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

Ana Luiza Bossolani Martins

Análise de Genes Envolvidos na Neurotransmissão, Formação e Manutenção Sináptica em Indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo

São José do Rio Preto
2014

Ana Luiza Bossolani Martins

Análise de Genes Envolvidos na Neurotransmissão, Formação e Manutenção Sináptica em Indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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: Profª. Drª. Agnes Cristina Fett Conte

São José do Rio Preto
2014

Martins, Ana Luiza Bossolani.
Análise de genes envolvidos na neurotransmissão, formação e manutenção sináptica em indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo / Ana Luiza Bossolani Martins. -- São José do Rio Preto, 2014
135 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Agnes Cristina Fett Conte
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Genes sinápticos. 3. Variações do número de cópias de DNA. 4. Transmissão nervosa. 5. Transtornos do espectro do autismo – Aspectos genéticos. I. Fett-Conte, Agnes Cristina. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.113

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Luiza Bossolani Martins

Análise de Genes Envolvidos na Neurotransmissão, Formação e Manutenção Sináptica em Indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo

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

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Agnes Cristina Fett Conte
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Társis Antonio Paiva Vieira
UNIFAL – Alfenas, MG

Profª. Drª. Karina Griesi Oliveira
USP – São Paulo, SP

Profª. Drª. Ana Elizabete Silva
UNESP – São José Rio Preto, SP

Profª. Drª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Ilha Solteira, SP

São José do Rio Preto
26 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo, por todos, por tanto....

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, quem considero especial em minha vida, pela confiança nestes sete anos, pelos momentos alegres, de companheirismo profissional, ensinamentos científicos acumulados no decorrer da minha vida acadêmica, pela super paciência, carinho e dedicação durante a realização deste trabalho, além do elo de amizade formado entre nós; com certeza grande parte do que sei hoje devo a você!

À Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno por sua generosidade, ensinamentos, por ter me recebido em seu Laboratório com carinho, disponibilizado condições técnicas e reagentes, e pela oportunidade que me deu de aprimorar meus conhecimentos científicos, pois grande parte do meu trabalho foi realizado graças à sua colaboração.

A todas as famílias dos pacientes pela participação, disponibilidade de tempo e de confiança, por poder compartilhar de suas histórias, sofrimentos e vitórias, que levarei para minha vida como exemplo de amor e superação.

A Patrícia Pereira do Nacimento, que posso chamar de “meu braço direito”, “minha memória”, pela amizade verdadeira, por toda sua dedicação, confiança e competência durante todo o período do meu Doutorado, por toda ajuda e apoio em momentos difíceis.

Ao Dante Bruno Avanso Rosan, novo integrante do nosso grupo de “autistas,” por sua dedicação, apoio e amizade.

A Adriana Barbosa Gonçalves, por me transmitir os primeiros ensinamentos quando cheguei ao Laboratório, de como lidar com as famílias envolvidas e realizar procedimentos laboratoriais.

A Carina Tatiana Giunco, “pelo primeiro chute para o gol”, por sempre atender ao nosso pedido de ajuda nas várias coletas que fizemos no período, por sua amizade e momentos de tensão e descontração.

A Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pelos primeiros passos na Genética, pela iniciativa primeira, que resultou na participação da Agnes e da minha (!) neste universo com o qual me identifiquei tanto.

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

Aos amigos do Laboratório de Genética do Desenvolvimento, Danielle, Karina, May, Lucas, Vanessa, Felipinho, Atique, Carol, Luciano, Gerson, Bruno, Roberto e Luciane, pelo "aconchego", quando cheguei à cidade São Paulo, uma cidade totalmente desconhecida pra mim, por me apelidarem carinhosamente de Diana, pela amizade, pelos momentos de muita descontração, mas também de muitas discussões e aprendizado em nossas reuniões formais e informais e que me fizeram entender que esse laboratório "se cercar vira circo, se cobrir vira hospício" e que por muitos finais de semana me fizeram companhia no Laboratório, certamente, o trabalho ficou mais "leve" e mais fácil de fazer.

A Naila Cristina Vilaça Lourenço, a Monize Lazar e a Antonia Cerqueira por toda ajuda com análises e interpretações de resultados, além do apoio e incentivo durante o Doutorado.

A Meire Aguena, por sempre entregar meus resultados tão rapidamente, Lilian Calabró dos Santos Oliveira, Roberto Rivelino de Camargo pelas extrações de DNA de muitos dos nossos pacientes.

A Cíntia Marques Ribeiro "lourão" que não mediu esforços em me ajudar com análises e ensinamentos, mesmo no período final do seu próprio Doutorado, que me mostrou como é bom e satisfatório trabalhar em equipe e o quanto lutamos juntas, uma sempre incentivando a outra em momentos de muito trabalho e cansaço.

Àquelas que eu chamo carinhosamente de bruxas Andressa, Melina, Larissa, Joanna e Simone, mas que são verdadeiras irmãs, que fazem da minha vida mais alegre, mais fácil de viver, a vocês devo todo o meu carinho, respeito, gratidão, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, por tudo, me sinto privilegiada por vocês fazerem parte da minha vida, algumas mesmo estando longe, certamente vocês são especiais na minha vida.

Às minhas amigas Ana Beatriz Bertolo, Carla Tomazini e Bianca Cecheto. Bia sua amizade é muito valiosa pra mim, você que sempre também esteve ao meu lado nos meus melhores e piores dias e que foi minha "família" em São Paulo. Carlinha por

todos os conselhos em muitos momentos difíceis e de desabafo, mas também de muitas alegrias compartilhadas. Bi, você com sua meiguice, generosidade, me ensinou ser uma pessoa melhor e a ter mais paciência com as adversidades da vida.

Aos amigos Ana Paula da Silva Perez, Gustavo Cassiano Cappati, Lilian Nogueira, Fabiana Nakashima, Camila Vieira, Fernanda Castanheira, Getulio Minoru, Patricia Zazeri Leite, Felipe Micalli, Felipe Cavassan, Adriana Sicuto de Oliveira, que apesar da distância, sempre demos um "jeitinho" de nos encontrar e relembrar da nossa velha e verdadeira amizade.

Aos colegas Camila Ive Ferreira Oliveira, Carlos Fabian Mendiburu e Paula Curi de Freitas e Fernanda Monteiro pelo carinho e companheirismo durante estes quatro anos de trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar e pelas sugestões e atenção.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disponibilidade de condições para o desenvolvimento da minha carreira acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pelo apoio e incentivo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Doutorado e Auxílio Financeiro.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Instituto de Biociências da USP- São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

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

“A situação é envolvente, só Jesus na causa”
(Ditado Popular, não é Brasilina?).

RESUMO

Mesmo com toda evolução de estratégias moleculares de investigação, a etiologia dos Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) ainda é bastante discutida, devido a sua variação e complexidade. São doenças que se manifestam nos três primeiros anos de vida, caracterizadas por alterações na comunicação, socialização, comportamento repetitivo e estereotipias, isolados ou associados a defeitos congênitos, doenças genéticas ou outras afecções. Em indivíduos com estas alterações do comportamento, dismórficos ou não dismórficos, já foram descritas alterações em todos os cromossomos e há genes propostos como candidatos de estarem envolvidos na etiopatogenia. Há relatos de casos com alterações, como mutações e variações no número de cópias (CNVs), envolvendo genes expressos no sistema nervoso central. Este estudo investigou por MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), mutações e CNVs nos genes sinápticos *UBE3A, GRM5, DLGAP2, NEDD4, NRXN1, CASP3, MAGI2, SHANK1, SHANK2 e PTEN,* que também estão envolvidos na formação, manutenção sináptica e neurotransmissão. Também investigou indiretamente outros genes e regiões gênicas possíveis de serem investigadas pelos kits comerciais utilizados. Foram estudados 300 indivíduos com Transtornos do Espectro do Autístismo e encontrados 23(8%) com alterações, em oito dos dez genes selecionados, além de outras três regiões como em *PTENP1, KLLN* e 16p11.2. Não foram observadas alterações nos genes *UBE3A, PTEN* e *SHANK1.* Nenhum paciente apresentou mais do que uma alteração. Nos casos possíveis, foi realizada a investigação da alteração nos progenitores para verificar se foram herdados ou *de novo.* Em alguns casos os achados genotípicos e fenotípicos puderam ser diretamente relacionados. Os dados mostraram que mutações, duplicações, mas especialmente deleções exônicas não são eventos raros em autistas e parecem participar na patogênese deste transtorno psiquiátrico. Estas alterações podem contribuir para a predisposição aos TEA.

Palavras-chave: Transtornos do Espectro do Autismo; genes sinápticos; CNVs

ABSTRACT

Even with all of molecular evolution research strategies, the etiology of Autism Spectrum Disorders (ASD) is still widely debated, due to its complexity and variation. These are disorders that manifest in the first three years of life, characterized by changes in communication, socialization, repetitive and stereotypic behavior, isolated or associated with birth defects, genetic disorders or other conditions. In individuals with these behavioral changes, dysmorphic or not dysmorphic, changes have been described in all chromosomes and genes proposed there as candidates to be involved in the pathogenesis. There are reports of cases with changes such as mutations and Copy Number Variations (CNVs) involving genes expressed in the central nervous system. This study investigated by MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), CNVs and mutations in synaptic genes *UBE3A, GRM5, DLGAP2, NEDD4, NRXN1, CASP3, MAGI2, SHANK1, SHANK2* and *PTEN*, which are also involved in the formation, maintenance and synaptic neurotransmission. Also indirectly investigated other possible genes and gene regions being investigated by commercial kits. The 300 individuals with the Autism Spectrum Disorders were studied and found 23 (8%) with alterations in eight of the ten selected genes, beyond three others regions as *PTENP1, KLLN* and 16p11.2. No alterations in *UBE3A, PTEN* and *SHANK1* genes were observed. No patient had more than one alteration. When possible, to investigate the alteration in the parents was performed to determine whether they were inherited or *de novo*. In some cases the genotypic and phenotypic findings could be directly related. The data showed that mutations, duplications, but especially exonic deletions are not uncommon in autistic events and seem to participate in the pathogenesis of this psychiatric disorder. These alterations may contribute to the predisposition to ASD.

Keywords: Autism Spectrum Disorders; synaptic genes; CNV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência dos ASD no período de 1975 a 2012 nos Estados Unidos.....	19
Figura 2	Fatores que explicam o aumento na prevalência dos ASD.....	20
Figura 3	Via da ubiquitinação. Relação entre os genes *UBE3A, NEDD4* e *CASP3*.....	24
Figura 4	Via de sinalização do *PTEN*. Relação entre os genes *PTEN, DLGAP2* e *MAGI2*.....	25
Figura 5	Via de orientação axonal. Relação entre os genes *SHANK1, SHANK2, NRXN1* e *GRM5*.....	26
Figura 6	Rede de interação entre os 10 genes sinápticos propostos no estudo.....	26
Figura 7	Fluxograma das estratégias para realização do projeto.....	32
Figura 8	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 6% correspondente a amplificação do gene *FMR1* de sete indivíduos do sexo masculino. A coluna 1, referente ao poço 1, mostra o padrão de peso molecular de 50pb; os poços 2, 3, 4, 5, 7 e 8 são de pacientes normais, que apresentam a banda controle de 223pb e a de 600pb, que referem-se às bandas de controle interno e de expansão da trinca CGG, respectivamente. O poço 6 representa um paciente com mutação completa (positivo). Observa-se a banda controle de 223pb, mas não a banda da região de repetições. O poço 9 representa o controle branco (teste de contaminação).....	39
Figura 9	Terminologia dos componentes da sonda. Uma sonda de MLPA consiste em dois oligonucleotídeos, no lado esquerdo está (LPO) Left Probe Oligonucleotide e no direito está (RPO) Right Probe Oligonucleotide (azul). LPO e RPO podem conter uma sequência opcional denominada Stuffer (verde listrado) e as sequências de reconhecimento dos primers Foward e Reverse (rosa e preto).....	42
Figura 10	Razão dos picos do MLPA mostrando a microduplicação na região 16p11.2, observada no caso F-7150-1/4902, que abrange os genes *HIRIP3, MAPK3, MAZ, MVP* e *SEZ6L2* (vermelho) (A), da mãe (B), da irmã gêmea dizigótica (C) e da outra irmã, portadoras da mesma alteração, analisados pelo programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão indicadas as sondas localizadas nos outros genes da região 16p11.2 e em azul, as sondas controle.....	52

Figura 11 (A) Razão dos picos do MLPA no caso F7285-1/08, que mostra a deleção da sonda localizada no éxon 7 do gene *GABRB3* (vermelho) analisado no programa GeneMarker v.1.97. Esta sonda está localizada na região 15q11-q13. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle. (B) Análise do Cromatograma do exon 7 do gene *GABRB3* mostrando a região do SNP (rs75015217) circulado em vermelho, analisado pelo programa Sequencher 5.0..... 53

Figura 12 (A) Razão dos picos do MLPA do caso F6249-1 que mostra a deleção no éxon 2 do gene *NEDD4* (vermelho), analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *CASP3* e *NEDD4* e em azul estão representadas as sondas controle. (B) Análise do Cromatograma do éxon 2 do *NEDD4* da paciente 5509 mostrando a deleção da trinca CTC. (C) Posição da mutação c.1616–1618delp.(Pro539del) com base no NM_198400.2 que resulta na perda de uma prolina na sequência da proteína Nedd4 pelo UCSC Genome Browser..... 54

Figura 13 Razão dos picos do MLPA do caso F6232-1 que mostra a deleção do éxon 1 do gene *CASP3* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *CASP3* e *NEDD4* e em azul estão representadas as sondas controle..... 55

Figura 14 (A)Razão dos picos do MLPA do caso 4333 que mostra a duplicação das sondas upstream D e E do gene *PTEN* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle (B) . Análise do cromatograma do éxon 1 do gene CASP3 mostrando a região do SNP (rs374692744) com a troca de C>G..... 56

Figura 15 Razão dos picos de MLPA do caso F6180-1 eu mostra a deleção de uma sonda do exon 1 do gene *PTENP1* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle..... 56

Figura 16 (A) Razão dos picos do MLPA do caso 4423 que mostra a deleção do éxon 11 do gene *DLGAP2* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *DLGAP2* e *MAGI2* e em azul estão representadas as sondas controle. (B) Análise do Cromatograma do exon 11 do gene *DLGAP2* do paciente 4423. A seta indica a mutação sinônima em que ocorre a troca de G>A no gene..... 57

Figura 17 Razão dos picos do MLPA do caso F1621-1 que mostra a deleção do éxon 22 do gene *MAGI2* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão marcadas as sondas localizadas nos outros éxons do gene *DLGAP2* e *MAGI2* e em azul estão representadas as sondas controle..... 58

Figura 18 Razão dos picos do MLPA. (A) Deleção das sondas localizadas nos éxons 4 e 5 do gene *NRXN1* (vermelho) do caso F6236-1 e (B) Deleção das sondas localizadas no éxon 19 do gene *NRXN1* (vermelho) do caso F7286-1/4452-B, analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle..... 59

Figura 19 (A) Razão dos picos do MLPA do caso F3282-1, que mostra a deleção da sonda localizadas no éxon 21 do gene *NRXN1* (vermelho), analisado no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle. (B) Análise do Cromatograma da paciente F3282-1. A seta indica a mutação sinônima em que ocorre a troca de G>C no gene *NRXN1*..... 60

Figura 20 Razão dos picos do MLPA do caso 4398, que mostra a deleção das sondas localizadas no éxon 11 do gene *SHANK2* (vermelho), analisado no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle..... 60

Figura 21 Razão dos picos do MLPA do caso F6270-1, que mostra a deleção dos éxons 2, 3, 8 e 10 do gene *GRM5* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *GRM5* e *SHANK1* e em azul estão representadas as sondas controle..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Genes Genes candidatos, localização cromossômica, via de participação, função e fenótipo clínico..... 23

Tabela 2 Alterações observadas nos 23 indivíduos com TEA..... 62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Programa de amplificação HOTFRA.....	36
Quadro 2	Programa de amplificação XFRA.....	37
Quadro 3	Sequência de amplificação dos *primers* f, Eag-L e Eag-U.....	37
Quadro 4	Tamanho esperado dos produtos da PCR, *primers* utilizados e definição dos possíveis resultados.....	38
Quadro 5	Distribuição das sondas dos seis genes nos kits in house.....	42
Quadro 6	Sondas in house de MLPA. As sequências em vermelho correspondem às sequências dos primers universais foward e reverse, respectivamente.....	43-45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. OBJETIVOS 29
3. MATERIAL E MÉTODOS 30
3.1 Casuística 30
3.2 Métodos 31
3.2.1 Coleta de sangue periférico 32
3.3 Métodos de Triagem da Casuística 32
3.3.1 Cultura de linfócitos e bandamento GTG 32
3.3.2 Extração de DNA de leucócitos por Ficoll 33
3.3.3 Extração de DNA por robô 34
3.3.4 PCR para FRAXA 36
3.4. Método de avaliação da variação do número de cópias (CNVs) 39
3.4.1 Escolha dos genes sinápticos, programas de desenho de sondas *in house* e kits comerciais de *Multiplex Ligation dependent-Probe Amplification* (MLPA) 39
3.4.2 Parâmetros do desenho de sondas *in house* 40
3.4.3 Preparação do probemix e montagem dos kits caseiros 45
3.4.5 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 45
3.5. Técnicas de Validação 47
3.5.1 Sequenciamento Sanger 47
3.5.2 Hibridização Genômica Comparativa (array-CGH) 47
4. RESULTADOS 51
5. DISCUSSÃO 64
6. CONCLUSÕES 74
7. REFERÊNCIAS 76
8. APÊNDICES 89
8.1 Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 89
8.2 Apêndice B- NRXN1 exonic deletions in Brazilian patients with idiopathic autistic spectrum disorders 91
8.3 Apêndice C - Screening de genes sinápticos em autistas brasileiros 105
8.4 Apêndice D – Is the autism phenotype in Rett Syndrome only due to mutations in MECP2? 117

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Existem diversas afecções neuropsiquiátricas que comprometem gravemente o comportamento do indivíduo. Particularmente, Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) têm despertado muito interesse científico, em função do tipo de comprometimento e prevalência na população. As manifestações são notadas na primeira infância, geralmente antes dos três anos de idade, e afetam o domínio da comunicação social e o domínio comportamental, comportamentos atípicos, repetitivos e interesses restritos, comprometendo toda a vida do indivíduo, que geralmente continuam com as manifestações na vida adulta (CHUTHAPISITH; RUANGDARAGANON, 2011, LAURITSEN, 2013). É importante que o diagnóstico seja precoce, dadas às implicações terapêuticas, que podem melhorar o desenvolvimento e suavizar, ou até mesmo sanar alguns sintomas (FARAS; ATEEQI; TIDMARSH, 2010; LAURITSEN, 2013). É reconhecido que os déficits causados pelos TEA podem não ser mais detectados na vida adulta, em função de não comprometerem, em alguns casos, demandas sociais mínimas e porque os déficits podem ser compensados por tratamentos de estimulação (LAURITSEN, 2013).

Até 2012 os diagnósticos denominados de Transtornos do Espectro Autístico (TEA) considerados pela literatura eram Autismo Infantil, Síndrome de Asperger e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem Outra Especificação (TID-SOE) que, .com o Transtorno Desintegrativo da Infância e Síndrome de Rett, pertenciam aos denominados Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (*Pervasive Developmental Disorders* - PDDs) descritos na 4° Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV) e na 10ª edição da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) (WHO, 1993; APA, 2000; HOFVANDER et al., 2009; CHIAPPEDI et al., 2010). Entretanto, na 5ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria (APA), a Síndrome de Rett foi retirada da classificação, que oficialmente considera uma única categoria denominada *Autistic Spectrum Disorders* (ASD), no Brasil definida como Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) (APA, 2013), genericamente referidos como Autismo (SKUSE, 2012; LAURITSEN, 2013).

Estas doenças, mais do que categorias diagnósticas bem definidas, formam um contínuo de manifestações, devido a uma ampla variação de sinais e sintomas clínicos,

que podem variar, inclusive, com a fase de vida do indivíduo. São descritos desde indivíduos com quadros clínicos muito exacerbados, que incluem ausência de fala, deficiência intelectual grave e auto-injúrias, até indivíduos com um quociente intelectual acima da média, apesar de apresentarem prejuízos na linguagem e habilidades sociais inadequadas (LOO, GRAHAM, HUGHES, 2009; PÉRISSE et al., 2010). Além disso, os critérios diagnósticos disponíveis são muito subjetivos para o estabelecimento dos diagnósticos diferenciais (SNOW; LECAVALIER, 2011). Por estas razões foi empregado o termo espectro (APA, 2012).

Diretrizes clínicas, como defendido por muitos profissionais e familiares, devem ser estabelecidas e são importantes para o processo de padronização de diagnóstico e manejo terapêutico, que ainda variam muito entre os países e até mesmo em diferentes localidades do mesmo país (LAURITSEN, 2013).

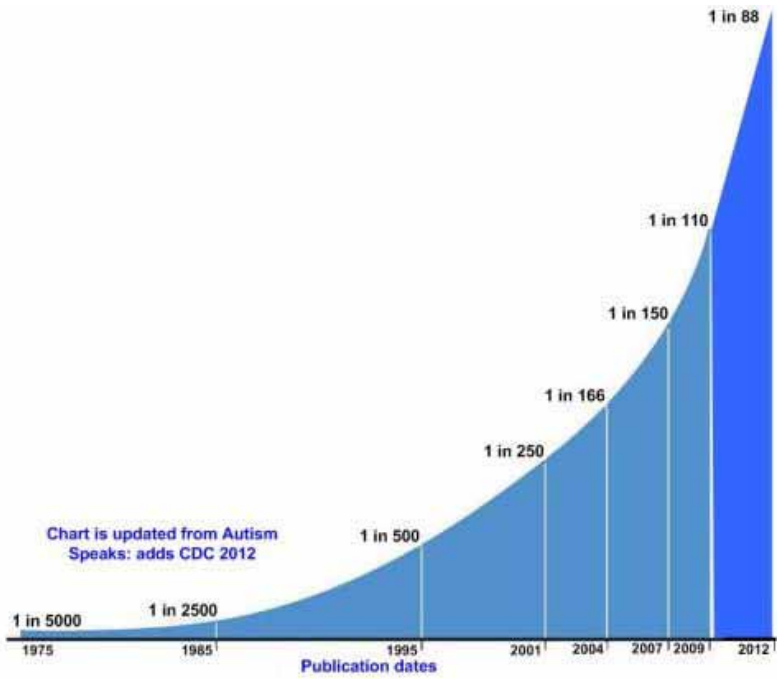
A prevalência dos TEA descrita na literatura é muito variável, embora muito alta. Nos Estados Unidos, há sugestões de que exista um afetado para cada 110 indivíduos da população em geral (1/70 meninos e 1/315 meninas) (ADDM, 2009). Na Islândia é de 1,2:100 (SAEMUNDSEN et al., 2013). A frequência mundial estimada é de 1:161 (ELSABBAGH et al., 2012), No Brasil, os estudos epidemiológicos são praticamente inexistentes. Um estudo piloto realizado em uma cidade do interior de São Paulo estimou a frequência dos TEA em torno de 1:370 indivíduos (PAULA et al., 2011), menor do que as demais, porém o tamanho pequeno da casuística avaliada pode justificar a diferença, segundo os próprios autores.

Estudos epidemiológicos mostram que houve um aumento na prevalência dos TEA, de 600% nos EUA (Figura 1) e esse aumento pode ser atribuído a vários fatores (Figura 2). Até mesmo erros de cálculo em alguns estudos são referidos, com extrapolações inadequadas de amostragens limitadas e enviesadas (KIM et al., 2011; ISAKSEN et al., 2012).

Deve ser considerado que houve mudanças nos critérios diagnósticos que levaram mais e diferentes crianças para a categoria diagnóstica dos TEA, houve um aumento no número de crianças com diagnóstico de Asperger, que parece ter sido a categoria diagnóstica que mais contribuiu para a prevalência ter aumentado tanto, uma maior conscientização entre pais, profissionais e público em geral sobre a existência de TEA, ou ainda, houve transferência de diagnóstico "menos populares" para diagnósticos "mais populares", que muitas vezes está ligada a apoio financeiro. Também se tornou mais comum diagnosticar TEA como condição associada a síndromes conhecidas, por

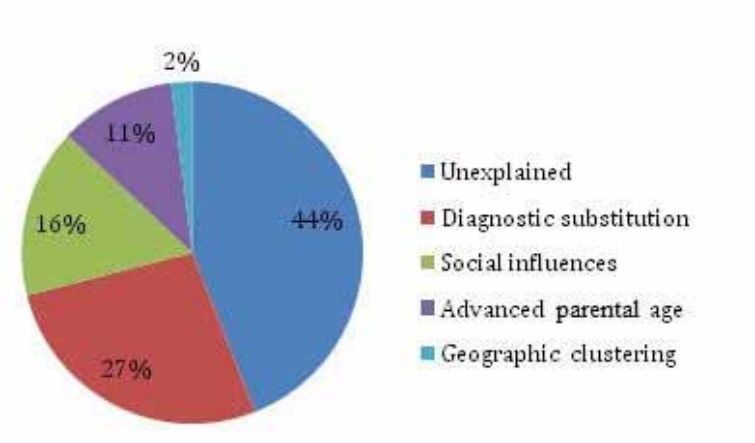
exemplo, Síndrome de Down e Síndrome do Cromossomo X Frágil (BERUMENT et al., 1999; WING; POTTER, 2002; FOMBONNE, 2005; BAIRD et al., 2006; LATIF; WILLIAMS, 2007).

Também, o aumento de serviços especializados que permite que mais casos sejam identificados, o diagnóstico mais precoce e o tipo de avaliador podem influenciar a frequência. Há relatórios que indicam que os professores relatam TEA mais frequentemente do que outros grupos de profissionais (ROSENBERG et al., 2009). Em adição às diferenças de prevalência em vários países, alguns estudos encontraram diferenças por etnia. Nos EUA, uma prevalência menor de TEA foi observada em hispânicos comparados com brancos, atribuída a variáveis socioeconômicas, embora erros de diagnóstico e questões metodológicas não possam ser descartadas (ZAROFF; UHM, 2012).



Fonte: http://www.autismspeaks.org/science/science-news/year-autism epidemiology

Figura 1. Prevalência dos ASD no período de 1975 a 2012 nos Estados Unidos.



Fonte: http://blog.autismspeaks.org/2011/02/03/s-evaluating-change/

Figura 2. Fatores que explicam o aumento na prevalência dos ASD.

Os TEA afetam mais o sexo masculino, na proporção de 4:1 meninos/meninas. Estudos recentes sugerem que as diferenças sexuais na apresentação fenotípica, incluindo manifestações menos graves de comportamentos restritos e repetitivos nas meninas, parecem interferir nesta proporção. Estudos genéticos mostram que as meninas parecem ser mais "protegidas" dos efeitos de variantes herdadas e *de novo* que causam TEA, sugerindo que genes que atuam no desenvolvimento sexual e/ou hormônios sexuais, principalmente a testosterona, podem modular os efeitos da variação genética no fenótipo autista (WERLING; GESCHWIND, 2013).

A classificação destas doenças é confusa, a obtenção de dados epidemiológicos é difícil, mas a etiologia é ainda mais complexa. Os fatores ambientais contribuem com cerca de 10% dos casos (GARBER, 2007). Entre eles, estão infecções materno-fetais, como a rubéola e a toxoplasmose, e a ingestão de talidomida e ácido valpróico no período gestacional (JONES; SZATMARI, 2002; PERSICO; BOURGERON, 2006).

Na última década, uma série de grandes avanços tecnológicos transformou a compreensão das causas genéticas do autismo. Os dados de todas as abordagens levam à conclusão de que o autismo é um distúrbio muito complexo e heterogêneo, de provável etiologia multifatorial na maioria dos casos, ou que nem mesmo se trata de uma única doença, mas que o espectro pode consistir de diferentes afecções que resultam em fenótipos semelhantes (CONOLLY; HAKONARSON, 2011).

O desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS) tornou possível sequenciar genomas e exomas inteiros, o que somado a alguns conhecimentos anteriores, também permitiu identificar várias mutações patogênicas e genes candidatos aos TEA e outros distúrbios do neurodesenvolvimento (CHOI et al., 2009; BILGÜVAR

et al., 2010; VISSERS et al., 2010; GILMAN et al., 2011; SANDERS et al., 2011; PAGNAMENTA et al., 2012; FETT-CONTE; BOSSOLANI-MARTINS; PEREIRA-NASCIMENTO, 2013). Segundo O'Roak et al. (2012) mutações *de novo* em famílias sem história prévia destes transtornos ou fenótipos relacionados aos TEA (famílias simplex) são de origem paterna na maior parte dos casos e positivamente correlacionada com a idade paterna avançada. Neale et al. (2012) estudaram 175 trios (pai, mãe e filho afetado) para avaliar mutações *de novo* e observaram que estas estão distribuídas em vários genes, mas têm penetrância incompleta. Os resultados corroboram com os modelos poligênicos em que as mutações espontâneas codificantes de um grande número de genes aumentam o risco de 5 a 20 vezes de desenvolver TEA.

Variações do número de cópia (CNVs) são microduplicações ou microdeleções resultantes de inserções, deleções ou translocações no genoma humano que são observadas na população em geral e comumente encontradas em regiões gênicas em indivíduos com distúrbios neuropsiquiátricos (PINTO et al., 2010).

CNVs podem ser herdadas ou *de novo*, frequentes ou raras, com uma frequência inferior a 1% na população. Estes eventos biológicos também foram identificados em TEA e em outros distúrbios como Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), esquizofrenia e transtorno bipolar (CHEN et al., 2010; GLESSNER et al., 2010; LEVINSON et al., 2011). Uma parcela substancial de casos de autismo parece resultar de CNVs raras. CNVs *de novo* maiores do que 100kb são mais comuns em indivíduos com TEA do que na população geral (CONOLLY; HAKONARSON, 2011).

Progressivamente, os conhecimentos têm validado o forte componente genético dos TEA, embora para a maioria dos indivíduos com fenótipo autista, não exista uma causa genética ou ambiental em comum conhecida, o que os define como "idiopáticos" (WISNIOWIECKA-KOWALNIK et al., 2013).

Segundo, Devlin & Scherer (2012), a etiologia genética pode ser identificada em 20-25% dos casos e podem ser consideradas quatro categorias: 1) rearranjos cromossômicos visíveis pela citogenética clássica, detectados em até 5% dos casos, como duplicações maternas de 15q11-q13, trissomia do cromossomo 21 (47,XX/XY,+21), síndrome de Turner (45,X) e síndrome de Klinefelter (47,XXY); 2) síndromes associadas, que contribuem com aproximadamente 10% dos casos, como as Síndromes do Cromossomo X Frágil, Esclerose Tuberosa, Fenilcetonúria, Rett, Timothy e Potocki-Lupski; 3) CNVs raras envolvendo 16p11.2, 7q11.23, 22q11.2, 1q21.1, 15q13.3, 17p12, 3q37-38, observadas em cerca de 5% dos casos e 4) mutações

penetrantes raras em *PTCHD1/PTCHD1AS, NRXN1, SHANK1, SHANK2*, *SHANK3, NLGN3, NLGN4X*, *NRXN3, CNTNAP2* e *DPP6,* observadas em 5% dos casos.

Os genes candidatos podem ser classificados em quatro grupos: 1) genes raros - os tipos de variantes alélicas incluem polimorfismos raros de genes únicos com alterações/mutações diretamente relacionadas aos TEA (*NRXN1* e *SHANK3* e vários outros genes sinápticos); 2) sindrômicos - genes implicados em síndromes cujas manifestações fenotípicas em uma subpopulação significativa de afetados incluem sintomas autistas (*FMR1* e *MECP2*); 3) associações - genes com polimorfismos comuns que conferem risco pequeno, provavelmente aditivo para TEA, que foram identificados a partir de estudos de associação, derivados de casos de etiologia desconhecida (*MET* e *GABRB1*) e 4) funcionais - genes com funções relevantes, relacionados com a biologia dos TEA e que não estão incluídos nas outras categorias (*CADSP2*, cujos modelos de ratos *knockout* apresentam características autistas, mas ainda não associado a humanos (SWANWICK et al., 2011). Entre eles, os raros e sindrômicos são os mais investigados, pela evidência de forte ligação com TEA (EL-FISHAWY; STATE, 2010).

Além de uma parcela dos indivíduos apresentarem mutações monogênicas, também tem sido proposto pela literatura o modelo oligogênico, segundo o qual haveria o envolvimento de dois ou mais genes que contribuiriam com pequenas alterações que, aditivamente resultariam no fenótipo autístico. Schaaf e colaboradores verificaram a relação genética entre o autismo sindrômico e o não sindrômico, e dos 21 genes analisados em 339 probandos, a taxa estimada de mutação *missense de novo* foi alta, o que levou os autores a sugerirem que mutações com perda de função são mais graves e podem causar o autismo sindrômico, enquanto mutações intermediárias, menos graves, podem causar o autismo não sindrômico (SCHAAF et al., 2011).

Em 2003, um grupo francês identificou mutações no gene da neuroligina (*NLGN*) em irmãos com TEA (JAMAIN et. al., 2003). Este trabalho abriu um campo de pesquisa em duas áreas principais: a base genética forte das formas não-sindrômicas de TEA e o modelo sináptico para este grupo de doenças (SWANWICK et al., 2011).

A hipótese de TEA como modelo de doença sináptica é bem conhecida, baseada em estudos anteriores que revelaram CNVs nestes genes, que poderiam influenciar a expressão dos mesmos (MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004; SEBAT et al., 2007; BOURGERON, 2009; GLESSNER et al., 2009; BERKEL et al., 2010; PINTO et al., 2010; VISSERS et al., 2010). As CNVs mais frequentes tendem a ser grandes (>500kb) e contém vários genes, enquanto CNVs raras ou *de novo* são menores

(<100Kb) em tamanho, às vezes interrompendo um único gene (MALHOTRA; SEBAT et al., 2012).

Algumas vias canônicas que envolvem genes que se expressam no cérebro ou durante o desenvolvimento cerebral, como os que codificam proteínas sinápticas, já foram descritas como envolvidas com a etiopatogenia dos TEA (VORSTMAN et al., 2006; CUSCO et al., 2009; PERCHE et al., 2010). A Tabela 1 apresenta 10 genes sinápticos candidatos ao envolvimento na etiopatogenia dos TEA.

Tabela 1. Genes candidatos, localização cromossômica, via de participação, função e fenótipo clínico.

Gene	**Locus**	**Via de participação** (Pathway)	**Função**	**Fenótipo Clínico**
UBE3A	15q11.2	*Protein Ubiquitination*	Ligase (E3) - sistema de ubiquitinação	TEA
NEDD4	15q	*Protein Ubiquitination*	Ligase (E3) - sistema de ubiquitinação	TEA
CASP3	4q34	*Protein Ubiquitination*	Protease- apoptose axonal	-----
PTEN	10q23.31	*PTEN signaling*	Supressor de tumor (fosfatase lipídica)-apoptose e sinapses	TEA com macrocefalia
DLGAP2	8p23	*PTEN signaling*	Receptor associado com NMDA* e canais de potássio	TEA
MAGI2	7q21	*PTEN signaling*	Receptor- sinapses	Esquizofrenia TEA
NRXN1	2p16.3	*Axonal Guidance*	Molécula de adesão celular	Autismo com fácies dismórficas e déficits de linguagem
SHANK1	19q13.3	*Axonal Guidance*	Proteína de suporte sináptico	TEA
SHANK2	11q13.2	*Axonal Guidance*	Proteína de suporte sináptico	TEA
GRM5	11q14.3	*Axonal Guidance*	Receptor metobotrópico de glutamato	Esquizofrenia TEA

* NMDA= N-metil-D-ácido aspártico

Os genes *UBE3A, NEDD4* e *CASP3* (Figura 3) participam da via de ubiquitinação. A via proteassoma-ubiquitina (UPP) é o maior sistema responsável pela degradação de proteínas intracelulares em eucariotos. Envolve um sistema do qual participam ligases ubiquitinas (E1, E2 e E3) marcam, transportam e regulam a

degradação de proteínas nos proteossomo. Assim, o sistema controla os níveis de proteínas-chave que regulam quase todas as atividades celulares, incluindo o ciclo celular, replicação e reparo do DNA, transcrição, controle de qualidade da proteína, resposta imune e apoptose (LIU; GOLDBERG; QIU, 2007).

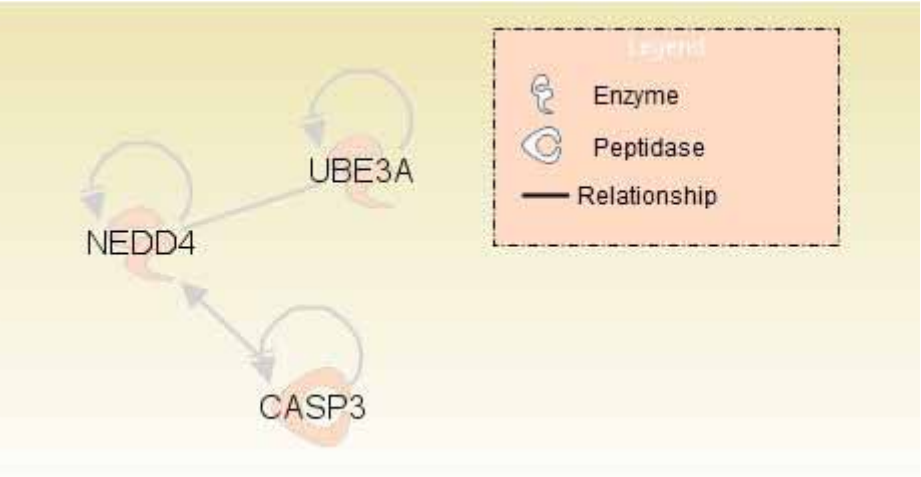


Figura 3. Via de ubiquitinação. Relação entre os genes *UBE3A, NEDD4* e *CASP3*. (IPA. INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS - INGENUITY® SYSTEMS).

O gene *UBE3A* codifica uma proteína ligase do tipo E3 que atua em compartimentos pré e pós-sinápticos, na regulação sináptica, incluindo liberação de neurotransmissor, reciclagem de vesículas sinápticas nos terminais pré-sinápticos e mudanças nas espinhas dendríticas e na densidade pós-sináptica (GLESSNER et al., 2009). Duplicações nesse gene levam a superexpressão específica da proteína Ube3a que funciona como um mediador, o qual desencadeia a ubiquitinação devido ao estresse genotóxico. Isso pode resultar em uma redução inadequada da apoptose devido à diminuição da sensibilidade a estímulos apoptóticos e maior tolerância a danos no DNA (BARON et al., 2006).

O gene *NEDD4* também codifica uma ubiquitina ligase do tipo E3, que está implicado em um número crescente de interações proteína-proteína neuronais e regula o gene *CASP3* (DONOVAN; PORONNIK, 2013). O gene *CASP3* codifica uma cisteína peptidase que atua na degradação neuronal. A ativação sequencial de caspases desempenha um papel central na execução da apoptose (SIMON et al., 2012).

Os genes *PTEN*, *MAGI2* e *DLGAP2* fazem parte da via de sinalização PTEN. Essa via desenvolve um papel essencial na sinalização, diferenciação neuronal e na

formação de circuitos neurais. O gene *PTEN* desenvolve um papel central nessa via, no desenvolvimento de células-tronco neurais (LV et al., 2013). Os genes *DLGAP2* e *MAGI2* codificam proteínas guanilato-quinases associadas à membrana celular. O primeiro possui papel na organização da sinapse e sinalização em células neuronais (CHIEN et al., 2013), além disso, regula e se liga a *PTEN* . O segundo atua também como uma molécula suporte que está presente em sinapses glutamatérgicas, mas também interage com sinapses gabaérgicas (SASSOÈ-POGNETTO et al., 2011) (Figura 4).

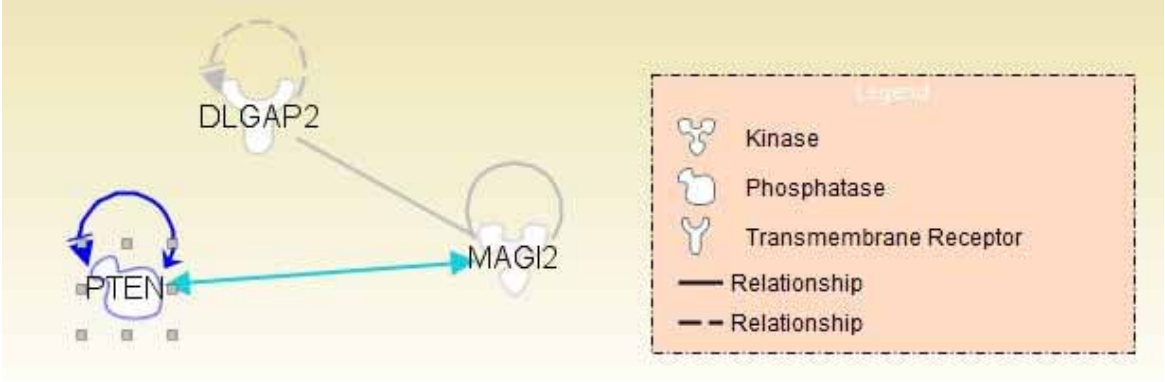


Figura 4. Via de sinalização do *PTEN*. Relação entre os genes *PTEN, DLGAP2* e *MAGI2*. (IPA. INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS - INGENUITY® SYSTEMS).

Os genes *NRXN1, SHANK2, SHANK1* e *GRM5* (Figura 5) fazem parte da via de orientação axonal. O gene *NRXN1* codifica proteínas que atuam como receptores de superfície celular ou adesão celular. A adesão celular é importante na coordenação sináptica, atividade cerebral, formação, principalmente manutenção e modificação de sinapses que são fundamentais para a aprendizagem, memória e cognição (DEAN; DRESBACH, 2006). Os genes *SHANK1* e *SHANK2* fazem parte da família de proteínas suporte (*SHANK1, SHANK2* e *SHANK3*). Estas proteínas interagem com as da família DLGAP em regiões pós-sinápticas e esta interação já foi proposta como um fator importante em TEA (BERKEL et al., 2010; PINTO et al., 2010). O gene *GRM5* codifica um receptor metabotrópico de glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, que atua na neurotransmissão glutamatérgica e está envolvido

na maioria dos aspectos da função normal do cérebro e que pode ser perturbada em muitas condições neuropatológicas (SKAFIDA et al., 2012).

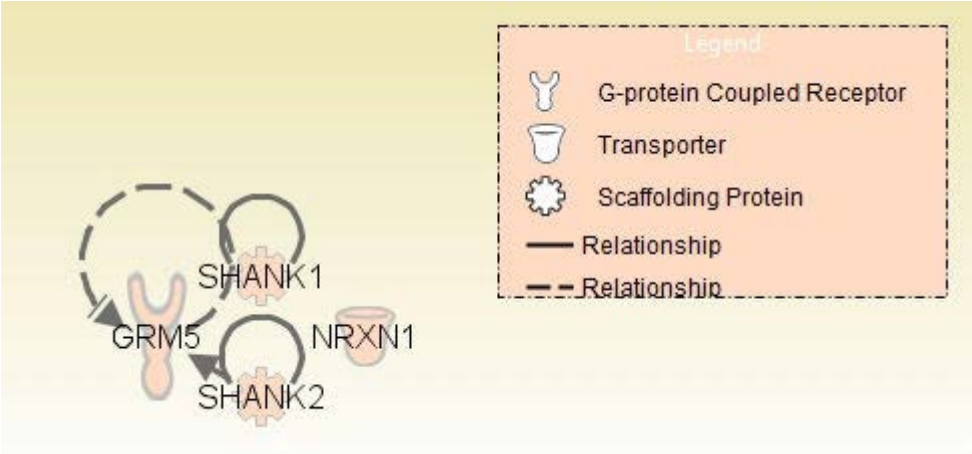


Figura 5. Via de orientação axonal. Relação entre os genes *SHANK1, SHANK2, NRXN1* e *GRM5*. (IPA. INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS - INGENUITY® SYSTEMS)

Os 10 genes têm relação direta ou indireta entre si, como mostra a Figura 6. Como parte dos pacientes com fenótipo autístico tem mutações em genes únicos, ou em mais do que um gene, muitos deles envolvidos com o processo sináptico e neurotransmissão, alterações moleculares devem ser investigadas, com possíveis extrapolações para o Aconselhamento Genético e compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos na predisposição. Inclusive, porque não foram encontrados estudos na literatura que tenham avaliado os 10 genes em conjunto em casuísticas de TEA idiopático.

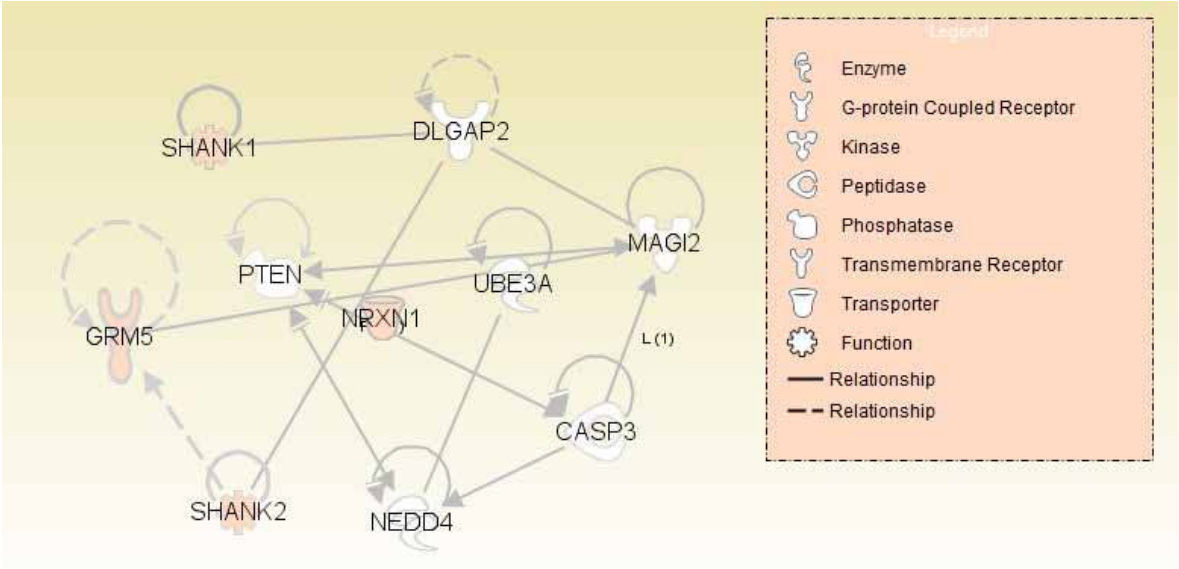


Figura 6. Rede de interação entre os 10 genes sinápticos propostos no estudo. (IPA. INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS - INGENUITY® SYSTEMS).

A hipóse científica que foi testada neste estudo é que os genes *UBE3A, DLGAP2, NRXN1, NEDD4, GRM5, CASP3, MAGI2, SHANK1, SHANK2* e *PTEN* podem estar alterados quantitativamente em indivíduos com TEA e devem ser investigados em afetados da população brasileira.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Geral:

Realizar a análise CNVs em genes que atuam no sistema nervoso central em vias sinápticas e neurotransmissão, em indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo.

Específicos:

1. Avaliar a presença de variação no número de cópias (CNVs) dos genes *UBE3A, DLGAP2, NRXN1, NEDD4, GRM5, CASP3, MAGI2, SHANK1, SHANK2* e *PTEN*, pela técnica de MLPA;

2. Em casos alterados, validar os achados por sequenciamento Sanger ou array-CGH;

3. Comparar os achados com bancos de dados de indivíduos normais;

4. Avaliar a presença de possíveis alterações também nos progenitores do afetado, para verificar se foram herdadas ou *de novo*;

5. Relacionar os achados genotípicos com os fenotípicos.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP-FAMERP), Processo nº3306/2010 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), confeccionado segundo a Resolução 196/96, obtido de todos os indivíduos estudados, foi assinado pelos responsáveis (Apêndice A)

3.1 Casuística

Foram selecionados para o estudo 311 indivíduos com Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e 11 foram excluídos da casuística, que foi composta por 300 indivíduos. As idades variaram de um a 47 anos de idade $\overline{X}$=12,1; σ=8,0), 239 (79,67%) homens e 61 (20,33%) mulheres, na proporção de 4:1.

Os diagnósticos foram confirmados segundo os critérios do DSM-IV e de escalas e instrumentos variados, conforme indicado e aplicado em cada caso por médicos e psicólogos componentes de equipes multidisciplinares das escolas especializadas de onde os indivíduos afetados foram procedentes. Entre os instrumentos utilizados estão a Escala de Avaliação para Autismo Infantil – CARS (SCHOPLER et al., 1980), Entrevista Diagnóstica para Autismo Revisada – ADI-R (LORD; RUTTER; LE COUTER, 1994) e ASQ (Questionário de Triagem para Autismo – (BERUMENT et al., 1999). Alguns pacientes também foram avaliados pela psiquiatra do grupo de pesquisa, Dra. Simone Secco da Rocha, especialista em TEA, para confirmação do diagnóstico, quando alguma dúvida sobre a conclusão do mesmo ainda existia.

A avaliação fenotípica para verificação de possíveis síndromes associadas, assim como a investigação de possíveis fatores etiológicos ambientais, foi realizada por geneticistas, pediatras e neuropediatras, membros da equipe multidisciplinar do Serviço de Genética da FAMERP/FUNFARME, conforme rotina do próprio Serviço.

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, do Recanto Tia Marlene de Votuporanga – SP,

da Associação para o Desenvolvimento dos Autistas em Campinas (ADACAMP), da UNESP-Campus de Marília (Serviço de Fonoaudiologia) e do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP-SP).

Não foram incluídos no estudo, pacientes com doenças de etiologia genética ou ambiental, aqueles cujas famílias não concordaram em participar deste estudo, aqueles que, mesmo com autorização do responsável para participação apresentaram desconforto exacerbado diante da possibilidade da punção venosa, e aqueles cujo material biológico obtido não apresentava condições de análise.

Nos casos possíveis, para esclarecer se algum achado fora herdado ou *de novo,* e sua relação com o fenótipo autístico, foi realizada a investigação do mesmo nos progenitores e irmãos dos afetados.

Dos 11 indivíduos que foram excluídos, dois apresentaram TEA atribuído a rubéola congênita, um teve o fenótipo associado à lesão cerebral hipoxico isquêmica no período neonatal, um apresentou o cariótipo compatível com síndrome de Klinefelter (47,XXY), um os pais não assinaram o Termo de Consetimento Livre e Esclarecido e seis o DNA não apresentava condições de análise, e não havia possibilidade de recoleta do material.

3.2 Métodos

Todos os indivíduos foram triados quanto à presença de cromossomopatias e os meninos foram investigados quanto à presença da mutação do gene *FMR1*, responsável pela Síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA). Para isto foi realizado o estudo cariotípico em metáfases obtidas de culturas de linfócitos submetidas ao bandamento GTG e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com *primers* específicos para a região alvo, respectivamente. Os indivíduos que apresentassem alterações cromossômicas e/ou mutação do gene *FMR1* seriam excluídos da etapa seguinte do projeto, que foi a avaliação molecular dos genes sinápticos pela técnica de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). O fluxograma relacionado à triagem dos indivíduos, considerando-se os critérios de inclusão e exclusão, está apresentado na Figura 7.

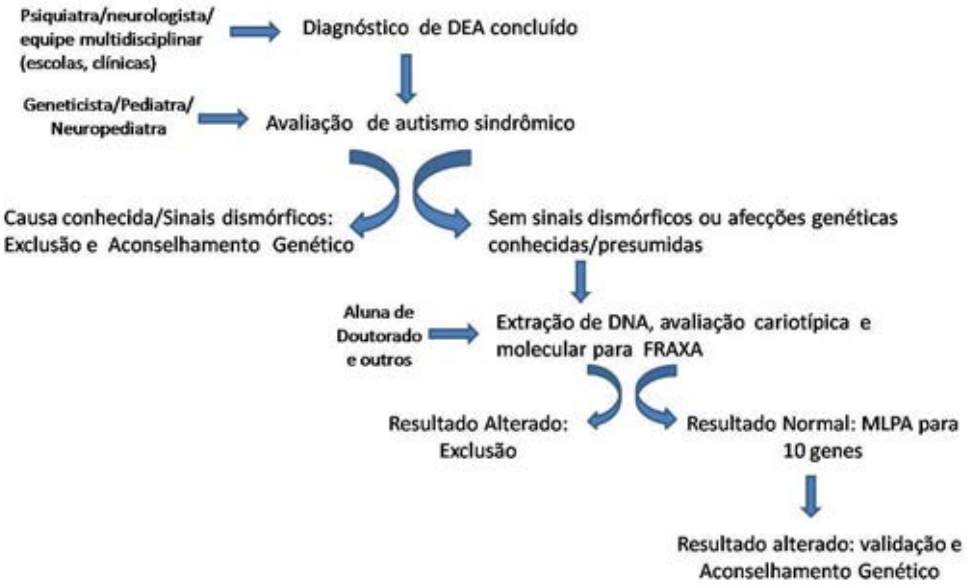


Figura 7. Fluxograma das estratégias para realização do projeto.

3.2.1 Coleta de sangue periférico

A coleta de sangue venoso periférico foi realizada por profissionais de saúde habilitados em local adequado. Assim, de cada indivíduo que entrou para o estudo, foram colhidos um total de 10ml de sangue venoso periférico em seringa seca e estéril, de onde 5ml foram transferidos para tubos *vacutainer* heparinizados e os 5ml restantes armazenados em tubos *vacutainer* com EDTA. O primeiro foi utilizado para realização de cultura temporária de linfócitos e o outro para os estudos moleculares.

3.3 Métodos de Triagem da Casuística

3.3.1 Cultura de linfócitos e bandamento GTG

As culturas de linfócitos foram desenvolvidas de acordo com o protocolo padrão utilizado pelo Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP/FUNFARME.

Em dois frascos de cultivo foram colocados 5ml de meio de cultura RPMI1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina (100U/ml), fito-hemaglutinina (PHA-Gibco 0,3ml/5ml de meio) e 0,2 ml de sangue total. Posteriormente os frascos foram incubados a 37ºC em estufa de CO_2 por 72 horas.

Após esse período, foi adicionado 0,1ml de solução de colquicina Houdé (4x10M), para interrupção da divisão celular, e os tubos foram reincubados por 20 minutos antes da colheita. Em seguida ao bloqueio celular, o material foi centrifugado a 1.000rpm durante sete minutos, o sedimento foi hipotonizado de forma progressiva com 11ml de KCl a 0,075M por 40 minutos, a 37ºC, e fixado em metanol: ácido acético (3:1). A suspensão celular foi gotejada em lâminas limpas, molhadas e geladas, que foram submetidas à técnica de bandamento GTG. Para esta finalidade, foram mergulhadas sequencialmente em tampão Sorensen pH 6,8, 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 cinco minutos e lavadas em água destilada.

Cada indivíduo foi identificado por um código conhecido apenas pelos responsáveis pela pesquisa.

O cariótipo (resolução de 300-450 bandas) foi analisado em 20 metáfases de cada caso. Todas as análises foram realizadas por dois observadores. Os achados e a descrição dos mesmos foram colocados em um laudo e seguiram os critérios contidos na ISCN (2013). As metáfases que apresentaram alterações foram fotodocumentadas.

3.3.2 Extração de DNA de leucócitos por Ficoll

O DNA de cada indivíduo foi obtido a partir de leucócitos de sangue venoso periférico, segundo a técnica descrita por Miller et al., (1988), com modificações. O volume de 5ml de sangue foi coletado em tubo *vacutainer* com EDTA, conforme descrição anterior. Em 84 casos, a extração foi feita por Ficoll.

Em um tubo de polipropileno de 15ml foram adicionados 3,5ml de FICOLL PAQUE e os 5ml de sangue periférico, este último, pela parede do tubo. O material foi centrifugado por 30 minutos a 3.500rpm e o sobrenadante (plasma) retirado e desprezado. O anel de leucócitos foi transferido para outro tubo e o volume de 15ml completado com PBS 1X. Após nova centrifugação a 3.500rpm por 12 minutos e retirada do sobrenadante, foi ressuspendido o "pellet" e o volume de 15ml foi novamente completado com PBS 1X. Após nova centrifugação a 3.500rpm por 12 minutos, o sobrenadante foi descartado. O "pellet" de leucócitos foi ressupendido, 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 37ºC overnight. Em seguida, o "pellet" de leucócitos recebeu 1ml de NaCl 6M saturado, seguido de agitação vigorosa, até formar espuma, e foi colocado no gelo por 15 minutos. O material foi novamente agitado e centrifugado a 3.500rpm por 15 minutos, o sobrenadante transferido para um novo tubo de 15ml e adicionados 10ml de etanol absoluto gelado, para a precipitação do DNA. O tubo foi invertido delicadamente até a visualização do DNA precipitado, que foi colocado em um microtubo de 1,5ml com 500µl de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação a 14.000rpm por três minutos, o etanol 70% foi descartado e o tubo deixado em repouso por 15 minutos. O DNA foi diluído em água ultra-pura e incubado a 37ºC por dois dias para eluição. Após este período, o material foi estocado a -20ºC. A estimativa da concentração foi realizada pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND 1000.

3.3.3 Extração de DNA por robô

Duzentas e dezesseis amostras de DNA foram extraídas pelo protocolo Increased Spin Fresh Whole Blood DNA Purification Protocol, do robô Autopure LS (Gentra Systems), que incluiu as seguintes etapas:

A) Lise das Células Vermelhas

-Escaneamento e verificação dos códigos de barras das tampas dos tubos de entrada e saída, para verificação da existência de amostra no tubo de entrada (tampa rosa) e garantia de que os tubos de saída estejam vazios (tampa azul).

-Distribuição de 15-19mL (para protocolo de 1 a 5mL) do reagente 1 (RBC Lysis Solution) em cada tubo de entrada. O sistema usou o reagente 1 para balancear os tubos antes da centrifugação. A quantidade dispensada variou dependendo do volume inicial da amostra. O volume total de amostras mais o reagente 1 foi de de 20mL para protocolo de 1 a 5mL.

-Incubação das amostras em RBC Lysis Solution para lisar as células vermelhas durante 10 minutos. As amostras permaneceram rodando levemente para homogenização durante a incubação.

-Centrifugação a 3.000rpm a 10°C por 2 minutos para formar um pellet de células brancas, com adição de 5mL (para protocolo de 1 a 5mL) do Reagente 4 (Isopropanol 100%) nos tubos de saída da linha C do Rack.

- Descarte do sobrenadante composto pelas células vermelhas lisadas.

B) Lise das Células Brancas e Precipitação das Proteínas

Nesta etapa, o robô dispensou 1,67mL (para protocolo de 1 a 5mL) do Reagente 3 (Protein Precipitation Solution) vigorosamente no centro do tubo de entrada para desmanchar o pellet de células brancas e precipitar as proteínas. Dispensou 5mL (para protocolo de 1 a 5mL) do Reagente 2 (Cell Lysis Solution) em cada tubo de entrada para lisar as células brancas e misturou as amostras vigorosamente por 02 minutos para precipitar as proteínas. Em seguida centrifugou as amostras a 3.000rpm a 10°C por 10 minutos. O precipitado de proteínas formou um pellet escuro. Em seguida, transferiu o sobrenadante com o DNA nos tubos de saída contendo Isopropanol a 100%.

C) Precipitação do DNA

Os tubos de saída foram girados levemente 50 vezes para precipitação do DNA. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas a 3.000rpm a 10°C por 5 minutos para formar um pellet de DNA. O sobrenadante de Isopropanol foi descartado e os tubos de saída foram invertidos pelo robô por um minuto para evaporação do álcool remanescente.

D) Lavagem do DNA

O robô dispensou 5mL (para protocolo de 1 a 5mL) do Reagente 5 (Etanol 70%) em cada tubo de saída, centrifugou as amostras a 3.000rpm a 10°C por três minutos para formar um pellet de DNA, descartou o sobrenadante de etanol e inverteu os tubos de saída por um minuto para evaporar qualquer álcool remanescente.

E) Hidratação do DNA

O volume do Reagente 6 (Hydration Solution) que foi selecionado pelo usuário nos tubos de saída para reidratar o DNA foi descartado. Depois de remover as amostras do instrumento, os tubos foram incubados por uma a duas horas a 65°C e deixados pelo menos por uma noite à temperatura ambiente. Para estocar, os tubos foram

centrifugados rapidamente e o DNA foi transferido para o tubo final. As amostras foram estocadas a 4°C.

3.3.4 PCR para FRAXA

A determinação do número de repetições CGG dos alelos do gene *FMR1* foi realizada segundo a técnica de Haddad et al. (1996).

A PCR foi processada em termociclador SelectCycler (98 tubos), em volumes de 25ul, contendo 50ng/ul de DNA genômico, 2,3ul de Tris-HCl-KCl 10mM (pH 8,3), 1ul de $MgCl_2$ 50mM, 4ul dNTP 1,25mM - 75% 7TEAza dGTP, 2,5ul de DMSO, 1ul de *work solution* (7,5uM Eag-U / 5uM f / 2uM Eag-L) dos *primers* (F, Eag-L e Eag-U) e 2ul do mix de TaqDNA polimerase a 5U.

A preparação da dNTP (1,25mM - 75% 7TEAza dGTP) foi realizada misturando-se 308,75ul de água ultra-pura, 5ul dATP [100mM], 5ul de dTTP [100mM], 5ul de dCTP [100mM], 1,25ul de dGTP [100mM] e 75ul de 7-TEAsa dGTP [5mM], para um volume final de 400ul. Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu DNA e este foi utilizado como controle de contaminação.

O mix da TaqDNA foi preparado misturando-se momentos antes da reação, 0,2ul de Tampão 10x Invitrogen, 0,32ul Taq (5U/ul) Invitrogen e 1,48ul de agua ultra-pura para o volume final de 2ul.

A preparação da *work solution* dos três *primers* (7,5uM Eag-U / 5uM f / 2uM Eag-L) foi realizada homogeneizando 7,5ul do *primer* Eag-U [100mM], 2ul do *primer* Eag-L [100mM], 5ul de f [100mM] e 85,5ul de agua ultra-pura, para o volume total de 100ul. A amplificação dos *primers* do gene *FMR1* foi realizada de acordo com os programas HOTFRA e XFRA de amplificação da reação apresentado nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

Etapa	**Temperatura (°C)**	**Duração**
Pré-aquecimento	98	10 minutos
Adição da Taq	72	∞

Quadro 1. Programa de amplificação HOTFRA.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração
Pré-aquecimento	94	2 minutos
Anelamento*	65	1 minuto
Extensão*	72	2 minutos
Denaturação*	94	1,5 minutos
Extensão final	72	10 minutos
*O ciclo desnaturação-anelamento-extensão será repetido 35 vezes.		

Quadro 2. Programa de amplificação XFRA.

Os três *primers* (f, Eag-L e Eag-U) utilizados amplificam a região do gene *FMR1* e produzem fragmentos de tamanhos diferentes. Conforme o tamanho dos fragmentos pode ser identificada a presença de alelos normais ou com a mutação completa.

As sequências de bases dos *primers* f(reverse 1), Eag-L(reverse 2) e Eag-U (foward), o tamanho esperado dos produtos e os seus resultados estão apresentados nos Quadros 3 e 4, respectivamente.

Primer	***Primers* 5' a 3'**	**Tamanho do *amplicon* (pb)**
f	AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA	30
Eag-L	CGCTGCGGGTGTAAACACTGAAACCACGTC	30
Eag-U	CGACCTGTCACCGCCCTTCAGCCTTCC	27

Quadro 3. Sequência de amplificação dos *primers* f, Eag-L e Eag-U.

Tamanho esperado dos produtos	*Primers*	Resultado
223 pb	Eag-U e Eag-L	alelos normais
488 a 632 pb	Eag-U e F	
223 pb	Eag-U e Eag-L	pré-mutação
635 a 1070 pb	Eag-U e F	
223 pb	Eag-U e Eag-L	mutação completa
Ausência de banda	Eag-U e F	

Quadro 4. Tamanho esperado dos produtos da PCR, *primers* utilizados e definição dos possíveis resultados.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (120 Volts por 60 minutos), juntamente com um marcador de peso molecular (Ladder Gibco DNA 100pb), o que permitiu observar se houve amplificação e se o tamanho do segmento obtido coincidiu com o esperado. A Figura 8 mostra o esquema de um perfil eletroforético do gel de acrilamida de resultados possíveis.

Nos casos em que houve suspeita de mutação completa, as reações foram repetidas e, se confirmado o resultado prévio, o caso foi enviado para o Laboratório da Profa. Dra. Ângela Maria Vianna Morgante da USP-SP, para realização da técnica de Southern Blotting e confirmação ou não do achado, o que não foi necessário nesse estudo.

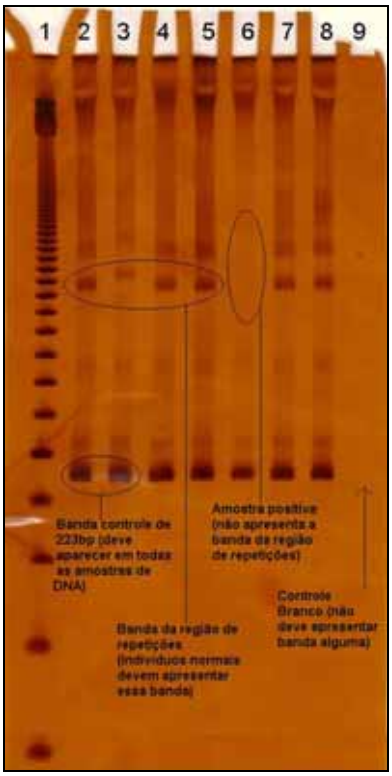


Figura 8. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 6% correspondente a amplificação do gene *FMR1* de sete indivíduos do sexo masculino. A coluna 1, referente ao poço 1, mostra o padrão de peso molecular de 50bp; os poços 2, 3, 4, 5, 7 e 8 são de pacientes normais, que apresentam a banda controle de 223bp e a de 600pb, que referem-se às bandas de controle interno e de expansão da trinca CGG, respectivamente. O poço 6 representa um paciente com mutação completa (positivo). Observa-se a banda controle de 223bp, mas não a banda da região de repetições. O poço 9 representa o controle branco (teste de contaminação).

3.4. Método de avaliação da variação do número de cópias (CNVs)

3.4.1 Escolha dos genes sinápticos, programas de desenho de sondas *in house* e kits comerciais de *Multiplex Ligation dependent-Probe Amplification* (MLPA)

A escolha dos genes sinápticos foi feita com base na literatura científica e pelo estudo realizado da inter-relação direta e indireta existente entre os genes testados com a utilização do programa IPA (Ingenuity Pathways Analysis) v.11631407 (Ingenuity®Systems), que possui a função de estabelecer a relação funcional entre os genes, entre outras funções.

Assim, foram escolhidas três vias principais, conforme anteriormente citado e apresentado na Tabela 1, onde também constam os genes estudados por via: *UBE3A, DLGAP2, NRXN1, NEDD4, GRM5, CASP3, MAGI2, SHANK1, SHANK2* e *PTEN.*

O desenho de hondas *in house* para *screening* de CNVs em genes candidatos sem disponibilidade de kits comerciais foi realizado com a colaboração da Dra. Juliana Mazzeu, da Universidade de Brasília – UnB. Foram desenhadas sondas *in house* pelo programa MEL tingeny 1.0 para seis genes: *DLGAP2, NEDD4, GRM5, CASP3, MAGI2 e SHANK1*.

Os outros quatro genes, *UBE3A, NRXN1, SHANK2* e *PTEN*, foram estudados por kits comerciais de MLPA da MRC-Holland. O gene *UBE3A* foi avaliado pelo kit *SALSA MLPA ProbeMix P343*, que permite a investigação das regiões 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13,3. Para 15q11-q13, o kit contêm sondas para os éxons 6, 7, 9, 12 e 13 do *UBE3A*, além de sondas para os genes *SNRPN-HB2-85, ATP10A, GABRB3, OCA2, APBA2, NDNL2, TJP1, TRPM1, KLF13, CHRNA7, SCG5.* Para 16p11.2, tem sondas para os genes *LAT, SPN, MAZ, MVP, SEZ6L2, HIRIP3, DOC2A, MAPK3* e *CD2BP2,* e para 22q13.3, sondas para os éxons 3, 15 e 22 do gene *SHANK3*. Assim, por este kit os pacientes foram triados também para mais duas regiões.

A escolha dos éxons envolveu possibilidade de desenho de sonda adequada para MLPA *in house,* evitando-se regiões que continham CNVs descritas na população normal.

O gene da *NRXN1* foi avaliado pelo kit SALSA MLPA *Probemix* P379, que contêm sondas para os 25 éxons do gene. *SHANK2* foi avaliado pelo kit SALSA MLPA *Probemix* P396, que contêm sondas para os éxons 1 ao 25, com exceção dos éxons 8 e 9.

Para o gene *PTEN* foram utilizados os kits SALSA MLPA *Probemix* P225-B3 e P225-C1(nova versão do mesmo kit), que contêm sondas para os 25 éxons do gene.

3.4.2 Parâmetros do desenho de sondas *in house*

Para o desenho foram seguidos os seguintes passos:

1) Obtenção preferencial das sequências exônicas (região codante) de interesse, correspondente ao gene estudado;

2) Confirmação destas sequências pela ferramenta USCS BLAT da plataforma Santa Cruz (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat);

3) Sequências colocadas em formato FASTA, convertidas em arquivos 'txt'e, então, importadas para o programa Allele ID ou pelo NM_ número de acesso, obtidas no endereço eletrônico (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene).

Os parâmetros seguidos para obtenção de sondas de qualidade foram :

a) A diferença entre o comprimento mínimo necessário das sondas deve ser de quatro nucleotídeos (nt);

b) O comprimento da sonda deve estar entre 100 a 140nt ;

c) O comprimento máximo absoluto para sondas sintéticas é de 168nt – quando utilizadas sequências stuffer ;

d) Temperatura de melting (Tm) de cada sequência de hibridação (LHS, RHS separadamente) deve ser ≥ 71 ° C – o mínimo absoluto é 68 °C ;

e) ΔG (estrutura secundária) (LHS / RHS), de preferência ≥ 0;

f) % GC = ~ 50%, especificamente em torno do 5 'e 3' do LHS.

g) Ausência de SNPs no sítio de ligação entre LHS e RHS, pois alteram o sinal da sonda;

h) Ausência de sobreposição de sondas, uma vez que elas irão competir para a mesma sequência alvo.

i) A região 5 ' da sonda LHS não começa com uma adenina (se não houver uma sequência stuffer, deve ser usada)

j) Teste da especificidade da sonda unindo as sondas LHS e RHS e inserindo-as no website do Genoma Humano Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606) ou pelo USCS BLAT.

k) Todas as sondas RHS devem ser fosforiladas na região 5´.

Como o tamanho dos *amplícons* produzidos são muitos grandes, maiores que 100pb, a instabilidade do oligo é prevista, e a escala de síntese deve ser em 4nmol.

A representação esquemática de uma sonda de MLPA está na apresentada na Figura 9 (Adaptação- Designing synthetic MLPA probes-MRC Holland, 2011). As sondas compuseram três kits apresentados no Quadro 5.



Figura 9. Terminologia dos componentes da sonda. Uma sonda de MLPA consiste em dois oligonucleotídeos, no lado esquerdo está (LPO) *Left Probe Oligonucleotide* e no direito está (RPO) *Right Probe Oligonucleotide* (azul). LPO e RPO podem conter uma sequência opcional denominada *Stuffer* (verde listrado) e as sequências de reconhecimento dos primers Foward e Reverse (rosa e preto).

Kit 1	**Gene 1**	**Gene 2**	**Gene 1 controle**	**Gene 2 controle**	**Total de sondas**
	CASP3	*NEDD4*	*VIPR2*	*KIAA0056*	
	4	3	1	1	9
Kit 2	**Gene 1**	**Gene 2**	**Gene 1 controle**	**Gene 2 controle**	**Total de sondas**
	DLGAP2	*MAGI2*	*VIPR2*	*KIAA0056*	
	4	7	1	1	13
Kit 3	**Gene 1**	**Gene 2**	**Gene 1 controle**	**Gene 2 controle**	**Total de sondas**
	GRM5	*SHANK1*	*VIPR2*	*KIAA0056*	
	5	6	1	1	13

Quadro 5. Distribuição das sondas dos seis genes nos kits *in house.*

As sequências das 31 sondas *in house* desenvolvidas e utilizadas neste estudo, a localização exônica/intrônica nos respectivos genes e o tamanho do *amplicon* em pares de bases (pb), de acordo com GRCh (hg19/Human) do banco de dados do *UCSC Genome Browser*, estão descritas no Quadro 6, assim como as sondas controles fornecidas pela Profa Dra. Juliana Mazzeu – UnB/Brasília.

Gene/Éxon/Intron	Sequência LHS+RHS (5´>3´)	(pb)
NEDD4_Ex_2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAACCTTCTCCTCTACCTCCAGGGTG GGAAGAGAGGCAGGATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	84
NEDD4_In_8	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGGAGCCAATACAGCACAGAATGTA GGCTCCAGGTGGTGATGTTCAGGGAAGGGTCTAGATTGGATCTTG CTGGCAC	96
NEDD4_Ex_10	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTAGGCCACAGTGGAGACCAGTCAGC TGACCTCAAGCCAGAGTTCTGCAGGCCCTCAATCTAGATTGGATC TTGCTGGCAC	100
CASP3_Ex_1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAAGCAGTGCAGACGCGGCTCCTAGC GGATGGGTGCTATTGTGAGGCGGTTCTAGATTGGATCTTGCTGGC AC	92
CASP3_Ex_2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCGAGCCCTGCTCACACTCGGCGCTC TGGTTTTCGGTGGGTGTGCCCTGCACCTGCCTCTTCTCTAGATTGG ATCTTGCTGGCAC	104
CASP3_Ex_8a	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCATGAAGGCAGAGCCATGGACCAC GCAGGAAGGGCCTACAGCCCATTTCTCCATACGCACTGGTATCTA GATTGGATCTTGCTGGCAC	108
CASP3_Ex_8b	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTCAGCCCGGGAGGCAGGCTCCAGGC CTCAGCAGGTGCGGAGCCGTCACTGCACCAAGTCTCACTGGCTGT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	112
DLGAP2_Ex_6	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACAGCCGCGGCCTCTACAACTCCAC GGACAGCCTGGACAGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	84
DLGAP2_Ex_9	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGAGGACAAAGGCCTTCAGTTCGGCT CATCCTTCCAGCGGCACTCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	88
DLGAP2_Ex_12	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCGAGCGGCGTCCTTCCGGCAGAATT CCGCCTCCGAGCGCGCGGACAGCATCTAGATTGGATCTTGCTGGC AC	92
DLGAP2_Ex_11	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGACGTCAGCATGAAGTTCGACGAGC TGCAGCGGCTGCGGCTCAACGACTGGAAGATGATGGTCTAGATTG GATCTTGCTGGCAC	104
MAGI2_Ex_1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTCTGCCCAGCCGTCCCTCTCATCCTC TCCACGGACAGCCTGGACAGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCA	96
MAGI2_Ex_10	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGATCGGCCGCCTCATTCTCTGCAC TCCATGC CAACTGATGGTCAGCTAGACGGCACGTATCCACTCTAGATTGGAT CTTGCTGGCAC	108
MAGI2_Ex_12	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGAGTTTATCTGCTCCGGCCATACCG CAGAACCTGCCCTTCCCACCTGCCCTTCACAGGAGCTCCTTTCCTC TAGATTGGATCTTGCTGGCAC	112

Quadro 6. Sondas *in house* de MLPA. As sequências em vermelho correspondem às sequências dos *primers* universais *foward* e *reverse*, respectivamente.

Gene/Éxon/Intron	Sequência LHS+RHS (5´>3´)	(pb)
MAGI2_Exon_15	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGGCAAAACCCACCGCTATGTCATCGACCTCATGCACCACGCAGCCCGCAATGGGCAGGTCAACCTCACTGTGATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	116
MAGI2_Ex_16	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCTGCCCAGAGAACGGGAGAAGTCCAGGCTCTGTATCCACCCACCACAGCTCTCCACGCAGTGACTACGCAACCTACATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	120
MAGI2_Ex_19	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCGACACCAGGCAGTACCCTCTGTCGGACTACAGACAACCCCAGGTACCTCCTCCCGGAGAGCAGGGTGGGTCCTGACCAAGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	124
MAGI2_Ex_22	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCAAGGCCTGGGAGCATCGACGTGAAGTCCCACGTGTCCGGTGTGCTTGGGCGGCATCGCATCAACGCGCAGACCTAAACTGATCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	128
GRM5_Ex_2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGGGTTGTGCCTTCAGATGCTCAGCAGGCAAGGGCCATGGTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	84
GRM5_Ex_3	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGGTGGTGGCCTGCTTCTGTGAGGGCATGACGGTGAGAGGTCTGCTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	88
GRM5_Ex_5	GGGTTCCCTAAGGGTTGGATGGGCTCCACAACATGCAGATGTCCCTCTGCCCAGGCTATGCAGGACTCTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	92
GRM5_Ex_8	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACATCCTCCGCAGCCAGCAGATCCAGCAGCCTAGTCAACCTGTGGAAGAGAAGGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	96
GRM5_Ex_10	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCTCGCAGGGCTCCCTCATGGAGCAGATCAGCAGTGTGGTCACCCGCTTCACGGCCAATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	100
SHANK1_Ex_1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGACGACGCCCACTTCAGCATGATGGTCTTCAGGATTGGCATCCCGGACCTGCACCAGACATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	104
SHANK1_Ex_5	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCACATTGACTTCCGGGCCCGGGATGGCATGACCGCACTGCATAAGGCCGCATGCGCCCGACACTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	108
SHANK1_Ex_2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGATGCCACCATCTGGACGGCCAAGCAGCAGGTGCTCTGTGCCCTGAGCGAGAGCCTGCAGGATGTGCTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	112
SHANK1_Ex_16	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGGTGGACGAGGGTGGCGTGGCATGGCGAGCTGGACTGCGAATGGGAGACTTCCTCATCGAGGTCAGTCCAGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	116

Quadro 6 - Continuação. Sondas *in house* de MLPA. As sequências em vermelho correspondem às sequências dos *primers* universais *foward* e *reverse*, respectivamente

Gene/Éxon	Sequência LHS+RHS (5´>3´)	(pb)
SHANK1_Ex_21	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCACCACCGTGCCCAGCCAAGTTACG AGCGTCCTTCTTCCTGCCTCCAGGACCTGGGTTGATGCTCCGGCAA AAATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	120
SHANK1_Ex_20	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCTGGCCGCAGCTCAACAGACCATCA GTGCAAGCGAAAGCCCTGGTCCCGGTGGCCTCGCGTCCCTGGGCA AACACCGACCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	124
VIPR2_Ex_19	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAAACAGGAAAATGGGACTTTGGTTG TGCTGAAGACGGGCCTGCGGTGAACACTGTGAACGTGCAGATCGC CTTCTCCGGTTTGACAGAGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	132
KIAA0056_Ex_22	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAACTCAGGCCCTGGCTCCTTCTCGAAC GAATTAGCGGAACACCCGCAGGAGCCTTGTTTGGCTTCCACTTTTC GGCCCGCCCAGTTCTCTGAGCGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	136

Quadro 6 - Continuação. Sondas *in house* de MLPA. As sequências em vermelho correspondem às sequências dos *primers* universais *foward* e *reverse*, respectivamente.

3.4.3 Preparação do probemix e montagem dos kits caseiros

Por recomendação da MRC Holland, todos os oligos devem ser diluídos em TE pH=7,5 (Tampão de Eluição). Assim, as soluções estoque dos oligos que estavam em concentração maior que 15nmol foram diluídas para obtenção de uma concentração final de 100mM e aquelas que estavam a uma quantidade menor do que 15nmol foram diluídas para 10mM. As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque, onde todos os oligos *(foward* e *reverse*) devem estar na concentração final de 1mM. Desta solução de trabalho foram pipetados 0,8ul de cada oligo (*foward* e *reverse*) de cada sonda selecionada, para compor um kit e completados com TE para um volume final de 200ul.

3.4.5 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

A técnica de MLPA foi realizada segundo Schouten et al. (2002), com um protocolo adaptado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (USP-SP). Para realização da mesma foram sintetizadas sondas *in house* (IDT Technologies), obtidos os reagentes separadamente, pelo kit comercial EK1 (MRC Holland).

A primeira etapa dos experimentos para as sondas *in house* dos seis genes consistiu na padronização, na qual amostras de cinco indivíduos fenotipicamente normais foram utilizadas para observar a qualidade do resultado obtido com as sondas desenhadas, antes de aplicá-las na casuística. Assim, foram estudados os genes com mais detalhes, contendo mais do que duas sondas por gene e sondas de controle interno da reação.

a) Desnaturação do DNA e hibridação das sondas

As amostras de DNA foram diluídas em TE para obter-se uma concentração de 50ng/ul de DNA. Os DNAs diluídos foram submetidos a uma temperatura de 98°C por cinco minutos e, em seguida, a 25°C, antes de serem retirados do termociclador. Após a desnaturação, foram acrescentados 0,375ul da *Probemix in-house* e 0,375ul do MLPA *buffer e* 0,25ul de H_2O ultra-pura a cada tubo. O *mix* foi incubado a 95°C por um minuto e em seguida permaneceu a 60°C por quatro horas.

b) Reação de ligação

No termociclador, em uma temperatura de 54°C, foram adicionados 8ul de *mix* ligase-65 às amostras. As amostras foram incubadas a 54°C por 15 minutos e, em seguida, a 98°C por cinco minutos.

c) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Com os tubos ainda na máquina, a uma temperatura de 60°C, foram adicionados 20ul do (*mix* Polymerase) e imediatamente se iniciou a reação de PCR nas seguintes condições: 32 ciclos por 20 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C e, no final dos ciclos, 20 minutos a 72°C.

c) Separação dos produtos amplificados

Em uma placa de sequenciamento foram adicionados 2ul do produto da PCR, 0,3ul de ROX (*sizer*) e 9ul de *HiDi* formamida. A leitura dos produtos amplificados foi feita no sequenciador automático *ABI-3730 DNA Analyzer* (48 capilares).

d) Visualização e análise dos resultados

A análise dos picos foi feita pelo programa Genemapper (versão 4.0) e a interpretação e normalização dos resultados no programa Genemarker (versão 1.97), considerando-se razões de referência abaixo de 0.75 e acima 1.30 como deleção e duplicação, respectivamente.

Após *screening* pela técnica de MLPA dos genes selecionados, os resultados indicativos de alterações foram validados por sequenciamento Sanger ou array-CGH180K(Agilent Technologies).

3.5. Técnicas de Validação

3.5.1 Sequenciamento Sanger

Os produtos das PCRs foram purificados com a utilização dos reagentes Exonuclease I (Exo I) para digerir o excesso de *primers* e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar o excesso de nucleotídeos provenientes da PCR.

A programação para o termociclador padronizada para a reação de sequenciamento foi: denaturação inicial: 96ºC por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de denaturação a 96ºC por 10 segundos, anelamento a 50ºC por 5 segundos, alongamento a 60ºC por 4 minutos e espera a 6ºC.

O produto final foi submetido à filtragem e purificação em placa de Sephadex® (GE), segundo protocolo próprio. Então, as amostras foram submetidas a eletroforese em capilares no sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) e o resultado analisado no programa Sequencher®.

3.5.2 Hibridização Genômica Comparativa (array-CGH)

Foram utilizados 500ng de DNA de cada amostra que no *NanoDrop* (PeqlabBiotechnologie™) exibiam razão A260/280 entre 1,8 e 2,0 (indicando baixa contaminação por proteínas) e razão A260/280 ≥ a 2 (indicando baixa contaminação por compostos orgânicos) e após corrida em gel de agarose a 1,2%.

Inicialmente, as moléculas de DNA foram fragmentadas pelas enzimas de restrição AluI e RsaI. Subsequentemente, os fragmentos foram amplificados e marcados com fluorófos de cores diferentes (cyanine3 e cyanine5) para serem detectados pelo laser do scanner (Agilent's High-Resolution C Scanner). Para tanto se utilizou o Genomic DNA EnzymaticLabeling Kit,Agilent Technologies®. Após a marcação dos foi realizada a purificcação utilizando-se colunas Microcon YM30 (Millipore®) para a retirada dos nucleotídeos não incorporados. A quantificação do DNA marcado foi realizado no *NanoDrop ND1000* (espectofotômetro da PeqlabBiotechnologie™). Aa absorbância foi medida em A260nm (DNA), A550nm (cyanine3) e A650nm (cyanine5). Para medir a atividade específica (AE) do DNA genômico marcado, o seguinte cálculo foi efetuado:

$$AE = \frac{(^{pmol}/_{\mu l} \text{ de cyanine3 + cyanine5})}{(^{\mu g}/_{\mu L} \text{ gDNA})}$$

Em seguida as amostras foram tratadas com Cot-1 DNA humano, com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas, precipitadas com acetato de sódio e etanol e, por fim, ressuspensas em um tampão TE (pH 8,0; Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA; United States). Para hibridação foi usado o *Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit*, de acordo com especificações do fabricante.

Os DNAs marcados foram hibridados às lâminas em um forno de hibridação a 65°C. Cada lâmina possuia quatro áreas com aproximadamente 180.000 sondas. Em uma área da lâmina o DNA de um paciente é marcado com cy3 e comparado com o DNA de outro paciente, marcado com cy5. Em outra área, o DNA do primeiro paciente está marcado com cy5 e é comparado com o DNA de um terceiro paciente, marcado com cy3. Ou seja, cada amostra estava em duplicata e foi comparada a duas outras amostras diferentes.

Após o período de 24 horas de hibridação, as lâminas foram submetidas a várias lavagens subseqüentes (com Agilent Oligo aCGH Wash Buffer 1 e Agilent Oligo aCGH Wash Buffer 2) e a uma secagem final (com Stabilization and Drying Solution, 500 ML, Agilent Technologies®).

As imagens foram obtidas com o uso do scanner Agilent e do programa *Feature Extraction* v10.5. As análises foram feitas com o programa *Agilent Genomic Workbench*

Lite Edition v6.5, usando o algoritmo estatístico ADM-2 e limiar 7.0. Apenas as alterações que continham no mínino três oligonucleotídeos consecutivos com razão log2 cy3/cy5 alterada foram consideradas pelo programa como uma possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico.

Resultados

4. RESULTADOS

Foram estudados 300 indivíduos com cariótipo e avaliação molecular do gene *FMR1* normais, e não dismórficos, com TEA idiopático. A investigação de CNVs nos 10 genes sinápticos foi realizada nos 300 casos.

No período do estudo foram realizadas 108 culturas de linfócitos com análise dos cariótipos e 134 análises moleculares do gene *FMR1*. Alguns indivíduos já haviam realizado estas análises vinculadas a exames particulares ou a projetos de pesquisas anteriores desenvolvidos na FAMERP e na USP/SP.

Nos 10 genes sinápticos e outras regiões/genes possíveis de serem avaliados pelos kits comerciais e *in house*, mas não incluídos nos objetivos do estudo, foram encontrados 23(8%) indivíduos com alterações, 15 (5,21%) com CNVs, cinco (1,74%) com indel, dois (0,7%) com mutações não descritas, e um (0,35%) SNP (polimorfismo de nucleotídeo único). Nenhum caso apresentou mais do que uma alteração nos genes avaliados.

4.1 *UBE3A, NEDD4*, *CASP3 (Protein Ubiquitination Pathway*), 16p11.2 e 15q11-13

Para o gene *UBE3A* não foram encontradas alterações a partir do kit comercial P343, entretanto dois achados em outras duas regiões avaliadas pelo mesmo kit foram visualizados. O primeiro deles foi detectado em um paciente (caso F-7150-1/4906) com diagnóstico de Síndrome de Asperger, que apresentou uma microduplicação da região 16p11.2. Esta mesma alteração foi verificada nos progenitores e nas duas irmãs, sendo uma delas gêmea dizigótica do afetado. Após análise da família foi observado que a mãe e as duas irmãs apresentam a mesma duplicação, mas sem fenótipo autístico. As análises dos afetados da família estão apresentadas na Figura 10.

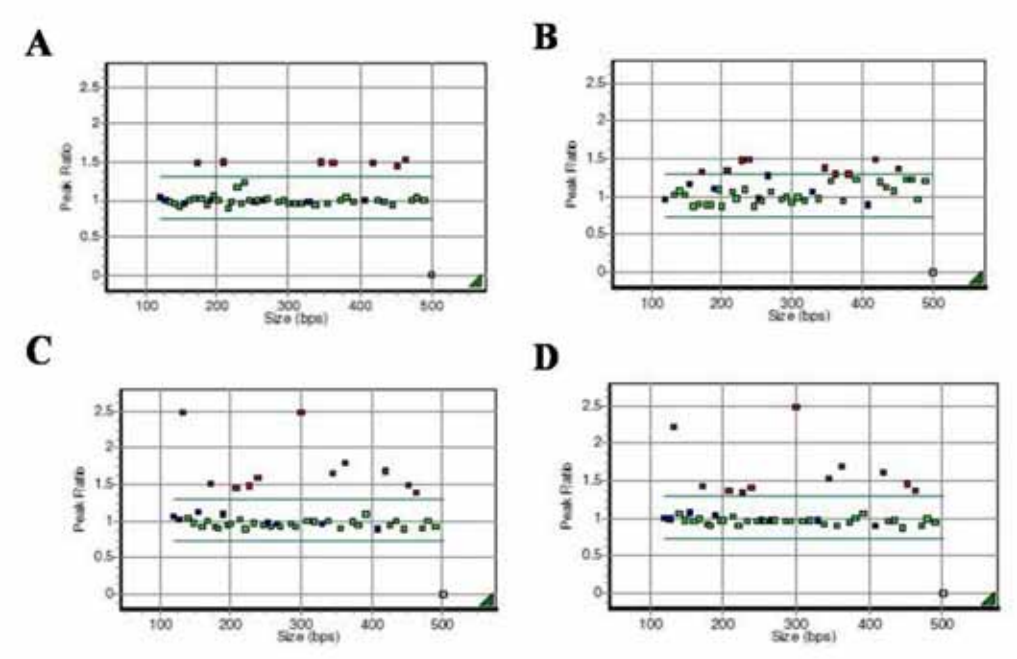


Figura 10. Razão dos picos do MLPA mostrando a microduplicação na região 16p11.2, observada no caso F-7150-1/4906, que abrange os genes *HIRIP3, MAPK3, MAZ, MVP* e *SEZ6L2* (vermelho) do paciente (A), da mãe (B), da irmã gêmea dizigótica (C) e (D) da outra irmã, portadoras da mesma alteração, analisados pelo programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão indicadas as sondas localizadas nos outros genes da região 16p11.2 e em azul, as sondas controle.

O segundo achado com o mesmo kit foi no paciente F-7285-1/08 e diagnóstico de Autismo, uma deleção no exon 7 do gene *GABRB3*, localizado na região 15q11-q13 (Figura 11A), herdada da mãe e também presente na irmã mais velha. O pai e a segunda irmã apresentaram resultados normais. Para esclarecimento do caso, pois somente uma sonda mostrava a deleção, foi realizado o sequenciamento direto do exon 7 e foi verificado que o paciente (Figura 11B), a mãe e a irmã mais velha apresentavam um polimorfismo na região de ligação da sonda, que impede sua hibridação de forma correta e, consequentemente, acusa a deleção. O SNP foi identificados como *rs75015217* (A>G), descrito na população, com frequência alélica de f(A)= 0,998 e f(G)=0,002 no dbSNP do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para a região 22q11 não foram encontradas alterações.

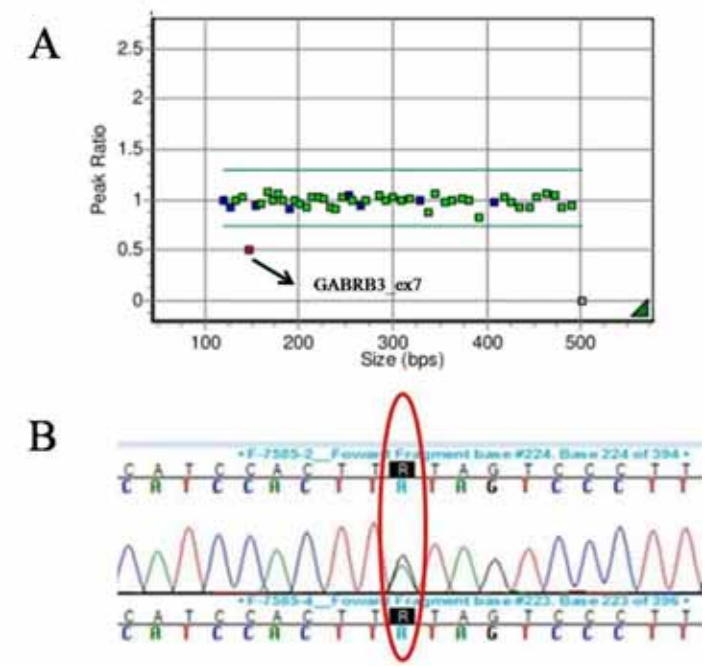


Figura 11. **(A)** Razão dos picos do MLPA no caso F7285-1/08, que acusa a deleção da sonda localizada no éxon 7 do gene *GABRB3* (vermelho) analisado no programa GeneMarker v.1.97. Esta sonda está localizada na região 15q11-q13. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle. **(B)** Análise do cromatograma do exon 7 do gene *GABRB3* mostrando a região do SNP (*rs75015217)* circulado em vermelho, analisado pelo programa *Sequencher 5.0*.

Cinco casos, F6249-1, 1318-B, F1611-1, F6251-1 e 5509, os três primeiros meninos e os dois últimos meninas, todos com diagnóstico de Autismo, apresentaram deleção de uma sonda no exon 2 do gene *NEDD4* (Figuras 12A e B), identificada como falta de uma trinca (GAG) na posição genômica (56155207 – 56155210), com base na sequência referência *NM_001284338.1* (UCSC Genome Browser). Sua frequência na casuística foi, portanto, de 0,017(1,7%). A deleção foi verificada nos bancos de dados *1000 Genomes- Deep Catalog of Human Genetic Variation* (http://browser.1000genomes.org/index.html), e não foi encontrada qualquer descrição desta alteração. No NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) *Exome Variant Server* (http://evs.gs.washington.edu/EVS/), foi encontrada esta deleção descrita como c.1616 – 1618del p.(Pro539del) (Figura 12C), com frequência de 50/12.468(0,4%). As famílias não foram estudadas.

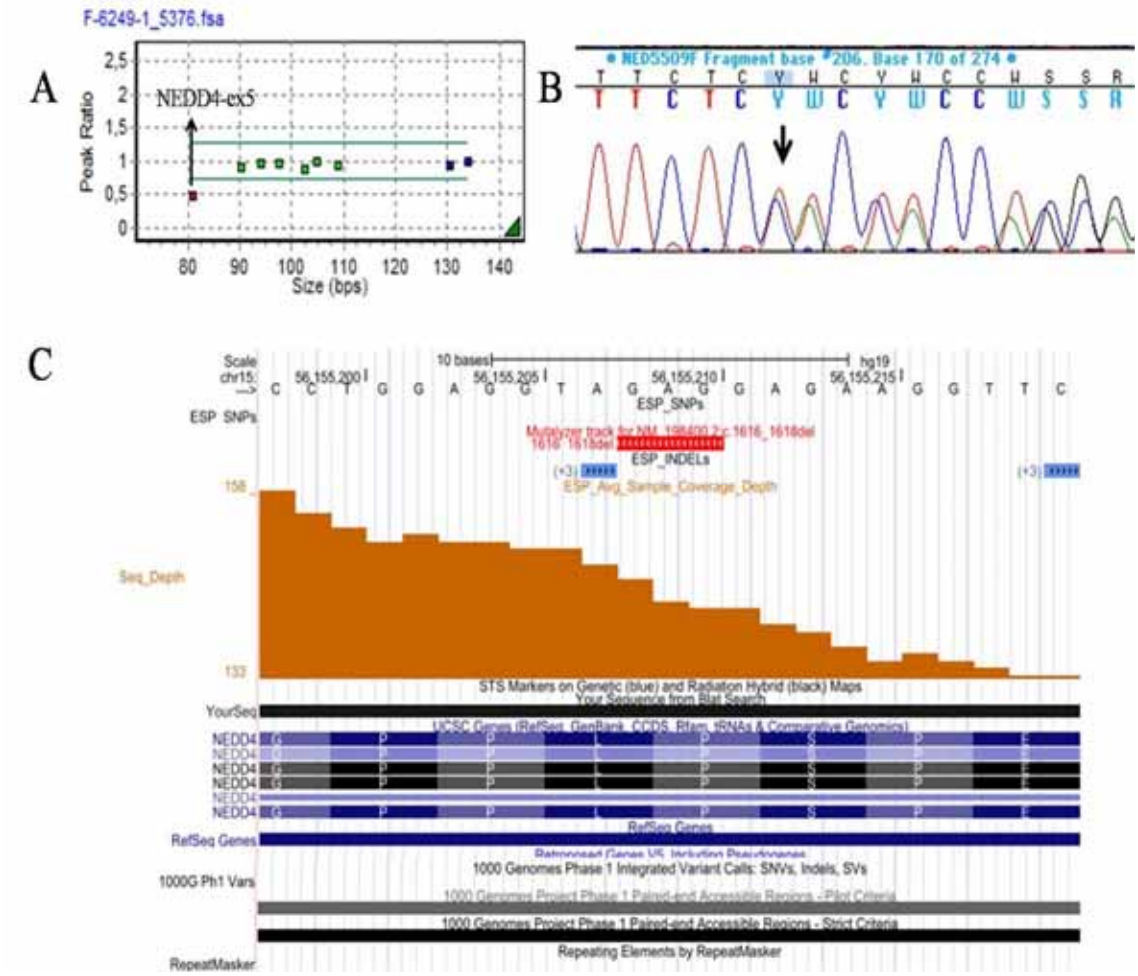


Figura 12. **(A)** Razão dos picos do MLPA do caso F6249-1 que acusa a deleção no éxon 2 do gene *NEDD4* (vermelho), analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *CASP3* e *NEDD4* e em azul estão representadas as sondas controle. **(B)** Análise do Cromatograma do éxon 2 do *NEDD4* da paciente 5509 mostrando a deleção da trinca CTC. **(C)** Posição da mutação c.1616–1618delp.(Pro539del) com base no *NM_001284338.1* que resulta na perda de uma prolina na sequência da proteína Nedd4 pelo UCSC Genome Browser.

O paciente F-6232-1 apresentou deleção de uma sonda no éxon 1, que se trata da região 5´UTR do gene *CASP3* (Figura 13), visualizadas pelo kit 1 *in house*. A validação por seqüenciamento identificou um SNP no sítio de ligação da parte F e R, o *rs374692744* (C>G), descrito na população. Consequências clínicas não foram avaliadas segundo dbSNP do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

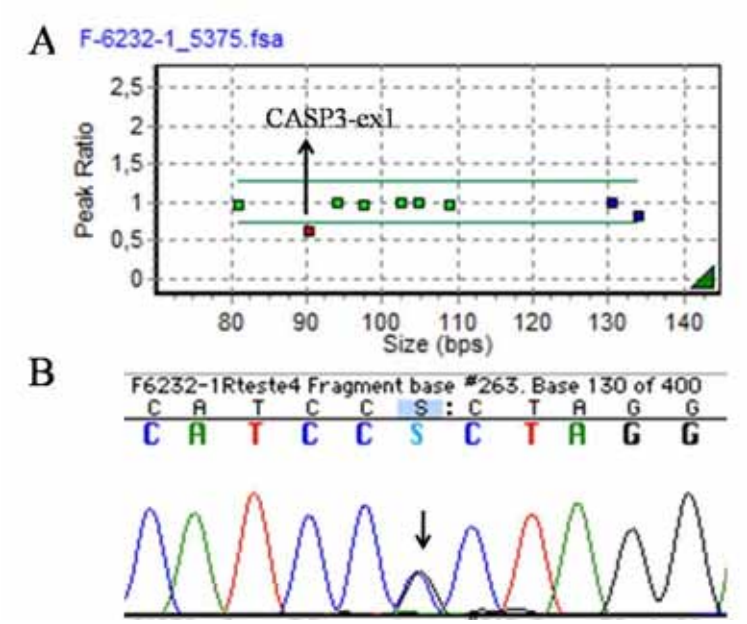


Figura 13. **(A)** Razão dos picos do MLPA do caso F6232-1 que acusa a deleção do éxon 1 do gene *CASP3* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão às sondas localizadas nos outros éxons do gene *CASP3* e *NEDD4* e em azul estão representadas as sondas controle. **(B)** Análise do cromatograma do éxon 1 do gene *CASP3* mostrando a região do SNP (*rs374692744)* com a troca de C>G.

4.2. *PTEN, DLGAP2*, *MAGI2 (PTEN signaling pathway*), *PTENP1* e *KLLN*

O kit comercial para o gene *PTEN*, que também avalia os genes *PTENP1* e *KLLN* e o kit *in house para DLGAP2* e *MAGI2,* revelaram alterações em seis casos.

Para o gene *PTEN* não foram encontradas alterações, entretanto, no paciente F-7133-1/4333, diagnosticado com TID-SOE, foi observada uma duplicação de duas sondas na região *upstream* ao gene, denominadas sondas *Upstream* D e E (Figura 14). Estas sondas correspondem na nova versão do kit P225-C1, à região do éxon 1 do gene *KLLN* com tamanho de 1,6Kb, segundo a sequência referência NM_001126049.1 (UCSC Genome Browser) e ela não está descrita no DGV- Database of Genomic Variants (DATABASE OF GENOMIC VARIANTS, 2012). A família não pode ser contatada, para esclarecimento da herança ou não da alteração.

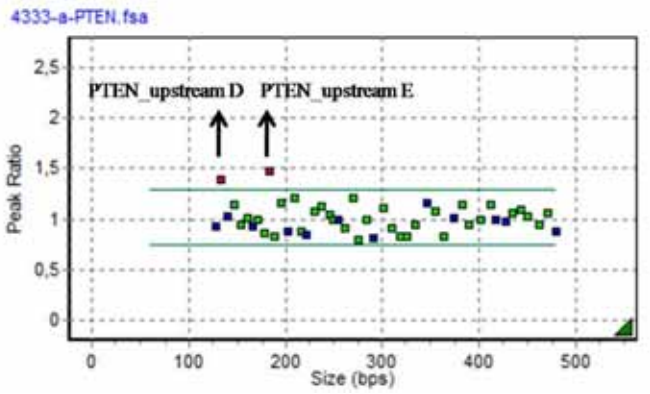


Figura 14. Razão dos picos do MLPA do caso 4333 que mostra a duplicação das sondas *upstream* D e E do gene *PTEN* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle.

Três pacientes do sexo masculino, F6180-1 com TID-SOE, F1356-4 com Síndrome de Asperger e F6607-1 com Autismo, apresentaram uma mesma deleção de uma única sonda, no exon 1 do gene *PTENP1* (Figura 15), localizado na região cromossômica 9q13.3. O fato de envolver apenas uma sonda necessita de confirmação por técnica complementar, o que não foi realizado.

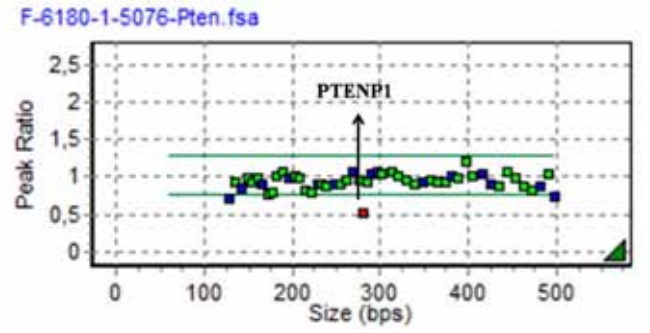


Figura 15. Razão dos picos de MLPA do caso F6180-1 eu mostra a deleção de uma sonda do exon 1 do gene *PTENP1* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle.

O paciente 4423, um menino com Autismo, apresentou deleção de uma sonda do éxon 11 do *DLGAP2* (Figura 16A). O éxon 11 foi sequenciado (Figura 16B) e foi

detectada uma mutação resultante da troca de G>A na posição 887 da trinca CAG→CAA, que codificam glutamina. Trata-se de uma troca sinônima NM_004745.4:c.2661G>A na posição genômica 16.454.17 do gene, ainda não descrita (UCSC Genome Browser), verificada nos bancos de dados de controles *1000 Genomes-A Deep Catalog of Human Genetic Variation* (http://browser.1000genomes.org/index.html) e NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) *Exome Variant Server* (http://evs.gs.washington.edu/EVS/). A família não foi avaliada.

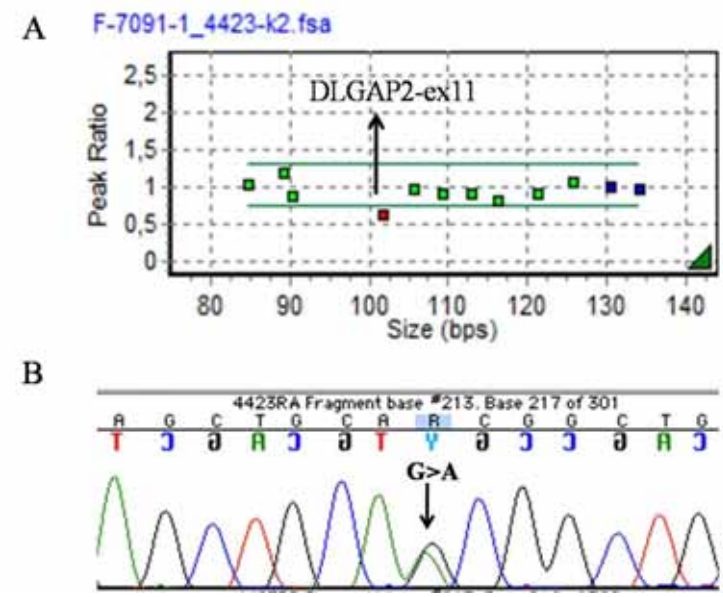


Figura 16. (A) Razão dos picos do MLPA do caso 4423 que acusa a deleção do éxon 11 do gene *DLGAP2* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *DLGAP2* e *MAGI2* e em azul estão representadas as sondas controle. **(B)** Análise do Cromatograma do exon 11 do gene *DLGAP2* do paciente 4423. A seta indica a mutação sinônima em que ocorre a troca de G>A no gene.

O caso F1621-1, um menino com Autismo, mostrou deleção também de apenas uma sonda no éxon 22 do *MAGI2* (Figura 17), não validada e não avaliada nos genitores.

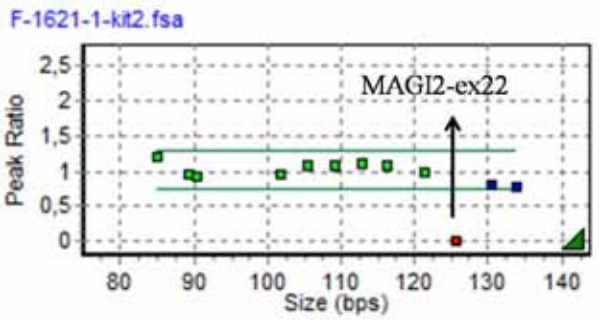


Figura 17. Razão dos picos do MLPA do caso F1621-1 que acusa a deleção do éxon 22 do gene *MAGI2* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão marcadas as sondas localizadas nos outros éxons do gene *DLGAP2* e *MAGI2* e em azul estão representadas as sondas controle.

4.3. *NRXN1, SHANK2, SHANK1* e *GRM5 (Axonal Guidance pathway*)

A investigação do gene *NRXN1* mostrou alterações em três casos.

O paciente F-6236-1/5364, diagnosticado com autismo, apresentou microdeleção em heterozigose dos exons 4 e 5 do gene *NRXN1*, com tamanho de 103,8Kb, não descrita no DGV- *Database of Genomic Variants* (DATABASE OF GENOMIC VARIANTS, 2012) (Figuras 18A). A mãe apresentou resultado normal, mas o estudo do pai não possível devido à impossibilidade de contato com o mesmo, que não se comunica com a família há anos (segundo informações coletadas). Portanto, não foi possível saber se esta CNV foi herdada ou não.

Outro caso, F7286-1, um indivíduo do sexo masculino diagnosticado com Autismo, apresentou microdeleção do exon 19 do gene *NRXN1*. A CNV do exon 19 foi observada em heterozigose, com tamanho de 110,8Kb. Os pais deste paciente foram testados e apresentaram resultados normais, caracterizando o achado como uma CNV *de novo* (Figura 18B).

Os resultados meleculares destes dois últimos pacientes, inclusive com detalhes fenotípicos, resultaram na elaboração do artigo científico intitulado "*NRXN1 exonic deletions in Brazilian patients with idiopathic autistic spectrum disorders*" apresentado no Apêndice B.

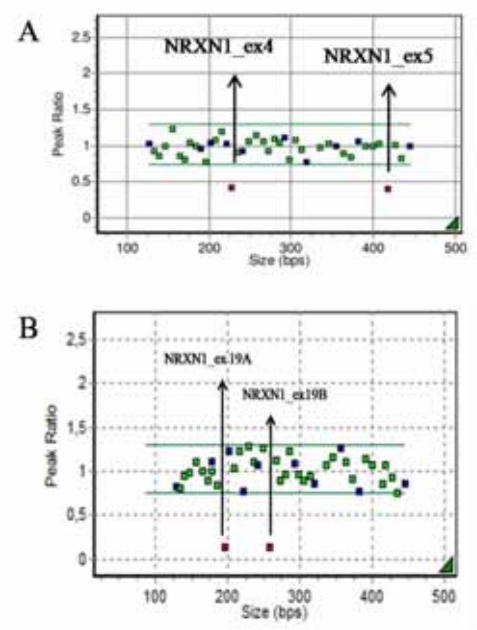


Figura 18. Razão dos picos do MLPA. **(A)** Deleção das sondas localizadas nos éxons 4 e 5 do gene *NRXN1* (vermelho) do caso F6236-1 e **(B)** Deleção das sondas localizadas no éxon 19 do gene *NRXN1* (vermelho) do caso F7286-1/4452-B, analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle.

Uma menina com Autismo, caso F3282-1, apresentou uma deleção no exon 20 do gene *NRXN1*. O sequenciamento esclareceu tratar-se de uma mutação sinônima caracterizada como NM_001135659(NRXN1):c.3702G>C no códon 1234, que codifica uma prolina, não descrita na posição genômica 50.318.597(UCSC Genome Browser) (Figura 19A e B). Esta variante foi investigada no 1000 *Genomes-A Deep Catalog of Human Genetic Variation* (http://browser.1000genomes.org/index.html) e NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) *Exome Variant Server* (http://evs.gs.washington.edu/EVS/), e não foi encontrada.

Os pais foram testados e a alteração foi herdada da mãe, que não apresenta alterações de comportamento.

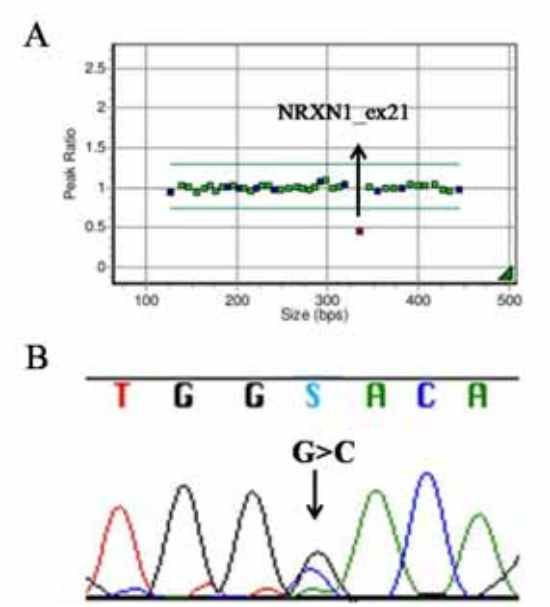


Figura 19. (A) Razão dos picos do MLPA do caso F3282-1, que acusa a deleção da sonda localizadas no éxon 21 do gene *NRXN1* (vermelho), analisado no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle. **(B)** Análise do Cromatograma da paciente F3282-1. A seta indica a mutação sinônima em que ocorre a troca de G>C no gene *NRXN1*.

Para o gene *SHANK2*, um menino com diagnóstico de Autismo (caso 4398) apresentou CNV caracterizada como deleção no éxon 11, com tamanho de 13,4kb (Figura 20).

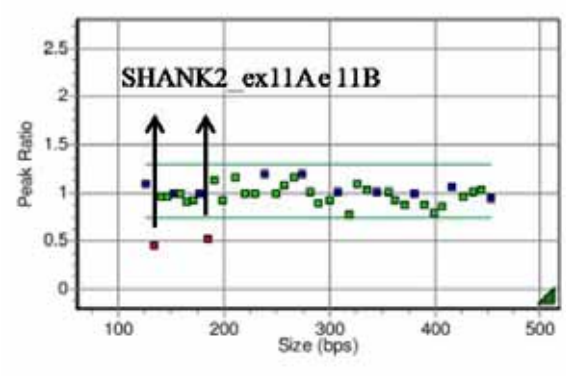


Figura 20. Razão dos picos do MLPA do caso 4398, que mostra a deleção das sondas localizadas no éxon 11 do gene *SHANK2* (vermelho), analisado no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle.

Cinco outros casos, F6265-1, F6270-1, F6280-1, F6012-1 e F3151-1, apenas o último do sexo feminino, todos com diagnóstico de Autismo, apresentaram deleção em todos os éxons estudados (04 sondas) do gene *GRM5* (Figura 21), cuja validação por array-CGH 180K (Agilent Technologies®) estava em andamento na entrega deste trabalho.

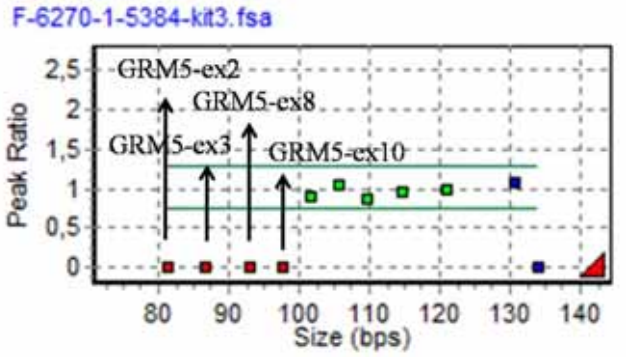


Figura 21. Razão dos picos do MLPA do caso F6270-1, que mostra a deleção dos éxons 2, 3, 8 e 10 do gene *GRM5* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *GRM5* e *SHANK1* e em azul estão representadas as sondas controle.

Para o gene *SHANK1* nenhuma alteração foi encontrada nos 300 indivíduos avaliados.

Parte dos resultados dos genes sinápticos, resultaram no artigo científico "*Screening* de genes sinápticos em autistas brasileiros" apresentado em Apêndice C.

Em Apêndice D consta o artigo intitulado "Is the autism phenotype in Rett Syndrome only due to mutations in *MECP2*?". Trata-se da descrição de uma CNV em 16p11.2, observada em uma paciente diagnosticada inicialmente como autista e incluída na casuística, mas depois excluída por ter sido concluído seu diagnóstico como Síndrome de Rett. Entretanto, a mesma paciente compôs a casuística de um estudo em colaboração, que confirmou que a mesma também apresenta mutação em *MECP2*. A opção por incluir este artigo nesta tese se deveu a importância científica do achado e a proposta científica que ele sugere.

As alterações encontradas em todos os genes investigados, sua localização exônica, herança e frequência na casuística estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Alterações observadas nos 23 indivíduos com TEA.

Gene/região	Alteração	Posição	Herança	N° de afetados	Frequência
***NEDD4*(S)**	del	Exon 2	NE	5	1,7%
***CASP3*(S)**	del	Exon 1	NE	1	0,3%
***DLGAP2*(S)**	c.2661G>A	Exon 11	NE	1	0,3%
***MAGI2*(S)**	del	Exon 22	NE	1	0,3%
***NRXN1*(S)**	del del c.3702G>C	Exons 4-5 Exon 19 Exon 21	NE *de novo* materna	3	1%
***SHANK2*(S)**	del	Exon 11	NE	1	0,3%
***GRM5*(S)**	del	Exon 2-10	NE	5	1,7%
***GABRB3*(S)**	*SNP*	Exon 7	materna	1	0,3%
***PTENP1*(NS)**	del	9p21	NE	3	1%
***KLLN*(NS)**	dup	Exon 1	NE	1	0,3%
16p11.2	dup	16p11.2	materna	1	0,3%
Total					**23**

del=deleção; dup=duplicação; S=gene sináptico; NS=gene não sináptico; NE=não esclarecido;

Discussão

5. DISCUSSÃO

As análises do cariótipo e da Síndrome do Cromossomo X Frágil (FRAXA) são recomendadas como parte do protocolo de investigação de TEA, pois estão entre as causas genéticas de TEA (MOESSNER et al., 2007; NEWBURY et al., 2009; SHEN et al., 2010). As alterações cromossômicas estão entre as mais frequentes, encontradas em 2-6% dos afetados (KUMAR; CHRISTIAN, 2009; BREMER et al, 2011). Estas podem causar alterações na migração neuronal e no crescimento do cérebro, com subsequente alteração na organização cortical, mudanças sinápticas e dendríticas, e resulatar no fenótipo autístico (BENVENUTO et al., 2009). Frequências entre 2% e 3% de FRAXA têm sido observadas em estudos de meninos com TEA, enquanto que em meninos com FRAXA, as frequências de TEA variam de 20% a 40% (KAUFMANN et al., 2004; SHIBAYAMA et al., 2004). Assim, por serem causas já vinculadas ao fenótipo autístico, os pacientes que as apresentaram não foram incluídos no estudo. Indivíduos dismórficos também não foram incluídos pelo fato de ter sido proposto investigar alterações que poderiam resultar no fenótipo comportamental (genes candidatos ao autismo) e não com efeitos pleiotrópicos.

Aqui foram estudados 300 indivíduos, um número adequado considerando-se que casuísticas compostas de indivíduos com TEA para estudo molecular variam de 145 (WIŚNIOWIECKA-KOWALNIK et al., 2013) a 3000 indivíduos (MATSUNAMI et al., 2013) e as maiores estão vinculadas a estudos de consórcios (ANNEY et al., 2010; HOLT et al., 2010).

CNVs são comumente descritas em TEA e muitas, herdadas e *de novo* já foram associadas ao fenótipo autístico (LEVY et al., 2011; RONEMUS et al., 2014). Além destas alterações, SNPs e mutações raras também são frequentemente relatadas na literatura (YANG; PAN, 2013; BEN-DAVID; SHIFMAN, 2013).

Muitas técnicas são utilizadas para detectar CNVs (GOUAS et al., 2008). Entretanto, é importante notar que cada método possui vantagens e limitações em diferentes circunstâncias. As tecnologias baseadas em microarray e MLPA estão entre os métodos mais confiáveis e efetivos para investigação destas alterações. Devido ao seu baixo custo, sensibilidade e facilidade de desenvolvimento e implementação, a técnica de MLPA se tornou muito popular como ferramenta diagnóstica e na pesquisa de CNVs (SHEN, WU, 2009), motivo pelo qual foi a opção deste estudo.

Também, a opção por genes sinápticos foi feita por seu envolvimento nas funções biológicas cerebrais comumente descritas como alteradas em TEA (BETANCUR et al., 2009; HUGUET; EY; BOURGERON, 2013).

Não foram encontrados estudos que estimaram frequências de alterações nos mesmos genes que os aqui estudados conjuntamente e com os mesmos critérios de inclusão/exclusão, o que dificulta a comparação da frequência total de alterações encontradas.

Entre os 10 genes sinápticos selecionados para este estudo, não foram encontradas alterações em *UBE3A*, *PTEN* e *SHANK1*.

UBE3A é um candidato à predisposição aos TEA e já foi observado em cerca de 1% dos casos (GLESNER et al, 2009). A ausência de alterações neste estudo pode ter ocorrido pelo fato de terem sido avaliados alguns, e não todos os éxons do gene. Assim, alterações nos éxons 6, 7, 9, 12 e 13 não puderam ser relacionadas ao fenótipo autístico na casuística avaliada.

O gene *PTEN* tem sido considerado um candidato em potencial na predisposição ao autismo, em função do seu papel no desenvolvimento cerebral. Está localizado em 10q23-31. É um supressor de tumor com papel na etiologia de alguns tipos de câncer. Mutações germinativas resultam em um fenótipo caracterizado por macrocefalia, convulsões e deficiência intelectual. Sua função fosfatase lipídica neutraliza diretamente a atividade PI3K, inibindo a ativação de AKT, uma quinase. A via PI3K/AKT é indispensável para a regulação do crescimento celular, sobrevivência e proliferação, de maneira que se for alterada, pode causar doença psiquiátrica ou tumor (JING-WEN et al., 2013). Mas não se sabe realmente como a perda de uma única cópia de *PTEN* altera a função neural. A haploinsuficiência parece aumentar a expressão de pequenos canais condutores de potássio cálcio-ativados, que resultaria em uma excitabilidade intrínseca (GARCIA-JUNCO-CLEMENTE et al., 2013). Deleções parecem desregular a plasticidade sináptica (TAKEUCHI et al., 2013). Mutações *de novo* no gene *PTEN* são a causa de muitos casos de autismo esporádico, sendo observadas entre 1 e 17% das casuísticas estudadas (JING-WEN et al., 2013). Sua importância em TEA é tão reconhecida que a literatura propõe que mutações sejam estudas como parte do protocolo de investigação clínica de TEA (CARTER, SCHERER, 2013).

A ausência de alterações neste estudo pode significar que alterações neste gene sejam mais raras na população brasileira e que o tamanho da casuística tenha sido insuficiente para detectá-las, pois os 25 éxons foram avaliados.

Em *SHANK1* não foram encontradas CNVs. Nesse gene foram descritas uma microdeleção segregando somente nos homens em quatro gerações de uma família de indivíduos com síndrome de Asperger, bem como outra deleção *de novo* em um menino com autismo de alto funcionamento. A frequência relatada é de 0,02% (SATO et al., 2012). Na presente casuística, a ausência de achados em *SHANK1*, pode ser explicada pelo fato de serem CNVs muito raras e o número de pacientes estudados pode não ter sido suficiente para detectá-las.

Recentemente, quatro estudos relataram coortes de indivíduos com TEA e microduplicações/deleções da região 16p11.2 (KUMAR et al., 2008; MARSHALL et al., 2008; WEISS et al., 2008; FERNANDEZ et al., 2012). Esta região é flanqueada por segmentos de baixa repetição contendo 99% de identidade, que predispõe este locus a uma recombinação homóloga não alélica, o que resulta em uma taxa elevada de mutação, devido a sua estrutura genômica (KUMAR et al., 2008). Fernandez e colaboradores (2012) sugeriram que as microdeleções são mais penetrantes, comparadas às microduplicações e que estas estão mais associadas a sinais dismorfismos menores. Os indivíduos com esta CNV podem apresentar, entre os sinais clínicos, autismo, atraso neuro-psico-motor (ADNPM), deficiência intelectual, escoliose, fácies dismórfica e baixo peso (TABET et al., 2012).

A duplicação observada no paciente aqui estudado envolve o gene *HIRIP3*, que produz ligantes que interagem com proteínas histonas, o *MAPK3*, responsável por uma quinase envolvida no progresso do ciclo celular, o *MAZ*, que codifica uma proteína zinc finger que atua como fator de transcrição ligado a purinas e fator ativante da amilóide A sérica, o gene *SEZ6L2*, que codifica uma proteína receptora transmembrânica tipo 1, e o *MVP*, responsável por uma proteína relacionada com a resistência pulmonar. Com exceção do gene *MVP*, os demais genes envolvidos possuem expressão no sistema nervoso central (BEDOYAN et al., 2010).

Esta CNV é encontrada em cerca de 1% dos indivíduos com TEA e o Aconselhamento Genético é desafiador, pois o fenótipo comportamental inclui autismo e outras doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia, sinais clínicos dismórficos, como os referidos anteriormente, como também pode ser normal (FERNANDEZ et al. 2012), como apresentado pela mãe e irmãs do paciente. Assim, estudos em casuísticas maiores são necessários, não só em autismo, como nas outras doenças psiquiátricas, para uma interpretação mais refinada e precisa. Também, não se pode descartar que esse indivíduo possua outras alterações em seu genoma, como já proposto pelo modelo

oligogênico para autismo. Este mesmo paciente compôs outra casuística vinculada a um estudo colaborativo do mesmo grupo de pesquisa e resultou na confecção de um artigo científico *"CNVs at the 15q13.3, 16p11.2 and 22q in Brazilian individuals with Autism spectrum disorders"*, enviado para publicação.

Em um paciente foi observado o polimorfismo *rs75015217* herdado, no gene *GABRB3*. Este SNP não possui relevância clínica para os afetados, segundo o banco do *NCBI dbSNPs* (NCBI, 2012), apesar de ser raro e estar localizado em uma região com 78% de chance de ser sítio aceptor de *splacing* do transcrito para a proteína, o que foi verificado pelo programa *Human Splicing Finder v. 2.4.1* (DESMET et al., 2009).

Alguns polimorfismos no gene *GABRB3* foram descritos como relacionados aos TEA, mas não o relatado aqui. Inclusive, alguns autores destacam a importância dos mesmos como auxiliares no diagnóstico diferencial destes transtornos (JIAO et al., 2011).

Os receptores GABA são importantes canais ligantes de cloreto que possuem um papel crítico no neurodesenvolvimento e participam da maioria das sinapses inibitórias rápidas no cérebro adulto. A subunidade β3 codifica o maior receptor GABA que é o gene *GABRB3*, trata-se da isoforma presente durante o desenvolvimento cerebral e está fortemente associado com TEA (SHAO et al., 2003; SAMACO et al., 2005). Um SNP associado com TEA é o SNP *rs25409* depositado no banco dbSNP, que codifica uma variante não sinônima (DELAHANTY et al., 2011).

Em *NEDD4* foi encontrada a deleção de uma trinca GAG que corresponde à mutação descrita c.1616 – 1618del p.(Pro539del) no banco de dados NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) *Exome Variant Server*, numa frequência cerca de quatro vezes maior do que a relatada para população normal americana e africana. Esse indel leva a perda de um aminoácido, uma prolina, que pode causar alterações na conformação e estrutura da mesma, pois a região N-terminal apresenta-se diminuída, além disso, na região de interação com a proteína TNIK, que regula a extensão do dendrito durante o desenvolvimento e a arborização neuronal (UNIPROT, 2014). Assim, pode ser proposto o envolvimento desta alteração no fenótipo autístico, o que merece ser investigado em estudos futuros.

A proteína Caspase-3 foi descrita com níveis significativamente aumentados ou diminuídos em indivíduos com TEA comparados com controles, que levou alguns autores a sugerirem um possível papel desta caspase codificada pelo *CASP3* na etiologia desses transtornos (EL-ANSARY; BEN BACHA; AL-AYADHI, 2011; SINISCALCO

et al., 2012). Há evidências de que esse gene possua um papel apoptótico no cérebro incluindo regulação da plasticidade sináptica (MACHNICKA et al., 2012) e da morfologia neuronal por remodelação do citoesqueleto de espectrina (WESTPHAL et al., 2010). Assim, deleções e duplicações em *CASP3* podem interferir nos níveis de expressão da proteína, bem como SNPs ou mutações raras. A deleção neste gene encontrada na paciente F6231-1 poderia explicar, pelo menos em parte, o seu fenótipo comportamental.

O gene *KLLN* foi recentemente identificado em 10q23.31. Codifica uma proteína encontada no núcleo que compartilha um promotor bidirecional com o gene *PTEN*. É regulado, como o *PTEN*, por p53 (proteína supressora de tumor) e participa do controle de parada do ciclo celular e apoptose, consequentemente, é um potencial gene supressor de tumor (CHO; LIANG, 2008). A CNV encontrada no paciente 4333, caracterizada como uma microduplicação, não está descrita nos bancos de dados e também não foram encontradas descrições de alterações deste gene em indivíduos com TEA. Entretanto, mais estudos são necessários para obtenção de esclarecimentos a respeito do seu papel nestas doenças, mesmo porque ele está relacionado ao *PTEN*, um supressor de tumor sabidamente associado com autismo, conforme referido anteriormente.

O gene *PTENP1* é um pseudogene localizado em 9p21 que possui alta homologia com o gene *PTEN*. Pseudogenes são definidos como loci genômicos que se assemelham a genes reais, mas ainda são considerados biologicamente sem importância porque abrigam códons de parada prematuros, deleções/inserções e mutações *frameshift* que anulam a sua tradução em proteínas funcionais. No entanto, as sequências nucleotídicas contidas dentro de pseudogenes estão bem conservadas, o que sugere que a pressão seletiva para manter estes elementos genéticos existe, e que eles podem desempenhar um papel celular importante. *PTENP1* parece ser responsável por um microRNA cujos níveis de expressão podem afetar os níveis do *PTEN*, e esta relação já foi associada com a patogênese do câncer (POLISENO et al., 2010).

Estes dados podem ser extrapolados e sugerir que alterações em *PTENP1*, como observado em três casos desta casuística, possam diminuir o nível de microRNas e consequentemente, diminuir os níveis de expressão do gene *PTEN* e resultar em comportamento autístico. Esta sugestão é reforçada pelo fato de deleções em *PTEN* que levam a nível baixo de expressão já foram relacionadas com alteração da neurotransmissão em autistas (HAWS et al., 2013).

Foi observada uma alteração em *DLGAP2* em um paciente, uma mutação sinônima, não descrita em TEA e que não está presente em nenhum dos banco de controles disponíveis. Mudanças de códons sinônimos nem sempre são neutras, indicando sua importância em estudos de associação de doenças. As substituições sinônimas podem afetar a estrutura de dobramento da proteína. Alguns estudos sugerem que os dados de variação sinônima devem ser analisados por meio de valores de uso códon sítio-específicos para inferir o impacto potencial das mudanças no fenótipo (BHARDWAJ, 2014). A seleção evolutiva dos códons, cujas propriedades são ideais para uma célula gerar um padrão de preferência na utilização de códons sinônimos, têm demonstrado fortes efeitos na utilização de codóns nos níveis de expressão (CHU et al., 2014). Assim, se este códon encontrado no paciente 4423 desempenhar um papel de códon preferencial, os níveis de expressão da proteína Dlgap2 podem estar comprometidos e participar da etiopatogenia dos TEA.

O gene *MAGI2* codifica uma proteína também conhecida como de suporte sináptico expressa apenas no cérebro que está presente em sinapses excitatórias e interage com receptores NMDA (YAMADA et al., 2003). Há descrições de alguns SNPs e de CNVs (deleções) que abrangem somente este gene em esquizofrenia (KARLSSON et al., 2012; KOIDE et al., 2012). Devido a sua função e envolvimento com outras doenças do neurodesenvolvimento, a deleção encontrada no em um dos indivíduos aqui estudados pode ter influenciado seu fenótipo comportamental.

O *NRXN1* (Neuroxina 1) é um dos maiores genes humanos, com 1,1 Mb e 24 exons (TABUCHI; SUDHOF, 2002). Ele codifica uma proteína de superfície celular envolvida na sinapse e sinalização (NAM; CHEN, 2005) e há alterações associadas com TEA, como mutações de ponto (FENG et al., 2006; KIM et al., 2008; YAN et al., 2008) e deleções (SZATMARI et al. 2007; MARSHALL et al. 2008; MORROW et al. 2008; GLESSNER et al. 2009).

Deleções no gene *NRXN1* também foram descritas na população normal em dois grandes estudos (INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM, 2008; ITSARA et al., 2009). Já foram relatadas frequências de deleções exônicas de 0,019% (CHING et al., 2010) e 0,02% (KIROV et al., 2009). Essas deleções em população controle, associada a relatos de casos em que foram herdadas de pais aparentemente normais, sugere que elas podem ter penetrância incompleta ou que o fenótipo comportamental alterado resulta da interação com outros genes, num padrão específico e individual (KIM et al., 2008; ZWEIER et al., 2009; CHING et al., 2010).

Alguns estudos têm sugerido que deleções envolvendo exons do *NRXN1* estão associadas à susceptibilidade para o autismo e outras doenças do desenvolvimento neurológico (FRIEDMAN et al., 2006; AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM et al., 2007; KIROV et al., 2009; GAI et al., 2012). O efeito destas deleções na expressão das neuroxinas no cérebro, entretanto, não está esclarecido (ZWEIER et al., 2009). Contudo, os indivíduos já descritos com essas perdas apresentam, além dos TEA, podem apresentar deficiência intelectual, atraso de fala, hipotonia, hemangiomas e Complexo VATER (REICHELT; RODGERS; CLAPCOTE et al., 2011).

Atraso no desenvolvimento, comportamentos anormais e uma ampla variedade de características dismórficas suaves estão entre os sinais clínicos mais comuns (GLESSNER et al., 2009; DABELL et al., 2013). As deleções exônicas no *NRXN1* foram identificadas em 1% entre os nossos pacientes. Esta frequência é consistente com aquelas previamente relatadas em TEA (PINTO et al., 2010). Desses achados resultou a elaboração de um artigo científico intitulado "*NRXN1* exonic deletions in Brazilian patients with idiopathic autistic spectrum disorders"(Apêndice B).

Em um caso foi observada uma mutação sinônima herdada e ainda não descrita em *NRXN1*. Como já referido, variantes sinônimas haviam sido esquecidas e consideradas como inofensivas, entretanto, alguns estudos demonstraram consequências funcionais destas mutações devido à diminuição da transcrição, da tradução e do dobramento alterado de proteínas (CHAMARY; HURST, 2005; GINGOLD; PILPEL, 2011). Pode ser sugerido que a utilização de códons poderia ser o mecanismo para a diminuição da tradução da proteína *NRXN1* com este tipo de variante. Deve ser também ressaltado que estas variantes sinônimas também acarretam consequências na sinalização *downstream* (NIZIALEK et al., 2013).

Entretanto, no caso aqui estudado, a mesma alteração foi também observada na mãe da paciente, sem alterações de comportamento. Muitas CNVs e mutações pontuais associadas ao fenótipo comportamental autístico já foram encontradas em genitores e irmãos normais. Há sugestões de que a penetrância incompleta e expressividade muito variável poderiam ser explicadas pela participação adicional de outros fatores genéticos, não presentes em não afetados. Por este modelo, a haploinsuficiência de *NRXN1* predisporia a fenótipos neuropsiquiátricos, mas só resultaria em anormalidades na presença de uma ou mais alterações aditivas (BÉNA et al., 2013)

Um paciente diagnosticado com autismo foi encontrado com deleção em *SHANK2*, o 4398. Shanks são proteínas de suporte da rede de densidade pós-sináptica de sinapses glutamatérgicas. Estas proteínas são fundamentais para formação e manutenção das sinapses, e para o equilíbrios excitatório e inibitório. O gene *SHANK2* está localizado em 11q13.3, e tem 621.8 kb, com , três promotores alternativos e um *stop* codon, que resultam em quatro isoformas, com 33 éxons codificantes na isoforma maior (GUILMATRE et al., 2014).

Alterações em *SHANK2* já foram descritas em pacientes com TEA com deficiência intelectual leve e moderada. Alguns estudos independentes revelaram a presença de microdeleções heterozigotas *de novo* neste gene em pacientes com TEA, atraso de fala e atraso do desenvolvimento (SCHLUTH-BOLARD et al., 2013; CHILIAN et al., 2013). Entretanto, ao contrário da maioria dos estudos sobre o assunto descritos na literatura, LIU et al. (2013), em um estudo de 285 pacientes não observaram casos com alteração em *SHANK2*, questionando um papel "maior" deste gene em chineses com TEA.

Mas, apesar das diversas descrições de microdeleções em *SHANK2* na literatura, o papel desta mutação na patogênese dos TEA não está esclarecido. Porém, um estudo recente e interessante mostrou que ratos Shank2 mutantes apresentam fenótipos comportamentais que são característicos de TEA. Além disso, o estudo sugere que a hipofunção dos receptores NMDA é a causa molecular subjacente da interacção social prejudicada e mostra que esta deficiência pode ser farmacologicamente revertida. NMDAR é um receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico (glutamato)/Aspartato e seu agonista exógeno NMDA. A ativação dos receptores de glutamato resulta na abertura de um canal iônico não-seletivo para os catiões. Isso permite o fluxo de Na^+ e de pequenas quantidade de Ca^{2+} para dentro da célula e de K^+ para fora da célula. O fluxo de cálcio através destes receptores desempenha um papel importante na plasticidade sináptica (TSE, 2012).

É interessante que alguns pacientes com microdeleções *de novo* no *SHANK2* também apresentam CNVs em 15q11-q13, já associadas a distúrbios psiquiátricos, incluindo TEA, o que reforça a importância da disfunção sináptica e da hipótese de "multiplos passos complexos" na etiopatogenia dos TEA (LEBLOND et al., 2012). Assim, pode ser sugerida a participação do mesmo na etiologia da doença do paciente aqui estudado, que apresentou uma deleção no éxon 11.

O glutamato é o neurotransmissor mais abundante em sinapses excitatórias no sistema nervoso central. Ele está implicado várias funções fisiológicas vitais, incluindo memória, percepção sensorial, aprendizagem, regulação do desenvolvimento por proliferação e sobrevivência de progenitores neuronais e neurônios (RZESKI; TURSKI; IKONOMIDOU, 2001). O gene *GRM5* foi associado previamente com esquizofrenia, FRAXA e TDAH, (DEVON et al., 2001; DE VRIJ et al., 2008). Em TDAH, inclusive, são descritas CNVs nesse gene (ELIA et al., 2010). O achado de cinco(1,7%) indivíduos com a mesma deleção na casuística estudada reforça a hipótese de que esse gene pode interferir na etiologia dos TEA.

As CNVs, sejam microdeleções ou microduplicações, como detectado em 20 casos parecem alterar a susceptibilidade para doenças comuns ou complexas (como os TEA), o que é revelado em estudos de larga escala, com grandes populações (SEBAT et al., 2007; YANG et al., 2007; IONITA-LAZA et al., 2009; MCCARROLL, 2008; STEFANSSON et al., 2008 ; MALHOTRA et al., 2012). Além disso, a detecção de mudanças quantitativas no DNA genômico é uma estratégia importante para o *screening* de mutações (SHEN ; WU, 2009; SHEN et al., 2010), e duas puderam ser identificadas neste estudo.

Neste estudo, as estratégias laboratoriais utilizadas revelaram alterações em 23 indivíduos com TEA, que correspondeu a 8% da casuística avaliada. Nenhum caso apresentou mais do que uma alteração e as que foram encontradas, algumas ainda não descritas, envolveram oito dos dez genes sinápticos estudados, além de outros dois genes e uma região que não haviam sido selecionados para o estudo, mas puderam ser avaliados pelos kits utilizados. Apenas os genes sinápticos *UBE3A* e *SHANK1* não mostraram CNVs. Estes dados mostram a importância da variação do número de cópias do genoma humano no fenótipo psiquiátrico.

O contexto genético de distúrbios neuropsiquiátricos é complexo e altamente heterogêneo. A ausência de segregação mendeliana clássica reforça os modelos que propõem o envolvimento de muitos genes com efeito menor e aditivo. Mais recentemente, no entanto, a identificação de formas aparentemente monogenéticas de mutações raras, e o desequilíbrio genómico resultante em variações no número de cópias, tem motivado diversos estudos, como este que foi apresentado.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os dados do *screening* de CNVs em genes que atuam no sistema nervoso central em vias sinápticas e em neurotransmissão, em indivíduos com TEA, sugerem que duplicações, mas especialmente deleções exônicas não são eventos raros nestes indivíduos e parecem participar na patogênese do transtorno psiquiátrico.

Estudos com CNVs em TEA devem ser estimulados e os resultados também podem direcionar o processo de Aconselhamento Genético em muitos casos.

Referências

7. REFERÊNCIAS

1000 Genomes. A Deep Catalog of Human Genetic Variation. Disponível em: < **http://browser.1000genomes.org/index.html**>. Acesso em: 10 dezembro. 2012.

ADDM - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006. **Prevalence of autism spectrum disorders- Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network MMWR Surveillence Summary**. United States: Centers for Disease Control and Prevention, v.58, p. 1-20, 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of MentalDisorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR). Washington DC: **AmericanPsychiatric Publishing**, Inc., 2000.

ANNEY, R. et al. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. **Human molecular genetics**, v.19, n.20, p. 4072-4082, 2010.

APA (American Psychiatric Association). Disponível em: < **http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx**>. Acesso em: 05 maio. 2012.

APA (American Psychiatric Association). Disponível em: < **http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx**>. Acesso em: 05 junho. 2013.

AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements, **Nature Genetics**, v.39, n.3, p.319-328, 2007.

AUTISM SPEAKS OFFICIAL Disponível em: <**http:blog.autismspeaks.org/tag/prevalence/**>. Acesso em: 05 dez. 2012.

AUTISM SPEAKS. Disponível em: <**http://www.autismspeaks.org/science/science-news/year-autism epidemiology**>. Acesso em: 05 dez. 2012.

BAIRD, G. et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). **Lancet**, v.368, n.9531, p.210-215, 2006.

BARON, C. A. et al. Genomic and functional profiling of duplicated chromosome 15 cell lines reveal regulatory alterations in UBE3A-associated ubiquitin–proteasome pathway processes. **Human molecular genetics**, v.15, n.6, p.853-869, 2006.

BEDOYAN, J. K. et al. Duplication 16p11.2 in a child with infantile seizure disorder. **American Journal of medical genetics. Part A**, v.152A, n.6, p.1567-1574, 2010.

BÉNA, F. et al. Molecular and clinical characterization of 25 individuals with exonic deletions of NRXN1 and comprehensive review of the literature. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v.162B, n.4, p.388-403, 2013.

BEN-DAVID, E.; SHIFMAN, S. Networks of neuronal genes affected by common and rare variants in autism spectrum disorders. **PLoS Genet,** v.8, n.3, p. e1002556, 2012.

BENVENUTO, A. et al. Recent Advances in the Pathogenesis of Syndromic Autisms. **International Journal Pediatrics**, p.198736, 2009.

BERKEL, S. et al. Mutations in SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. **Nature Genetics**, v.42, n.6, p.489-491, 2010.

BERUMENT, S.K. et al. Autism screening questionnaire: diagnostic validity. **The British journal of psychiatry: the journal of mental science**, v.175, p.444-451, 1999.

BETANCUR et al. The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. **Trends in neurosciences**, v.32, n.7, p.402-412, 2009.

BHARDWAJ, A. Investigating the role of site specific synonymous variation in disease association studies. **Mitochondrion**, 2014. *No prelo*.

BILGÜVAR, K. et al. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. **Nature**, v.467, n.7312, p.207-210, 2010.

BOURGERON, T. A synaptic trek to autism. **Current Opinion in Neurobiology**, v.19, n.2, p.231-234, 2009.

BREMER, A. et al. Copy Number Variation Characteristics in Subpopulations of Patients With Autism Spectrum Disorders. **American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics**, v.156, n.2, p.115-124, 2011.

CARTER, M. T., SCHERER, S. W. Autism spectrum disorder in the genetics clinic: a review. **Clinical Genetics**, v.83, n.5, p.399-407, 2013.

CHAMARY, J.V.; HURST, L.D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. **Genome Biology**, v.6, n.9, p.75, 2005.

CHEN, X. et al. Novel association strategy with copy number variation for identifying new risk Loci of human diseases. **PLoS One**, v.5, n.8, p.e12185, 2010.

CHIAPEDDI, M. et al. Autism and classification systems: a study of 84 childreen. **Italian Journal of pdediatrics**, v.36, n.10, p.1-5, 2010.

CHIEN, W.H. et al. Deep exon resequencing of DLGAP2 as a candidate gene of autism spectrum disorders. **Molecular autism**, v.4, n.1, p.26, 2013.

CHILIAN, B. et al. Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. **Clinical genetics**, 2013. *No prelo*.

CHING, M. S. et al. Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. **American Journal of Medical Genetics Part B,**

Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics, v.153B, n.4, p.937-947, 2010.

CHO, Y. J; LIANG, P. Killin is a p53-regulated nuclear inhibitor of DNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.105, n. 14, p. 5396-5401, 2008.

CHOI, M. et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** , v.106, n.45, p.19096-19101, 2009.

CHU, D. et al. Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs. **The EMBO journal**, v.33, n.1, p.21-34, 2014.

CHUTHAPISITH, J.; RUANGDARAGANON, N. Early Detection of Autism Spectrum Disorders. In: Deutsh, S. I and Urbano, M. R. Autism Spectrum Disorders: **The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment**. Thailand, p. 3-10. 2011.

CONOLLY, J.J.M.; HAKONARSON, H. The Genetics of Autism Spectrum Disorders. In: Deutsh, S. I and Urbano, M. R. **Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment**. Croácia: In Tech, 2011, p.51-55.

CUSCÓ, I. et al. Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamatergic synapse in the etiology of the disorder. **Human molecular genetics**, v.18, n.10, p.1795-1804, 2009.

DABELL, M.P. et al. Investigation of NRXN1 deletions: clinical and molecular characterization. **American Journal of Medical Genetics**. **Part A**, v. 161, n.4, p.717-731, 2013.

DATABASE OF GENOMIC VARIANTS – DGV. Disponível em: <**http://projects.tcag.ca/variation/**>. Acesso em: 25 out. 2012.

DE VRIJ, F.M. et al. Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in Fmr1 KO mice. **Neurobiology of disease**, v.31, n.1, p.127-132, 2008.

DEAN, C.,;DRESBACH, T. Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. **Trends in neurosciences**, v.29, n.1, p.21-29, 2006.

DELAHANTY, R.J et al. Maternal transmission of a rare GABRB3 signal peptide variant is associated with autism. **Molecular Psychiatry**, v.16, n.1, p.86-96, 2011.

DESMET, F-O. et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.9, p.e67, 2009.

DEVLIN, B.; SCHERER, S.W. Genetic architecture in autism spectrum disorder. **Current opinion in genetics & development**, v.22, n.3, p.229-237, 2012.

DEVON, R. S. et al. The genomic organisation of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 gene, and its association with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v.6, n.3, p.311-314, 2001.

DONOVAN, P.; PORONNIK, P. Nedd4 and Nedd4-2: ubiquitin ligases at work in the neuron. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.45, n.3, p.706-710, 2013.

EL-ANSARY, A.K.; BEN BACHA, A.G.; AL-AYADHI, L.Y. Proinflammatory and proapoptotic markers in relation to mono and di-cations in plasma of autistic patients from Saudi Arabia. **Journal of Neuroinflammation**, v.8, p.142, 2011.

EL-FISHAWAY, P.; STATE, M. W. The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. **Psychiatric Clinics of North America**, v.33, n.1, p.83-105, 2010.

ELIA, J. et al. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. **Molecular Psychiatry**, v.15, n.6, p.637-646, 2010.

ELSABBAGH, M. et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism research: official journal of the International Society for Autism Research**, v.5, n.3, p.160-79, 2012.

FARAS, H.; ATEEQI, N. A.; TIDMARSH, L. Autism spectrum disorders. **Annals of Saudi Medicine,** v. 30, n. 4, p. 295-300, 2010.

FENG, J. et al. High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. **Neuroscience letters**, v.409, n.1, p.10-13, 2006.

FERNANDEZ, B. A. et al. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. **Journal of Medical Genetics**, v.47, n.3, p.195-203, 2012.

FETT-CONTE, A. C.; BOSSOLANI-MARTINS, A. L.; PEREIRA-NASCIMENTO, P. Etiology of Autism. In: Fitzgerald, M. Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I [Internet]. Rijeka, Croatia, 2013.

FOMBONNE, E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. **The Journal of clinical psychiatry**, Suppl 10, P.3-8, 2005.

FRIEDMAN, J.M. et al., Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation, **American Journal of Human Genetics**, v.79, n.3, p.500-513, 2006.

GAI, X. et al. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. **Molecular psychiatry**. v.17, n.4, p.402-11, 2012.

GARBER, K. Autism´s case may reside in abnormalities at the synapse. Science, v.317, p.190-191, 2007.

GARCIA-JUNCO-CLEMENTE, P. et al. Overexpression of calcium-activated potassium channels underlies cortical dysfunction in a model of PTEN-associated

autism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, n.45, p.18297-18302, 2013.

GILMAN, S.R. et al. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses, **Neuron,** v.70, n.5, p.898-907, 2011.

GINGOLD, H.; PILPEL, Y. Determinants of translation efficiency and accuracy. **Molecular systems biology [electronic resource]**, v. 7, n.481, 2011.

GLESSNER, J. T. et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. **Nature**, v.459, n.7246, p.569-573, 2009.

GLESSNER, J.T. et al. Strong synaptic transmission impact by copy number variations in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.107, n.23, p.10584-10589, 2010.

GOUAS, L. et al. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. **Pathologie-Biologie (Paris)**, v.56, n.6, p.345-353, 2008.

GUILMATRE, A. et al. The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. **Developmental neurobiology**, v.74, n.2, p.113-122, 2014.

HADDAD et al. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Human Genetics,** v.97, n.6, p.808-812, 1996.

HAWS, M. E. et al. PTEN knockdown alters dendritic spine/protrusion morphology, not density. **The Journal of comparative neurology**, 2013. *No prelo*.

HOFVANDER B. et al. Psychiatric and psychosocial problems in adults with normal-intelligence autism spectrum disorders. **BMC Psychiatry**, v.9, n.35, p.1-9, 2009.

HOLT et al. Linkage and candidate gene studies of autism spectrum disorders in European populations. **European journal of human genetics : EJHG**, v.18, n.9, p.1013-1019, 2010.

HUGUET, G.; EY, E.; BOURGERON. T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. **Annual review of genomics and human genetics**, v.14, p.191-213, 2013.

INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. **Nature**, v.455, n.7210, p.237-241, 2008.

INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENETIC NOMENCLATURE **ISCN,2013:** International System for Human Cytogenetic Nomenclature Farmington ; Karger, 2013.

IONITA-LAZA, I. et al. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. **Genomics**, v. 93, n. 1, p. 22-26, 2009.

IPA. Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity® Systems). Disponível em: <**www.ingenuity.com**>. Acesso em: 05 jan. 2010.

ISAKSEN J, et al. Observed prevalence of autism spectrum disorders in two Norwegian counties. **European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society**, v.16, n.6, p.592-598, 2012.

ITSARA, A. et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. **American Journal of Human Genetics**, v.84, n.2, p.148-161, 2009.

JAMAIN,S. et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. **Nature Genetics**, v.34, n.1, p.27-20, 2003.

JIAO, Y. et al. Predictive models for subtypes of autism spectrum disorder based on single-nucleotide polymorphisms and magnetic resonance imaging. **Advances in Medical Sciences**, v.56, n.2, p.334-342, 2011.

JING-WEN, L.V. et al. Role of the PTEN signaling pathway in autism spectrum disorder. Role of the PTEN signaling pathway in autism spectrum disorder. **Neuroscience bulletin**, v.29, n.6, p.773-778, 2013.

JONES , M. B.; SZATAMARI,P. A risk-factor modelo of epistatic interaction, focusing on autism. **American Journal of Medical Genetics**, v.114, n.15 , p.558-565, 2002.

KARLSSON, R. et al. MAGI1 copy number variation in bipolar affective disorder and schizophrenia. Biological psychiatry, v.71, n.10, p.922-930, 2012.

KAUFMANN, W.E. et al. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. **American journal of medical genetics. Part A**, v.129A, n.3, p.225-234, 2004.

KIM, H. G. et al. Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. **American Journal of Human Genetics**, v.82, n.1, p.199-207, 2008.

KIM, Y. S. et al. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. **The American journal of psychiatry**, v.168, n. 9, p. 904-912, 2011.

KIROV, G. et al. Neurexin 1 (NRXN1) deletions in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n.5, p. 851-854, 2009.

KOIDE, T. et al. Common variants in MAGI2 gene are associated with increased risk for cognitive impairment in schizophrenic patients. **PLoS One**, v.7, n.5, p.e36836, 2012.

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

KUMAR, R.A.; KARAMOHAMED, S.; SUDI, J., et al. Recurrent 16 p 11.2 microdeletions in autism. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n.4, p.628, 2008.

LATIF, A.H.; WILLIAMS, W.R. Diagnostic trends in autistic spectrum disorders in the South Wales valleys. **Autism**, v. 11, n. 6, p479-487, 2007.

LAURITSEN, M. B. Autism spectrum disorders. **European Society of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 1, p 37-S42, 2013. *Suplemment.*

LEBLOND, C. S. et al. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. **PLoS Genet**, v. 8, n. 2, p. e1002521, 2012.

LEVINSON, D. F. et al. Copy number variants in schizophrenia: confirmation of five previous findings and new evidence for 3q29 microdeletions and VIPR2 duplications. **The American journal of psychiatry**, v.168, n. 3, p.302-316, 2011.

LEVY, D. et al. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. **Neuron**, v.70, n.5, p.886-897, 2011.

LIU, C.H.; GOLDBERG, A.L.; QIU, X.B. New insights into the role of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of apoptosis. **Chang Gung medical journal**, v.30, n. 6, p .469-479, 2007.

LIU,Y. et al. Lack of association between NLGN3, NLGN4, SHANK2 and SHANK3 gene variants and autism spectrum disorder in a Chinese population. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56639, 2013.

LOO, C.Y.; GRAHAM, R.M.; HUGHES, C.V. Behaviour guidance in dental treatment of patients with autism spectrum disorder**. International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children**, v. 19, n. 6, p. 390-398, 2009.

LORD, C; RUTTER, M; LE COUTEUR, A . Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders**. Journal of Autism and Developmental Disorders**, v.24, n.5, p. 659-685, 1994.

LV, J.W. et al. Role of the PTEN signaling pathway in autism spectrum disorder. **Neuroscience bulletin**, v.29, n.6, p.773-778, 2013.

MACHNICKA, B. et al. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 69, n. 2, p.191-201, 2012.

MALHOTRA, D.; SEBAT, J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1223-1241, 2012.

MARSHALL, C. R. et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. **American journal of human genetics**, v. 82, n.2, p. 477-488, 2008.

MATSUNAMI, N. et al. Identification of rare recurrent copy number variants in high-risk autism families and their prevalence in a large ASD population. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e52239, 2013.

MCCARROLL, S. A. Extending genome-wide association studies to copy-number variation. **Human Molecular Genetics**, v. 17, p. 135-142, 2008.

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.

MORROW, E. M. et al. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. **Science**, v. 321, n. 5886, p. 218-223, 2008.

MUHLE, R.; TRENTACOSTE, S.V.; RAPIN, I. The genetics of autism. **Pediatrics**, v.113, n. 5, p. e472-486, 2004.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: < **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=75015217**>. Acesso em: 10 setembro. 2012.

NEALE, B.M. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. **Nature**, v.485, n.7397, p.242-245, 2012.

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.

NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server. Disponível em: **< http://evs.gs.washington.edu/EVS/>**. Acesso em: 10 dezembro. 2012.

NIZIALEK, E.A. et al. Germline and somatic KLLN alterations in breast cancer dysregulate G2 arrest. **Human molecular genetics**, v.22, n.12, p.2451-2461, 2013.

O'ROAK, B.J. et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. **Nature,** v. 485, n. 7397, p.246-250, 2012.

PAGNAMENTA, A.T. et al. Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies. **Journal of human genetics**, v.57, n.1, p.70-72, 2012.

PAULA, C. S et al. Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 41, n. 12,1738-1742, 2011.

PERCHE, O. et al. Autism, genetics and synaptic function alterations. **Pathologie-biologie**, v.58, n.5, p.381-386, 2010.

PÉRISSE, D. et al. Risk factors of acute behavioral regression in psychiatrically hospitalized adolescents with autism. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 100-108, 2010.

PERSICO, A. M.; BOURGERON, T. Searching for ways out of the autism maze:genetic, epigenetic and environmental clues. **Trends Neuroscience**, v. 29,n. p. 349-358, 2006.

PINTO, D et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. **Nature**, v. 466, n. 7304, p. 368-372, 2010.

POLISENO, L. et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. **Nature**, v.465, n.7301, p.1033-1038, 2010.

REICHELT, A.C.; RODGERS, R.J.; CLAPCOTE, S. J. The role of neurexins in schizophrenia and autistic spectrum disorder. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1519-1526, 2011.

RONEMUS, M et al. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n.2, p. 133-141, 2014.

ROSENBERG, R. E. et al. Trends in autism spectrum disorder diagnoses: 1994-2007. **Journal of autism and developmental disorders**, v.39, n. 8, p. 1099-1111, 2009.

RZESKI,W.; TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C. Glutamate antagonists limit tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n.11, 6372-6377, 2001.

SAEMUNDSEN, E. et al. Prevalence of autism spectrum disorders in an Icelandic birth cohort. **BMJ open**, v. 3, n.6, p. e002748, 2013.

SAMACO, R. C. et al. Epigenetic overlapinautism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 4, p.483-492, 2005.

SANDERS, S.S. Whole-exome sequencing: a powerful technique for identifying novel genes of complex disorders. **Clinical genetics**, v.79, n.2, p.132-133, 2011.

SASSOÈ-POGNETTO, M. et al. Understanding the molecular diversity of GABAergic synapses. **Frontiers in cellular neuroscience**, v.5, n.4, 2011.

SATO, D. et al. SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. **American journal of human genetics**, v. 90, n. 5, p. 879-887, 2012.

SCHAAF, C. P. et al. Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorder. **Human Molecular Genetics**, v.20, n.17, p.3366-3375, 2011.

SCHLUTH-BOLARD, C. et al. Breakpoint mappingby next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/ or congenital malformations. **Journal of medical genetics**, v. 50, n. 3, p. 144–150, 2013.

SCHOPLER, E. et al. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 10, n. 1, p. 91-103, 1980.

SCHOUTEN, J.P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, **Nucleic Acids Research**, v.30, n. 12:e57, 2002.

SEBAT, J. et al. Strong association of de novo copy number variation mutations with autism. **Science**, v.316, n. p. 445-449, 2007.

SHAO, Y. et al. Fine mapping of autistic disorder to chromosome 15q11-q13 by use of phenotypic subtypes. **American Journal of Human Genetics**, v.72, n.3, p.539-548, 2003.

SHEN, Y. et al. Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders, **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. 727-735, 2010.

SHEN, Y; WU, B.L. Designing a simple Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 36, n. 4, p. 257-265, 2009.

SHIBAYAMA, A. et al. MECP2 structural and 3'-UTR variants in schizophrenia, autism and other psychiatric diseases: a possible association with autism. **American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v.128B, n. 1, p.50-53, 2004.

SIMON, D.J. et al. A caspase cascade regulating developmental axon degeneration. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n.49, p. 17540-17553, 2012.

SINISCALCO, D. et al. The expression of caspases is enhanced in peripheral blood mononuclear cells of autism spectrum disorder patients. **Journal of autism and developmental disorders**, v.42, n.7, p.1403-1410, 2012.

SKAFIDAS, E. et al. Predicting the diagnosis of autism spectrum disorder using gene pathway analysis. **Molecular psychiatry**, 2012. *No prelo.*

SKUSE, D. H. DSM-5's conceptualization of autistic disorders. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 4, p. 344–346, 2012.

SNOW, A. V.; LECAVALIER, L. Comparing Autism, PDD-NOS, and Other Developmental Disabilities on Parent-Reported Behavior Problems: Little Evidence for ASD Subtype Validity. **Journal of Autism and Development Disorders**, v.41, n.3, p. 302-310, 2011.

STEFANSSON, H. et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. **Nature**, v. 455, n. 7210, p. 232-236, 2008.

SWANWICK, C. C. et al. Genetic Heterogeneity of Autism Spectrum Disorders. In: Deutsh, S. I and Urbano, M. R. **Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment**. Croácia: In Tech, 2011, p. 65-82.

SZATMARI, P. et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. Nature Genetics, v.39, n. 3, p. 319-328, 2007.

TABET, A. C. et al. Autism Multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother. **European journal of Human Genetics**, v.20, n.5, 2012.

TABUCHI, K.; SUDHOF, T. C. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing**. Genomics**, v.79, n.6, p.849-859, 2002.

TAKEUCHI, K et al. Dysregulation of synaptic plasticity precedes appearance of morphological defects in a Pten conditional knockout mouse model of autism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, n.12, p.4738-43, 2013.

TSE, M. T. Neurodevelopmental disorders: Exploring the links between SHANK2 and autism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 7, p. 518, 2012.

UNIPROT. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P46934>. Acesso em: 10 janeiro. 2014.

VAN RIJN, S. et al. Social behavior and autism traits in a sex chromosomal disorder: Klinefelter (47XXY) syndrome. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 38, n. 9, p. 1634-1641, 2008.

VISSERS, L. E. et al. A de novo paradigm for mental retardation. **Nature Genetics**, v.42, n.12, p.1109-1112, 2010.

VORSTMAN, J.A. 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.

WEISS, L. A. et al. Association Between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. **The New England journal of medicine**, v. 358, n.7, p. 667-675, 2008.

WERLING, D.M.; GESCHWIND, D.H. Sex differences in autism spectrum disorders. **Current opinion in neurology**, v.26, n. 2, p.146-153, 2013.

WESTPHAL, D. et al. Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth. **The Journal of biological chemistry**,v.285, n.53, p. 42046-42057, 2010.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders: diagnostic criteria for research. **World Health Organization**: Geneva, 1993.

WING, L.; POTTER, D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? **Mental retardation and developmental disabilities research reviews**, v.8, n.3, p.151-161, 2002.

WIŚNIOWIECKA-KOWALNIK, B. et al. Application of custom-designed oligonucleotide array CGH in 145 patients with autistic spectrum disorders. **European Journal of Human Genetics: EJHG**, v.21, n.6, p.620-625, 2013.

YAMADA, A. et al. Nectin-dependent localization of synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) at the puncta adherentia junctions formed between the mossy fibre terminals and the dendrites of pyramidal cells in the CA3 area of the mouse hippocampus. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**,v. 8, n.12, p. 985-994, 2003.

YAN, J. et al. Neurexin 1alpha structural variants associated with autism. **Neuroscience Letters**, v. 438, n.3, p. 368-370, 2008.

YANG, Y. et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): Low copy number is a risk factor for and high copy number is a pro-tective factor against SLE susceptibility in European Americans. **American journal of human genetics**, v. 80, n. 6, p. 1037-1054, 2007.

YANG,Y.; PAN, C. Role of metabotropic glutamate receptor 7 in autism spectrum disorders: a pilot study. **Life sciences**, v. 92, n. 2, p. 149-153, 2013.

ZAROFF, C. M.; UHM, S.Y. Prevalence of autism spectrum disorders and influence of country of measurement and ethnicity. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, v.47, n.3, p. 395-398, 2012.

ZWEIER, C. et al. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, n.5, p. 655-666, 2009.

Apêndices

8. APÊNDICES

8.1 Apêndice 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 esclarecido sobre os riscos e benefícios do estudo. É da responsabilidade do pesquisador dar toda e qualquer informação necessária e solicitada. Este documento, portanto, 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 de Genes Envolvidos na Neurotransmissão, Formação e Manutenção Sináptica em Indivíduos com Doenças do Espectro Autístico"**, que está sob a responsabilidade das pesquisadoras **Profª. Drª. Agnes Cristina Fett Conte** (orientadora - Depto de Biologia Molecular – FAMERP) e **Ana Luiza Bossolani Martins** (doutoranda – IBILCE/UNESP), cujos telefones para contato são: (17)32015000, ramal 1931 (Serviço de Genética) e (17)32015000 ramal 5813 (Comitê de Ética em Pesquisa/FAMERP)

O **objetivo** é avaliar algumas regiões específicas do material genético, denominadas genes, que participam de sinapses (região de interação entre células nervosas) em pessoas 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 destas doenças e é isso que será estudado.

Para participar, será necessária a coleta de um pouco (10ml) de sangue da veia do braço do (a) seu (sua) filho (a), sem necessidade de estar em jejum, que será coletado por profissional especializado**.** O sangue do paciente será utilizado única e exclusivamente para atingir o objetivo deste estudo e após a sua utilização será descartado.

Os possíveis **riscos** para a saúde incluem 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 e todas as informações/esclarecimentos serão oferecidos a você 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 este 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 no comportamento 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 RESPONSBILIDADE: 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 (17) 3201-5000 ramal 1931.

Pesquisador:.....

RG:.....

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

Assinatura:.....

8.2 Apêndice B- NRXN1 exonic deletions in Brazilian patients with idiopathic autistic spectrum disorders

CNVs of *NRXN1* in autistic Brazilian patients

Bossolani-Martins A.L.[1], Ribeiro C.M[2], Pereira-Nascimento P.[1], Moreira D.de P.[2], Rosan D.B.A[.1], Giunco C.T.[3], Passos-Bueno M.R.[2], Fett-Conte A.C.[4]

[1]Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP; São José do Rio Preto, SP, Brazil.
[2] Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – IB-USP; São Paulo, SP, Brazil.
[3] Fundação Padre Albino – FIPA; Catanduva, SP, Brazil.
[4]Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP/FUNFARME; São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Address correspondence to: Ana Luiza Bossolani Martins Author, Laboratório de Genética, Hospital de Base, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544; São José do Rio Preto, SP, CEP: 15090-000, SP, Brazil, [anabossolani@gmail.com], 55 17 32015000 r. 1932.

ABSTRACT

Autism spectrum disorders (ASD) represent a group of neurodevelopmental disorders characterized by a core set of social-communicative and behavioral impairments. The neurexin-1 (*NRXN1*) gene mapped on chromosome 2p16.3 encodes a cell adhesion molecule in the nervous system. Inherited or *de novo* deletions suggested neurexin as a candidate gene for the ethiopathogenesis of ASD. We present the results of CNVs screening in *NRXN1* of 300 idiopathic ASD using Multiplex Ligation depedent-Probe Amplification (MLPA). We found a 0.5% frequency of exonic deletions in ASD population. The clinical data of the affected were compared with those of previously described patients. We concluded that *NRXN1* exonic deletions are no rare in this population and that there is not a specific phenotype associated with these deletions. Dysmorphisms and behavioral phenotype can be related to the location of exonic deletions in *NRXN* and we suggest global developmental delay, language delay, seizures/abnormal electroencephalogram, malar hypoplasia/mild midface hypoplasia and prominent nose like frequently features in ASD with *NRXN1* deletions. Our data support previous findings that *NRXN1* may be pathogenic and predispose to autism spectrum disorders.

Key words: Neurexin-1; ASD; dysmorphic; MLPA;

INTRODUCTION

Autism spectrum disorders (ASD) are a group of psychiatric disorders characterized by deficits in the social, communication and behavior areas. The social interaction and communication skills are qualitatively impaired. The behavior is characterized by repetitions and stereotypes, with very limited interests [Llaneza et al., 2010]. The prevalence of ASD is approximately 1:150 and occurs in all ethnic and social groups [Nassar et al., 2009; Currenti, 2010].

The etiology of ASD is complex and can be determined in about 25% of cases. Rare *de novo* or inherited copy number variations (CNVs), mainly those that affect genes with synaptic function, are observed in 5-10% of idiopathic ASD [Devlin and Sherer, 2012]. Thus, the genes that participate in the synaptic function may contribute to the etiology of ASD [Marshall et al., 2008]. One of these genes, the human neurexin 1 gene (*NRXN1*), maps to chromosome 2p16.3 in a large genomic segment of 1.1 Mb [Tabuchi and Südhof, 2002]. Neurexins are neuronal cell-surface proteins that function as cell-adhesion molecules and receptors in the formation of glutamatergic (excitatory) and GABAergic (inhibitory) synapses [Siddiqui et al., 2010; Pizzarelli and Cherubini, 2011]. Due to their role in synaptic signaling, neurexins are considered to have a fundamental importance in brain skills related to information processing [Futai et al., 2013].

Studies have suggested that deletions involving *NRXN1* exons are associated with susceptibility for autism and other neurodevelopmental disorders [Friedman et al., 2006; Autism Genome Project Consortium et al., 2007; Kirov et al.,2009; Gai et al., 2012]. Developmental delay, abnormal behavior, and variable mild dysmorphic features are among the most common clinical signs [Glessner et al., 2009]. The frequency of exonic deletions varies from 0.3% to 0.8% in ASD populations [Guilmatre et al., 2009;

Sanders et al., 2011], however there are no data about microdeletions in the Brazilian population.

This study presents the results of screening for CNVs in the *NRXN1* gene in ASD and reports the clinical features of positive cases.

MATERIALS AND METHODS

We studied 300 unrelated individuals with idiopathic ASD (239 males and 61 females). Ages ranged from 1 to 47 years old ($\mu = 12.1$; $\sigma = 8.0$). All the probands and their parents were Brazilian. The sample for the present study was recruited in psychiatric clinics and specialized schools of São Paulo State, Brazil. Diagnosis of ASD was performed according to DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 4th edition) following previous standardized criteria [Orabona et al., 2009; Griesi-Oliveira et al., 2012]. All patients were analyzed for possible associated syndromes, as well as for potential environmental etiologic factors, chromosomal abnormalities by conventional GTG-band and the males were tested for the *FMR1* gene mutation. Subjects with these alterations were excluded.

Written informed consent was obtained from all the patients, and the research was approved by the Ethics Research Committee of School of Medicine of Sao Jose do Rio Preto (nº3306/2010).

CNVs Detection

The individuals were screened by Multiplex Ligation dependent-Probe Amplification (MLPA). The alterations observed by MLPA were observed in software of analysis.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by standard procedures.

Multiplex Ligation dependent-Probe Amplification (MLPA)

It was performed according to manufacturer protocol using SALSA MLPA P379 -NRXN1 probemix commercial kit (MRC, Holland) according to the reference sequence NM_001135659.1, with probes for each exon of the gene and second probes included for exons: 1, 10, 19, 20, 21, 24 and 25. Analysis of the peaks of GeneMapper program (version 4.0) of (ABI-3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) and the interpretation of the results were performed in Genemarker program (version 1.97) in which are considered as reference ratios below 0,75 and above 1,30 as deletion and duplication, respectively.

RESULTS

We identified heterozygous exon-disrupting deletions of *NRXN1* in 2 (0.5%) patients, males with ASD**.**

Patient 1 presented a deletion located at the fourth and fifth coding exons of *NRXN1* with size 103.8Kb as was first detected by MLPA. He was born after a full-term pregnancy; his birth weight was 3,200g and length was 47cm. He was diagnosed with Autism. His father is reported to be socially awkward, although he was never diagnosed with ASD. The mother does not have the deletion and a blood sample from the father was not available. The pedigree, MLPA peak ratio for *NRXN1* test probes, of Patient 1 are presented in Figure 1 (A and C).

The Patient 2 showed a *de novo* deletion involving exon 19 of the *NRXN1* with a size of 110.8Kb. He was the couple´s second live-born child. His birth weight was

3,680g and length 50cm. He also was diagnosed with Autism. Family history revealed that the father is alcoholic, among the mother's relatives, there are cases of epilepsy and among the father´s there are reports of intellectual disability and social isolation. Figure 1 shows the pedigree, MLPA peak ratio for *NRXN1* test probes of Patient 2 (B and D). The Table I showed the laboratorial data of the subjects.

The frontal views of patients are showed in Figure 2 and the clinical features are presented in Table II. The main features were compared with those previously described in ASD patients with *NRXN1* exonic deletions [Ching et al., 2010; Wisniowiecka-Kowalnik et al., 2010; Dabell et al.,2013]. Of the 40 phenotypic aspects evaluated, Patient 1 had 21 (52.5%) and Patient 2 had 17 (42.5%).

DISCUSSION

Exonic *NRXN1* deletions were identified in 0.5% of the patients. This frequency is consistent with those previously reported in ASD [Pinto et al., 2010; Devin and Sherer, 2012]. Both the CNVs that we found are not described in the Database of Genomic Variants (DGV) (http://projects.tcag.ca/variation) of healthy individuals, but have been described in patients with ASD [Szatmari et al., 2007; Hedges et al., 2012]. This finding provides additional support for the importance of these exonic deletions, which have been proposed not only for predisposition for autism but also for various neurodevelopmental disorders [Gregor et al., 2011; Schaaf et al., 2012]. According to Dabell et al. [2013], an exonic *NRXN1* deletion can increase the risk for ASD by ~20-fold.

In addition to the behavioral phenotype, there are descriptions of clinical dysmorphic features in individuals who have deletions in *NRXN1*. However, no syndrome related to these alterations has been described. The clinical features described are many and highly variable among those affected. But, some features are observed

more frequently, including global developmental delay, language delay, seizures/abnormal electroencephalogram (EEG), midface hypoplasia and promiment nose [Ching et al., 2010; Wisniowiecka-Kowalnik et al., 2010; Dabell et al., 2013]. The features were less frequent including bulbous nose and high palate, wide/bulbous nasal tip, wide nasal bridge, flattened philtrum and pointed chin, all with. These characteristics were observed in our patients (Table II).

However, it should be remembered that the size of deletions varies between ASD patients. This suggests that the pathogenicity of CNVs of *NRXN1* may be affected by the size and location within the gene, as the deletion impairs transcription, translation, and/or protein structure, which can affect the phenotype [Gauthier et al., 2011]. Thus, the fact that Patient 1 had a deletion of exons 4 and 5, and Patient 2 had deletion of exon 19, that is, CNVs encompassing ~ 100kb in both cases, may explain the phenotypic variation between them. Our patients presented EEG alterations and Patient 2 had seizures. Heterozygous loss of *NRXN1* shows that haploinsufficiency may predispose to seizures as have been described in one third of individuals with deletions in *NRXN1* [Zweir et al. 2009; Harrison et al., 2011]. We suggest like frequently features in *NRXN1* gene deletions in patients with autism, including global developmental delay, language delay, abnormal EEG, malar hypoplasia/mild midface hypoplasia and prominent nose.

Phenotypic variations may also reflect the highly pleiotropic effects observed for specific CNVs such as those associated with *NRXN1* [Ching et al., 2010].

Genetic counseling for these exonic deletions should consider a description of the wide phenotypic spectrum. Further research to investigate variable phenotypes associated with this genomic region should clarify the role of *NRXN1* exonic deletions in the development of ASD and physical features.

CONCLUSION

The data of screening for CNVs on *NRXN1* gene in ASD Brazilian individuals suggests that *NRXN1* exonic deletions are no rare in this population. Dysmorphisms and behavioral phenotype can be related to the location of exonic deletions in *NRXN1*. Based on gene function *NRXN1* in central nervous system, can be suggested the involvement of CNVs observed in the pathogenesis of psychiatric illness of our patients, which can direct the process of genetic counseling of the families involved.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Grants 2010/14943-6 and 2011/07833-2), a BAP/FAMERP (Grant 2012/2013). The authors would like to acknowledge all the participants in this study and families. There are no conflicts of interest, either real or perceived among authors.

REFERENCES

Autism Genome Project Consortium, P. Szatmari, A. D. Paterson et al. 2007. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. Nat Genet. 39:319-328.

Ching MS, Shen Y, Tan WH, Jeste SS, Morrow EM, Chen X, Mukaddes NM, Yoo SY, Hanson E, Hundley R, et al. Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 153B:937-947, 2010.

Currenti SA. 2010. Understanding and Determining the Etiology of Autism. Cell Mol Neurobiol. 30:161-171.

Dabell MP, Rosenfeld JA, Bader P, Escobar LF, El-Khechen D, Vallee SE, Dinulos MB, Curry C, Fisher J, Tervo R, et al. 2013. Investigation of NRXN1 deletions: clinical and molecular characterization. Am J Med Genet A. 161:717-731.

Devlin B, Scherer SW. 2012. Genetic architecture in autism spectrum disorder. Curr Opin Genet Dev. 22:229-237.

Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, et al. 2006. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. Am J Hum Genet. 79:500-513.

Futai K, Doty CD, Baek B, Ryu J, Sheng M. 2013. Specific trans-synaptic interaction with inhibitory interneuronal neurexin underlies differential ability of neuroligins to induce functional inhibitory synapses. J Neurosci. 33:3612-3623.

Gai X, Xie HM, Perin JC et al. 2012. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. Mol Psychiatry. 17:402-411.

Gauthier J, Siddiqui TJ, Huashan P et al. 2011. Truncating mutations in NRXN2 and NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. Hum Genet. 30:563-573.

Glessner JT, Wang K, Cai G et al. 2009. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. Nature. 459:569-573.

Gregor A, Albrecht B, Bader I et al. 2011. Expanding the clinical spectrum associated with defects in CNTNAP2 and NRXN1. BMC Med Genet. 12:106.

Griesi-Oliveira K, Moreira Dde P et al. 2012. A complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 5, and X in autism spectrum disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 159B:529-536.

Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL et al. 2009. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. Arch Gen Psychiatry. 66:947-956.

Harrison V, Connell L, Hayesmoore J, McParland J, Pike MG, Blair E. 2011. Compound heterozygous deletion of NRXN1 causing severe developmental delay with early onset epilepsy in two sisters. Am J Med Genet A. 155A:2826-2831.

Hedges DJ, Hamilton-Nelson KL, Sacharow SJ et al. 2012. Evidence of novel fine-scale structural variation at autism spectrum disorder candidate loci. Mol Autism. 2:3:2.

Kirov G, Rujescu D, Ingason A, Collier DA, O'Donovan MC, Owen MJ. 2009. Neurexin 1 (NRXN1) deletions in schizophrenia. Schizophr Bull. 35:851-854.

Llaneza DC, DeLuke SV, Batista M, Crawley JN, Christodulu KV, Frye CA. 2010. Communication, interventions, and scientific advances in autism: a commentary. Physiol Behav 100:268-276.

Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, et al. 2002. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. Am J Hum Genet. 82:477-488.

Nassar N, Dixon G, Bourke J, Bower C, Glasson E, de Klerk N, Leonard H. 2009. Autism spectrum disorders in young cchildren: effect of changes in diagnostic practices. Int J Epidemiol. 38:1245-1254.

Orabona GM, Griesi-Oliveira K, Vadasz E et al. 2009. HTR1B and HTR2C in autism spectrum disorders in Brazilian families, Brain Res. 1250:14-19.

Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L et al. 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. Nature. 466:368-372.

Pizzarelli R, Cherubini E. 2011. Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. Neural Plast. 2011:297153.

Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism AR, Thomson SA, et al. 2011.. Neuron. 70:863-885.

Schaaf CP, Boone PM, Sampath S et al. 2012. Phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations of NRXN1 exon deletions. Eur J Hum Genet. 20:1240-1247.

Siddiqui TJ, Pancaroglu R, Kang Y, Rooyakkers A, Craig AM. 2010. LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. J Neurosci. 22:7495-7506.

Tabuchi K, Südhof TC. 2002. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. Genomics. 79:849-859.

Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nesteruk M, Peters SU, Xia Z, Cooper ML, Savage S, Amato RS, Bader P, Browning MF, Haun CL, et al. 2010. Intragenic rearrangements in NRXN1 in three families with autism spectrum disorder, developmental delay, and speech delay. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 153B:983-993.

Zweier C, de Jong EK, Zweier M, et al. 2009. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. Am J Hum Genet. 85:655-666.

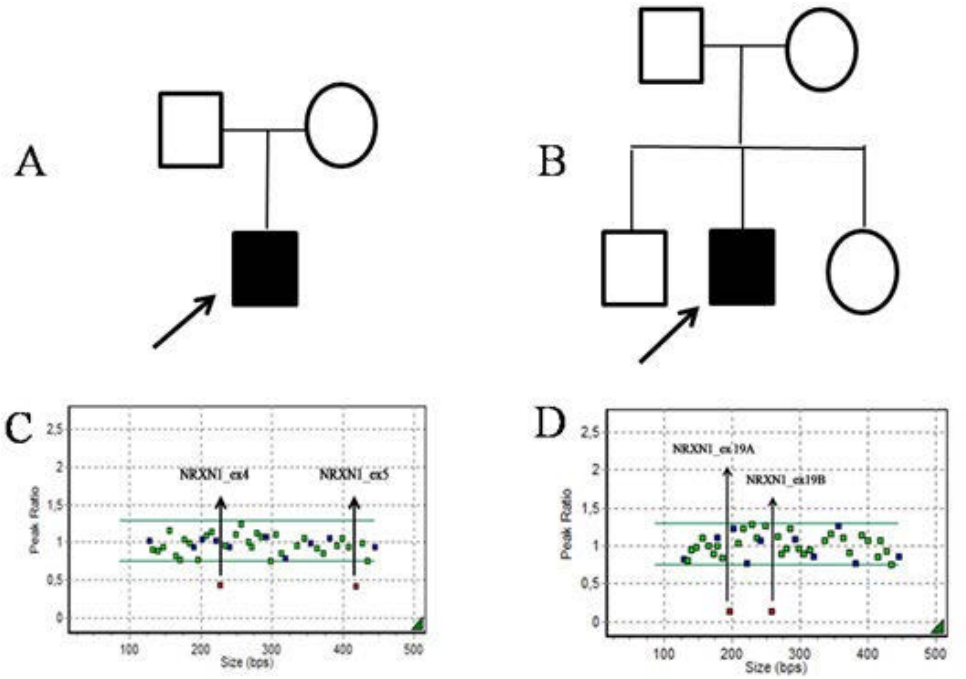


Figure 1. Pedigrees of patients 1(A) and 2(B); MLPA peak ratio of Patient 1 (C) and Patient 2 (D) for NRXN1 test probes. Red, probes with peak ratios < 0.75, corresponding to exons of NRXN1 deleted localized in chromosomal region 2p16.3; Green, normal probes with peak ratios > 0.75 and <1,3 and control probes (blue).

Table I. Description of deletions at *NRXN1* in Patients 1 and 2.

Deletion	**Patient 1**	**Patient 2**
Size of deletion (Kb)	103.8	110.8
Isoform	Neurexin-1-alpha 2	Neurexin-1-alpha 2
Inheritance	unknow	*de novo*
Exon – intron deleted	3-5 exons/ 3,4 introns	19 exon
Other genetic tests	normal karyotype	normal karyotype
	normal molecular fragile X test	normal molecular fragile X test
Indication for testing	Autism	Autism



Figure 2. Frontal view of patients 1 (A) and 2 (B).

Table II. Previously described features of patients with *NRXN1* deletions and of ours subjects.

Described Dysmorphic Features	Patient 1	Patient 2	Ching et al., 2010; Wisniowiecka-Kowalnik et al., 2010; Dabell et al., 2013
Global developmental delay	+	+	15,7%
Motor difficulty	+	-	--
Language delay	+	+	15,7%
Seizures	-	+	--
Abnormal EEG	+	+	21%
Dolichocephaly	+	-	--
Plagiocephaly	-	-	--
Bi-temporal narrowing	+	-	--
Long face	+	-	--
Small face	-	-	--
Oval – shaped face	+	-	--
Large ears	-	-	--
Prominent ears	-	+	--
Frontal bossing	+	-	--
High forehead	+	-	--
Arched eyebrows	+	-	--
Deep-set eyes	-	+	--
Strabismus	-	-	--
Short fissures palpebral	-	+	--
Down-slating palpebral fissures	-	+	--
Up-slating palpebral fissures	+	-	--
Epicanthal folds	-	-	--
Malar hypoplasia/ mild midface hypoplasia	+	+	31,5%
Flated nose	-	-	--
Bulbous nose	+	+	10,5%
Prominent nose	+	+	21%
Wide/bulbous nasal tip	+	+	5%
Wide nasal bridge	+	+	5%
Wide mouth	+	-	--
Flattened philtrum	+	+	5%
Everson of upper lip	-	-	--
High palate	+	+	10,5%
Narrow palate	-	-	--
Widely spaced teeth	-	-	--
Mild retro/micrognathia	-	+	--
Pointed chin	+	+	5%
Large chin	+	+	--
Finger abnormalities	-	-	--
Cardiac abnormalities	-	-	--
Skin abnormalities	-	-	--

+ = presence of the characteristic; - = ausence of the characteristic; EEG = electroencephalogram

8.3 Apêndice C - *Screening* de genes sinápticos em autistas brasileiros

Screening de genes sinápticos em autistas brasileiros

Resumo

A triagem de alterações em genes sinápticos em indivíduos com Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) tem possibilitado a identificação de muitas alterações como mutações, Indels, Polimorfismos de Nucleotídeos Único (SNP) e Variação no Número de Cópias (CNVs). O objetivo desse trabalho foi investigar a presença destas variantes nos genes sinápticos *UBE3A*, *NEDD4*, *PTEN*, *DLGAP2*, *SHANK1* e *SHANK2* em 300 indivíduos com TEA idiopático da população brasileira. Seis indivíduos (2,3%) apresentaram alterações, que foram caracterizadas como mutações sinônimas no gene *DLGAP2* em um caso, uma Indel no gene *NEDD4* em cinco casos e uma CNV (microdeleção) no gene *SHANK2* em outro. Nenhum indivíduo apresentou mais do que uma alteração. Estes genes participam de vias importantes do neurodesenvolvimento, como as vias da ubiquitinação, da sinalização do *PTEN* e da orientação axonal. As alterações encontradas podem ter contribuído com a etiologia dos TEA nos pacientes estudados.

Introdução

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) constituem um grupo de condições graves também atualmente referidas como "autismo" que, de acordo com o novo DSM-5, compromete dois domínios, comunicação social e comportamental, incluindo interesses restritos, estereotipias e comportamentos repetitivos (LAURITSEN, 2013). A prevalência na população é muito alta, recentemente estimada em 62:10.000 (ELSABBAGH et al., 2012).

As causas genéticas dos TEA são muito variáveis, com envolvimento de alterações gênicas e cromossômicas. São identificadas alterações moleculares em cerca de 20% dos casos, com herdabilidade estimada em 90% e a maioria dos casos não tem etiologia conhecida (HALLMAYER et al., 2011; DEVLIN; SCHERER, 2012; ROSTI et al., 2014).

Muitos genes identificados como alterados em TEA estão envolvidos na mesma função biológica, cuja consequência final pode ser a mesma, ou seja, o fenótipo autista

(CUSCÓ et al., 2009; GLESSNER et al., 2009; BUCAN et al., 2009; SBACCHI et al., 2010). Por exemplo, algumas CNVs e mutações pontuais detectadas em genes que participam do complexo neuronal sináptico já foram propostas como envolvidas na etiologia genética dos TEA (SATO et al., 2012).

Já foi proposto que o gene *UBE3A*, que codifica uma ligase E3, participa da via de ubiquitinação de proteínas, seja um candidato provável para conduzir ao fenótipo comportamental autístico, em função da sua expressão no cérebro adulto (LEHMAN, 2009; SMITH et al., 2011). Na mesma via, e pouco estudado em TEA, atua o gene *NEDD4,* outro possível candidato, pois também codifica uma ligase do tipo E3 e possui um papel crucial em todos os estágios do desenvolvimento neuronal (SAKATA et al., 2004; BAKKERS et al., 2005; DALTON et al., 2011).

O gene *PTEN* é o regulador principal da via de sinalização PTEN. Codifica uma proteína fosfatase lipídica que participa da regulação do crescimento, sobrevivência, orientação e proliferação neuronal (GREGORIAN et al., 2009). Anormalidades nesta via já foram associadas a distúrbios neurológicos e psiquiátricos, como tumores cerebrais, autismo e esquizofrenia (JING-WEN et al., 2013). Nesta mesma via atua o gene *DLGAP2* que codifica uma proteína guanilato quinase associada à membrana, que atua na densidade pós-sináptica (PSD) e desempenha um papel na organização molecular de sinapses e na sinalização de neurônios. Vários estudos têm sugerido que as proteínas sinápticas localizadas na densidade pós-sináptica estão envolvidas na fisiopatologia de distúrbios psiquiátricos (RANTA et al., 2000; WU et al. 2013).

SHANK1 e *SHANK2* são membros da família Shank, que codifica proteínas suporte de sinapses glutamatérgicas e participam da via de orientação axonal Organizam-se em grandes plataformas moleculares interligando proteínas de membrana pós-sinápticas com o citoesqueleto de actina de espinhas dendríticas (GRABRUCKER et al., 2011; VERPELLI et al., 2012). Alterações em *SHANK2* já foram associadas com TEA e deficiência intelectual leve a grave, enquanto alterações em *SHANK1* têm sido associadas com autismo de alto funcionamento em pacientes do sexo masculino e com ansiedade e timidez em mulheres (BERKEL et al., 2010; SATO et al., 2012).

Este estudo investigou CNVs e outras variantes nos genes sinápticos *UBE3A*, *NEDD4*, *PTEN*, *DLGAP2*, *SHANK1* e *SHANK2* de indivíduos brasileiros com TEA idiopático.

Material e Métodos

Casuística

Foram selecionados para o estudo 300 indivíduos não dismórficos, 239 do sexo masculino e 61 do sexo feminino, com idades entre um e 47 anos e diagnóstico de TEA, sem etiologia presumida ou conhecida. O diagnóstico psiquiátrico foi realizado de acordo com os critérios do Diagnóstico e Manual Estatístico de Doenças Mentais (DSM- IV) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 200) e com a utilização de testes de avaliação complementar, aplicados pelos psiquiatras responsáveis pelos casos. Os pacientes foram provenientes de clínicas psiquiátricas e escolas especializadas do Estado de São Paulo, Brasil.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FAMERP e o consentimento informado foi obtido de familiares ou outros cuidadores legais de todos os participantes.

Todos os pacientes foram testados para alterações de cariótipo, por bandamento GTG, e para mutações no gene *FMR*, pela técnica de PCR (HADDAD et al. , 1996).

Seleção dos genes sinápticos

A escolha dos genes sinápticos e das regiões destes genes que foram avaliadas foi feita com base na literatura científica e pelo estudo realizado da inter-relação direta e indireta existente entre eles, com a utilização do programa IPA (Ingenuity Pathways Analysis) v. 11631407 (Ingenuity® Systems). Foram estudados *UBE3A*, *NEDD4*, *PTEN*, *DLGAP2*, *SHANK1* e *SHANK2*.

Customização de Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) e uso de kits comerciais

MLPA foi realizada segundo Schouten et al. (2002). Para os estudo dos genes *NEDD4, DLGAP2* e *SHANK1* foram desenhadas sondas in house pelo programa MEL *tingeny* 1.0., sintetizadas pela empresa IDT Technologies, e com a utilização dos reagentes do kit comercial EK1 (MRC Holland-Amsterdan).

As sondas *in house* foram desenhadas com base nas sequências de referência NM_001284338.1 (*NEDD4*), NM_004745.4 (*DLGAP2*) e NM_016148.2 (*SHANK1*),

segundo o protocolo Synthetic Probe Design (MRC-Holland). Para o gene *NEDD4* foram desenhadas sondas para os éxons 2 e 10, além do intron 8; para *DLGAP2* foram desenhadas para os exons 6, 9 ,11 e 12 e *SHANK1* para os exons 1, 2, 5, 16, 20 e 21. Cada um dos três genes foram incluídos em kits diferentes e os três kits receberam duas sondas controles (VIPR2 ; KIAA0056).

Para o estudo do gene *UBE3A* foi utilizado o kit comercial SALSA MLPA probemix P343, para o *PTEN* os kits SALSA MLPA probemix (P225-B3 ; P225-C1) e para o *SHANK2* foi utilizado o kit SALSA MLPA probemix P396 da (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

A análise dos picos de MLPA foi feita pelo programa Genemapper (versão 4.0) do ABI-3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) e a interpretação e normalização dos resultados no programa Genemarker (versão 1.97), considerando-se razões de referência abaixo de 0.75 e acima 1.30 como deleção e duplicação, respectivamente.

Sanger Sequencing

Para esclarecimento dos achados de MLPA foi realizado o sequenciamento de Sanger dos exon 11 do gene *DLGAP2* (8p23) e do exon 2 do gene *NEDD4* (15q). A metodologia incluiu a realização de PCRs, purificação do produto por Exonuclease I (Exo I) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), reação de sequenciamento e purificação do produto por Sephadex® (GE), segundo protocolo próprio. A amostra foi submetida à eletroforese em capilares no sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) e o resultado analisado no programa Sequencher®.

Resultados

Foram observadas alterações em sete casos (2,3%), envolvendo os genes *NEDD4*, *DLGAP2* e *SHANK2*.

Nenhum paciente apresentou alterações nos genes *UBE3*, *PTEN* e *SHANK1*.

Cinco casos (1,7%), três meninos (F6249-1, 1318-B e F1611-1) e duas meninas (F6251-1 e 5509), todos com diagnóstico de Autismo, apresentaram deleção de uma sonda no exon 2 do gene *NEDD4* (Figuras 1.A e B), identificada como falta de uma trinca (GAG) na posição genômica (56155207 – 56155210), com base na sequência referência NM_001284338.1 (UCSC Genome Browser). A deleção encontrada foi verificada nos bancos de dados *1000 Genomes- Deep Catalog of Human Genetic*

Variation (http://browser.1000genomes.org/index.html), e não foi encontrada descrição da mesma. No NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) *Exome Variant Server* (http://evs.gs.washington.edu/EVS/), foi encontrada esta deleção descrita como c.1616 – 1618del p.(Pro539del) (Figura 1C), com frequência de 0,4%.

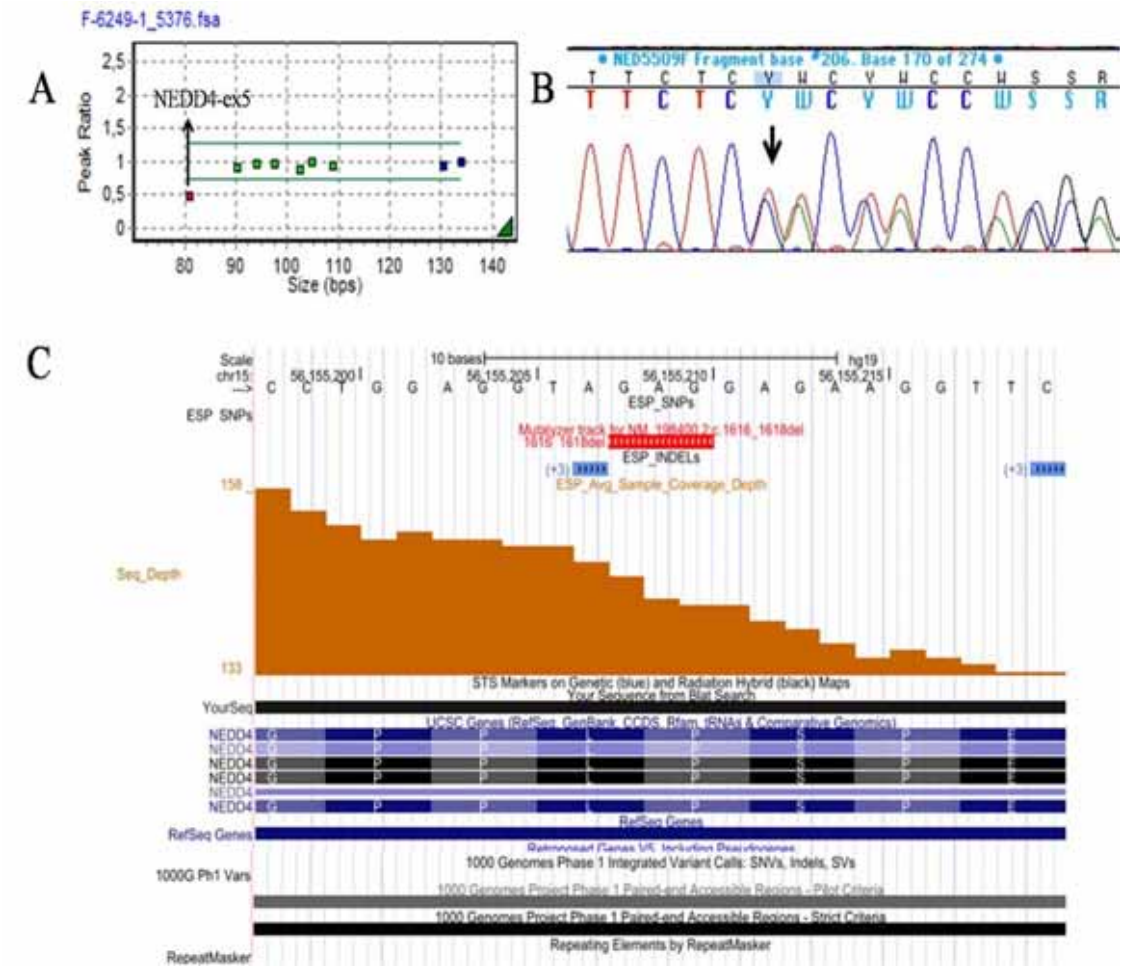


Figura 1. (A) Razão dos picos do MLPA do caso F6249-1 que mostra a deleção no éxon 2 do gene *NEDD4* (vermelho), analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *CASP3* e *NEDD4* e em azul estão representadas as sondas controle. **(B)** Análise do Cromatograma do éxon 2 do *NEDD4* da paciente 5509 mostrando a deleção da trinca CTC. **(C)** Posição da mutação c.1616–1618delp.(Pro539del) com base no *NM_001284338.1* que resulta na perda de uma prolina na sequência da proteína Nedd4 pelo UCSC Genome Browser.

Alteração no gene *DLGAP2* foi observada em um (0,3%) caso (4423), um menino com Autismo, que apresentou deleção de uma sonda do éxon 11 do (Figura 2A). O éxon 11 foi sequenciado (Figura 2B) e foi detectada uma mutação resultante da troca de G>A na posição 887 da trinca CAG→CAA, que codifica uma glutamina. Trata-se de uma troca sinônima NM_004745.4:c.2661G>A na posição genômica 16.454.17 do gene, ainda não descrita (UCSC Genome Browser), verificada nos bancos de dados de controles *1000 Genomes-A Deep Catalog of Human Genetic Variation* (http://browser.1000genomes.org/index.html) e NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) *Exome Variant Server* (http://evs.gs.washington.edu/EVS/).

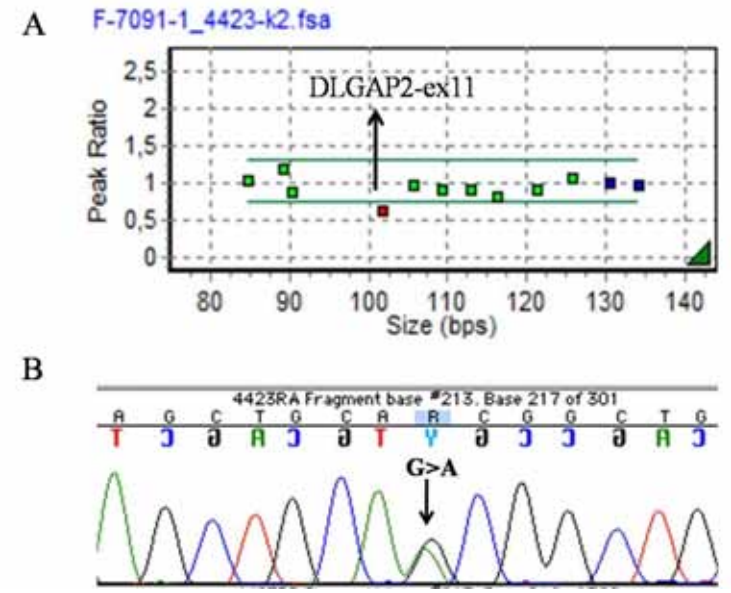


Figura 2. (A) Razão dos picos do MLPA do caso 4423 que mostra a deleção do éxon 11 do gene *DLGAP2* (vermelho) analisados no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene *DLGAP2* e *MAGI2* e em azul estão representadas as sondas controle. **(B)** Análise do Cromatograma do exon 11 do gene DLGAP2 do paciente 4423. A seta indica a mutação sinônima em que ocorre a troca de G>A no gene.

Quanto ao gene *SHANK2*, um (0,3) paciente, um menino com diagnóstico de Autismo (caso 4398), apresentou uma CNV caracterizada como microdeleção no éxon 11, com tamanho de 13,4kb (Figura 3).

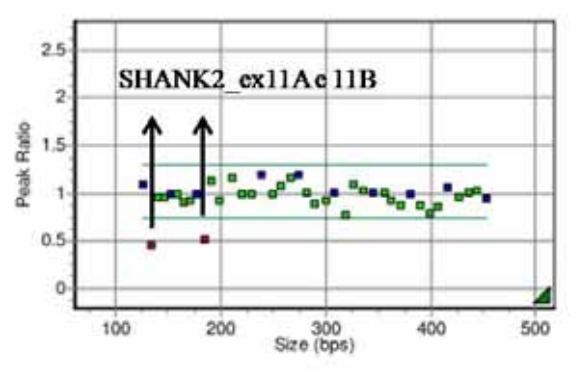


Figura 3. Razão dos picos do MLPA do caso 4398, que mostra a deleção das sondas localizadas no éxon 11 do gene *SHANK2* (vermelho), analisado no programa GeneMarker v.1.97. Em verde estão as sondas localizadas nos outros éxons do gene e em azul estão representadas as sondas controle.

Discussão

Muitas técnicas são utilizadas para detectar variantes genômicas (GOUAS et al., 2008). Entretanto, é importante notar que cada método possui vantagens e limitações em diferentes circunstâncias. As tecnologias baseadas em *microarray* e MLPA estão entre os métodos mais confiáveis e efetivos para investigação destas alterações. Devido ao seu baixo custo, sensibilidade e facilidade de desenvolvimento e implementação, a técnica de MLPA se tornou muito popular como ferramenta diagnóstica e na pesquisa de CNVs (SHEN, WU, 2009), motivo pelo qual foi a opção deste estudo.

Entre os 10 genes sinápticos selecionados para este estudo, não foram encontradas alterações em *UBE3A*, *PTEN* e *SHANK1*.

UBE3A é um candidato à predisposição aos TEA e já foi observado em cerca de 1% dos casos (GLESNER et al, 2009). A ausência de alterações neste estudo pode ter ocorrido pelo fato de terem sido avaliados alguns, e não todos os éxons do gene. O gene *PTEN* também tem sido considerado um candidato em potencial na predisposição ao autismo, em função do seu papel no desenvolvimento cerebral. Mutações *de novo* no gene *PTEN* são referidas como a causa de muitos casos de autismo esporádico, sendo observadas com frequências que variam entre 1 e 17% nas casuísticas, muito provavelmente devido a variações genéticas entre as populações (JING-WEN et al., 2013). A ausência de alterações neste estudo pode significar que alterações neste gene sejam mais raras na população brasileira e que o tamanho da casuística tenha sido insuficiente para detectá-las, uma vez que todos os 25 éxons do gene foram avaliados.

Já as alterações em *SHANK1* parecem estar relacionadas com fenótipos mais leves de autismo e são detectadas com frequências muito baixas nas casuísticas avaliadas, de cerca de 0,02% (SATO et al., 2012), o que também pode explicar a ausência de alterações neste estudo.

Quanto aos genes sinápticos nos quais foram observadas variantes, em *NEDD4* foi encontrada uma deleção de uma trinca GAG que corresponde à mutação descrita c.1616 – 1618del p.(Pro539del) no banco de dados NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) *Exome Variant Server*, numa frequência cerca de quatro vezes maior do que a relatada para a população normal americana e africana. Apesar de se tratar de uma mutação sinônima, ocorre a perda de um aminoácido, uma prolina, que pode causar alteração da estrutura da mesma que apresenta a região N-terminal diminuída, além disso, na região de interação com a proteína TNIK, que regula extensão do dendrito durante o desenvolvimento e a arborização neuronal (UNIPROT, 2014). Assim, pode ser sugerido o envolvimento desta alteração no fenótipo autístico, o que merece ser investigado em estudos futuros.

Também foi observada uma alteração em *DLGAP2* em um paciente, uma mutação sinônima, não descrita em TEA e que não está presente em nenhum dos banco de controles disponíveis. Mudanças de códons sinônimos nem sempre são neutras, indicando sua importância em estudos de associação de doenças. As substituições sinônimas podem afetar a estrutura de dobramento da proteína. Alguns estudos sugerem que os dados de variação sinônima devem ser analisados por meio de valores de uso códon sítio-específicos para inferir o impacto potencial das mudanças no fenótipo (BHARDWAJ, 2014). A seleção evolutiva dos códons, cujas propriedades são ideais para uma célula gerar um padrão de preferência na utilização de códons sinônimos, têm monstrado fortes efeitos na utilização de codóns nos níveis de expressão (CHU et al., 2014). Assim, se este códon encontrado no paciente desempenhar um papel de códon preferencial, os níveis de expressão da proteína Dlgap2 podem estar comprometidos e participar da etiopatogenia dos TEA.

Em um caso foi observada deleção em *SHANK2* e alguns estudos independentes, já revelaram a presença de microdeleções heterozigotas *de novo* neste gene em pacientes com TEA, atraso de fala e atraso do desenvolvimento (SCHLUTH-BOLARD et al., 2013; CHILIAN et al., 2013). Entretanto, ao contrário da maioria dos estudos, LIU et al. (2013), em um estudo de 285 pacientes não observaram casos com alteração em *SHANK2*, questionando um papel "maior" deste gene em chineses com TEA. Mas,

apesar das diversas descrições de microdeleções em *SHANK2* na literatura, o papel desta mutação na patogênese dos TEA não está esclarecido. É interessante que alguns pacientes com microdeleções *de novo* no *SHANK2* também apresentam CNVs em 15q11-q13, já associadas a distúrbios psiquiátricos, incluindo TEA, o que reforça a importância da disfunção sináptica e da hipótese de "multiplos passos complexos" na etiopatogenia dos TEA (LEBLOND et al., 2012). Assim, pode ser sugerida a participação do mesmo na etiologia da doença do paciente aqui estudado, que apresentou uma deleção no éxon 11.

Neste estudo, a estratégia de screening utilizada possibilitou a identificação de 2,3% de alterações que podem estar relacionadas com o fenótipo autístico, inclusive, em *NEDD4*, ainda pouco estudado em TEA. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar os tipos e frequências de alterações genômicas em casuísticas brasileiras.

References

1000 Genomes. A Deep Catalog of Human Genetic Variation. Disponível em: < http://browser.1000genomes.org/index.html)>. Acesso em: 10 dezembro. 2012.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of MentalDisorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR). Washington DC: **AmericanPsychiatric Publishing**, Inc., 2000.

BAKKERS, J. et al. Destabilization of DeltaNp63alpha by Nedd4-mediated ubiquitination and Ubc9-mediated sumoylation, and its implications on dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. **Cell Cycle**, v.4, n.6, p.790-800, 2005.

BERKEL, S. et al. Mutations in SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. **Nature Genetics**, v.42, n.6, p.489-491, 2010.

BHARDWAJ, A. Investigating the role of site specific synonymous variation in disease association studies. **Mitochondrion**, 2014. *No prelo*.

BUCAN, M. et al. Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. PLoS Genetics, v.5, n.6, p. 1000536, 2009.

CHILIAN, B. et al. Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. **Clinical genetics**, 2013. *No prelo*.

CHU, D. et al. Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs. **The EMBO journal**, v.33, n.1, p.21-34, 2014.

CUSCÓ, I. et al. Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamatergic synapse in the etiology of the disorder. **Human molecular genetics**, v.18, n. 10, p.1795-1804, 2009.

DALTON, H.E. et al. Drosophila Ndfip is a novel regulator of Notch signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 7, p. 1150-1160, 2011.

DEVLIN, B.; SCHERER, S.W. Genetic architecture in autism spectrum disorder. **Current opinion in genetics & development**, v.22, n. 3, p.229-237, 2012.

ELSABBAGH, M. et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism research: official journal of the International Society for Autism Research**, v. 5, n.3, p.160-79, 2012.

GLESSNER, J. T. et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. **Nature**, v.459, n.7246, p. 569-573, 2009.

GOUAS, L. et al. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. **Pathologie-Biologie (Paris)**, v. 56, n. 6, p. 345-353, 2008.

GRABRUCKER, A.M. et al. Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. **Trends in cell biology**, v.21, n.10, p. 594-603, 2011.

GREGORIAN, C. et al. Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n.6, p. 1874-1886, 2009.

HADDAD et al. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Human Genetics,** v. 97, n. 6, p. 808-812, 1996.

HALLMAYER, J. et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. **Archives of general psychiatry**, v. 68, n.11, p.1095-1102, 2011.

IPA. Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity® Systems). Disponível em: <www.ingenuity.com>. Acesso em: 05 jan. 2010.

JING-WEN, L.V. et al. Role of the PTEN signaling pathway in autism spectrum disorder. Role of the PTEN signaling pathway in autism spectrum disorder. **Neuroscience bulletin**, v. 29, n.6, p. 773-778, 2013.

LAURITSEN, M. B. Autism spectrum disorders. **European Society of Child and Adolescent Psychiatry**, Suppl 1, S37-S42, 2013.

LEBLOND, C. S. et al. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. **PLoS Genet**, v. 8, n. 2, p. e1002521, 2012.

LEHMAN, N.L. The ubiquitin proteasome system in neuropathology. **Acta neuropathologica**, v. 118, n.3, p.329-347, 2009.

LIU,Y. et al. Lack of association between NLGN3, NLGN4, SHANK2 and SHANK3 gene variants and autism spectrum disorder in a Chinese population. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56639, 2013.

NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server. Disponível em: < http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. Acesso em: 10 dezembro. 2012.

RANTA, S. et al. Positional cloning and characterization of the human DLGAP2 gene and its exclusion in progressive epilepsy with mental retardation. **European journal of human genetics: EJHG**, v.8, n.5, p.381-384, 2000.

ROSTI, R. O. et al. The genetic landscape of autism spectrum disorders. **Developmental medicine child neurology**, v.56, n.1, p. 12-18, 2014.

SAKATA, T. et al. Drosophila Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. **Current Biology: CB**, v.14, n. 24, p. 2228-2236, 2004.

SATO, D. et al. SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. **American journal of human genetics**, v. 90, n. 5, p. 879-887, 2012.

SBACCHI, S. et al. Functional annotation of genes overlapping copy number variants in autistic patients: focus on axon pathfinding. Current Genomics, v. 11, n. 2, ,p. 136-145, 2010.

SCHLUTH-BOLARD, C. et al. Breakpoint mappingby next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/ or congenital malformations. **Journal of medical genetics**, v. 50, n. 3, p. 144–150, 2013.

SCHOUTEN, J.P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, **Nucleic Acids Research**, v.**30**, n. 12:e57, 2002.

SHEN, Y; WU, B.L. Designing a simple Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 36, n. 4, p. 257-265, 2009.

SMITH, S.E. et al. Increased gene dosage of Ube3a results in autism traits and decreased glutamate synaptic transmission in mice. **Science translational medicine**, v.3, n. 103, p.103ra97, 2011.

UCSC GENOME BROWSER . The human genome browser at UCSC. Genome Research, v.12, n.6, p.996-1006, 2002.

UNIPROT. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P46934>. Acesso em: 10 janeiro. 2014.

NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server. Disponível em: < http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. Acesso em: 10 dezembro. 2012.

VERPELLI, C. et al. Scaffold proteins at the postsynaptic density. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 970, p. 29-61, 2012.

WU, K. et al. Glutamate system genes and brain volume alterations in pediatric obsessive-compulsive disorder: a preliminary study. **Psychiatry research**, v. 211, n.3, p. 214-220, 2013.

8.4 Apêndice D – Is the autism phenotype in Rett Syndrome only due to mutations in MECP2?

Is the autism phenotype in Rett Syndrome only due to mutations in *MECP2*?

Ana Luiza Bossolani-Martins[1]; Danielle de P. Moreira[2]; Naila C. V. Lourenço[2]; Monize Lazar[2]; Cintia M. Ribeiro[2]; Karina Griesi-Oliveira[2]; Agnes C. Fett-Conte[3]; Maria Rita Passos-Bueno[2].

Affiliations: [1]Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; [2] Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP), São Paulo, São Paulo, Brazil; [3]Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Running Title: Two hits in Rett Syndrome

Corresponding Author:

Maria Rita Passos Bueno PhD.

Rua do Matão, 277

Sala 200 - Instituto de Biociências

Universidade de São Paulo

São Paulo – SP - Brasil

Zip Code: 05508-900

Phone: 55+11+30919910

Fax:55+11+30917416

E-mail: passos@ib.usp.br

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASD) represent an heterogenous group of neurodevelopmental disorders characterized by a core set of social-communicative and behavioral impairments. The genetic causes of ASD are heterogeneous and still not fully known, but about 5-10% of ASD individuals harbors rare micro-chromosome alterations (CNVs). ASD is part of several genetic disorders, as Rett syndrome (RTT), a Mendelian disorder caused mainly by mutations in *MECP2*. It has been shown that 30-50% of RTT patients present autistic behavior. In the present report, we describe a girl with autistic-like behavior and with clinical diagnosis of RTT who presented both *de novo* mutations on *MECP2* and the CNV at 16p11.2. These results raise the possibility that a second hit may contribute to the autistic behavior in RTT, a hypothesis that deserve to be investigated in a larger number of RTT cases. Genetic counseling in affected individuals with two genetic hits might have different outcomes depending on the inheritance of the causative or predisposing mutation.

KEY WORDS

Multiple hits; Methyl-CpG-Binding Protein 2; Autism Spectrum Disorders; DNA Copy Number Variation; 16p11.2, genetic counseling

INTRODUCTION

Autism Spectrum Disorders (ASD) and Rett syndrome (RTT) are classified as distinct disorders based on their clinical features and etiology. ASD are common neurodevelopmental disorders, with prevalence of 1:110 [Kogan et al., 2009], characterized by three core symptom domains: ritualistic-repetitive behaviors, impaired social interaction and impaired communication and language [Alarcon et al., 2008; Cargile et al., 2002;]. Several candidate loci, particularly micro-alterations or copy number variations (CNVs), have been identified as causative of ASD using genomic tools [International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998; Philippe et al.,1999]. Most of the causative mutations of ASD are private. Exceptions to this rule are the CNVs at 15q11-q13.3, 16p11.2 and 22q13 and point mutations at *CHD8* [Christian et al., 2008; Horev et al., 2011; Schroer et al., 1998], which accounts for nearly 4% of all ASD individuals. These ASD mutations are also usually associated with phenotypic non-penetrance. A growing number of evidences suggest that the penetrance of the phenotype depends on multiple hits [Bijlsma et al., 2009; Ghebranious et al., 2007; Grayton et al., 2012; Walker; Scherer, 2013].

Rett syndrome is a rare neurodevelopmental disorder that affects 1/10,000 to 1/15,000 females [Laurvick et al., 2006]. RTT is characterized by an initial period of apparently normal development until 6 to 12 months, followed by a period of rapid decline with loss of hand use and spoken language and the onset of stereotypic hand movements, abnormal gait, and growth failure [Hagberg et al., 2002]. RTT is an X-linked dominant disorder caused mainly by *de novo* mutations in methyl-CpG-binding protein 2 (*MeCP2*), at Xq28 [Amir et al., 1999]. Autistic-like behavior is observed in 30-50% of the cases with RTT [Wulffaert et al., 2009].

Here we present a girl with autistic-like behavior for whom it was requested molecular tests both for RTT as well as for ASD.

MATERIAL AND METHODS

Genomic DNA was extracted from peripheral white blood cells by standard procedures. The third and fourth coding exons of *MECP2* were analyzed by the Sequencing facility of the Human Genome Research Center (http://genoma.ib.usp.br/?page_id=922), using standardized protocols (ABI-3730 DNA Analyzer;Applied Biosystems). Primers and detailed PCR conditions are available under request. The sequences were aligned with normal *MECP2* reference sequence (NM_004992.3) using DNA Sequence Analysis Software - Sequencher 5.1 software.

SALSA MLPA P343 Autism-1 probemix commercial kit (MRC, Holland), with probes for 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13, was used for Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) test, according to manufacturer protocol. Analysis of the peaks of GeneMapper program (version 4.0) and the interpretation of the results were performed in Genemarker program (version 1.97) in which were considered as reference ratio below 0,75 and above 1,30 as deletion and duplication, respectively. This study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Biosciences, University of São Paulo (IB-USP) protocol n°121/2011. Written consent for the study was given by the proband's parents.

Clinical history

The propositus, female was first evaluated by us at the age of 7 years old. She was born at 35 weeks gestation by normal vaginal delivery, with less than 2kg and from

a dizygotic twin pregnancy. The parents are non-consanguineous, mother was 24 years old and father was 25 years old at time of the infant´s birth, in Saboya Hospital, Sao Paulo city, Brazil. The patient´s mother has multiple episodes of vaginal bleeding, threatened miscarriage with hospitalization for inhibition of delivery in the 6th month. Family history included one spontaneous abortion (III-2) at the 4th month of pregnancy. Other family members were considered healthy (FIG.1).

Developmental history revealed hypotonia from birth, difficulties in breast feeding, never crawled, falling very often when started to walk at 2 years old. She walked, with the legs extended and rocking the body laterally, with no signs of scoliosis. At the age of 3 years old, she started to show stereotypic movements of the hands and body, twisting her fingers and taking them to her mouth, retained some manual skills, holding objects and dropping them. She also presented hyperpnea, bruxism and poor eye contact, impairment of speech, echolalia, autistic behavior and intellectual disabilities. At 5 years old, she was diagnosed with autism, according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th. Edition - DSM-IV criteria (APA, 2000), P04 and E45, according to International Classification of Diseases - ICD-10.

She also met criteria for RTT at 6 years old after another clinical assessment. Her head circumference in this period was 47cm (P<2nd percentile), weight was 14,7Kg (< 3rd percentile) and stature was 105cm (<3rd percentile). Clinical evaluation revealed facial abnormalities as frontal bossing, deployment of high hair on the forehead, slanting down palpebral fissures, short philtrum, wide mouth, protruding auricles and prognathism. The head MRI (magnetic resonance imaging), echocardiogram, TSH/T4L/PKU and karyotype by conventional G-band were all normal. The brain stem-evoked response audiometry (BERA) was intact indicating normal hearing in the left and right sides. The main phenotypic features of the proband are shown in Table I.

Molecular and Genotype-Phentoype correlation analysis

Molecular analysis in the proband revealed the mutation c.763C>T (p.Arg255X) at *MECP2* and one heterozygous deletion at 16p11.2 spanning about 716Kb and encompassing *DOC2, HRIP3, MAPK3, MAZ, MVP, SEZ6L2* and *SPN* (FIG. 2). The mother and twin sister were also tested for *MECP2* and the results were normal. With the exception of the individual III-9 (FIG. 1), the other siblings were tested for the 16p11.2 CNV and none of them carry this alteration. Thus, both the c.763C>T at *MECP2* and the 16p11.2 CNV in the proband are *de novo* mutations (FIG. 2).

We have next compared the clinical features of our patient with those reported in typical RTT patients and 16p11.2 deletion cases (Table I). We observed that the proband presented nearly all the clinical features of RTT or of the16p deletion syndrome.

DISCUSSION

We here describe the occurrence of two *de novo* pathogenic mutations, a CNV at 16p11.2 and a nonsense mutation in *MECP2*, in a single patient with RTT and autistic features. The mutation c.763C> T in *MECP2* is located in one of the hotspots of the gene and has already been described in several RTT patients with no doubts about its pathogenicity. The 16p11.2 microdeletion consistently impacts cognitive functioning and behavior, and it is considered a risk factor to autism [Zufferey et al, 2012]. Despite being one of the most recurrent rearrangement among ASD patients accounting for about 1% of ASD cases, it is not found in controls [Glessner et al., 2009; Shen et al., 2010; Shinawi et al., 2010, Moreira et al., 2013 manuscript in preparation)

The clinical features of this girl fulfill the diagnostic criteria of RTT. Although there is a great clinical overlap between RTT and 16p11.2 deletion syndrome, we observed that the proband does not present some of the specific clinical features of the 16p11.2 deletion syndrome, such as overweight or macrocephaly. It is of particular interest that autistic features occurs in 30-50% of the RTT individuals, while they are present in about 18% of individuals with 16p11.2 deletion syndrome [Shinawi et al., 2010]. It is known that *MECP2* regulates *UBE3A* and *GABRB3* in 15q region [Samaco et al., 2005], a region also known to be associated with ASD. Dysregulation of these genes by lack of *MECP2* could thus explain the autistic features among RTT individuals. It is noteworthy that recently, Longo et al, [2004] reported three RTT individuals with *MECP2* mutations and also carriers of 15q11-13 rearrangements. These observations raise the possibility that other hits along the genome might contribute to the penetrance of autistic features in RTT individuals. Therefore, it is possible that the autistic feature found in 30-50% of RTT patients also depends on a second hit, such as CNVs at 16p11.2 or 15q11-q13.

The genetic counseling involving two independent alterations can be challenging, particularly for the CNVs at 15q11-q13 or 16p11.2, which are associated with an still unknown penetrance [Ciuladaitê et al., 2011; Urraca et al., 2013]. It has been observed that about 40% of ASD carriers of 15q11-q13 or 16p11.2 CNVs have inherited the CNV from one healthy parent [Devlin; Sherer, 2012]. In our case, as both mutations were *de novo*, we considered low the recurrence risk for RTT or ASD. However, if the 16p11.2 CNV had been inherited from a non-penetrant parent, a risk for ASD should also be considered.

In summary, we discovered two rare mutational events in the present proband, which have raised the question about the need to test *MECP2* and ASD CNVs in patients with clinical features of RTT and autistic features. In addition, our data suggest the importance to verify in larger cohorts if the autistic features in RTT patients depend on additional genomic hits.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Grants 2010/14943-6). The authors would like to acknowledge all the participants in this study and family.

INTERNET ADDRESSES

World Health Organization - International Classification of Diseases (ICD-10): http://www.who.int/en/

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man: http://omim.org/entry/312750

REFERENCES

American Psychiatric Association. 2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition - Text Revision (DSMIV-TR). Washington, DC: American Psychiatric Association. 943p.

.

Alarcón M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH. 2008. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. Am J Hum Genet. 82:150-159.

Allanson JE, Hennekam RC, Moog U, Smeets EE. 2011. Rett Syndrome: A Study of the Face. Am J Med Genet A 155A:1563-1567.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet. 23:185-188.

Bardakjian TM, Kwok S, Slavotinek AM, Schneider AS. 2010. Clinical report of microphthalmia and optic nerve coloboma associated with a de novo microdeletion of chromosome 16p11.2. Am J Med Genet A. 152A:3120-3123.

Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, Fransen van de Putte DE, Anderlid BM, Lundin J, Lapunzina P, Pérez Jurado LA, Delle Chiaie B, Loeys B, Menten B, Oostra A, Verhelst H, Amor DJ, Bruno DL, van Essen AJ, Hordijk R, Sikkema-Raddatz B, Verbruggen KT, Jongmans MC, Pfundt R, Reeser HM, Breuning MH,

Ruivenkamp CA. 2009. Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. Eur J Med Genet. 52:77-87.

Cargile CB, Goh DL, Goodman BK, Chen XN, Korenberg JR, Semenza GL, Thomas GH. 2002. Molecular cytogenetic characterization of a subtle interstitial del(3)(p25.3p26.2) in a patient with deletion 3p syndrome. Am J Med Genet. 109:133-138.

Christian SL, Brune CW, Sudi J, Kumar RA, Liu S, Karamohamed S, Badner JA, Matsui S, Conroy J, McQuaid D, Gergel J, Hatchwell E, Gilliam TC, Gershon ES, Nowak NJ, Dobyns WB, Cook EH Jr. 2008. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. Biol Psychiatry. 63:1111-1117.

Ciuladaitė Z, Kasnauskienė J, Cimbalistienė L, Preikšaitienė E, Patsalis PC, Kučinskas V. 2011. Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. J Appl Genet. 52:443-449.

Devlin B, Scherer SW. 2012. Genetic architecture in autism spectrum disorder. Curr Opin Genet Dev. 22:229-237.

Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, Joseph-George AM, Mackay S, Whitten K, Noble B, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Tucker E, Turner L, Marshall CR, Scherer SW. 2010. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. J Med Genet. 47:195-203.

Ghebranious N, Giampietro PF, Wesbrook FP, Rezkalla SH. 2007. A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation. Am J Med Genet A. 143A:1462-1471.

Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PM, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garris M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, Game RM, Rudd DS, Zurawiecki D, McDougle CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Kolevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T, McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JI, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SF, Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD, Hakonarson H. 2009. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. Nature. 459:569-573.

Grayton HM, Fernandes C, Rujescu D, Collier DA. 2012. Copy number variations in neurodevelopmental disorders. Prog Neurobiol. 99:81-91.

Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. 2002. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, September 11, 2001. Eur J Paediatr Neurol. 6:293-297.

Hanson E, Nasir RH, Fong A, Lian A, Hundley R, Shen Y, Wu BL, Holm IA, Miller DT; 16p11.2 Study Group Clinicians. 2010. Cognitive and behavioral characterization of 16p11.2 deletion syndrome. J Dev Behav Pediatr. 31:649-657.

Horev G, Ellegood J, Lerch JP, Son YE, Muthuswamy L, Vogel H, Krieger AM, Buja A, Henkelman RM, Wigler M, Mills AA. 2011. Dosage-dependent phenotypes in models of 16p11.2 lesions found in autism. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:17076-17081.

International Molecular Genetic Study of Autism Consortium: A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. 1998. Hum Mol Genet. 7:571-578.

Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA, Boyle CA, Perrin JM, Ghandour RM, Singh GK, Strickland BB, Trevathan E, van Dyck PC. 2009. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. 124:1395-1403.

Laurvick CL, de Klerk N, Bower C, Christodoulou J, Ravine D, Ellaway C, Williamson S, Leonard H. 2006. Rett syndrome in Australia: a review of the epidemiolog. J Pediatr. 148:347-352.

Longo I, Russo L, Meloni I, Ricci I, Ariani F, Pescucci C, Giordano CT, Canitano R, Hayek G, Zappella M, Neri G, Renieri A, Gurrieri F. 2004. Three Rett patients with both MECP2 mutation and 15q11-13 rearrangements. Eur J Hum Genet. 12:682-685.

Philippe A, Martinez M, Guilloud-Bataille M, Gillberg C, Råstam M, Sponheim E, Coleman M, Zappella M, Aschauer H, Van Maldergem L, Penet C, Feingold J, Brice A, Leboyer M. 1999. Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study. Hum Mol Genet. 8:805-812.

Samaco, R. C.; Hogart, A.; LaSalle, J. M. 2005. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. Hum Mol Genet. 14:483-492.

Schaaf CP, Goin-Kochel RP, Nowell KP, Hunter JV, Aleck KA, Cox S, Patel A, Bacino CA, Shinawi M. 2011. Expanding the clinical spectrum of the 16p11.2 chromosomal rearrangements: three patients with syringomyelia. Eur J Hum Genet. 19:152-156.

Schroer RJ, Phelan MC, Michaelis RC, Crawford EC, Skinner SA, Cuccaro M, Simensen RJ, Bishop J, Skinner C, Fender D, Stevenson RE. 1998. Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. Am J Med Genet. 76:327-336.

Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB, Miller KJ, Frazier JA, Silverstein I, Picker J, Weissman L, Raffalli P, Jeste S, Demmer LA, Peters HK, Brewster SJ, Kowalczyk SJ, Rosen-Sheidley B, McGowan C, Duda AW 3rd, Lincoln SA, Lowe KR, Schonwald A, Robbins M, Hisama F, Wolff R, Becker R, Nasir R, Urion DK, Milunsky JM, Rappaport L, Gusella JF, Walsh CA, Wu BL, Miller DT; Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. 2010. Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders. Pediatrics. 125:e727-735.

Shimojima K, Inoue T, Fujii Y, Ohno K, Yamamoto T. 2009. A familial 593-kb microdeletion of 16p11.2 associated with mental retardation and hemivertebrae. Eur J Med Genet. 52:433-435.

Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, Pursley A, Clark G, Lee J, Proud M, Stocco A, Rodriguez DL, Kozel BA, Sparagana S, Roeder ER, McGrew SG, Kurczynski TW, Allison LJ, Amato S, Savage S, Patel A, Stankiewicz P, Beaudet AL, Cheung SW, Lupski JR. 2010. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. J Med Genet. 47:332-341.

Urraca N, Cleary J, Brewer V, Pivnick EK, McVicar K, Thibert RL, Schanen NC, Esmer C, Lamport D, Reiter LT. 2013.The interstitial duplication 15q11.2-q13 syndrome includes autism, mild facial anomalies and a characteristic EEG signature. Autism Res. 6:268-279.

Walker, S.; Scherer, S. W. 2013. Identification of candidate intergenic risk loci in autism spectrum disorder. BMC Genomics. 14:499.

Wulffaert J, Van Berckelaer-Onnes IA, Scholte EM. 2009. Autistic disorder symptoms in Rett syndrome. Autism : the international journal of research and practice. Autism. 13:567-581.

Zufferey F, Sherr EH, Beckmann ND, Hanson E, Maillard AM, Hippolyte L, Macé A, Ferrari C, Kutalik Z, Andrieux J, Aylward E, Barker M, Bernier R, Bouquillon S, Conus P, Delobel

B, Faucett WA, Goin-Kochel RP, Grant E, Harewood L, Hunter JV, Lebon S, Ledbetter DH, Martin CL, Männik K, Martinet D, Mukherjee P, Ramocki MB, Spence SJ, Steinman KJ, Tjernagel J, Spiro JE, Reymond A, Beckmann JS, Chung WK, Jacquemont S; Simons VIP Consortium; 16p11.2 European Consortium. 2012. A 600 kb deletion syndrome at 16p11.2 leads to energy imbalance and neuropsychiatric disorders. J Med Genet. 49:660-668.

Table I. Comparison of phenotypic features of the proband and phenotypic features present in affected individuals with RTT and 16p11.2 deletion.

Features clinical	Rett Syndrome (763C>T/p.Arg255X)	16p11.2 deletion	Proband (Rett syndrome and 16p11.2 deletion)
Abnormal sleep patterns	+	-	+
Respiratory dysfunctions (hiperpnea)	+	-	+
Constipation	+	-	+
Microcephaly	+	-	+
Eating difficulties	+	-	+
Loss of purposeful hand motions	+	-	+
Muscle rigidity/spasticity	+	-	-
Repetitive hand motions	+	-	+
Scoliosis	+	-	-
Bruxism	+	-	+
Developmental delay	+	+(100%)	+
Motor delay	+	+(50%)	+
Speech delay/ Non verbal	+	+(100%)	+
Autism	+(31-50%)	+(18%)	+
Short palpebral fissures	-	-	+
Long philtrum	-	-	+
Thin upper lip	-	-	-
Maxillary hypoplasia	-	-	-
Short nose	-	-	-
Hypotonia	+	+	+
Low weight after birth	-	-	+
Overweight after birth	-	+	-
Macrocephaly(Infancy and Childhood)	-	+	-
Hypertelorism	+	+	+
Wide mouth	+	+ (1/3 = 33%)	+
Pointed chin	+	+(1/3 = 33%)	-

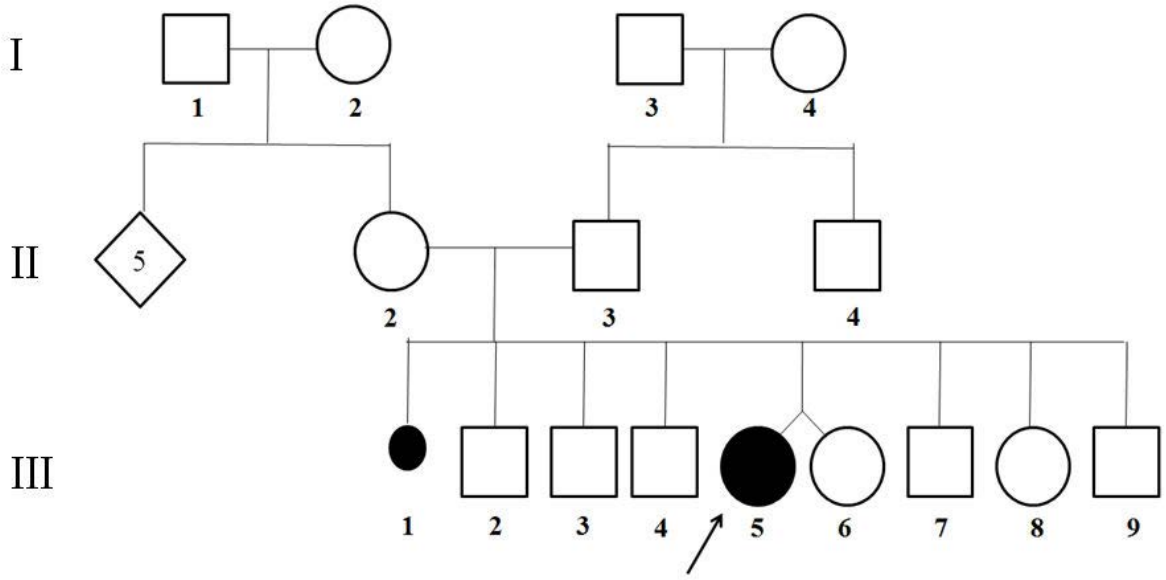
+ = presence of the characteristic; - = absence of the characteristic

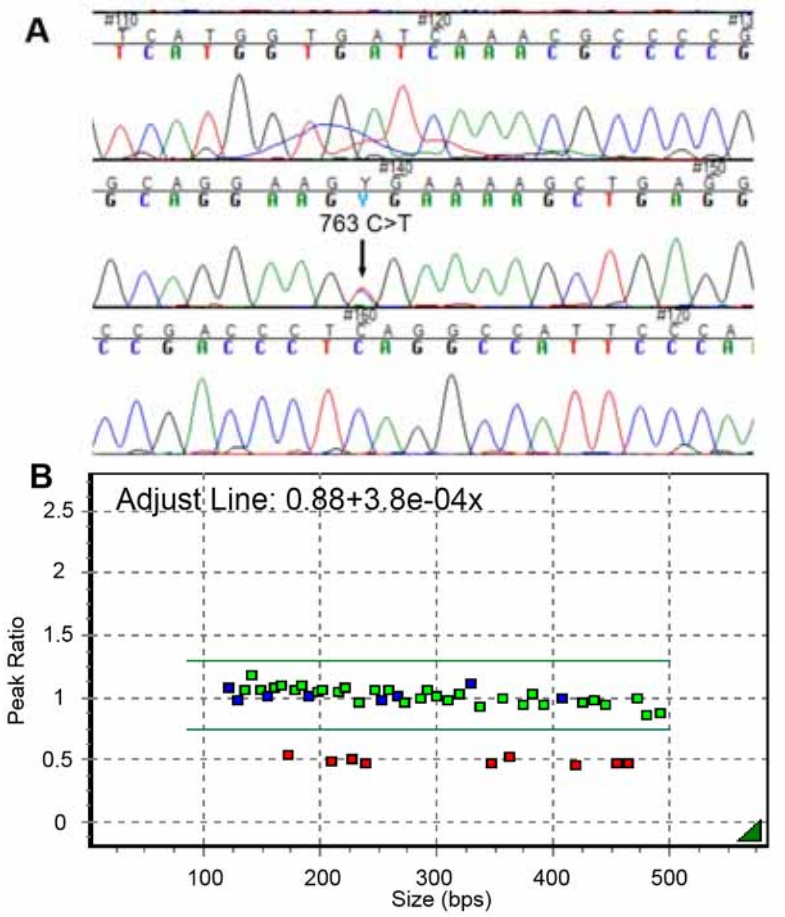
[Ghebranious et al., 2007; Bijlsma et al., 2009; Shimojima et al., 2009; Bardakjian et al., 2010; Fernandez et al., 2010; Hanson et al., 2010;Allanson et al., 2011; Shinawi et al., 2010; Schaaf et al., 2011; Čiuladaitė et al., 2011; http://omim.org/entry/312750].

LEGENDS FOR FIGURES

FIG. 1. Summarized genealogy of the proband (III-5) with Rett Syndrome and16p11.2 deletion.

FIG. 2. (A) DNA sequence chromatogram from RTT patient showing an heterozygous mutation in *MECP2* (c.763C>T/p.Arg255X). (B) MLPA peak ratio for 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 probes of patient. Red, probes with peak ratio ≤0,75, corresponding to deletions of *DOC2, HRIP3, MAPK3, MAZ, MVP, SEZ6L2* and *SPN* genes localized on chromosomal region 16p11.2; Green, normal probes with peak ratio ≥0,75 and ≤1,3 and control probes (blue).


I
1
2
3
4
II
5
2
3
4
III
1
2
3
4
5
6
7
8
9


A
763 C>T
B
Adjust Line: 0.88+3.8e-04x
Peak Ratio
2.5
2
1.5
1
0.5
0
100
200
300
400
500
Size (bps)

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto,____/____/____

_____
Assinatura