

## **TRANSTORNO ESPECTRO AUTISTA TEA: DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL**

*Laryssa R. Bueno<sup>1</sup>, Luma Q. Paini<sup>2</sup>, Juliana S. Schauren<sup>3</sup>*

### **Resumo**

O transtorno do Espectro Autista TEA é um conjunto de distúrbios do neurodesenvolvimento que tem como característica a dificuldade no convívio social e na comunicação do indivíduo e ainda relutância ao afastar-se de rotinas, deficiência intelectual baixa com dificuldade em exercer habilidades comportamentais simples, hiperatividade, distúrbios do sono e epilepsia dentre todas as síndromes relevantes no TEA. Afeta 1% da população sendo mais prevalente em homens do que mulheres é hereditário em cerca de 50% a 90% dos casos o que explica a importância de compreender os aspectos genéticos para ter informações sobre o risco de recorrência, prognóstico e terapêutica. A síndrome do x-frágil foi a de escolha para estudo, pois é a que ocorre em maior prevalência dentre as síndromes monogênicas. A síndrome do X-frágil possui características clínicas presentes como face alongada, orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das articulações, macroorquidia e prega palmar transversa e alguns sinais comportamentais como morder as mãos, movimentos repetitivos com as mãos, aversão ao contato físico e pouco contato visual, esses pacientes possuem ansiedade, variação de humor, hiperatividade e agressividade, esses sinais e sintomas estão presentes em 90% dos casos mas não confirmam o diagnóstico, dessa forma é necessária a confirmação através de testes genéticos.

*Palavras-chave:* Diagnóstico para Transtorno Espectro Autista. Testes genéticos para autismo. Transtorno Espectro Autista. Síndrome do X-frágil.

### **Abstract**

The Autistic Spectrum Disorder (TEA) is a set of neurodevelopmental disorders characterized by difficulty in social interaction and communication of the individual and still reluctance to move away from routines, low intellectual disability with difficulty in exercising simple behavioral skills, hyperactivity, sleep disorders and epilepsy among all relevant syndromes in ASD. Affects 1% of the population being more prevalent in men than women is hereditary in about 50% to 90% of cases which explains the importance of understanding the genetic aspects to have information about the risk of recurrence, prognosis and therapy. The x-fragile syndrome was the one of choice for study, since it is the one that occurs in greater prevalence among the monogenic syndromes. The X-fragile syndrome has clinical features present as elongated face, prominent ears, hyperextensibility of the joints, macroorchidia and transverse palmar fold and some behavioral signs such as biting hands, repetitive hand movements, aversion to physical contact and poor visual contact, these patients have anxiety, mood swings, hyperactivity and aggressiveness, these signs and symptoms are present in 90% of the cases but do not confirm the diagnosis, so confirmation through genetic testing is necessary.

*Keywords:* Diagnosis for Autistic Spectrum Disorder. Genetic Tests for Autism. Autistic Spectrum Disorder. X-Fragile Syndrome.

1 Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR). Endereço eletrônico para correspondência: Laryssa Regis Bueno, laryssaregis@hotmail.com

2 Acadêmico do curso de Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba PR.

3 Biomédica, Prof. Doutora da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR). Endereço eletrônico para correspondência: Juliana da Silveira Schauren, juliana.schauren@utp.com.br

## 1. Introdução

O transtorno do Espectro Autista TEA é um conjunto de distúrbios do neurodesenvolvimento que tem como característica a dificuldade no convívio social e na comunicação do indivíduo e ainda relutância ao afastar-se de rotinas, deficiência intelectual baixa com dificuldade em exercer habilidades comportamentais simples, hiperatividade, distúrbios do sono e epilepsia (OLIVEIRA & SERTIÉ, 2017).

O autismo foi descrito pela primeira vez em 1943 pelo psiquiatra infantil Kanner, que relatou como uma síndrome isolada tendo como principal característica a obsessão e insistência na preservação da mesmice e a solidão autista, era considerada como uma forma de esquizofrenia infantil e isso permaneceu durante 30 anos. Foi apenas em 1980 que o autismo foi formalmente reconhecido como sua própria entidade de diagnóstico clínico, definida com três características essenciais: deficiência na comunicação, falta de interesse em outras pessoas e comportamentos bizarros (ZIATS & RENNERT, 2016).

Normalmente é realizado o diagnóstico em torno dos três anos de idade (GONÇALVES et al., 2017). O TEA afeta 1% da população sendo mais prevalente em homens do que mulheres é hereditário em cerca de 50% a 90% dos casos o que explica a importância de compreender os aspectos genéticos para ter informações sobre o risco de recorrência, prognóstico e terapêutica (OLIVEIRA & SERTIÉ, 2017).

A etiologia do TEA ainda não é totalmente conhecida, mas sabe-se que há 2% de anormalidades cromossômicas, 5% relacionado a síndromes monogênicas, 10% relacionado a microduplicações e microdeleções, 3% são causas ambientais e 80% está relacionado a causas multifatoriais e epigenética (FREITAS, 2017).

O autismo também pode estar associado a distúrbios metabólicos em um número relativamente pequenos dos casos, mesmo assim recomenda-se investigações de erros inatos do metabolismo em todos os pacientes com TEA (OLIVEIRA & SERTIÉ, 2017).

Quanto às causas genéticas temos as alterações cromossômicas microscopicamente visíveis que são mais frequentemente encontradas em casos de TEA, como a duplicação 15q11-q13 e as deleções 2q37, 22q11.2, 22q13.3 e 16p11, juntas tem uma incidência de 3% a 5% (FREITAS, 2017).

Há também as alterações conhecidas na forma de comorbidades com síndromes genéticas monogênicas, como as síndromes do x-frágil com alteração no gene FMR1, síndrome Rett com alteração no gene MECP2, esclerose tuberosa com alteração nos genes TSC1 e TSC2, síndrome de Angelman com alteração no gene UBE3A, neurofibromatose com alteração no gene NF1 entre outras síndromes que estão fortemente ligadas ao TEA, grande parte destas síndromes são causadas por microdeleções e microduplicações as designadas CNVs que nada mais são que o número de cópias submicroscópicas anormais de segmentos de DNA do genoma humano, que podem ser herdadas ou podem ser ocasionadas a partir de mutações esporádicas (FREITAS, 2017).

O Biomédico tem grande importância no diagnóstico do autismo, pois é um profissional altamente capacitado para atuar diretamente no laboratório com testes genéticos, moleculares e pesquisa de genes, dessa forma o diagnóstico será mais rápido para que o médico neurologista, psiquiatras e toda a equipe multidisciplinar possa orientar a família e iniciar um tratamento adequado a esse paciente.

Este trabalho tem como objetivo descrever as características genéticas do TEA: Transtorno Espectro Autista e a síndrome monogênica X- frágil com sintomas que incluem o TEA e que merece atenção especial, devido a uma alta prevalência entre indivíduos com autismo que é necessário realizar testes genéticos.

## 2. Metodologia

Este estudo caracteriza-se por uma revisão bibliográfica, onde foram pesquisados artigos sobre TEA: Transtorno Espectro Autista e testes genéticos para diagnóstico da síndrome do X-frágil. Esta pesquisa foi baseada em busca de artigos nas bases de dados “google acadêmico”, Pubmed e Scielo onde foram utilizados os termos de busca: “Transtorno Espectro Autista”, “Diagnóstico para Transtorno Espectro Autista”, “Testes genéticos para autismo”, “genes do autismo”, “síndrome do X-frágil”. No período de julho à novembro de 2018.

## 3. Discussão

Dentre as três síndromes monogênicas a de maior prevalência entre os pacientes com TEA é a síndrome do X-frágil.

### *Síndrome do X-frágil*

A síndrome do X-frágil (SXF) além do histórico familiar de deficiência mental, possuem características clínicas presentes como face alongada, orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das articulações, macroorquidia e prega palmar transversa e alguns sinais comportamentais como morder as mãos, movimentos repetitivos com as mãos, aversão ao contato físico e pouco contato visual, esses pacientes possuem ansiedade, variação de humor, hiperatividade e agressividade, esses sinais e sintomas estão presentes em 90% dos casos mas não confirmam o diagnóstico, dessa forma é necessária a confirmação através do exame genético com técnicas específicas para a síndrome estudada (KUMARI & USDIN, 2010).

Os homens são mais afetados do que as mulheres porque são homocigóticos para o cromossomo X e as mulheres possuem a compensação do outro cromossomo X, dessa forma as mulheres que são portadoras do gene mutado irão apresentar sinais e sintomas mais leves que

vão variar de acordo com o grau de mutação ou pré-mutação em que se encontra o gene FMR1 (OOSTRA & WILLEMSSEN, 2009).

É uma síndrome monogênica de herança recessiva ligada ao X, com alteração no gene FMR1 (Fragile X-linked Mental Retardation Type 1), que causa distúrbios de neurodesenvolvimento ligado ao TEA (KUMARI & USDIN, 2010).

Na SXF o cromossomo X refere-se a um marcador citogenético (FRAXA) conhecido de sítio frágil folato-sensível, onde a cromatina não se condensa, esta localizado no Xq27.3, é uma região que está sujeita a quebras frequentes. O gene FMR1 contém 38 quilobases, 17 éxons e 16 introns apresenta em sua região 5' não traduzida um microsatélite de trinucleotídeos CGG e é transcrito em um mRNA de 4,8 quilobases onde serve de molde para sintetizar a proteína FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), o sequenciamento deste gene em humanos revelou um total de 185.775 pares de bases em sua constituição (KHALIL et al., 2008).

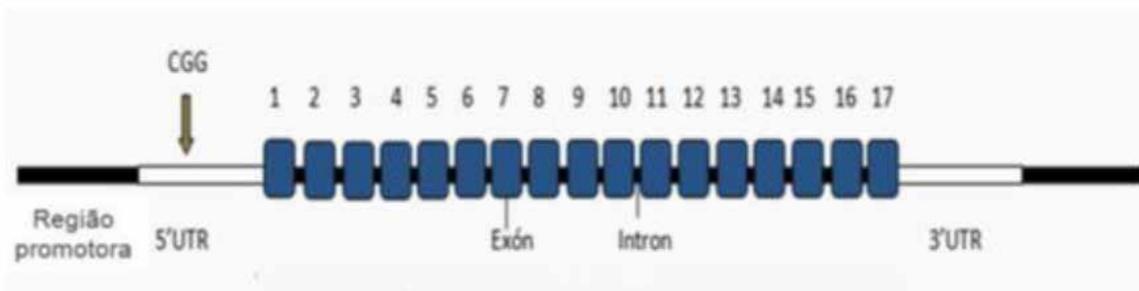


Figura 1. Representação esquemática do gene FMR1  
Fonte: Gomez, 2011.

Resultados moleculares demonstraram a presença da expansão de CGG no gene FMR1, a região gênica foi então chamada de sítio FRAXA, já foram descritos outros sítios frágeis no cromossomo X como o FRAXD, FRAXE e FRAXF. O FRAXE está relacionado a mutação no gene FMR2 e contém repetição de CGG instáveis que também tem relação com retardo mental, o sítio FRAXF e o FRAXD não causa nenhum fenótipo anormal aparentemente, são localizados em regiões muito próximas ao sítio FRAXA. Devido ao fato desses sítios estarem localizados a regiões próximas do cromossomo X e co-localizados ao FRAXA isso pode dificultar na interpretação e na análise citogenética dos pacientes da SXF (BIACSI, 2008).

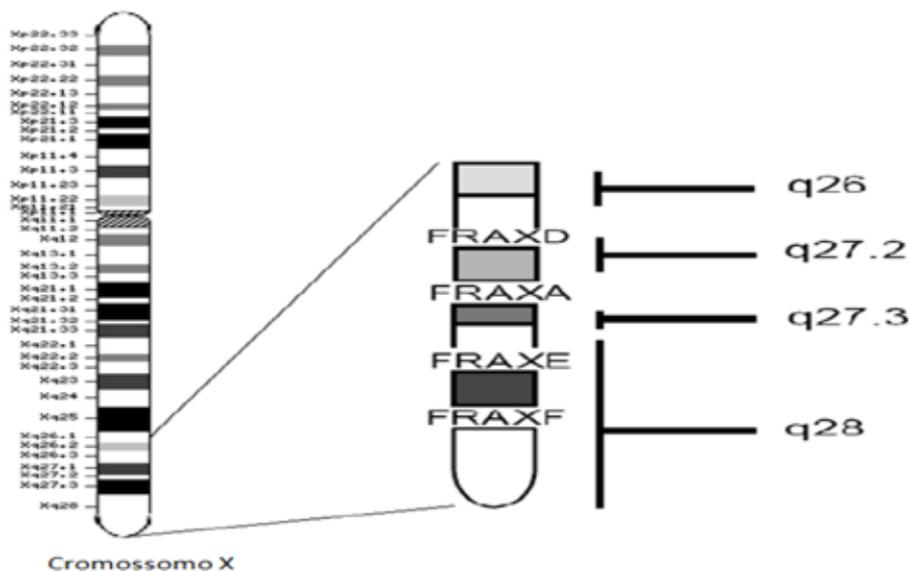


Figura 2. Ideograma do cromossomo X  
 Fonte: Gomez, 2011.

## Testes genéticos da SXF

Antes de identificarem o gene FMR1 como responsável pela síndrome da X-frágil o diagnóstico era feito por meio de cariótipo, porém não é mais recomendado por se tratar de uma técnica com baixa sensibilidade, baixa especificidade e um risco relativamente alto para diagnóstico falso-negativo (SHNTORCH et al., 2012).

A genética molecular deixou mais compreensível a variabilidade do sítio frágil, contanto que as mutações estejam contrárias em uma mesma família, a identificação molecular do gene FMR1, tornou-se o padrão ouro para o diagnóstico confiável da SXF, dessa forma indivíduos que possuem deficiência intelectual como o autismo ou que tenham sinais sugestivos do quadro clínico da doença, é necessário se submeter ao teste genético molecular para definir o número de cópias CGG que está no gene FMR1. Os diagnósticos realizados para a SXF envolvem a análise cromossômica ou cariótipo, testes de imunocitoquímica e imunohistoquímica que apresenta a porcentagem de proteína FMRP nas células e os diagnósticos moleculares por Southern Blotting, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), sequenciamento e MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) (YIM et al., 2008).

## Análise citogenética

É uma técnica que consiste no estudo numérico e morfológico de cromossomos metafásicos dentre os métodos laboratoriais para diagnóstico para a SXF a análise citogenética foi a primeira descrita. Para realizar essa técnica que também é conhecida como cariótipo para a síndrome do

X-frágil, as culturas celulares são incubadas em meios de cultura com baixo ácido fólico para induzir a fragilidade na região Xq27.3 do cromossomo, processos de incubação e bandeamento G concede a visualização e classificação dos cromossomos, esse método pode falhar na detecção da fragilidade em mulheres e homens afetados pela síndrome. Com a baixa especificidade e sensibilidade esse método não é muito utilizado para o diagnóstico da SXF, a principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de identificar outras alterações cromossômicas em indivíduos com outros distúrbios (SHNTORCH et al., 2012).



Figura 3. Imagem de Cromossomo X metafásico  
Fonte: Queiroz, 2006.

### *Testes de imunocitoquímica e imunohistoquímica*

O teste de imunocitoquímica indica percentual de FMRP em linfócitos das amostras dos pacientes, esses linfócitos são visualizados em microscópio óptico e estabelece o percentual através do número de linfócitos positivos são os que apresentarem coloração avermelhada, os pacientes afetados apresentam de 0 a 15% de FMRP enquanto que pessoas normais possuem de 80 a 100%. Essa técnica é eficiente no diagnóstico de pacientes afetados do sexo masculino (STOGER, 2011).

O teste de imunohistoquímica identifica a presença ou ausência da proteína FMRP e pode ser usado como um método alternativo no diagnóstico pré-natal em amostras de fetos do sexo masculino quando há indicação clínica de mutação completa, em casos de fetos do sexo feminino não é recomendado no diagnóstico pré-natal pois pode dar resultado falso-negativo ou falso-positivo, os autores dizem que esse fenômeno é a inativação aleatória do cromossomo X em células de fetos do sexo feminino (STOGER, 2011).

### *Southern Blotting (SB)*

É o método utilizado para identificar a mutação completa e a pré-mutação, onde é possível revelar o estado de metilação do gene. É uma técnica confiável para pacientes do sexo feminino, masculino e permite visualizar de uma forma direta o tamanho das sequências repetitivas, tanto os indivíduos que

são normais quanto os indivíduos que apresentam a mutação, contudo o SB não permite determinar de forma precisa a ocorrência de sequências repetitivas de tamanho pequeno, mas que são importantes para diferenciar as sequências normais das pré-mutadas (SHNTORCH et al., 2012).

A técnica de SB como diagnóstico de rotina traz algumas desvantagens pois apresenta custo alto, é trabalhosa e requer uma grande quantidade de DNA de alta qualidade (OOSTRA & WILLEMSSEN, 2009).

## *PCR ( Reação em Cadeia da Polimerase)*

É um método *in vitro* que a partir de uma pequena quantidade de DNA permite uma amplificação de sequências específicas, para o diagnóstico da SXF já foram feitos vários iniciadores e métodos de separação e detecção dos alelos, que já foi comprovado que não há qualquer polimorfismo conhecido que afete os iniciadores comumente utilizados no diagnóstico da SXF diferente do que ocorre em outras síndromes onde a técnica pode ocorrer falha na detecção de um alelo se existir algum polimorfismo no local de anelamento do iniciador (HALLAHAN et al., 2012).

Para analisar o gene FMR1 pela PCR consiste na amplificação de milhares de cópias de pedaços do gene onde irá conter as repetições CGG. A PCR é bastante importante porque sua precisão possibilita identificar as repetições que já estão expandidas e que descrevem a pré-mutação, pois possuem um risco de aumentar nas gerações futuras e expandir-se em mutações completas (HALLAHAN et al., 2012).

É um método simples, específico e bastante sensível e portanto é necessária a atenção na realização dos trabalhos para evitar a contaminação cruzadas que podem inviabilizar os resultados (SHNTORCH et al., 2012).

A primeira etapa da técnica de PCR é o aquecimento para desnaturação da dupla fita de DNA, após a ligação dos iniciadores nos locais complementares específicos e da extensão do DNA pela enzima. Ciclo será chamado cada série de desnaturação, anelamento e extensão que ocorrem em diferentes temperaturas. As sequências de DNA de interesse serão produzidas pois a cada ciclo de produtos formados são utilizados pelos iniciadores na produção de novas sequências do DNA alvo no ciclo seguinte (HALLAHAN et al., 2012).

Para diagnóstico específico da SXF a amplificação dos produtos são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e revelados por um intercalante de DNA como o brometo de etídio, após os tamanhos dos fragmentos podem ser visualizados e analisados (HALLAHAN et al., 2012).

Em homens há ausência de amplificação sugere mutação completa, diferente de indivíduos normais que tem a presença de amplificação. Em mulheres normais podem apresentar um ou dois pedaços amplificados, dependendo se os dois cromossomos X apresentarem tamanhos próximos ou não, em mulheres com a suspeita de mutação completa é necessário que se faça outra técnica como a de sequenciamento, pois na PCR elas terão um único fragmento amplificado podendo confundir com o resultado obtido em pessoas sem mutação (HALLAHAN et al., 2012).

## Sequenciamento

Métodos automáticos para sequenciar regiões das repetições de CGG também são utilizados como diagnóstico da síndrome, apesar de uma minoria de indivíduos com SXF possuem deleção ou mutação de ponto como responsável pela manifestação da doença que não a expansão de CGG, nestes casos são indicados estudos específicos como o sequenciamento do gene FMR1, apesar de ser uma técnica específica e sensível é mais utilizada em pesquisas de genes devido seu alto custo de equipamento e material de consumo (SHNTORCH et al., 2012).

## MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification)

A técnica de MLPA permite identificar as alterações no número de cópias em até 50 sequências diferentes de DNA em uma única reação de amplificação, ou seja permite a identificação de grande número de sequencias simultaneamente, essa identificação é efetuada por meio da hibridação de sondas específicas, a peculiaridade desta técnica é que não é o DNA genômico que é o alvo da amplificação por PCR mas sim as sondas que se hibridam ao DNA é que são amplificadas. As sondas de MLPA constituem-se em dois oligonucleotídeos complementares às sequencias alvo de DNA genômico, oligonucleotídeo sintético curto e o longo (SHNTORCH et al., 2012).

A análise pela técnica de MLPA é utilizada quando existem ocasiões em que o gene ou parte dele se encontra deletado ou duplicado. As técnicas de PCR e sequenciamento apresentam limitações na detecção da amplificação exclusiva do alelo normal ou na amplificação de vários alelos, um problema que o MLPA não possui, entretanto o MLPA é uma técnica de difícil padronização por possuir sondas muito sensíveis e exigir uma grande quantidade de DNA íntegro que requer um alto investimento em equipamentos e kits utilizados (SHEN & WU, 2009).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de métodos diagnóstico laboratoriais da SXF

Método	Vantagens	Desvantagens
Cariótipo	Analisa os cromossomos, permitindo a identificação das estruturas, anormalidades estruturais e o sítio frágil.	Risco de resultado falso-negativo, não diferencia FRAXA de FRAXE, não detecta portadores, não identifica mutação pontual.
Southern Blotting	Permite o diagnóstico para homens e mulheres, incluindo portadoras.	Alto custo, requer grande quantidade de DNA de alta qualidade, indisponibilidade comercial de sondas.
PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	Resultado rápido, utiliza pequena amostra de DNA.	Confirmação apenas para SXF em homens, risco de resultado inconclusivo, risco alto de não detectar portadores, não identifica mutação pontual.
Sequenciamento	Identifica mutações de ponto, confiável para homens e mulheres.	Alto custo requer profissionais altamente qualificados.
MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification)	Identificação de duplicações e deleções em um grande número de sequências simultaneamente, resultados rápidos.	Alto custo, requer DNA de alta qualidade, difícil padronização.

Adaptado STEINER et al., 2005.

A técnica padrão-ouro para o diagnóstico da SXF é a PCR, porém irá depender das características clínicas de cada paciente para a escolha adequada de cada técnica com suas vantagens e desvantagens (STEINER et al., 2005).

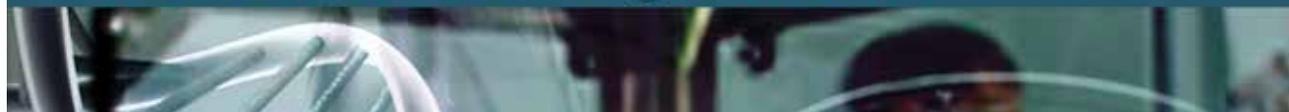
## Considerações Finais

Acredita-se que a rápida evolução do conhecimento proporcionada pelas pesquisas genéticas relacionadas ao autismo ligado à síndrome X-frágil certamente contribuirá para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais precisas e, possivelmente, para terapias baseadas em evidências genéticas, tornando a investigação da etiologia genética do TEA e SXF em crianças ainda mais importante.

Dentre todas as síndromes relevantes no TEA os exames para diagnósticos que são mais solicitados são os da SXF, uma triagem aprimorada beneficia muitos pacientes juntamente com um diagnóstico rápido e correto aliado ao estímulo e tratamento precoce possui grande interferência no prognóstico desses pacientes.

## Referências

- BIACSI, R.; KUMARI, D.; USDIN, K. SIRT1 Inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome. *Plos Genetics*, vol. 4, n. 3, mar. 2008.
- GONÇALVES, A. P.; SILVA, B.; MENEZES, M.; TONIAL, L. Transtornos do espectro do autismo e psicanálise: revisitando a literatura. *Tempo Psicanalítico*, Rio de Janeiro, v. 49.2, p. 152-181, 2017.
- FREITAS, A.M.; BRUNONI, D.; MUSSOLINI, J.L. TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: ESTUDO DE UMA SÉRIE DE CASOS COM ALTERAÇÕES GENÉTICAS. *São Paulo*, v.17, n.2, p. 101-110, 2017.
- HALLAHAN, P. B; DALY, M., E; SIMMONS, A; MOORE, C., J; MURPHY, K., C; AND MURPHY, D., D., C. Fragile X syndrome: a pilot proton magnetic resonance spectroscopy study in premutation carriers. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 4:23. 2012.
- OOSTRA, B.A.; WILLEMSSEN, R. FMR1: a gene with three faces. *Biochim Biophys Acta*, v.1790(6), p.467-77, 2009.
- OLIVEIRA, K.G.; SERTIÉ, A.L. Transtornos do espectro autista: um guia atualizado para aconselhamento genético. *Einstein* 15(2):233-8 2017.
- 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. *J. Genet Genomics*, v.36(4), p. 257-65, 2009.
- SHTORCH, A.; AMIEL, A.; PELES, L.; PRAS, E.; RIES-LEVAVI, L. Three peaks in the polymerase chain reaction fragile X analysis. *Journal of Medical Screening*. (19):3112-115. 2012.
- STEINER, C.E.; GUERREIRO, M.M.; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; LOPES-CENDES, I. Laboratorial diagnosis of fragile-X syndrome: experience in a sample of individuals with pervasive developmental disorders. *Arq Neuropsiquiatr*, v.63(3A), p.564-70, 2005.
- STOGER R.; GENEREUX D.P.; HAGERMAN R.J.; HAGERMAN P.J.; TASSONE F., et al. Testing the FMR1 Promoter for Mosaicism in DNA Methylation among CpG Sites, Strands, and Cells in FMR1-Expressing Males with Fragile X Syndrome. *PLOS ONE*. 6(8):23648. 2011.



KHALIL, A.M.; FAGHIHI, M.A.; MODARRESI, F.; BROTHERS, S.P.; WAHLESTEDT, C. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in Fragile X Syndrome. *Plos One*, vol.3, n. 1, jan.2008.

KUMARI, D.; USDIN, K. The distribution of repressive histone modifications on silenced FMR1 alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, v.19(23), p.4634-42, 2010.

YIM, S.Y.; JEAN, B.H.; YANG, J.A.; KIM, H.J. Fragile X syndrome in Korea: a case series and a review of the literature. *J Korean Med Sci*, v.23(3), p.470-6, 2008

ZIATS, N.M.; RENNERT, O.M. The Evolving Diagnostic and Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Genetics*. Vol. 7, 2016.