3, 6, 8-10 e 12. Marcação com Ladder de 100pb na coluna 1, ausência de amplificação nas colunas 2, 4-5, 7 e controle negativo na coluna 13.....	50
Figura 9	Eletroferograma parcial das sequências <i>right</i> e <i>left</i> do éxon 8 do gene <i>SHANK3</i> contendo a região de 80-157pb do <i>amplicon</i> total de 200pb analisadas no programa <i>DS Gene 2.0 (Accelrys, USA)</i>	50
Figura 10	Eletroferograma parcial das sequências <i>right</i> e <i>left</i> do ponto 1 do éxon 22 do gene <i>SHANK3</i> contendo os primeiros 80pb do total do <i>amplicon</i> de 186pb analisadas no programa <i>DS Gene 2.0 (Accelrys, USA)</i>	51
Figura 11	Eletroferograma parcial das sequências <i>right</i> e <i>left</i> do ponto 2 do éxon 22 do gene <i>SHANK3</i> contendo a região de 50-127pb do total do <i>amplicon</i> de 183pb analisadas no programa <i>DS Gene 2.0 (Accelrys, USA)</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização da casuística quanto à idade (em anos), sexo, diagnóstico e procedência.....	33
Tabela 2	Resultados obtidos das diferentes análises realizadas em cada caso estudado.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Programa de amplificação utilizado para os <i>primers</i> 1 e 2 do gene <i>SHANK3</i>	39
Quadro 2	Programa de amplificação utilizado para o <i>primer</i> 3 do gene <i>SHANK3</i>	39
Quadro 3	Condições de reação utilizadas para a amplificação dos éxons oito e 22 do gene <i>SHANK3</i>	40
Quadro 4	<i>Primers</i> para amplificação e sequenciamento do gene <i>SHANK3</i>	40

SUMÁRIO

	Resumo.....	VIII
	Abstract.....	X
1	Introdução.....	18
1.1	Caracterização dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento.....	18
1.2	Etiologia das DEA.....	21
1.3	Regiões subteloméricas e DEA.....	24
1.4	Gene <i>SHANK3</i>	26
2	Objetivos.....	30
3	Material e Métodos.....	31
3.1	Casuística.....	31
3.2	Métodos.....	33
3.2.1	Cultura de linfócitos, bandamento GTG convencional e em alta resolução.....	34
3.2.2	Extração de DNA.....	35
3.2.3	Amplificação do DNA extraído.....	36
3.2.4	Eletroforese em gel de agarose.....	37
3.2.5	Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento.....	40
3.2.6	Sequenciamento do gene <i>SHANK3</i>	40
4	Resultados.....	42
5	Discussão.....	51
6	Conclusões.....	57
7	Referências.....	58
8	Anexos.....	68
8.1	Anexo A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	68
9	Apêndices.....	71
9.1	Apêndice A- Análise citogenética por bandamento GTG convencional e em alta resolução da região 2q37 em pacientes com doenças do Espectro Autístico.....	71

9.2	Apêndice B- Molecular Evaluation of exon 8 e 22 of the <i>SHANK3</i> gene in Autism Spectrum Disorders.....	73
9.3	Apêndice C- Evaluation of 2q37 and 22q13 by High Resolution Cytogenetics in Brazilians with Autism Spectrum Disorder.....	82

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento

A designação Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (*Pervasive Developmental Disorders* - PDD) surgiu no final dos anos 60, derivada especialmente dos trabalhos de M. Rutter, I. Kolvin e D. Cohen (MERCADANTE; VAN DER GAAG; SCHWARTZMAN, 2006). Refere-se a um grupo de doenças psiquiátricas que se caracterizam por manifestações em três áreas (domínios): social, da comunicação e do comportamento. A interação social e as habilidades de comunicação estão qualitativamente prejudicadas. O comportamento padrão é caracterizado por repetições e estereotípias, com interesses muito limitados, entre outros (APA, 1994).

A identificação dos PDD e suas manifestações seguem os critérios diagnósticos descritos no Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM – IV) (APA, 1994), e se baseia no número e distribuição de aspectos comportamentais de cada domínio, assim como na idade das manifestações. Incluem cinco diagnósticos: Autismo, Síndrome de Asperger, Síndrome de Rett, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (PDD-NOS). O Código Internacional de Doenças (CID-10) inclui também outras duas categorias, Autismo Atípico e Transtorno Hiperativo Associado com Retardo Mental e Movimentos Estereotipados (CARVALHEIRA; VERGANI; BRUNONI, 2004; SCHMIDT et al., 2008).

As manifestações cognitivas destas doenças psiquiátricas são altamente variáveis e podem ser muito semelhantes. São descritos desde indivíduos com quadros clínicos muito exacerbados, que incluem ausência total de linguagem oral, retardo mental grave e auto-injúrias, até indivíduos com um QI acima da média, apesar de apresentarem prejuízos na linguagem e habilidades sociais

inadequadas (GILLBERG; COLEMAN, 2000; BARON-COHEN et al., 2001; MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004).

Indivíduos com PDD também podem apresentar outras manifestações clínicas, como convulsões, que são observadas em cerca de 30% dos casos, o que sugere a ocorrência de dano cerebral pela ação de fatores neurobiológicos (HUGHES, 2009).

Dentre os diagnósticos, o Autismo é o mais estudado, provavelmente pela precocidade das manifestações e maior frequência populacional em geral (HUGHES, 2009). Compromete quatro vezes mais meninos do que meninas e é caracterizado por prejuízos no desenvolvimento global, que inclui respostas anormais a estímulos auditivos e visuais, problemas graves de relacionamento social, comportamento ritualístico, isolamento, aderência inflexível a rotinas e rituais, preocupações persistentes com partes de objetos, estereotípias motoras, agitar de mãos e balançar do corpo, capacidade diminuída para pensamentos abstratos e simbólicos, ou para jogos imaginativos, e inteligência subnormal, normal ou acima do normal. Também são observados déficits qualitativos na comunicação, como a falta ou atraso no desenvolvimento da linguagem (não compensada por outros meios de comunicação), dificuldade de abstração, uso estereotipado de linguagem, incapacidade em iniciar e manter diálogo, entre outros (NIKOLOV; JONKER; SCAHILL, 2006; BENÍTEZ-BURRACO, 2008). O brincar também está comprometido no autista, que não participa de brincadeiras imaginativas espontâneas e sociais imitativas que seriam apropriadas para sua idade cronológica (LOSH et al., 2008; SINZIG et al., 2008).

O risco de recorrência na irmandade é alto e os estudos de gêmeos monozigóticos mostram uma herdabilidade de 60 a 90 %, o que mostra a participação de forte componente genético na etiologia da doença. Não há relação com status de imigração, condições socioeconômicas ou etnia (MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004).

Na Síndrome de Asperger também há prejuízos precoces na interação social, os interesses são restritos e o comportamento é repetitivo, como os observados no Autismo, porém, não há atraso significativo na linguagem, o

desenvolvimento cognitivo geralmente está preservado e a memória pode ser prodigiosa. Os indivíduos com essa síndrome ficam isolados socialmente, mas não por ficarem ausentes, mas porque na presença de outras pessoas eles se aproximam, mas de forma excêntrica e totalmente inadequada. Por exemplo, podem se apresentar ao interlocutor, geralmente um adulto, com uma conversa caracterizada como longa e “pedante” sobre um assunto restrito e apenas de interesse próprio (KLIN et al, 2003; KOPRA et al., 2008; ROY et al., 2009).

O Transtorno Desintegrativo da Infância é diagnosticado quando há regressão, a partir de cerca de três anos de idade, de habilidades anteriormente adquiridas de comportamento, cognição e de linguagem. Os pais referem uma total regressão do comportamento, que passa a apresentar características autísticas (MORDEKAR et al, 2009).

A Síndrome de Rett afeta predominantemente mulheres e também se caracteriza por regressão do desenvolvimento, mas progressiva e acompanhada por atrofia muscular e cerebral, que resulta em um quadro típico de estereotipia manual e marcha alterada (BADOE, 2009).

PDD-NOS é uma categoria diagnóstica de exclusão. Um indivíduo pode receber este diagnóstico se preencher critérios do domínio social e mais um dos dois outros domínios (comunicação ou comportamento). Ocorrem prejuízos graves no desenvolvimento da interação social recíproca e na capacidade de comunicação verbal ou não-verbal, além de outros, mas em número insuficiente para ser considerado o diagnóstico de Autismo ou outro PDD, de acordo com os critérios convencionais (MERCADANTE et al., 2006; MATSON et al., 2008).

Assim, os PDD são doenças comportamentais com manifestações precoces e muito semelhantes entre si, o que dificulta o diagnóstico diferencial (APA, 1994; BOSA, 2006; GUPTA; STATE 2006; SEGENRICH; MATTOS, 2007; BENÍTEZ-BURRACO, 2008; LOSH et al., 2008). Em função desta dificuldade, dada a sutileza e relativa subjetividade dos critérios diagnósticos, especialmente entre Autismo, Síndrome de Asperger e PDD-NOS, essas três condições foram incluídas em um grupo referido como Doenças do Espectro Autístico – DEA (CDC, 2006).

A prevalência das DEA ainda não está esclarecida. Há estimativas muito variáveis, de 3:10.000 indivíduos da população em geral, até 66:10.000, o que equivaleria a 1:150, ou seja, extremamente alta. Discute-se se há um aumento progressivo real da frequência destas doenças na população, e especulam-se diversos fatores de risco, ou se este aumento resulta do fato dos diagnósticos estarem se tornando mais precoces e dos profissionais da educação e da saúde estarem mais atentos aos sintomas, o que levaria à identificação de um número maior de casos (CURRENTI, 2009).

1.2 Etiologia das DEA

A etiologia das DEA possui um forte componente genético sugerido pelos estudos de ligação, pela recorrência familiar, alta concordância em gêmeos monozigóticos e descrições de afetados com diferentes alterações em diversos genes e regiões cromossômicas. Além disto, fatores ambientais também têm sido sugeridos como importantes na etiologia e no aumento da prevalência das DEA, não apenas pelos efeitos cerebrais disruptivos que causam no cérebro, mas por seus possíveis efeitos sobre a regulação de alguns genes (HERBERT et al., 2006; BUXBAUM et al., 2007; CURRENTI, 2009).

Entre os fatores ambientais sugeridos como envolvidos no desenvolvimento das DEA estão: anticorpos maternos, que poderiam agir contra proteínas do cérebro fetal e alterar seu desenvolvimento; terapias com antipiréticos (antitérmicos), como acetaminofeno (paracetamol), que interferem no desenvolvimento normal do cérebro; infecções virais durante a gestação, como por rubéola, *Hemophilus influenzae* e citomegalovírus, que resultam em lesões cerebrais, e exposição intra-uterina a medicamentos, como talidomida e valproato, a metais pesados e a radiação eletromagnética (VORSTMAN et al., 2006; BRAUNSCHWEIG et al., 2008; SINGER et al., 2008).

Na verdade, parece que fatores ambientais e genéticos combinados definem o risco para as DEA, segundo a hipótese proposta por Deth et al (2008). De acordo com a hipótese, o risco para o autismo não depende de fator isolado e poderia ser influenciado por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em

qualquer nível das vias neuro-anatômicas ou metabólicas, associados com a exposição a fatores de risco ambiental. Por exemplo, o polimorfismo MTHFR C677T causa uma diminuição na atividade enzimática relacionada ao metabolismo do folato. A não suplementação dos afetados com ácido fólico no período pós-natal poderia resultar em regressão neurológica e risco aumentado para autismo (CURRENTI, 2009).

As DEA são etiologicamente muito heterogêneas. Em apenas 10% dos casos a causa pode ser conhecida, incluindo-se as genéticas. Entre elas, as mais freqüentes são as mutações no gene *FMR1*, que resultam na síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA), nos genes *TSC1* e *TSC2* da Esclerose Tuberosa e anormalidades cromossômicas (MOESSNER et al., 2007).

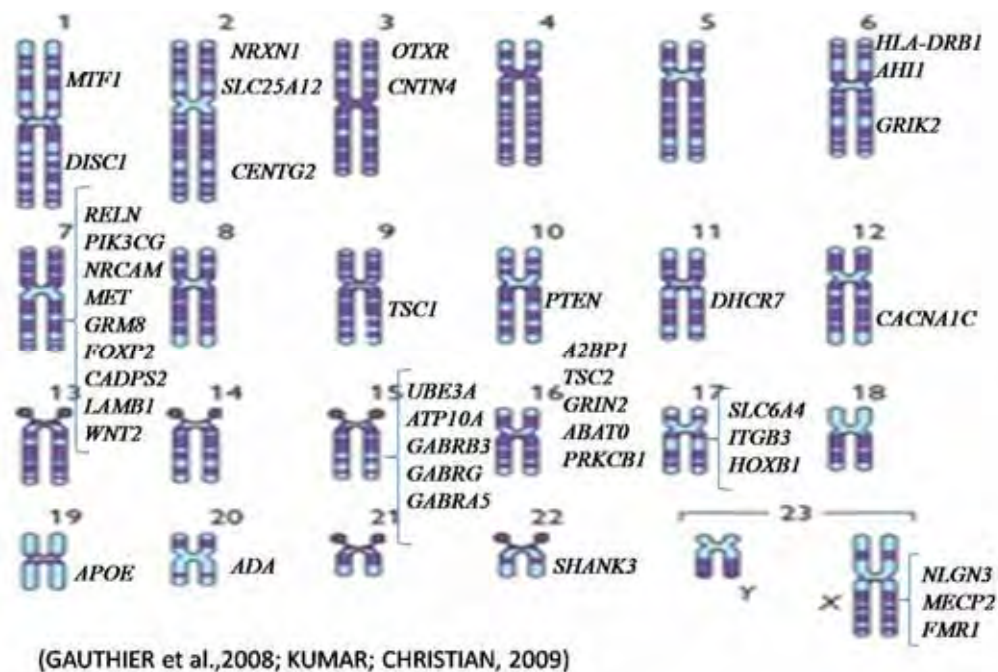
A análise do cariótipo mostra alterações em 3 a 6% dos casos. As deleções e duplicações em 2q, 7q, 15q e 22q são comumente relatadas (DURAND et al., 2007, NEWBURY et al., 2009). Contudo, o significado funcional destas alterações permanece desconhecido, pois há variação do tamanho das regiões cromossômicas e diversidade de loci envolvidos. Também, a maioria dos rearranjos é observada em casos esporádicos nas famílias ou ocorre *de novo* em indivíduos com história familiar positiva de DEA, o que dificulta a interpretação (BATTAGLIA; BONAGLIA, 2006).

Anormalidades cromossômicas têm sido investigadas em DEA porque os afetados, além dos sintomas nas três áreas do prejuízo, também apresentam uma variedade de alterações físicas e comportamentais comumente associadas com tais anormalidades, como retardo mental, epilepsia e dismorfismos faciais (WASSINK et al., 2007).

Há uma variedade de genes candidatos propostos como envolvidos na etiologia das DEA. Apesar dos resultados promissores e dos estudos de associação, os dados obtidos ainda são inconclusivos, o que se deve à heterogeneidade genética, ao provável envolvimento de muitos genes que interagem entre si, epistasia, interações gene-ambiente e variabilidade na expressão, além da influência de mecanismos epigenéticos, como *imprinting* e inativação do X (VORSTMAN et al., 2006).

Outro fator complicador na interpretação da etiologia é o fato da expressão de alguns genes ser influenciada por regiões reguladoras específicas localizadas a distâncias relativamente grandes, mesmo em outros cromossomos, o que dificulta a seleção de genes candidatos. Entre os já propostos, muitos se expressam no cérebro ou durante o desenvolvimento cerebral, como os que codificam proteínas envolvidas nas sinapses, no sistema serotoninérgico e genes do sistema ácido gama-aminobutírico (VORSTMAN et al., 2006).

As regiões associadas com DEA, com seus respectivos genes candidatos, são destacadas abaixo na Figura 1.



O desenvolvimento de *microarray* baseado em CGH (Comparative Genomic Hybridization) tem possibilitado a detecção de microdeleções e microduplicações submicroscópicas em pacientes com DEA. Estas têm sido referidas como Variação no Número de Cópias (CNVs), que parecem ter um papel fundamental no autismo, maior do que previamente se pensava. Um estudo recente encontrou 51 CNVs específicas em 46 de 397 pacientes com DEA, que possivelmente resultaram no desequilíbrio de dose de 272 genes, muitos dos considerados candidatos. CNVs *de novo* também já foram observadas em 7% das famílias com DEA e somente em 1% das famílias controles (CHRISTIAN et al,

2009; SYKES et al., 2009; WANG et al., 2009). Inclusive, a descoberta de CNVs ligadas ao X pode contribuir para explicar a prevalência aumentada em homens (MARSHALL et al., 2008).

Contudo, as mudanças no número de cópias no genoma humano não ocorrem exclusivamente em pacientes, pois também são observadas em indivíduos não afetados. Embora a prevalência na população seja desconhecida, é possível que os desequilíbrios genômicos sustentem a variação fenotípica humana, mas também a susceptibilidade a doenças (VORSTMAN et al., 2006).

Em DEA também foram descritas alterações submicroscópicas em regiões subteloméricas, muito difíceis de serem diagnosticadas em uma avaliação cariotípica de rotina. A extremidade distal do braço longo do cromossomo 2 (2q37) e do 22 (22q13.3) são as regiões alteradas em alguns casos, principalmente com deleções (WOLFF et al., 2002; LUKUSA et al., 2005, SEGURADO et al., 2005).

Muitos estudos preconizam a análise convencional do cariótipo e em alta resolução (HRK) em pacientes com DEA. A análise em alta resolução não detecta de forma precisa anormalidades menores que ~5Mb e também pode não detectar anormalidade maiores não detectadas em bandamento GTG convencional. Estas limitações são particularmente problemáticas na análise das regiões subteloméricas, que são ricas em genes, susceptíveis a rearranjos, como deleções e duplicações, mas que são pequenas e estão localizadas no interior de uma única banda. Por esta razão, a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) é uma técnica indicada para superar algumas limitações e esclarecer achados da HRK (WASSINK et al., 2007).

1.3 Regiões subteloméricas e DEA

As regiões de bandas quase terminais dos cromossomos são denominadas regiões subteloméricas. São as regiões mais ricas em genes do genoma, o que é sugerido pela quantidade aumentada de GC (JOYCE et al., 2001; WASSINK et al., 2007).

Algumas síndromes genéticas resultam de microdeleções cromossômicas distais, como em 1p36, 2q37, 3q29 e 22q13.3 (DURAND, et al., 2007).

Deleções em 2q estão associadas com um fenótipo caracterizado por baixo peso ao nascimento, atraso do desenvolvimento, defeitos craniofaciais, pescoço curto, além de hipotonia e comportamento autístico. A incidência da deleção subtelomérica em 2q37 na população geral, entretanto, não está esclarecida (GALASSO et al., 2008). A associação com DEA foi primeiramente sugerida por Stein et al. (1992). Desde então, vários relatos destacam o fenótipo comportamental autístico, observado em 24% dos pacientes revistos por Casas et al. (2004) e em 35% dos casos relatados por Aldred et al. (2004). Características autísticas ocorrem em associação com deleções terminais com pontos de quebra em qualquer sub-banda de 2q37. Além dos comportamentos repetitivos e prejuízos na comunicação e na interação social, os pacientes apresentam movimentos estereotipados, agressão intermitente, déficit de atenção, transtorno obsessivo-compulsivo e distúrbios do sono, sugerindo uma nova síndrome envolvendo essa região (FALK; CASAS, 2007).

Entre os genes sugeridos como candidatos que estão mapeados em 2q37, se destaca o *CENTG2* (*Centaurin Gamma2 -2q37.2*), pois é expresso em regiões do sistema nervoso central como amígdala, cerebelo e hipocampo, que estão descritas como alteradas em alguns autistas. O *CENTG2* apresenta 4.112 pares de bases e codifica uma proteína do citoesqueleto envolvida em processos neuronais múltiplos do desenvolvimento e da maturação cerebral. Algumas mutações detectadas neste gene já foram relacionadas com susceptibilidade ao Autismo, mas seu envolvimento na predisposição a esta doença não está esclarecido (LUKUSA et al., 2004; WASSINK et al., 2005).

Entretanto, os estudos da associação *CENTG2*/autismo são contraditórios. Por exemplo, Lukusa et al. (2004) descreveram três irmãos que apresentavam uma deleção terminal em 2q37.3, atraso do desenvolvimento, deficiência mental, anormalidades de mãos, pés e facies dismórficas, mas apenas um era autista. Segundo os autores, esta diferença no fenótipo comportamental, apesar da deleção terminal de 2q estar presente em todos eles, mostra a necessidade de uma

investigação para possíveis diferenças crípticas nos tamanhos dos segmentos deletados, assim como a existência de outros fatores como penetrância incompleta e *imprinting* (CASAS et al., 2004).

A Síndrome da Deleção 22q13.3, ou Síndrome de Phelan-McDermid, é uma síndrome de microdeleção cromossômica caracterizada por hipotonia neonatal, atraso global do desenvolvimento, crescimento normal a acelerado, ausência a ou atraso grave da fala e características dismórficas menores. A deleção ocorre com frequência igual em homens e mulheres e foi relatada também em mosaicismo. As características comportamentais incluem contato visual pobre, movimentos estereotipados, socialização diminuída e prejuízos na linguagem, consistentes com DEA. A incidência é desconhecida, porém é descrita uma origem preferencialmente paterna (LUCIANI et al., 2003; PHELAN, 2008). Há relatos de muitos pontos de quebra localizados no mesmo intervalo. Há uma quantidade numerosa de seqüências *Alu*. Esses elementos *Alu* são conhecidos como sítios de recombinação desigual, conduzindo a várias alterações citogenéticas, como deleções, anéis ou translocações (LUCIANI et al., 2003). A base molecular dos mecanismos que conduzem à deleção terminal ainda é pouco definida, essencialmente por duas razões: os pontos de quebra podem ser determinados no nível de pares de bases somente em poucos casos e podem ser diferentes a partir dos pontos de quebra original, como consequência da ação de mecanismos de reparo ativados por quebras no DNA dupla fita (BONAGLIA et al., 2006).

As deleções em 22q13.3 têm sido um dos defeitos mais comumente associados com autismo e parecem envolver principalmente o gene *SHANK3* (PHELAN, 2008).

1.4 Gene *SHANK3*

A caracterização molecular das deleções em 22q13.3 mostra que há três genes localizados nessa região, a partir do centrômero: *SHANK3*, *ACR* e *RABL2B*.

As alterações em *SHANK3* provavelmente sejam a causa dos sintomas neurocomportamentais. Segundo Bonaglia et al. (2006) há um *hot spot* localizado dentro de *SHANK3*. Mais recentemente, mutações *de novo* foram encontradas em pacientes com DEA (DELAHAYE et al., 2009).

O gene *SHANK3* codifica uma proteína de densidade pós-sináptica (PSD) de sinapses excitatórias que pode funcionar como suporte principal formando grandes placas que compõem uma plataforma para a construção de um complexo PSD. No complexo PSD, a proteína shank3 se liga a neuroliginas, que juntas com as neuroxinas formam um complexo em sinapses glutamatérgicas, que sinaliza moléculas e proteínas do citoesqueleto, presentes nas espinhas dendríticas e no complexo PSD (Figura 2).

SHANK3, então, promove a formação, maturação e aumento de espinhas dendríticas, num sistema complexo no qual perturbações em um número potencial de moléculas, isoladas ou em combinação, podem resultar em quadros clínicos comportamentais semelhantes (MOESSNER et al., 2007).

Alterações em *SHANK3* já foram associadas com DEA, deficiência cognitiva grave e alterações de fala e linguagem (DURAND et al., 2007; MOESSNER et al., 2007). Estudos mais recentes têm revelado deleções *de novo* e mutações em *SHANK3* em indivíduos com autismo, ressaltando um papel importante deste gene no fenótipo autístico (SYKES et al., 2009).

Particularmente no éxon 22, que possui 2.254pb, já foram encontradas inserções e deleções de nucleotídeos que resultaram em mutações *frameshift* e na formação de proteínas truncadas com perda de função. Por exemplo, foram descritas a inserção de uma guanina na posição 3680 e uma deleção de 15 nucleotídeos na posição 4358-4372 do RNAm. Também no éxon 8, que tem 78pb, foi encontrada uma mutação *de novo*, caracterizada pela troca A962G do RNAm, que resultou na substituição Q321R em heterozigose. Os dados combinados sugerem que a haploinsuficiência de *SHANK3* pode causar uma forma monogênica de autismo em uma frequência suficiente para ser considerado em testes diagnósticos de rotina (DURAND et al., 2007; MOESSNER et al., 2007).

Com estes achados ainda pouco explorados e não esclarecidos, o estudo de alterações em 2q37 e 22q13.3, mutações no gene *SHANK3* e dos fenótipos clínicos correspondentes pode beneficiar pacientes, suas famílias e profissionais que lidam com DEA.

A hipótese científica que foi testada neste estudo é que alguns pacientes com DEA apresentam alterações em 2q37 e 22q13.3 que podem ser detectadas por análise do cariótipo em alta resolução, além de mutações nos exons 8 e 22 do gene *SHANK3*, numa frequência que justifique sua avaliação rotineira nesta população.

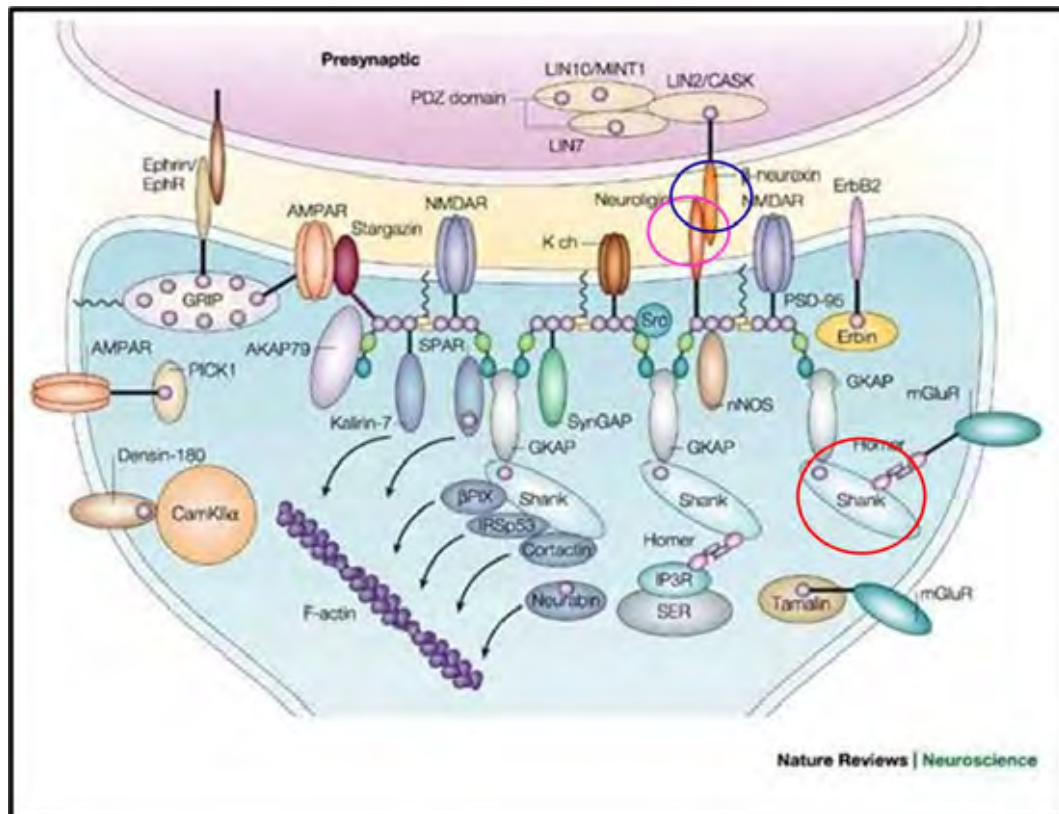


Figura 2. Sinapse excitatória mostrando a proteína shank (circulada em vermelho) com a neuroligina (circulada em rosa), ligada a neuroxina (circulada em azul) que participam da formação do complexo de densidade pós-sináptica (PSD) (KIM; SHENG, 2004).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Geral

Realizar a análise da ocorrência de alterações cariotípicas e moleculares de indivíduos com Doenças do Espectro Autístico.

Específicos:

- 1- Estudar o cariótipo de indivíduos com diagnóstico de Doença do Espectro Autístico pela técnica de bandamento GTG convencional;
- 2- Estudar as regiões 2q37 e 22q13 pela técnica de bandamento GTG em alta resolução;
- 3- Avaliar a presença de mutações nos éxons 8 e 22 do gene *SHANK3* por seqüenciamento direto.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Em conformidade com as Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos, este projeto foi aprovado pelo CEP (FAMERP) e CONEP (Processo 25000.015469/2007-59). Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – (Resolução 196/96) (Anexo I), foram estudados 48 indivíduos com diagnóstico de Doença do Espectro Autístico (DEA), segundo os critérios do DSM-IV (APA, 1994). Os probandos 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) e de clínicas especializadas (CE). Os diagnósticos foram realizados por psiquiatras e psicólogos, membros de equipes interdisciplinares e especialistas em autismo.

Entre os indivíduos estudados, 35 (73%) eram do sexo masculino e 13 (27%) do sexo feminino. As idades variaram de três a 34 anos (\bar{X} = 14,89) e desvio padrão de 7,40. Quanto ao diagnóstico, 22 (46%) apresentavam Autismo, 20 (42%) PDD-NOS e seis (12%) Síndrome de Asperger. A Tabela 1 apresenta a caracterização da casuística quanto ao sexo, idade, diagnóstico de PDD e procedência.

Não foram incluídos no estudo pacientes com doenças de etiologia genética ou ambientais, aqueles cujas famílias não concordaram em participar deste estudo e aqueles que, mesmo com autorização do responsável para participação do projeto, apresentaram desconforto exacerbado diante da possibilidade da punção venosa.

Tabela 1. Caracterização da casuística quanto à idade (em anos), sexo, diagnóstico e procedência.

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico de DEA	Procedência
1	12	M	Autismo	CE
2	13	M	Asperger	CE
3	8	M	PDD-NOS	AG
4	7	M	PDD-NOS	AG
5	13	M	Autismo	AG
6	19	M	Asperger	CE
7	17	F	PDD-NOS	AMA
8	13	M	PDD-NOS	AMA
9	7	M	Autismo	AMA
10	21	M	PDD-NOS	AMA
11	23	M	PDD-NOS	AMA
12	10	M	PDD-NOS	RTM
13	13	M	Asperger	CE
14	34	M	PDD-NOS	CE
15	22	F	Asperger	CE
16	13	F	Autismo	AMA
17	8	F	Autismo	AMA
18	3	M	PDD-NOS	CE
19	25	M	Autismo	AMA
20	13	F	Autismo	AG
21	12	M	PDD-NOS	RTM
22	29	F	Autismo	RTM
23	18	F	Autismo	RTM
24	7	F	PDD-NOS	RTM
25	27	M	Autismo	RTM
26	22	F	Autismo	RTM
27	3	M	PDD-NOS	CE
28	11	M	PDD-NOS	AG
29	9	M	Autismo	AMA
30	11	M	PDD-NOS	AMA
31	22	M	Autismo	AMA
32	19	F	PDD-NOS	EMA
33	15	M	Asperger	AMA
34	7	M	Autismo	AMA
35	23	M	Autismo	AG
36	30	M	PDD-NOS	AG
37	5	M	Autismo	AMA

Tabela 1- Continuação.

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico de DEA	Procedência
38	9	F	PDD-NOS	AMA
39	19	M	Autismo	AMA
40	18	M	Autismo	AMA
41	17	M	Autismo	AMA
42	14	M	Autismo	AMA
43	10	M	PDD-NOS	CE
44	13	M	Asperger	AG
45	10	M	Autismo	AMA
46	8	F	PDD-NOS	CE
47	8	F	PDD-NOS	CE
48	25	M	Autismo	AMA

EMA=Escola Municipal do Autista Maria Lúcia de Oliveira de São José do Rio Preto; AMA=Associação dos Amigos dos Autistas de Ribeirão Preto – SP; AG=Ambulatório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – SP; RTM=Recanto Tia Marlene de Votuporanga – SP; CE=clínicas especializadas; F= feminino; M= masculino.

3.2 Métodos

De cada paciente foram coletados cerca de 10ml de sangue periférico. A coleta foi realizada com seringa estéril descartável, por profissional qualificado. Destes, 5ml foram transferidos para tubo vacutainer com heparina, para cultura de linfócitos e estudo citogenético, e 5ml para tubo com EDTA, para extração de DNA e estudo molecular.

Todos os indivíduos foram investigados quanto a presença de cromossomopatias. Para isto foi realizado o estudo cariotípico convencional em metáfases obtidas de culturas de linfócitos submetidas ao bandamento GTG.

A análise das regiões 2q37 e 22q13 foi realizada pela técnica de bandamento GTG em alta resolução, que também necessitou de cultura de linfócitos prévia com agente indutor para obtenção de cromossomos prometafásicos.

Mutações nos éxons 8 e 22 do gene *SHANK3* foram investigadas por sequenciamento direto.

3.2.1 Cultura de linfócitos, bandamento GTG convencional e em alta resolução

As culturas de linfócitos foram desenvolvidas por 72 horas, segundo a técnica de Moorhead et al., (1960), com modificações, de acordo com o protocolo utilizado pelo Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP/FUNFARME.

Em três frascos foram colocados 5ml de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina (100U/ml), fito-hemaglutinina (PHA-Gibco 0,2ml/5ml de meio) e 0,2 ml de sangue total.

Para interrupção da divisão celular foi adicionado 0,1ml de solução de colquicina Houdé (4x10M), que foi reincubado por 30 minutos antes da colheita. Após o bloqueio celular, o material foi centrifugado a 900-1000rpm durante sete minutos, o sedimento hipotonizado com 6ml de KCl a 0,075M por 10 minutos, a 37°C, e fixado em metanol ácido acético (3:1). A suspensão celular foi, então gotejada em lâminas limpas, molhadas e geladas.

Em dois frascos destinados à técnica de bandamento GTG em alta resolução, após o período de incubação, foram adicionados 0,1ml de Actinomicina D (concentração final de 2µg/ml), de acordo com o protocolo estabelecido no Laboratório de Genética e estes foram novamente incubados à 37°C por 40 minutos, após esse período foi adicionada colquicina Houdé (4x10M) durante seis minutos e os frascos foram novamente reincubados na estufa a 37°C. Após o bloqueio celular, a colheita da cultura ocorreu igualmente aos demais frascos que não receberam Actinomicina D.

Cada caso foi identificado durante toda a execução do projeto por um código, que era conhecido apenas pelos responsáveis pela pesquisa.

As lâminas foram submetidas à técnica de bandamento GTG, realizada segundo a técnica de Grouchy e Turleau (1984), com modificações.

As lâminas foram mergulhadas seqüencialmente em tampão Sorensen pH6,8; solução de tripsina 0,2% e solução salina de PBS, respectivamente, por 15

minutos, dois a 10 segundos e um minuto. Posteriormente, foram coradas em solução de Giemsa a 2% por três minutos e lavadas em água destilada.

O cariótipo convencional (resolução de 300-450 bandas) de cada indivíduo foi analisado em 20 metáfases submetidas ao bandamento GTG. Para o estudo cariotípico em alta resolução foram avaliadas outras cinco metáfases com resolução mínima de 550 bandas. Todas as análises foram realizadas pela mestrandia e conferidas por outro orientadora, responsável pela conferência de todos os resultados. Para determinação do padrão de resolução de bandas foram selecionados segmentos dos cromossomos maiores (1-3) e o padrão observado foi comparado às representações diagramáticas em diferentes resoluções contidas na ISCN (2009).

Os achados e a descrição dos mesmos seguiram os critérios contidos na ISCN (2009). As metáfases que apresentaram alterações foram fotografadas.

Para esclarecimento do resultado de um paciente, foram analisadas 10 metáfases pela técnica de FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) com a utilização das sondas *Tel Vysion 2q Spectrum Orange (Vysis)* para a região subtelomérica e *CEP 2 Spectrum Orange (Vysis)* para a região centromérica controle, ambas com marcação em vermelho. A técnica foi realizada segundo as instruções do fabricante e colaboração da doutoranda Adriana Barbosa Gonçalves.

3.2.2 Extração de DNA de leucócitos

O DNA genômico 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 3500rpm. O sobrenadante (plasma) foi retirado e desprezado. O anel de leucócitos foi transferido com pipeta Pasteur descartável para outro tubo e o volume de 15ml foi completado com PBS 1X. Nova

centrifugação foi realizada a 3500rpm por 12 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur descartável, o “pellet” suspenso e novamente completado o volume de 15ml com PBS 1X. O material foi centrifugado a 3500rpm por 12 minutos e o sobrenadante recolhido com pipeta descartável. O “pellet” de leucócitos foi novamente suspenso e em seguida foram adicionados 1ml de PBS 1X, 3ml 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*.

Ao “pellet” de leucócitos foi acrescentado 1ml de NaCl 6M saturado. O tubo foi agitado vigorosamente até formar espuma e colocado no gelo por 15 minutos. O material foi novamente agitado e centrifugado a 3500rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo 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, então, colocado em um *eppendorf* de 1,5ml com 500µl de etanol 70% gelado. O material foi centrifugado a 14.000rpm por três minutos, o etanol 70% descartado e o tubo deixado em repouso por 15 minutos. O DNA foi diluído em água estéril 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*.

3.2.3 Amplificação do DNA extraído

Esta etapa contou com a colaboração das Profas. Dras. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni e Eloíza Helena Tajara da Silva, do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica. A amplificação do éxons 8 e 22 do gene *SHANK3* foi realizada segundo a técnica de Saiki et al. (1998), com algumas modificações.

Para a padronização das concentrações dos reagentes e condições de ciclagem da PCR para os éxons 8 e 22 do gene *SHANK3*, foram realizados diferentes testes com variações da concentração do DNA (50ng/µl, 25ng/µl e 20ng/µl), do volume dos *primers*, com concentração final de 10µM, (2,5µl, 2,0µl

e 1µl) e também da temperatura de anelamento (57°C a 61°C). Após a padronização, a amplificação dos dois éxons do gene foi realizada seguindo os programas de amplificação e as condições de reação que estão descritas nos Quadros 1, 2 e 3.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi processada em termociclador *GeneAmp[®] PCR System 9700* da *Applied Biosystems*, em volumes de 25µl. Em todos os experimentos um dos tubos não recebeu DNA (controle de contaminação).

O éxon 8 gera um produto de 200 pares de bases (pb), que correspondeu ao *primer 3*, que flanqueia todo o éxon, ou seja, da posição 8671pb a 8870pb do DNA.

Foram utilizados dois pares de *primers* para o éxon 22 do gene *SHANK3*, pois se trata de um éxon grande. Foi flanqueando da posição 46748pb a 46934pb do DNA, que correspondeu ao *primer 1*, e da posição 47435pb a 47617pb do DNA, que correspondeu ao *primer 2*. Portanto, para o éxon 22 foram gerados dois produtos de amplificação, um de 186 e outro de 183 pares de bases (pb). Estas duas regiões estudadas foram chamadas respectivamente de pontos 1 e 2.

As seqüências de bases dos *primer* utilizados estão descritas no Quadro 4.

3.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Foram utilizados 5µl de cada amostra, que foram aplicados em géis de agarose a 2%, com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetidos à eletroforese horizontal por 30 minutos à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1x (Tris 89mM, EDTA 2,5mM e ácido bórico 89mM com pH 8,3). Em todas as eletroforeses realizadas, foram utilizados como marcador o DNA Ladder de 100pb.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração
Desnaturação inicial	95	05 minutos
Desnaturação*	95	30 segundos
Anelamento*	57	30 segundos
Extensão*	72	01 minuto
Extensão final	72	10 minutos
*O ciclo desnaturação-anelamento-extensão foi repetido 30 vezes		

Quadro 1. Programa de amplificação utilizado para os *primers* 1 e 2 do gene *SHANK3*.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração
Desnaturação inicial	94	04 minutos
Desnaturação*	94	45 segundos
Anelamento*	62	45 segundos
Extensão*	72	01 minuto
Extensão final	72	10 minutos
*O ciclo desnaturação-anelamento-extensão foi repetido 35 vezes		

Quadro 2. Programa de amplificação utilizado para o *primer* 3 do gene *SHANK3*.

Reagentes	Concentração final
Tampão	1X
MgCl ₂	50 mM
dNTP	1,25 mM
<i>Right Primers 1, 2, 3</i>	10µM
<i>Left Primers 1, 2, 3</i>	10 µM
Taq DNA Polimerase (Invitrogen)	5 U
Água Milli-Q	q.s.p. 25 µl
DNA	25-50ng/ µl

Quadro 3. Condições de reação utilizadas para a amplificação dos éxons 8 e 22 do gene *SHANK3*.

Primer	Função	Primers 5' a 3'	Posição	Tamanho do amplicon (pb)
1	Right	CACAGCCGCTGACTGCAT	Éxon 22 (ponto 1) 46748pb a 46934pb	186
	Left	GAAGTCACCCGAGGACAAGA		
2	Right	CCCATAGCTTGGACCTTCT	Éxon 22 (ponto2) 47435pb a 47617pb	183
	Left	CAAGCCCAAGCTCAAGTCC		
3	Right	GGGAAGAACCAAGTTCAGA	Éxon 8 8671pb a 8870pb	200
	Left	CAGCTGTGATTCCCTCTTCC		

Quadro 4. *Primers* para amplificação e sequenciamento do gene *SHANK3*.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV no transiluminador *Hoefer MacroVue UVis-20* da *Amershan* e armazenados em fotodocumentador pelo sistema *EDAS 290*, o que permitiu observar se houve amplificação e se o tamanho do segmento obtido coincidiu com o esperado.

3.2.5 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos obtidos em todas as reações de PCR foram purificados com etanol, de acordo com metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). Os *amplicons* foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5ml, onde foi realizada a purificação. A estes tubos foram adicionados 5µl de acetato de sódio 3M seguidos de 150µl de etanol 100%. Os tubos foram, colocados em freezer -80°C por uma hora, para que o DNA fosse precipitado, e submetidos à centrifugação a 15.000rpm na centrífuga *Sorvall Legend Match 1.6R* da *Thermo Scientific*, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150µl de etanol a 70% (Merck). Em seguida, foi realizada centrifugação por 20 minutos, a 15.000rpm, a 4°C para obtenção de um precipitado, que foi homogeneizado em 20µl de água ultra-pura (Invitrogen). Em seguida, as amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000* da *Thermo Scientific*.

3.2.6 Sequenciamento do gene *SHANK3*

As amostras amplificadas e purificadas foram submetidas ao sequenciamento automático no aparelho de capilaridade *3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, do Laboratório de Virologia (FAMERP).

As seqüências dos éxons 8 e 22 do gene *SHANK3* foram determinadas utilizando-se o kit *Big Dye Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*), segundo recomendações do fabricante. O sequenciamento teve como finalidade confirmar se os *amplicons* correspondiam realmente às regiões especificadas e analisar a presença de alterações não só nos pontos de mutações descritas, mas em todo o

amplicon. Na reação de PCR para sequenciamento foram utilizados 2,0µl de *Big Dye Terminator*, 4,0µl de solução tamponante (5X), 1,0µl de *primer* específico (3,2 µM), 1,0µl de DNA purificado com concentração aproximada de 200 ng/ml e água Milli Q (Invitrogen) suficiente para completar 20µl de reação. Para cada amostra foi realizada uma reação com o *primer sense* (right) e uma reação com o *anti-sense* (left). As condições da PCR para sequenciamento estão descritas no Quadro 5.

A análise das sequências foi realizada no programa *DS Gene 2.0* (*Accelrys, USA*) e feita uma comparação com sequências existentes no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Etapa	Temperatura (°C)	Duração
Desnaturação*	96	30 segundos
Anelamento*	50	15 segundos
Extensão*	60	04 minutos
Extensão final	4	∞
O ciclo (*) foi repetido 25 vezes		

Quadro 5. Programa de amplificação utilizado para reação de sequenciamento do gene *SHANK3*.

Resultados

4. RESULTADOS

Foram investigados 48 indivíduos com Doenças do Espectro Autístico. A análise citogenética convencional em bandamento GTG foi realizada nos 48 indivíduos e em alta resolução da região 2q37 e da região 22q13 em 43. O sequenciamento direto do éxon 8 do gene *SHANK3* foi possível em 31 indivíduos, do ponto 1 do éxon 22 em 30 e do ponto 2 em 31 indivíduos.

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises realizadas em cada caso. Em alguns houve necessidade de repetição da cultura de linfócitos, por não crescimento celular ou não obtenção de células em prometáfase ou metáfase inicial, que não foi possível por dificuldade de contato com as famílias, recusa de nova coleta, ou porque o indivíduo residia em locais muito distantes. Em outros não foi possível o estudo do gene *SHANK3* por problemas de amplificação das amostras ou falta de tempo hábil para nova coleta de sangue e finalização.

Nenhum indivíduo apresentou alteração cromossômica numérica ou estrutural pela análise convencional em bandamento GTG.

Com relação à análise citogenética por bandamento GTG em alta resolução, 42 indivíduos apresentaram metáfases nitidamente normais para as regiões 2q37 e 22q13 (Figuras 3 e 4, respectivamente).

Um paciente com diagnóstico de Síndrome de Asperger apresentou uma alteração que foi caracterizada como possível deleção em 2q37, observada em um dos cromossomos do par 2 em todas as metáfases analisadas (Figura 5a e b). Contudo, para esclarecimento do achado, foi realizada a análise por FISH com a sonda específica para a região subtelomérica do cromossomo 2 (2q37), que mostrou os dois sinais normais esperados e afastou a suspeita da deleção nesta região específica (Figura 5c).

Com relação à análise molecular por sequenciamento direto dos éxons 8 e 22 do gene *SHANK3*, todos os indivíduos mostraram as sequências selvagens (normais).

As Figuras de 6 a 8 apresentam os géis de agarose para os *amplicons* de 200pb, 186pb e 183pb, correspondentes aos éxons 8 e pontos 1 e 2 do éxon 22, respectivamente.

As Figuras de 9 a 11 apresentam os eletroferogramas parciais correspondentes a partes de sequências do éxon 8 e das regiões seleccionadas do éxon 22.

Os artigos científicos originados à partir dos dados obtidos estão apresentados no Apêndice.

Tabela 2- Resultados obtidos das diferentes análises realizadas em cada caso estudado.

Caso	Cariótipo convencional	Alta resolução 2q37	Alta resolução 22q13	Éxon 8 do gene <i>SHANK3</i>	Éxon 22 do gene <i>SHANK3</i> (ponto 1)	Éxon 22 do gene <i>SHANK3</i> (ponto 2)
1	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
2	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
3	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
4	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
5	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
6	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
7	46,XX	NL	NL	NR	NR	NR
8	46,XY	NL	NL	S	S	S
9	46,XY	NL	NL	S	S	S
10	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
11	46,XY	NL	NL	S	S	S
12	46,XY	NL	NL	S	S	S
13	46,XY	NL	NL	S	NO	S
14	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
15	46,XX	NL	NL	S	S	S
16	46,XX	NL	NL	S	S	S
17	46,XX	NL	NL	S	S	S
18	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
19	46,XY	NL	NL	S	S	S
20	46,XX	NL	NL	S	S	S
21	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
22	46,XX	NL	NL	NR	NR	NR
23	46,XX	NL	NL	NR	NR	NR
24	46,XX	NL	NL	NR	NR	NR
25	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
26	46,XX	NL	NL	NR	NR	NR
27	46,XY	NL	NL	NR	NR	NR
28	46,XY	NO	NO	S	S	S
29	46,XY	NL	NL	S	S	S
30	46,XY	NL	NL	S	S	S
31	46,XY	NL	NL	S	S	S
32	46,XX	NL	NL	S	S	S

Tabela 2- Continuação.

	Cariótipo convencional	Alta resolução 2q37	Alta resolução 22q13	Éxon 8 do gene <i>SHANK3</i>	Éxon 22 do gene <i>SHANK3</i> (ponto 1)	Éxon 22 do gene <i>SHANK3</i> (ponto 2)
33	46,XY	NL	NL	S	S	S
34	46,XY	NL	NL	S	S	S
35	46,XY	NL	NL	S	S	S
36	46,XY	NL	NL	S	S	S
37	46,XY	NL	NL	S	S	S
38	46,XX	NO	NO	S	S	S
39	46,XY	NL	NL	S	S	S
40	46,XY	NL	NL	S	S	S
41	46,XY	NO	NO	S	S	S
42	46,XY	NL	NL	S	S	S
43	46,XY	NO	NO	S	S	S
44	46,XY	NL	NL	S	S	S
45	46,XY	NL	NL	S	S	S
46	46,XX	NL	NL	S	S	S
47	46,XX	NL	NL	S	S	S
48	46,XY	NO	NO	S	S	S

NL = resultado normal; NO= resultado não obtido; NR= resultado não realizado; S= sequência selvagem.

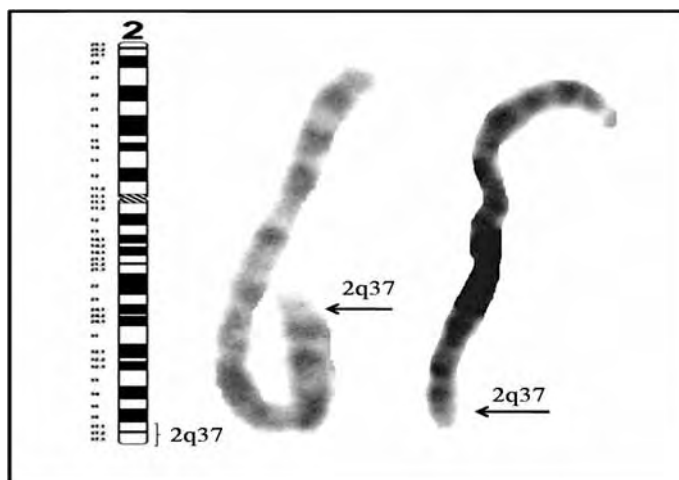


Figura 3. Diagrama do cromossomo 2 à esquerda e par de cromossomos 2 à direita, em bandamento GTG em alta resolução, com destaque da região 2q37 presente no par de homólogos.



Figura 4. Metáfase em bandamento GTG em alta resolução. O ideograma do cromossomo 22 à esquerda e as setas indicam a região 22q13.3 presente no par de homólogos.

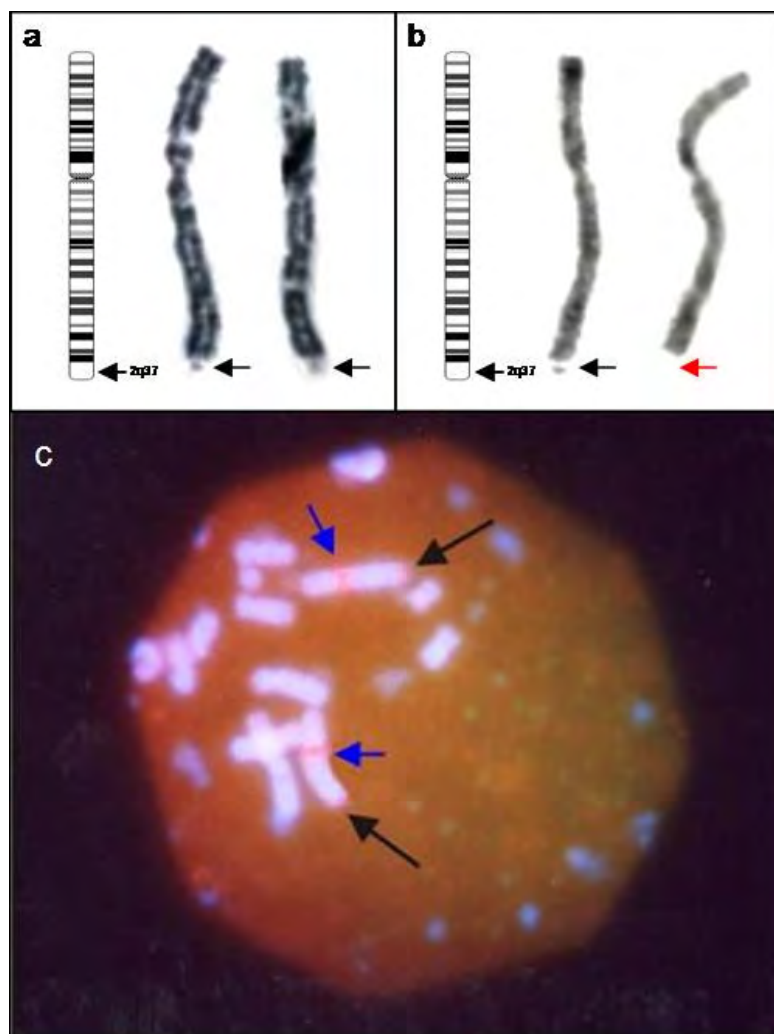


Figura 5. (a) Esquema representativo das bandas GTG do cromossomo 2 à esquerda e par de cromossomos 2 normais à direita. As setas indicam 2q37. (b) Esquema representativo das bandas GTG do cromossomo 2 à esquerda, cromossomo 2 normal no centro e sugestivo de deleção em 2q37 do paciente (seta vermelha), à direita. (c) Metáfase parcial do paciente submetida à técnica de FISH, com os quatro sinais normais em vermelho. As setas azuis e pretas indicam a região centromérica e a região 2q37, respectivamente.

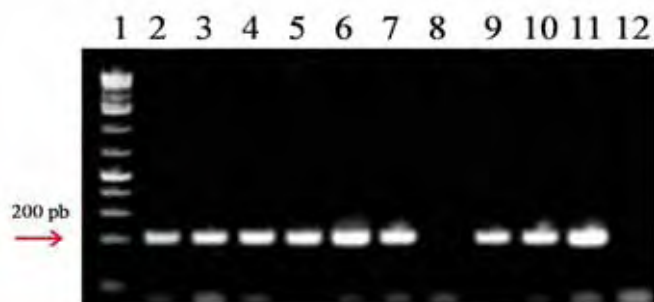


Figura 6. Perfil eletroforético em gel de agarose 2% correspondente a amplificação do éxon 8 do gene *SHANK3* nas colunas 2-7 e 9-11. Marcação com Ladder de 100pb na coluna 1, ausência de amplificação na coluna 8 e controle negativo na coluna 12 .

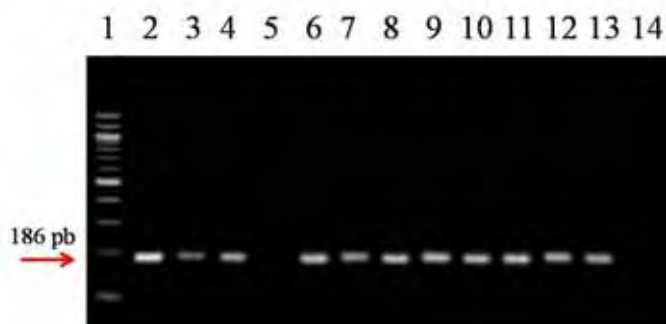


Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose 2% correspondente a amplificação do éxon 22-ponto1 do gene *SHANK3* nas colunas de 2-4 e 6-13. Marcação com Ladder de 100pb na coluna 1, ausência de amplificação na coluna 5 e controle negativo na coluna 14.

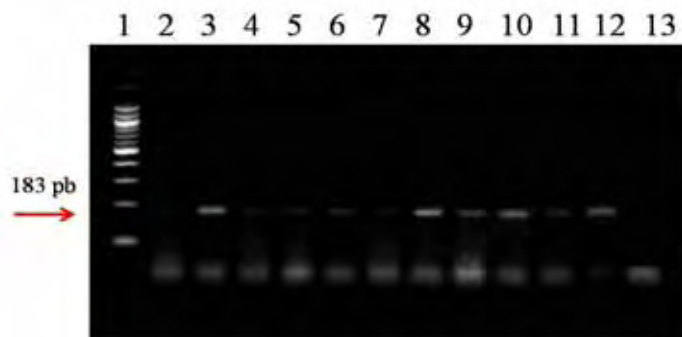


Figura 8. Perfil eletroforético em gel de agarose 2% correspondente a amplificação do (éxon 22-ponto2) nas colunas de 3, 6, 8-10 e 12. Marcação com Ladder de 100pb na coluna 1, ausência de amplificação nas colunas 2,4-5, 7 e controle negativo na coluna 13.

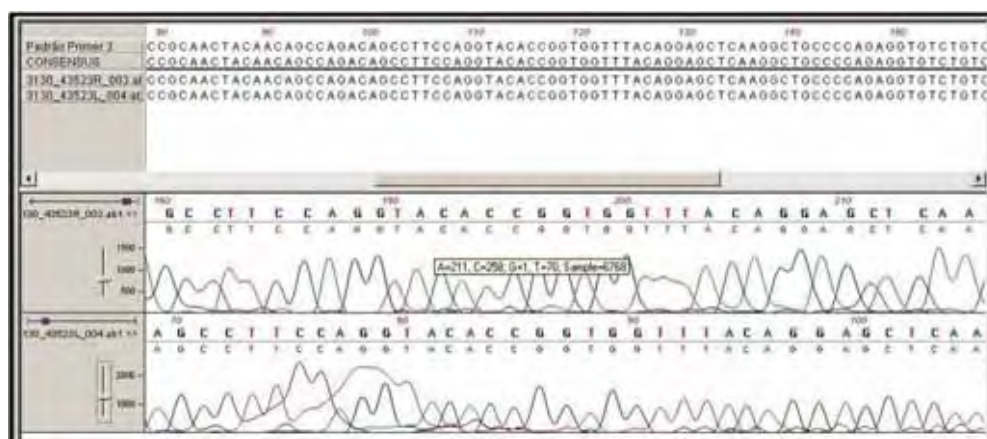


Figura 9. Eletroferograma parcial das sequências *right* e *left* do éxon 8 do gene *SHANK3* contendo a região de 80-157pb do *amplicon* total de 200pb analisadas no programa *DS Gene 2.0* (Accelrys, USA).

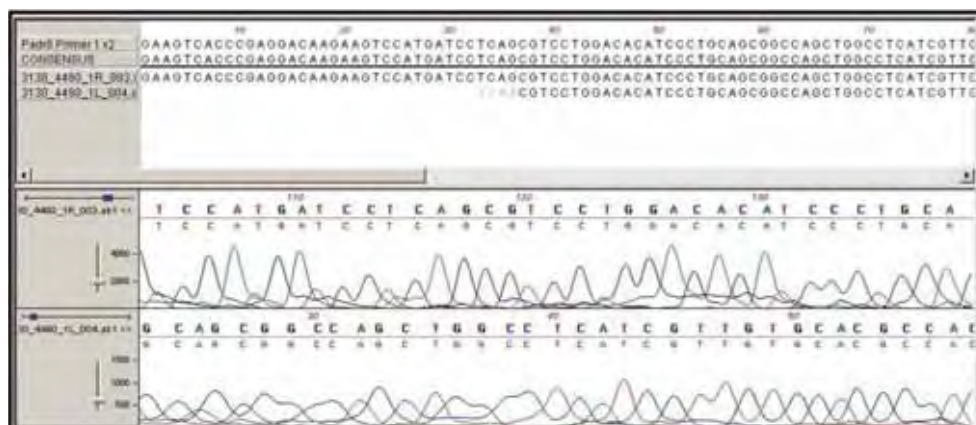


Figura 10. Eletroferograma parcial das seqüências right e left do ponto 1 do éxon 22 do gene *SHANK3* contendo os primeiros 80pb do total do *amplicon* de 186pb analisadas no programa *DS Gene 2.0* (Accelrys, USA).

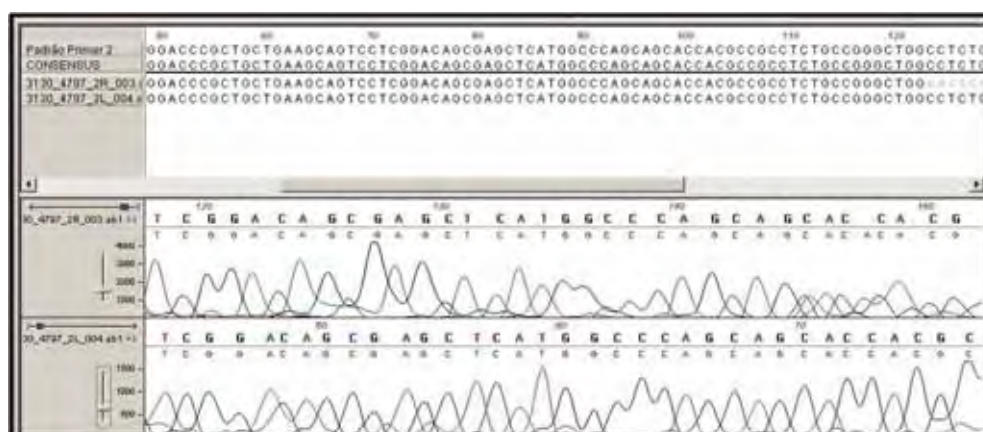


Figura 11. Eletroferograma parcial das seqüências right e left do ponto 2 do éxon 22 do gene *SHANK3* contendo a região de 50-127pb do total do *amplicon* de 183pb analisadas no programa *DS Gene 2.0* (Accelrys, USA).

Discussão

5. DISCUSSÃO

As DEA são um grupo de doenças de etiologia variável e muito complexa que uma minoria de casos possui causa genética única conhecida. Entretanto, na maioria há fortes evidências da participação de componentes genéticos. Inclusive, foram descritos rearranjos envolvendo praticamente todos os cromossomos em indivíduos com DEA (DELLA MÔNICA et al., 2007). Neste estudo, nenhum caso apresentou alteração detectada por análise citogenética convencional, o que pode ter ocorrido em função da casuística ser pequena. Entretanto, mesmo assim, como as descrições de alterações cromossômicas em DEA referem uma frequência de 3-6% (GIUNCO, 2002; DURAND et al., 2007; NEWBURY et al., 2009), seriam esperados um ou dois resultados positivos. Também deve ser considerado que tais alterações são mais frequentes que em autistas do que em portadores de outras DEA, e a casuística aqui foi heterogênea.

Entre as regiões propostas sugeridas como possivelmente envolvidas na etiologia das DEA estão 2q37 e 22q13, observadas como alteradas em alguns pacientes e que levaram a sugestão de alguns genes candidatos (BARTLETT et al., 2005; SURESH et al., 2006; VORTSMAN et al., 2006). Casas et al. (2004) descreveram 60 indivíduos com deleções em 2q35, 2q36 e 2q37, dos quais alguns apresentavam comportamento autístico como um dos efeitos neurológicos.

Na região 2q37, após revisão da literatura, Gallasso et al. (2008) encontraram um total de 50 casos de deleções com pontos de quebra em 2q37.1 (18 casos), 2q37.2 (10 casos) e 2q37.3 (22 casos), sugerindo alguns genes importantes nessas sub-bandas.

Na banda 2q37.3 há alguns genes, como o *KIF1A* e o *HES6*. O gene *KIF1A* participa do transporte axonal de precursores de vesículas sinápticas. Há sugestões de que teria um possível papel crítico na plasticidade, manutenção e maturação de neurônios, inclusive, no início da vida.

O gene *HES6* codifica um co-fator de transcrição que é expresso em todo o período de desenvolvimento do sistema nervoso central e desenvolve uma função

na neurogênese cortical e na diferenciação, pela inibição da atividade anti-neurogênica de *HES6* (GALASSO et al., 2008).

Embora muitos genes candidatos para o autismo tenham sido identificados na banda 2q37.3, na síndrome da deleção em 2q37, a maioria das crianças com autismo, como parte do quadro clínico, tem o ponto de quebra em 2q37.2. Nessa região, estão mapeados o gene *GBX2* ou *gastrulation brain homeo box 2*, que se expressa na região cerebral anterior, e o gene *CENTG2* ou *centaurin gamma 2*, que se expressa em várias regiões do cérebro fetal (WASSINK, et al., 2005).

CENTG2 foi considerado um forte candidato para o autismo. Também se expressa no cérebro adulto e a proteína desse gene é encontrada em vesículas de crescimento neuronal, sinapses de desenvolvimento e em neurônios maduros. As variantes encontradas neste gene geram substituição dos aminoácidos e pode ser que variantes sinônimas podem alterar múltiplos aspectos da expressão gênica e do processamento. Por outro lado, variantes não sinônimas, mais prováveis de serem deletérias, frequentemente ocorrem sem qualquer associação com efeito fenotípico (WASSINK, et al., 2005).

Já em 2q37.1 está localizado o gene *NMURI* (*Receptor 1 da Neuromedina U*). As estruturas do sistema nervoso central expressam níveis menores da sua proteína quando comparados os dos órgãos periféricos, mas proteínas *Nmur1* foram detectadas em abundância no cerebelo, amígdala e hipocampo, o que sugere um papel na modulação da ação dopaminérgica (GALASSO et al., 2008).

O potencial envolvimento destes genes, ainda não muito conhecidos, e a ação sinérgica entre estes e outros genes envolvidos na função, diferenciação e reparo neuronal, podem explicar as variações observadas nos déficits neuropsicológicos associados com a síndrome da deleção em 2q37 e desperta a atenção para o estudo desta região em DEA (GALASSO et al., 2008).

Contudo, deleções em 2q37 também já foram descritas em afetados com características fenotípicas específicas e nos seus pais fenotipicamente normais, sugerindo se tratar de um polimorfismo familiar em alguns casos, mas a maioria dos portadores tem comprometimento clínico (KITSIOU-TZELI et al., 2007)

No presente estudo, nenhum indivíduo apresentou deleção em 2q37 após análise por bandamento GTG em alta resolução. Entretanto, um com diagnóstico de síndrome de Asperger, apresentou uma suspeita de deleção de 2q37, mas que não foi confirmada por FISH. Não é possível descartar que o paciente apresente uma outra alteração na região terminal do braço longo do cromossomo 2, porém envolvendo outras regiões que não foram avaliadas neste estudo, mas que não envolve 2q37. Pois a sonda utilizada hibridiza-se em parte da sub-banda 2q37.3 e não inteiramente, não descartando então que na mesma sub-banda possa ter ocorrido deleção ou até mesmo em outra sub-banda de 2q37.

Quanto à região avaliada do cromossomo 22, há uma afecção denominada síndrome da deleção de 22q13, ou síndrome de Phelan McDermid, caracterizada por hipotonia neonatal grave (>97%), problemas globais do desenvolvimento (>98%), incluindo comportamento autístico, crescimento normal a acelerado (95%), fala ausente ou gravemente atrasada (>98%) e características dismórficas menores (PHELAN, 2008; OMIM, 2009). O interesse científico crescente nesta região decorre da sua ligação com quadros autísticos (HEILSTEDT et al., 2003; RAVNAN et al, 2006). Inclusive, a deleção em 22q13 foi proposta como uma das alterações cromossômicas mais comumente associadas com autismo (PHELAN, 2008).

Nesse estudo não foram encontradas deleções em 22q13.3 pela análise citogenética em bandamento GTG em alta resolução. Desde que o tamanho dessas deleções pode variar em tamanho, de 160Kb a 9Mb, a análise em alta resolução pode realmente não detectar muitas delas. Há a necessidade de estudos pela técnica de FISH para a confirmação de resultados (BARBOSA-GONÇALVES et al., 2008). A análise em alta resolução pode realmente não ser suficiente para detecção destas alterações (LUCIANI, et al., 2003), contudo, isto não ocorreu com os casos aqui estudados, uma vez que através de um outro projeto vinculado ao mesmo grupo de pesquisa da autora, todos foram avaliados por FISH e não mostraram alterações em 2q37 e 22q13.3 (BARBOSA-GONÇALVES, comunicação pessoal).

Nenhuma técnica é conclusiva quando é utilizada isoladamente. A análise por FISH com sondas subteloméricas também pode gerar resultados ambíguos que requerem avaliação cuidadosa da intensidade da hibridização do sinal (tamanho do sinal). Apenas discriminar a presença ou ausência dos sinais não é suficiente (LUCIANI, et al., 2003; BONAGLIA, et al., 2006).

Apesar do grande número de casos relatados de deleções nas regiões referidas, muitos deles não foram descritos na literatura de DEA, pois alguns estudos têm interesse específico em quadros autísticos e outros em citogenética, mas não em ambos. Por exemplo, um caso pode ser apresentado com a anormalidade citogenética bem descrita, mas sem a descrição do fenótipo comportamental do afetado. Além disso, é provável que muitos casos clínicos não foram publicados, enquanto ao mesmo tempo pode ocorrer um viés da publicação em favor de casos clinicamente interessantes (VORSTMAN, et al., 2006).

Além disso, os indivíduos aqui estudados não foram selecionados quanto a presença de quadros clínicos específicos que caracterizam as síndromes descritas nas regiões 2q37 e 22q13.3, o que pode explicar também a não detecção de alterações nessas regiões.

Portanto, em pacientes com DEA têm sido descritas alterações cromossômicas subteloméricas crípticas, como em 2q37 e 22q13, mas estas são mais raras que se supõe ou muito difíceis de serem diagnosticadas em uma avaliação cariotípica convencional ou mesmo em alta resolução. Isto sugere que a avaliação destas regiões na triagem de pacientes ou nos protocolos de investigação laboratorial de rotina deve ser questionado.

A região 22q13.3 desperta interesse científico não só pelas deleções associadas a DEA, mas também pelas alterações no gene *SHANK3*, mapeado 22q13.3 (LINTAS; PERSICO, 2008). Casos investigados por Delahaye, et al. (2009), por exemplo, confirmam a haploinsuficiência de *SHANK3* no fenótipo da síndrome da deleção de 22q13.3, que inclui autismo.

No presente estudo foram avaliados os éxons 8 e 22 do gene *SHANK3*. Inicialmente, a proposta era estudar o éxon 21, de acordo com alterações descritas por Durand et al. (2007) e Moessner et al. (2007). Entretanto, observou-se que os

primers descritos anelavam-se à região correspondente ao éxon 21 da sequência genômica do *SHANK3*, inicialmente derivada do gene *SHANK3* de rato com *Expressed Sequence Tags (ESTs)* humanas listadas no *UCSC Genome Browser*, mas não com as do éxon 21 humano, e sim com as do 22, de acordo com o *Genbank*. Assim, após comunicação pessoal com um dos autores, este confirmou que as alterações estavam localizadas no éxon 22 humano.

A análise das seqüências do éxon 8 e dos dois pontos escolhidos do éxon 22 por sequenciamento direto, revelou seqüências selvagens, ou seja, normais em todos os indivíduos estudados.

Este resultado pode ser explicado pelo fato de que as mutações em *SHANK3* em pacientes com DEA são raras e têm sido investigadas mais recentemente nessa população. Alterações envolvendo este gene ocorrem em cerca de 1,1% dos indivíduos com DEA e o número de indivíduos estudados ainda é restrito (LINTAS; PERSICO, 2008).

Contudo, um estudo realizado em 330 famílias com mais de um indivíduo com DEA e em 76 casos esporádicos em suas famílias, investigou SNPs e CNVs no gene *SHANK3* e não encontrou alterações. Uma das justificativas do autor foi que utilizaram técnicas de rastreamento e que alterações podem não ter sido detectadas, uma vez que eles não realizaram sequenciamento do gene para confirmar os achados (SYKES et al., 2009). Pode ser sugerido, com os dados obtidos aqui, inclusive porque o sequenciamento das regiões descritas como alteradas no gene *SHANK3* foi feito, que os achados são raros, porém estudos com casuísticas maiores são necessários para conclusão.

Assim, em DEA são inúmeras e variáveis alterações descritas, com envolvimento de diversas regiões cromossômicas e muitos genes propostos como candidatos, além do que foi investigado neste estudo. Esta complexidade resulta em dúvidas quanto ao que merece ser inicialmente incluído nos protocolos de investigação laboratorial dos afetados para ser utilizado no Aconselhamento Genético das famílias.

Sociedade Americana Psiquiatria sugere que em casos de DEA seja realizada seleção clínica criteriosa, avaliação por um geneticista clínico, além da

análise do cariótipo e investigação molecular da síndrome do Cromossomo X Frágil (PHILIPPE et al., 2008).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A introdução da análise de regiões específicas como 2q37 e 22q13 no protocolo de investigação genética de rotina dos indivíduos com DEA parece não ser necessária em indivíduos não selecionados, porém indivíduos que apresentem fenótipos clínicos compatíveis com as síndromes caracterizadas nessas regiões podem ser indicados para investigação das mesmas.

As suspeitas de deleção ou qualquer outra alteração estrutural detectadas pela técnica de bandamento GTG em alta resolução em sujeitos com DEA devem ser confirmadas por técnicas complementares como a técnica de FISH.

Não há sugestões de que a análise de mutações nos éxons 8 e 22 do gene *SHANK3* mereça ser investigada em protocolos de avaliação dos pacientes, entretanto em indivíduos que apresentarem a síndrome da deleção de 22q13.3 após análise clínica e confirmação por um outro exame, como a técnica de FISH específica para essa região, é sugestivo uma análise do gene *SHANK3* para investigação de alterações no mesmo.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ALDRED, M. A et al. Molecular Analysis of 20 patients with 2q37.3 monosomy: Definition of minimum deletion intervals for key phenotypes. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 6, p. 433-439, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. **American Psychiatric Association**: Washington (DC), 1994.

BADDOE, E. V. Classical Rett Syndrome in a Ghanaian child: a case report. **West African Journal of Medicine**, v. 28, n. 2, p. 134-136, 2009.

BARBOSA-GONÇALVES, A. et al. Subtelomeric region of chromosome 2 in patients with autism spectrum disorders. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 527-533, 2008.

BARON-COHEN, S. et al. The autism-spectrum quotient (AQ); evidence from Asperger syndrome/high-functioning autism, males and females, scientists and mathematicians. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 31, n. 1, p. 5-17, 2001.

BARTLETT, C. W. et al. Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. **International Journal Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2-3, p. 221-234, 2005.

BATTAGLIA, A.; BONAGLIA, M. C. The yield of Subtelomeric FISH Analysis in the Evaluation of Autistic Spectrum Disorders. **American Journal of Medical Genetics Part C**, v. 142C, n. 1, p. 8-12, 2006.

BENITEZ-BURRACO, A. A. Autism and language: some molecular aspects. **Revista de Neurologia**, v. 46, n. 1, p. 40-48, 2008.

BONAGLIA, M. C. et al. Identification of a recurrent within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. **Journal of Medical of Genetics**, v. 43, n. 10, p. 822-828, 2006.

BOSA, C. A. Autism: psychoeducational intervention. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. Suppl 1, p. S47-53, 2006.

BRAUNSCHWEIG, D. et al. Autism: maternally derived antibodies specific for fetal brain proteins. **Neurotoxicologic**, v. 29, n. 2, p. 226-231, 2008.

BUXBAUM, J. D.; et. al. Mutation analysis of the NSD1 gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. **BMC Medical Genetics**, v. 8, n. 68, p. 1-7, 2007.

CARVALHEIRA, G.; VERGANI, N.; BRUNONI, D. Genetics of autism. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n.4, p. 270-272, 2004.

CASAS, K. A. et al. Chromosome 2q terminal deletion: report of 6 new patients and review of phenotype-breakpoint correlations in 66 individuals. **American journal of medical genetics**, v. 130, n. 4, p. 331-339, 2004.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Mental health in the United State: parental report of diagnosed autism in children aged 4-17 years-United States. **MMWR Morb Wkly Rep**, v. 55, n. 17, p. 481-486, 2006.

CHRISTIAN, S. L. et al. Novel Submicroscopic Chromosomal Abnormalities Detected in Autism Spectrum Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 12, p. 1111-1117, 2009.

CURRENTI, S. A. Understanding and Determining the Etiology of Autism. **Cellular e Molecular Neurobiology**, 2009. No prelo.

DELAHAYE, A. et al. Chromosome 22q13.3 deletion Syndrome with a de novo interstitial 22q13.3 cryptic deletion disrupting SHANK3. **European Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 5, p. 328-332, 2009.

DELLA-MONICA, M. et al. A case of autism an interstitial 1q deletion (1q23.3-24.2) and a de novo translocation of chromosomes 1q and 5q. **American Journal of Medical Genetic Part A**, v. 143A, n. 22, p. 2733-2777, 2007.

DETH, R. et al. How enviromental and genetic factors combine to cause autism: a redox/methylation hypotesis. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 190-201, 2008.

DURAND, C. M. et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. **Nature Genetics**, v. 39, n.1, p. 25-27, 2007.

FALK, R. E.; CASAS, K. A. Chromosome 2q37 Deletion: Clinical and Molecular Aspects. **American Journal of Medical Genetics Part C**, v. 145C, n. 4, p. 357-371, 2007.

GALASSO, C. et al. Deletion 2q37: an identifiable clinical syndrome with mental retardation and autism. **Journal of Child Neurology**, v. 23, n. 7, p. 802-806, 2008.

GAUTHIER, J. et al. Novel de Novo *SHANK3* Mutation in Autistic Patients. **American Journal of Medical Genetics. Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 150B, n. 3, p. 421-424, 2008.

GENBANK, 2008. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Acesso em: 25 fev. 2008.

GILLBERG, C.; COLEMAN, M. **The Biology of Autistic Syndromes**. 3. ed. London: Mac Keith Press, 2000.

GIUNCO, C. T. **Avaliação Genético-Clínica e Citogenética Molecular das Regiões 7q31-q33 e 15q11-q13 em Transtornos Invasivos do Desenvolvimento**. Tese (Mestrado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, 127p; 2002.

GROUCHY, J. DE. ; TURLEAU, C. **Clinical atlas of human chromosomes**, New York: Wiley, 1984.

GUPTA, A. R.; STATE, M. W. Autism genetics. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Supl 1, p. S29-38, 2006.

HEILSTEDT, H. A. et. al. Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. **Clinical Genetics**, v. 64, n. 4, p. 310-316, 2003.

HERBERT, M. R. et al. Autism and Enviromental Genomics. **Neurotoxocologic**, v. 27, n. 5, p. 671-684, 2006.

HUGHES, J. R. Update on Autism: a Review of 1300 Reports. **Epilepsy and Behavior**, v. 16, n.4, p. 569-589, 2009.

ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Basel: Karger, 2009.

JOYCE, C. A. et al. Subtelomeric Rearrangements: Results From a Study of Selected and Unselected Probands with Idiopathic Mental Retardation and Control Individuals by using high-resolution G-Banding and FISH. **Human Genetics**, v. 109, n. 4, p. 440-451, 2001.

KITSIOU-TZELI, S. et al. Array-CGH analysis and clinical description of 2q37.3 de novo subtelomeric deletion. **European Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 1, p. 73-78, 2007.

KLIN, A. Asperger syndrome: an update. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 2, p.103-109, 2003.

KOPRA, K. et al. Comparison of Diagnostic Methods for Asperger Syndrome. **Journal of Autism and Developmental Disorder**, v. 38, n. 8, p. 1167-1573, 2008.

KUMAR, R. A.; CHRISTIAN, S. L. Genetics of Autism Spectrum Disorders. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 9, n. 3, p. 188-197, 2009.

LINTAS, C; PERSICO, A. M. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 8, p. 1-8, 2008.

LOSCH, M. et. al. Defining key features of the broad autism phenotype: a comparison across parents of multiple and single-incidence autism families. **American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatry Genetic**, v. 147B, n. 4, p. 424-33, 2008.

LUCIANI, J. J. et. al. Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. **J Med Genet**, v. 40, n. 9, p. 690-696, 2003.

LUKUSA, T. et al. Deletion 2q37.3 and autism: molecular cytogenetic mapping of the candidate region for autistic disorder. **Genetic Counseling**, v. 15, n. 3, p. 293-301, 2004.

LUKUSA, T.; et. al. Terminal 2q37 deletion and autistic behaviour. **Genetic Counseling**, v. 16, n. 2, p. 179-180, 2005.

MARSHALL, C. et al. Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorders. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 2, p. 477-488, 2008.

MATSON, J. L. M. et al. Symptoms in adults with intellectual disability: toward an empirically oriented diagnostic model. **Journal Autism Developmental Disorder**, v. 38, n. 3, p. 530-537, 2008.

MERCADANTE, M. T.; et. al. Saccadic movements using eye-tracking technology in individuals with autism spectrum disorders: pilot study. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 3A, p. 559-562, 2006.

MERCADANTE, M. T.; VAN DER GAAG R. J.; SCHWARTZMAN J. S. Transtornos invasivos do desenvolvimento não-autísticos: síndrome de Rett, transtorno desintegrativo da infância e transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, p. 12-20, 2006. *Suplement*.

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. et al. Contribution of *SHANK3* mutations to autism spectrum disorder. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 6, p. 1289-1297, 2007.

MOORHEAD, P. S. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MORDEKAR S. R et al. Corticosteroid treatment of behaviour, language and motor regression in childhood disintegrative disorder. **European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of European Paediatric Neurology Society**, v. 13, n. 4, p. 367-369, 2009.

MUHLE, R.; TRENTACOSTE, S. V.; RAPIN, I. The genetics of Autism. **Pediatrics**, v.113, n.5, p. 472-486, 2004.

NEWBURY, D. F. et al. Mapping of partially overlapping de novo deletions across an autism susceptibility region (AUTS5) in two unrelated individuals affected by developmental delays with communication impairment. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149A, n. 4, p. 588-597, 2009.

NIKOLOV, R.; JONKER, J.; SCAHILL, L. Autistic disorder: current psychopharmacological treatments and areas of interest for future developments. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 1, p. 39-46, 2006. *Suplement*.

PHELAN, M. C. Deletion 22q13.3 syndrome. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 3, n. 14, p. 1-6, 2008.

PHILIPPE, A. et al. Neurobehavioral profile and brain imaging study of the 22q13.3 deletion syndrome in childhood. **Pediatrics**, v. 122, n. 2, p. e376-e381, 2008.

RAVNAN, J. B., et al. Subtelomere FISH analysis of 11688 cases: an evaluation of the frequency of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. **Journal of Medical Genetic**, v. 43, p. 478-489, 2006.

ROY, M. Asperger's Syndrome in Adulthood. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 106, n. 5, p.59-64, 2009.

SAIKI, R. K. et al. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1998.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001.

SCHMIDT, G. L.; et. al. Impairments in phonological processing and nonverbal intellectual function in parents of children with autism. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 30, n. 5, p. 557-567, 2008.

SEGENREICH, D.; MATTOS, P. Atualização sobre comorbidade entre transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e transtornos invasivos do desenvolvimento (TID). **Revista de psiquiatria clínica**, v. 34, n. 4, p. 184-190, 2007.

SEGURADO, R. et al. Confirmation of association between autism and the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene on chromosome 2q31. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 11, p. 2182-2184, 2005.

SINGER, H. S. et al. Antibodies against fetal brain in sera of mothers with autistic children. **Journal of Neuroimmunology**, v. 194, n. 1-2, p. 165-172, 2008.

SINZIG, J.; et. al. Inhibition, flexibility, working memory and planning in autism spectrum disorders with and without comorbid ADHD symptoms. **Child and Adolescent Psychiatry Mental Health**, v. 2, n. 1, p. 4, 2008.

STEIN, C. K et al. Deletion of 2q37 – a new syndrome? **American Journal Medical of Genetics**, v. 51, p-1223, 1992. *Supplement*.

SURESH, R. et. al. New complexities in the genetics of stuttering: significant Sex-specific linkage signals. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, n. 4, p. 554-563, 2006.

SYKES, N. H. et al. Copy Number Variation and Association Analysis of SHANK3 as a Candidate gene for Autism in the IMGSAC Collection. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 10, p. 1347-1353, 2009.

VORSTMAN, J. A. S. et al. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 18-28, 2006.

WANG, K. et al. Common Genetic Variants on 5p14.1 Associate with Autism Spectrum Disorders. **Nature**, v. 459, n. 7246, p. 528-533, 2009.

WASSINK, T. H. et al. Systematic for Subtelomeric Anomalies in a Clinical Sample of Autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v.37, n. 4, p. 703-708, 2007.

WASSINK, T. H. et. al. Evaluation of the chromosome 2q37 gene *CENTG2* as an autism. **American Journal of Medical Part B Neuropsychiatry Genetic**, v. 136, n. 1, p. 36-44, 2005.

WOLFF, D. J. et al. Pilot assessment of the subtelomeric regions of children with autism: detection of 2q deletion. **Genetic Medical**, v. 4, n. 1, p. 10-14, 2002.

8. ANEXOS

8.1 Anexo A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Para uma investigação científica honesta e segura, a pessoa que vai participar do estudo, ou o seu responsável legal deve dar seu consentimento livremente, após ter sido muito bem informado sobre os riscos e benefícios do estudo. É da responsabilidade do pesquisador lhe dar toda e qualquer informação necessária e solicitada. Este termo de consentimento tem a finalidade de proteger o participante do estudo.

Este documento tem o objetivo de convidar o (a)....., **pelo qual o (a) senhor (a) é responsável legal**, a participar do Projeto de Pesquisa “**Análise Citogenética em Alta Resolução de 2q37 e 22q13 e Molecular do gene *Shank3* em Doenças do Espectro Autístico**”, que está sob a responsabilidade das pesquisadoras **Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte** (Depto de Biologia Molecular – FAMERP) e **Ana Luiza Bossolani Martins** (mestranda – IBILCE/UNESP), cujos telefones para contato são: (0xx17) 32015000 ramal 5813 (Comitê de Ética em Pesquisa) e 32015000, ramal 1931 (Serviço de Genética).

O **objetivo** é avaliar regiões específicas do material genético, denominadas regiões subteloméricas dos braços longos dos cromossomos 2 (2q) e 22 (22q), em pacientes com doenças do espectro autístico, que são doenças comportamentais, como a que seu (sua) filho (a) apresenta. Estas regiões podem estar relacionadas com a causa da doença e é isso que será estudado.

Para atingir este objetivo, será necessária **a coleta de um pouco (5ml) de sangue da veia do braço do (a) seu (sua) filho (a), sem necessidade de estar em jejum**. Será coletado por profissional especializado. **Também serão tiradas fotos em vistas frontal e lateral e será feita uma entrevista com os pais**. O

sangue do paciente será utilizado única e exclusivamente para atingir o objetivo deste estudo e após a sua utilização será descartado.

Os **riscos** para a saúde são: dor, ardência, infecção ou mancha roxa no braço no local da retirada do sangue, mas todas as medidas de proteção serão tomadas.

Para **esclarecimento de dúvidas** as pesquisadoras responsáveis podem ser contatadas pelo telefone ou pessoalmente. Em caso de ser detectada alguma alteração nos exames, os resultados serão muito bem esclarecidos e todas as informações/esclarecimentos serão oferecidos em sessão de Aconselhamento Genético, que será realizada pela pesquisadora orientadora deste estudo. Também todas as informações obtidas da sua participação serão consideradas confidenciais, ficando a identidade de toda sua família mantida em segredo, em qualquer situação. As informações obtidas desta pesquisa **só poderão ser divulgadas em reuniões ou revistas científicas** e sem **revelar o nome do (a) seu (sua) filho (a)**. Se decidir não participar ou interromper a sua participação, em qualquer época, você não terá nenhum tipo de prejuízo, não perderá nenhum benefício e não precisará dar justificativas da sua atitude.

Ao assinar esse documento, você estará confirmando que o leu, recebeu informações claras sobre este estudo, que teve oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas, que **está de acordo em participar livre e espontaneamente** e sabe que, sob hipótese alguma receberá qualquer tipo de gratificação pela participação.

Este estudo poderá contribuir para o conhecimento das causas e das manifestações envolvidas na doença do tipo autístico e que, dependendo do resultado, no seu caso, poderá auxiliar no diagnóstico e orientação genética para a sua família.

Eu dou o meu consentimento para participação do (a) meu (minha) filho (a).

Nome do responsável legal:

Vínculo: Pai() mãe() outro().....

Quero receber os resultados dos exames? Sim () Não ()

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

.....

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios desta investigação. Coloquei-me à disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para qualquer outro esclarecimento pelo telefone (0xx17) 3201-5000 ramal 1931.

Pesquisador:.....

RG:.....

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

Apêndices

9. APÊNDICES

9.1 Apêndice A- Análise citogenética por bandamento GTG convencional e em alta resolução da região 2q37 em pacientes com doenças do Espectro Autístico

ARTIGO ORIGINAL

Análise citogenética por bandamento GTG convencional e em alta resolução da região 2q37 em pacientes com doenças do espectro autístico

Cytogenetic analysis by conventional GTG-banding and in high resolution of the region 2q37 in patients with autistic spectrum disorders

Ann Luiza B. Martins¹; Adriana Barbosa-Gonçalves²; Simone S. da Rocha³; Agnes Cristina Fett Conte⁴

¹Mestranda em Genética; ²Doutoranda em Genética; ³Puquma - CAPS Infantil, Mestranda em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação da FAMERP; ⁴Professora Livre-Docente, Adjunta do Departamento de Biologia Molecular - Serviço de Genética da FAMERP-FUNEARME

⁵Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto-SP

Resumo As Doenças do Espectro Autístico incluem o Autismo, o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação e a Síndrome de Asperger. A etiologia é bastante desconhecida, devido a sua variação e complexidade. São doenças presentes desde os 30 meses de idade, caracterizadas por comportamento ritualístico, fala ausente ou pouco desenvolvida, além de problemas graves de relacionamento social e deficiência mental na maior parte dos casos. Podem ocorrer isoladamente ou como parte das manifestações de afecções específicas, como doenças genéticas e cromossômicas, com a participação de praticamente todos os cromossomos. Há relatos de pacientes com alterações subteloômicas, inclusive, envolvendo a extremidade distal (subtelomérica) do braço longo do cromossomo 2 (2q37). Este estudo teve como objetivos a avaliação do cariótipo pela técnica de bandamento GTG e da região 2q37 em alta resolução de indivíduos com doenças do espectro autístico. Foram estudados 15 pacientes. Um deles (6,67%) apresentou deleção em 2q37 (região subteloômica), quando analisado em alta resolução. Este achado não foi confirmado pela técnica Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Portanto, a análise citogenética em alta resolução de 2q37 pode ser incluída na investigação destes pacientes, contudo, os achados devem ser confirmados por técnicas complementares.

Palavras-chave Análise Citogenética; Cromossomos Humanos Par 2; Transtorno Autístico; Deleção Cromossômica;

O artigo intitulado “Molecular Evaluation of exon 8 e 22 of the *SHANK3* gene in Autism Spectrum Disorders” foi submetido à revista *Molecular Psychiatry*.

9.2 Apêndice B- Molecular Evaluation of exon 8 e 22 of the *SHANK3* gene in Autism Spectrum Disorders

Molecular Evaluation of exons 8 and 22 of the *SHANK3* gene in Autism Spectrum Disorders

AL Bossolani-Martins¹, FC Rodrigues-Lisoni², ML Nogueira³, A Barbosa-Gonçalves⁴, EH Tajara⁵ and AC Fett-Conte⁵

¹ Biology Department, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil; ² Biology and Zoology Department, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS), Ilha Solteira, SP, Brazil; ³ Department of Dermatological, Infectious and Parasitic diseases, Medicine School in São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil; ⁴ Biology Department, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil. ⁵ Molecular Biology Department, Medicine School in São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Abstract

Autism spectrum disorders are a group of neurodevelopmental disorders with a complex and heterogeneous etiology. Studies have shown that genetic factors play an important role in the aetiology of these diseases. Recently, de novo mutations, frameshifts and deletions have been described in the *SHANK3* gene, also known as *ProSAP2* gene, which encodes a synaptic scaffolding protein. All the participants of this study had normal karyotypes and underwent screening for Fragile-X syndrome. Subsequently, they were analyzed by direct sequencing of different points of exons 8 and 22 of the *SHANK3* gene. None of the study participants presented with changes in these regions. These findings may be due to the fact that mutations, deletions and duplications of the *SHANK3* gene are rare.

Key-words: Autism Spectrum Disorders, 22q13.3, *SHANK3*

Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASDs) are a clinically complex group of childhood disorders that have firm evidence of an underlying genetic etiology.¹ The group of ASDs includes autism, as well as Pervasive Developmental Disorder not otherwise specified (PDD-NOS) and Asperger's syndrome.² The diagnosis of ASDs is based on impairments in reciprocal social interaction and communication, and restricted and stereotyped patterns of interests and activities with abnormal development apparent within the first 3 years of life.³ The prevalence of ASDs is estimated at 1 per 150 children.⁴ Cases are isolated or associated and a recognized cause is identified in ~10% of individuals, most commonly fragile-X syndrome, tuberous sclerosis and cytogenetically detectable

chromosome abnormalities.^{5,6,7} Standard karyotype analyses show chromosomal rearrangements in 3%-6% of cases, the most common being deletions and duplications on chromosomes 2q, 7q, 15q and 22q.^{8,9}

The *SHANK3* gene, mapped on chromosome 22q13.3, has been extensively studied in this population. This gene encodes the postsynaptic density protein (PSD) specialized at excitatory synapses, where it may function as a master scaffold forming large sheets that may well represent the platform for the construction of the PSD complex, where it binds directly to neuroligins.^{10,11} The PSD is usually located at the tip of dendritic protrusions of about 1-2 μm in length, termed dendritic spines, and separated from the presynaptic transmitter-containing terminal by the synaptic cleft. Thus shank proteins are not considered to provide a direct scaffolding function for transmitter receptors, but rather work indirectly by connecting different types of scaffold/receptor complexes, leading to the concept of a “master” or “higher order” scaffold. This view is strongly supported by different protein interactions in which Shank proteins are involved.¹² In addition to their function of assembling the PSD during synaptogenesis, the *SHANK3* protein may play a role in synaptic plasticity and in the regulation of dendritic spine morphology.¹³

SHANK3 mutations, deletions and duplications are rare, occurring in only 1.1% of patients with ASD. However, the genotype-phenotype correlation suggests that individuals with severe language and social impairment might be good candidates for *SHANK3* mutation screening.¹⁴

Two recent studies reported possible correlations between mutations or small cytogenetic rearrangements affecting the *SHANK3* gene and an ASD phenotype chiefly characterized by severe verbal and social deficits. The first study found a deletion of 142 Kb in intron 8, one frameshift mutation (E409X) in exon 21, a deletion of 800 kb, and R12C and R300C mutations in exons 1 and 8, respectively.⁸ The second work reported a missense mutation (Q321R) in exon 8, a 15-nt deletion in exon 21 and deletions of 277 Kb, 3.2 Mb and 4.36 Mb in 22q13.²

The lack of one functional copy of the gene would thus lead to severe neurological deficits because individual neurons cannot provide enough Shank proteins for synapse development and maintenance. In addition, it makes sense that the amount of Shank protein in dendrites is tightly controlled, most likely by local synthesis derived from dendritically transported mRNAs, and activity-dependent degradation through the ubiquitin proteasome system.¹²

This current pilot study evaluated exons 8 and 22 of the *SHANK3* gene by direct sequencing.

Subjects and Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the Medicine School in São José do Rio Preto and CONEP (process 25000.015469/2007-59). After obtaining written informed consent from parents, a total of 30 (22 male and 8 female) unrelated individuals with ASDs were studied. These individuals, of mixed ethnicity and representative of the Brazilian

population, were aged from 5 to 30 years old (mean = 14.16 and standard deviation = 6.30 years). Fifteen (50%) were diagnosed as autistic, 11 (36.67%) with PDD-NOS and 4 (13.33%) with Asperger's syndrome. The patients were from two specialized autism schools and all individuals were conclusively diagnosed by psychiatrists using different methods. Additionally, all were evaluated by an interdisciplinary team composed of a psychiatrist, neurologist, geneticist, psychologist, speech therapist and nurse before participating in this study. Besides the clinical evaluation, the diagnosis of ASD was made if the patient met the DSM-IV criteria. Patients were submitted to clinical and karyotypic examinations and molecular investigations of the *FMR1* gene. Only those individuals with normal results for these tests were included in the study. We also excluded patients with evidence of any other psychiatric or neurological conditions and those with other genetic syndromes. Genomic DNA was isolated from the leukocytes of peripheral blood¹⁵ and the primer sequences were designed using the Primer3 program.

For all patients, the entire exon 8 and parts of the coding region of exon 22 of the *SHANK3* gene were screened.

Exon 8 was targeted using the forward and reverse primers (5'-CAGCTGTGATTCCCTCTTCC-3' and 5'-GGGAAGAACCAAGGTTTCAGA-3') flanking the positions 8671 and 8870 of DNA producing an amplification of 200 bp. Exon 22 was targeted using two pairs of primers; the first flanked the positions 46748 and 46934 of DNA, producing an amplification of 186 pb (forward primer 5'-GAAGTCACCCGAGGACAAGA-3' and reverse primer 5'-CACAGCCGCTGACTGCAT-3') and the second flanked the positions 47435 and 47617 of DNA, producing an amplification of 183 pb (forward primer 5'-CAAGCCCAAGCTCAAGTCC-3' and reverse primer 5'-GGGAAGAACCAAGGTTTCAGA-3').

Amplification was performed in a reaction volume of 25µL containing 1x PCR Buffer, 50mM of MgCl₂, 1.25mM dNTPs (GE Healthcare), 50ng genomic DNA, 10µM of each primer, and 5U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The PCR reaction was carried out in a GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA) with 4 min of denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 45s, 45s at an annealing temperature of 62°C, and for exon 8, an extension for 1 min at 72°C, with 5 min denaturation at 95°C, followed by 30 cycles of 95°C for 30s, 30s at the annealing temperature at 57°C, and for each primers of exon 22, extension for 1 min at 72°C.

PCR products were purified with ethanol.¹⁶ Sequencing reactions were carried out with the Applied Biosystems Dye-Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, USA) and analyzed on a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, CA). Analysis of sequences was performed using the DS Gene 2.0 program (Accelrys, USA) and a comparison with existing sequences was made using GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/24137474).

To date 30 individuals have been investigated. Karyotyping was performed when possible on probands resulting in 27 individuals and 9 subjects for molecular genetic testing of the Fragile-X syndrome with one affected individual in each

family. Direct sequencing of exon 8 and two exon 22 regions of the *SHANK3* gene was performed for all subjects.

Results

All subjects had wild sequences according to Genbank. Thus, all participants had normal sequences from 8700 to 8870, the position of exon 8 in the *SHANK3* gene. Furthermore, they were normal considering the regions from 46748 to 46934 and from 47435 to 47617 positions of DNA of exon 22 of the *SHANK3* gene when analyzed by direct sequencing.

Discussion

SHANK3 is located on chromosome 22q13.3, spans approximately 57kb and contains 23 exons. Seven of the exons are alternatively spliced, which may influence the spectrum of SHANK-interacting proteins. *SHANK3* expression in the brain seems to be confined to the cortex, hippocampus and cerebellum.¹⁷ Owing to its emerging role in neuropsychiatric disorders, *SHANK3* was first implicated in the field of neuro-psychiatric disorders when a patient with 22q13.3 deletion syndrome was found to have a *de novo* reciprocal translocation that disrupted the gene. Subsequent studies have identified *de novo* deletions and mutations of *SHANK3* in individuals with autism, thus corroborating with previous reports about the role of the gene within the autistic phenotype.¹⁸

Exon 8 of the *SHANK3* gene has 78 pb and exon 21 has 2254 pb. A *de novo* mutation has been described in exon 8, characterized by the exchange of A962G mRNA, which resulted in a heterozygous Q321R substitution.² In this study the entire exon 8 was screened in all participants but no changes were identified.

A frameshift mutation (E409X) and a 15-nt deletion have also been found in exon 21.^{2,8} We initially chose to study this site (exon 21) as it had previously been reported as disrupted^{2,8}, but the sequences of primers described by the authors correspond to exon 22 of the human *SHANK3* gene according to GenBank data. In personal correspondence with Christian R. Marshall, one of authors, it was noted that the sequence described was correct, but that it corresponded to exon 22 instead of 21. Thus, we chose to study parts of exon 22 and all the subjects were normal.

A correlation between mutations or small cytogenetic rearrangements affecting different exons of *SHANK3* and ASD is possible.^{2,14,19} Based on diagnostic tests, karyotyping and fragile-X testing must be requested for all patients with ASD. In the presence of dysmorphic features and evident neurological symptoms, it is reasonable to suspect the chromosomal rearrangements exist even if the karyotype appears normal. Depending upon availability and cost, BAC or CGH analysis is strongly advised in these cases. As these technologies will become progressively more available, it will be important not to restrict them to patients with dysmorphia, as microdeletions and microduplications are also common among patients with idiopathic, non-dysmorphic ASD.¹⁴ However genetic screening is a powerful tool when dealing with monogenic Mendelian disorders that are

characterized by direct genotype-phenotype correlations. In the case of complex disorders, such as ASD, widespread genetic testing would not only be expensive and time-consuming, but also generally inappropriate due to the etiological complexity.²⁰

Our findings were normal possibly due to the fact that mutations, deletions and duplications in *SHANK3* are rare events, only occurring in approximately 1.1% of individuals with ASD^{14,18,21} and in this pilot study we investigated a small number of Brazilian subjects. Sykes et al. (2009)²¹ not found SNP association and copy number variants (CNVs) in *SHANK3* but so rare mutations potentially could have been missed within the gene, cause sequence analysis was not conducted, but we did and not found too.

There are numerous and variable changes in ASD, involving different chromosomal regions and many genes have been proposed as candidates including the one investigated here. Maybe genetic screening programs for the *SHANK3* gene could be implemented but not for all patients with ASD, only for those patients with severe verbal and social deficits bearing in mind that some *SHANK3* mutations have also been found to be transmitted to unaffected siblings of ASD probands.²

The etiological complexity results in misinformation about what deserves to be initially included in the protocols of laboratory investigations of affected individuals.

Conflict of Interest Statement. The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank all the patients and families who collaborated with this study. We also thank David A. Hewitt for the correction of English and idiomatic adaptations. Bossolani-Martins AL is grateful to the Brazilian agency Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for a Ph.D. scholarship.

References

1. Kumar RA, Christian SL: Genetics of Autism Spectrum Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2009; **9**:188-97.
2. Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J *et al*: Contribution of *SHANK3* mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2007; **81**: 1289-1297.

3. Lord C, Cook EH, Leventhal BL, Amaral DG: Autism spectrum disorders. *Neuron* 2000; **28**: 355-363.
4. Herbert MR: Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol.* 2010; Jan 16. Epub ahead of print 16 January 2010;
5. Folstein SE, Rosen-Sheidley B: Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2001; **2**: 943-955.
6. Xu J, Zwaigenbaum L, Szatmari P, Scherer SW: Molecular cytogenetics of autism. *Curr Genomics* 2000; **5**: 347-364.
7. Veenstra-Vanderweele J, Christian SL, Cook EH Jr: Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; **5**: 379-405.
8. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F *et al*: Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 2007; **39**: 25-27
9. Newbury DF, Warburton PC, Wilson N, Bacchelli E, Carone S; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium *et al*: Mapping of partially overlapping de novo deletions across an autism susceptibility region (AUTS5) in two unrelated individuals affected by developmental delays with communication impairment. *Am J Med Genet A.* 2009; **149A**: 588-597.

10. Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya MR *et al*: An architectural framework that may lie at the core of the post-synaptic density. *Science* 2006; **311**: 531-535.
11. Meyer G, Varoquaux F, Neeb A, Oschlies M, Brose N: The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology* 2004; **47**: 724-733.
12. Kreienkamp HJ: Scaffolding proteins at the postsynaptic density: shank as the architectural framework. *Handb Exp Pharmacol.* 2008; **186**: 365-80.
13. Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A *et al*: Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J Med Genet.* 2006; **43**:822-828.
14. Lintas C, Persico AM: Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet.* 2008; **46**:1-8.
15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1998; **16**: 1215.
16. Sambrook J, Russel DW: *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* Cold spring harbor laboratory press: New York, USA, 2001.
17. Streng M, Kim E: The shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci.* 2000; **113**:1851-1856.
18. Gauthier J, Spiegelman D, Piton A, Lafrenière RG, Laurent S, St-Onge J *et al*: Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009; **150B**:421-424.

19. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J *et al*:
Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet.* 2008; **82**: 477-488.
20. Caglayan AO: Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism.
Dev Med Child Neurol. 2010; Jan 5. Epub ahead of print 5 January 2010.
21. Sykes NH, Toma C, Wilson N, Volpi EV, Sousa I, Pagnamenta AT *et al*:
Copy Number Variation and Association Analysis of SHANK3 as a
Candidate gene for Autism in the IMGSAC Collection. *Eur J Hum Genet.*
2009; **17**: 1347-1353.

O artigo intitulado “Evaluation of 2q37 and 22q13 by High Resolution Cytogenetics in Brazilians with Autism Spectrum Disorders” será submetido a revista *Human Genetics*.

9.3 Apêndice C- Evaluation of 2q37 and 22q13 by High Resolution Cytogenetics in Brazilians with Autism Spectrum Disorders

Evaluation of 2q37 and 22q13 by High Resolution Cytogenetics in Brazilians with Autism Spectrum Disorders

Ana L. Bossolani-Martins¹ · Adriana Barbosa-Gonçalves¹ · Agnes C. Fett-Conte²

¹ Biology Department, Instituto de Biociência Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto, Brazil

² Molecular Biology Department, Medicine School in São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil

Corresponding author: A.C. Fett-Conte

E-mail: genetica@famerp.br

Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto,

São José do Rio Preto, SP, Brasil

Abstract

Some reports have described an increased frequency of chromosomal abnormalities in subjects with Autism Spectrum Disorders, including both visible and cryptic anomalies such as deletions of 2q37 and 22q13. Using high resolution G-banding techniques, we assessed these chromosomal regions in 43 patients with sporadic cases of autism spectrum disorders **in their families**. All nonspecific results were elucidated by Fluorescence *in situ* Hybridization. No abnormalities were detected in these regions. We conclude that high resolution cytogenetic analysis of the 2q37 and 22q13 regions should not be so broadly indicated in these disorders. They seem to be rare events and this kind of investigation is not a useful screening tool for the autism spectrum disorder population.

Key-words: Autism Spectrum Disorders, terminal deletions, 2q37, 22q13, cytogenetics

Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASD) are diagnosed in early childhood and include Autism, Asperger's disorder and Pervasive developmental disorder - not otherwise specified (PDD-NOS). Thus, these disorders are associated to varying degrees of dysfunctional communication and social skills, repetitive and stereotypic behavior, as well as attention and learning disabilities (Theoharides 2009). ASD are about four times more common in boys than girls and currently 1 in 150 children are diagnosed with an ASD (Currenti 2009).

Chromosomal abnormalities have been the focus of research on the etiology of ASD because individuals, in addition to core symptoms, also experience a variety of physical and behavioral impairments that are commonly associated with chromosomal abnormalities such as mental retardation, epilepsy, facial dysmorphism and physical anomalies (Wassink et al. 2007). Different structural chromosomal abnormalities have been reported in subjects with autism. There are several reports of autistic patients who are described as having 22q13 and 2q37 monosomies resulting from simple terminal deletions involving the distal portions of chromosomes (Bonaglia et al. 2006).

A diagnosis of autism or description of autistic behavior was reported by Casas et al. (2004) in 24% of subjects with 2q37 deletions and by Aldred et al. (2004) in 35% of their cohort.

The 22q13 deletion has also been shown to be a chromosomal defect associated with autism. It is known as Phelan-McDermid syndrome and manifests in patients as dysmorphic features and with autistic behavior (Cohen et al. 2005).

High-resolution karyotyping has been proposed as a routine laboratory test for patients with ASD because it detects cytogenetic anomalies in 5-10% of cases and may discover the diagnosis of small chromosomal deletions (Conrad et al. 1995; Wassink et al. 2007).

Here, we report on the results of a study that, using high resolution G-banding, investigated the presence of abnormalities in the 2q37 and 22q13 regions in a small cohort of selected probands with ASD.

Materials and Methods

Subjects

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. All families were recruited from special clinics and schools for Pervasive Developmental Disorders.

The primary inclusion criterion for participation in the study was a DSM-IV diagnosis for ASD. Diagnostic evaluations were conducted by psychologists, psychiatrists, members of interdisciplinary teams and specialists in autism. Subjects were excluded if they had been exposed to teratogenic agents, suffered birth asphyxia or infections, any chromosomal abnormality detected by conventional G-band, positive results of analysis for Fragile X syndrome or if they had medical conditions or genetic syndromes associated with ASD. Forty-three subjects, 31 males and 12 females, were evaluated in this study. Twenty (46.52%) had been diagnosed with Autism, 6 (13.95%) with Asperger's Syndrome and 17 (39.53%) with PDD-NOS.

Cytogenetic Studies

Blood samples were collected from all participants in vacutainers containing sodium heparin. Prometaphase chromosomes were prepared from phytohemagglutinin stimulated peripheral lymphocytes using the standard method for conventional and high-resolution GTG-banding techniques (>550 bands). Cases with prometaphases suspected as having 2q37 deletions were submitted to

Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) using a Tel Vysion 2q Spectrum Orange (Vysis) probe. In order to determine the banding resolution, we selected segments of long chromosomes and compared them with diagrammatic representations according to ISCN (2009).

Results

Normal karyotypes were obtained for all 43 probands by conventional and high resolution G-banding. Cryptic rearrangements involving the 2q37 and 22q13 chromosomal regions were not detected in any of our patients. Cases with prometaphases suspected as having 2q37 deletions were submitted to Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with the results proving to be normal.

Discussion

Cytogenetic abnormalities can lead to functional genetic changes in several ways: dosage effects as a consequence of changes in gene copy number (e.g. as in deletions or duplications), breakpoints associated with a rearrangement event may directly disrupt a gene, genes may be separated from gene-regulatory sequences as a consequence of a rearrangement (position effect) and deletions may lead to the unmasking of a point mutation in a gene located in the corresponding region of the non-deleted homologous chromosome (Vorstman et al. 2006). Because of this, cytogenetic abnormalities are the focus of much research to investigate the complex and heterogeneous etiology of ASD, including candidates such as 2q37 and 22q13.

Associations between deletions in the 2q37 and 22q13 regions and the diagnosis of ASD do not seem to be common. These regions can be normal at the cytogenetic level despite of presenting genes already described as being involved in the autism phenotypes, such as *CENTG2* in 2q37 and *SHANK3* in 22q13.3. We used the high resolution G-band technique which gave normal results for all patients. However, this technique may fail to detect subtelomeric chromosomal abnormalities of less than ~5Mb in length, which are gene-rich regions prone to anomalies. The technique can also miss larger abnormalities that do not alter the G-banding pattern (Salman, Jhanwar, Ostrer 2004). Thus, FISH can be used to overcome some limitations in cases identified as positive by high resolution banding analysis. The slides on which prometaphases were detected and thus suggestive of abnormalities were subsequently submitted to FISH with all demonstrating normal signals.

Hence, we conclude that high resolution cytogenetic analysis of subtelomeric 2q37 and 22q13 regions do not appear to prove useful as a cytogenetic screening tool for Autism Spectrum Disorders.

Acknowledgements

We would like to thank the families who participated in this study. We would also like to thank David A. Hewitt for the correction of English and idiomatic adaptations. Bossolani-Martins AL is grateful to the Brazilian agency Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for a Ph.D. scholarship.

References

Aldred MA, Sanford RO, Thomas NS et al (2004) Molecular analysis of 20 patients with 2q37.3 monosomy: definition of minimum deletion intervals for key phenotypes. *J Med Genet.* 41: 433-439

Bonaglia MC, Giorda R, Mani E et al (2006) Identification breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J Med Genet.* 43:822-8

Casas KA, Mononen TK, Mikail CN et al (2004) Chromosome 2q terminal deletion: Report of 6 new cases and review of phenotype-breakpoint correlations in 66 individuals. *Am J Med Genet Part A.* 130A: 331-339

Cohen D, Pichard N, Tordjman S et al (2005) Specific genetic disorders and autism: clinical contributions toward their identification. *J Autism Dev Disord.* 35: 103-116

Conrad B, Dewald G, Lopez M et al (1995) Clinical phenotype associated with terminal 2q37 deletion. *Clin Genet.* 48:134-139

Currenti AS (2009) Understanding and Determining the Etiology of Autism. *Cell Mol Neurobiol.*

Shaffer LG, Slovak LM, Campbeel LJ (2009) ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger

Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H (2004) Will the new cytogenetics replace the old

Stein CK, Del Signore C, Belliger M et al (1992) Deletion of 2q37- a new syndrome? *Am J Hum Genet Suppl.* 51: 1223

Theoharides TC (2009) Autism spectrum disorders and mastocytosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 22:859-865

Vorstman JAS, Staal WG, Van Daalen E et al (2006) Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry.* 11: 18-28

Wassink TH, Molly L, Piven J et al (2007) Systematic Screening for Subtelomeric Anomalies in a Clinical Sample of Autism. *J Autism Dev Disord.* 37: 703-708

Wong AC, Ning Y, Flint J et al (1997) Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *Am J Hum Genet.* 60: 113-120