



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

VICTOR CEZAR GOMES MELO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES
DIAGNOSTICADOS CLINICAMENTE COM SÍNDROME DE
RETT NO ESTADO DO PARÁ**

BELÉM-PA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES
DIAGNOSTICADOS CLINICAMENTE COM SÍNDROME DE
RETT NO ESTADO DO PARÁ**

Autor: VICTOR CEZAR GOMES MELO

Orientador: PROF. DR. LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA

Co-orientadora: PROF^a. DR^a. MARIA HELENA THOMAZ MAIA

Documento de Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Farmacologia e Bioquímica do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Pará como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia e Bioquímica.

BELÉM-PA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

M528c Melo, Victor Cezar Gomes.
 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES
 DIAGNOSTICADOS CLINICAMENTE COM SÍNDROME DE
 RETT NO ESTADO DO PARÁ / Victor Cezar Gomes Melo. —
 2023.
 60 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
 Coorientação: Prof^a. Dra. Maria Helena Thomaz Maia
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
 graduação em Farmacologia e Bioquímica, Belém, 2023.

 1. Síndrome de Rett. 2. MECP2. 3. Deficiência
 intelectual. 4. Convulsão. I. Título.

CDD 572.6

DEDICATÓRIA/AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho e me mostrar que há outros planos além do meu. Mesmo que me aborreça pelo modo como o caminho está se desenrolando, o final acaba sendo melhor do que esperado por me possibilitar conhecer novas e melhores pessoas, hábitos, pensamentos e direções.

Agradeço a minha família que sempre me apoiou mesmo não entendendo plenamente as minhas atitudes. Agradeço especialmente aos meus pais, Ângelo Cezar e Sandra Silva, pelo incentivo, palavras amigas e alertas que sempre me guiaram por caminhos seguros e bons e por sempre saberem minhas capacidades e limitações e provendo conselhos valiosos que me permitem agir de maneira melhor.

Agradeço ao prof. Santana pela orientação e ter aberto as portas, não somente para o laboratório, mas para um universo de saberes e conhecimento, não somente científicos, mas de vida e por sempre reconhecer os esforços dos seus alunos e nos dar novos desafios permitindo um crescimento profissional e humano melhor.

Agradeço também a profa. Maria Helena, que com seu jeito descontraído e inspirador, conseguiu me cativar por questões científicas e humanas, as conversas e impressionantes aquisições de conhecimento e sabedoria e suas orientações também foram fundamentais para o andamento do presente trabalho.

Um agradecimento todo especial principalmente à Fernanda Rodríguez Ramos que sem ela este trabalho com 100% de certeza não seria possível. Pessoa dedicada, humana, sensata, extrovertida nos momentos certos e séria com seus compromissos e com seus pacientes. Mas, sua trajetória foi interrompida pela Covid-19 e este presente trabalho é a continuação que ela não pôde concluir. Em suma, este faz uma honrosa valorização de sua memória neste trabalho.

Um agradecimento especial para a o povo do laboratório por sempre estar dispostos a me ajudar nos problemas e pelo ambiente familiar e descontraído que as vezes é possível perder a noção de espaço e tempo e a seriedade que é a missão que escolhemos de vida.

RESUMO

Introdução: A síndrome de Rett (RTT) é uma doença rara que afeta principalmente pessoas do sexo feminino e é a segunda causa de deficiência intelectual em meninas e evolui com regressão de habilidades aprendidas após 6 a 18 meses do nascimento, sendo classificado em RTT típico e RTT atípico que guardam certa relação com o gene afetado e este último tende ser mais grave. A causa etiológica de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor com a presença de convulsão e deficiência intelectual pode ser causada por diversas variantes genéticas patogênicas, principalmente no gene *MECP2* em meninas. **Objetivo:** Realizar estudos moleculares em amostra de pacientes com características clínicas de RTT. **Materiais e métodos:** As amostras foram provenientes do Serviço de Referência em Doenças Raras do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS) no período de 2017 a 2019, posterior a aprovação no comitê de ética em pesquisa. Foi realizado o diagnóstico clínico pelos critérios de Neul et al, 2010, escala de severidade de Kerr e a confirmação molecular via sequenciamento pela metodologia de Sanger dos éxons 3 e 4 do gene *MECP2* tanto dos pacientes quanto dos pais (33 no total). O programa Biostat 5.3. foi o pacote estatístico para avaliar a gravidade e a relação fenótipo genótipo, tomando com significância $p < 0,05$. **Resultados:** 17 pacientes tiveram impressão diagnóstica clínica de RTT, 15 meninas e 2 meninos; a média da idade no diagnóstico para a forma típica foi de 7,8 anos ($DP=\pm 2,1$) e a atípica de 3,8 anos ($DP=\pm 3,8$). Em três meninas foram encontradas variantes patogênicas no gene *MECP2*: 01 com p.Arg168* e 02 com p.Arg294*. O teste exato de Fisher não foi significativo ($p=0,20$) para verificar diferença entre o achado da mutação e a forma clínica; não houve diferença significativa entre os tipos clínicos e a gravidade dos sintomas de acordo com o teste de Mann-Whitney U ($p=0,23$). Foi observada uma elevada frequência (0,38) da variante benigna rs3027928 nos pacientes, incluindo seus pais, sendo significativamente maior ($p < 0,0001$) que a frequência encontrada na América Latina (0,03). Esta variante também não foi associada ao quadro clínico das pacientes ($OR=1,3$). **Conclusão:** Foi possível estabelecer um método diagnóstico *in house* para diagnóstico molecular de meninas com deficiência intelectual, útil para determinar a prevalência, prognóstico e melhor acompanhamento de casos com síndrome de Rett. Além disso, a presente metodologia pode beneficiar o diagnóstico molecular de variantes patogênicas no gene *MECP2* de futuros pacientes com suspeita de apresentar Síndrome de Rett. Tal procedimento será útil para o aconselhamento genético de famílias em risco.

Palavras-chave: Síndrome de Rett; *MECP2*; Deficiência intelectual; convulsão.

ABSTRACT

Introduction: Rett syndrome (RTS) is a rare disease that mainly affects females and is the second cause of intellectual disability in girls and evolves with regression of skills learned after 6 to 18 months of birth, being classified as typical TTR and Atypical TTR that have a certain relationship with the affected gene and the latter tends to be more serious. The etiological cause of delayed neuropsychomotor development with the presence of seizures and intellectual disability can be caused by several pathogenic genetic variants, mainly in the *MECP2* gene in girls. **Objective:** To carry out molecular studies in a sample of patients with clinical characteristics of TTR. **Materials and methods:** The samples came from the Rare Diseases Reference Service of the Bettina Ferro de Souza University Hospital (HUBFS) from 2017 to 2019, after approval by the research ethics committee. The clinical diagnosis was made using the criteria of Neul et al, 2010, Kerr severity scale and molecular confirmation via sequencing using the methodology Sanger analysis of exons 3 and 4 of the *MECP2* gene from both patients and parents (33 in total). The Biostat 5.3 program. was the statistical package to evaluate the severity and genotype-phenotype relationship, taking significance at $p < 0.05$. **Results:** 17 patients had a clinical diagnostic impression of RTT, 15 girls and 2 boys; the average age at diagnosis for the typical form was 7.8 years ($SD=+2.1$) and the atypical form was 3.8 years ($SD=+3.8$). In three girls, pathogenic variants were found in the *MECP2* gene: 01 with p.Arg168* and 02 with p.Arg294*. Fisher's exact test was not significant ($p=0.20$) to verify the difference between the mutation finding and the clinical form; there was no significant difference between clinical types and severity of symptoms according to the Mann-Whitney U test ($p=0.23$). A high frequency (0.38) of the benign variant rs3027928 was observed in patients, including their parents, being significantly higher ($p < 0.0001$) than the frequency found in Latin America (0.03). This variant was also not associated with the patients' clinical condition ($OR=1.3$). **Conclusion:** It was possible to establish an in-house diagnostic method for the molecular diagnosis of girls with intellectual disabilities, useful for determining the prevalence, prognosis and better monitoring of cases with Rett syndrome. Furthermore, the present methodology may benefit the molecular diagnosis of pathogenic variants in the *MECP2* gene in future patients suspected of having Rett Syndrome. Such a procedure will be useful for genetic counseling of families at risk.

Keywords: Rett syndrome; *MECP2*; Intellectual disability; Seizure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Relação temporal em anos e os eventos clínicos principais na RTT organizados em estágios de I a IV. Os estágios são melhor condizentes com a forma RTT típica (adaptado de Kyle et al, 2018).	2
Figura 2 Visão do gene <i>MECP2</i> e suas isoformas do <i>splicing</i> alternativo. O controle de expressão na região 5'-UTR é regulada por diversas demandas celulares enquanto que em 3'-UTR apresenta quatro sítios de poliadenilação que guarda relação ao turnover da proteína sendo que em neurônio as sequências de poliadenilação são mais curtas podendo indicar mais regulação para expressão (Kyle et al, 2018).....	8
Figura 3 Atuação funcional de MECP2 no processo de silenciamento gênico em marcações de sítio contendo 5-MeCyt no DNA. MECP2 funciona como um leitor de DNA metilado e uma ponte para a montagem de complexo de silenciamento gênico em específico para que a proteína HDAC possa realizar a desacetilação de DNA e histonas (adaptado de Kyle et al, 2018).....	11
Figura 4: Relação entre as principais lesões moleculares envolvidas em RTT de acordo com a porcentagem/domínio funcional (adaptado de Kyle et al, 2018).....	12
Figura 5 Pontuações agrupadas em baixa (0), média (1) e alta (2) na escala de severidade de Kerr para pacientes RTT clássico e RTT atípico. Uma paciente com RTT clássico foi excluída por não ter alguns dados clínicos.....	28
Figura 6 Localização dos domínios perdidos devido ao termino prematuro causado pelas mutações das pacientes.....	29

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 01 – Critérios para o diagnóstico de Síndrome de Rett (RTT) de acordo com os critérios revisados de Neul et al, 2010.....	4
Quadro 02 – Principais particularidades entre a forma típica e as formas atípicas de RTT de acordo com os critérios de Neul et al, 2010.....	8
Tabela 01: Sequências dos primers e tamanho do fragmento das PCR dos éxons 3 e 4 do gene MECP2.....	23
Tabela 02: Sequências dos primers 3 e 4 para sequenciamento através da metodologia de Sanger.....	25
Tabela 03: Critérios principais e secundários dos pacientes diagnósticos com RTT..	27
Tabela 04: tipo clínico de RTT em relação as mutações pelo teste de Fisher.....	29

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

5'-metil-Citocina (5-MeCyt)

C-terminal domain (CTD)

Histona desacetilase (HDAC)

Inativação randômica do cromossomo X (XCI)

Isoforma MECP2_e1 (e1)

Isoforma MECP2_e2 (e2)

Methyl binding domain (MBD)

Methyl-CpG 2 binding repressor protein (MECP2)

Metilação única e simétrica de metil-citosina (mCpG)

NCoR interaction domain (NID)

N-terminal domain (NTD)

Poliadenilação (polyA).

Proteína intrinsecamente desordenada (IDP)

Região não traduzida (UTR)

Síndrome de Rett (RTT)

Sistema Nervoso Central (SNC)

Transcription repression domain (TRD)

Transtorno do espectro autista (TEA)

Trato gastrointestinais (TGI)

Região Interdomínio (ID)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Diagnóstico e Sintomatologia.....	1
1.2 Prevalência e Epidemiologia.....	6
1.3 Da Genética à função de <i>MECP2</i>	7
1.4 Variantes patogênicas no gene <i>MECP2</i> e suas interações com o fenótipo clínico	11
1.5 Abordagens moleculares para o diagnóstico	13
1.6 Vias metabólicas, genes e processos afetados que causam o fenótipo RTT.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVO	18
3.1 Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Amostragem	19
4.3 Caracterização clínica dos pacientes com suspeita de Síndrome de Rett.....	19
4.4. Coleta de material biológico.....	20
4.5 Isolamento e quantificação de DNA.....	20
4.6 Investigação de variantes nos éxons 3 e 4 do gene <i>MECP2</i> mediante sequenciamento em pacientes com fenótipo RTT.....	20
4.6.7 Amplificação do Éxon 4E	23
4.8 Reação de sequenciamento	24
4.9 Edição e análise das sequências	24
4.10 Análise das mutações	25
4.11. Análise estatística	25
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSSÃO	30
8. CONCLUSÕES	33
9. REFERÊNCIAS.....	34
10. APÊNDICES.....	44
10.1 Apêndice A: Termo de consentimento para pacientes com RTT	44
10.2 Apêndice B: ALGORITMO DIAGNÓSTICO (Deve cumprir período de regressão psicomotora entre 6-18 meses, exceto para a variante congênita) .	48
10.3 Apêndice C: ESCALA DE SEVERIDADE DE KERR.....	49
11. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO/ACEITE DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	51

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Rett (RTT; OMIM #312750) é uma doença genética rara, dominante, ligada ao X, que afeta pessoas do sexo feminino (Sirianni et al, 1998). RTT é a segunda causa mais comum de deficiência intelectual (DI) entre meninas, após a Síndrome de Down (Neul et al, 2010; Petazzi et al, 2013). A RTT pertencia à classificação de doença de atraso do neurodesenvolvimento, no entanto, agora, se enquadra em doença neurológica (Lyst et al, 2015).

As características patognomônicas de RTT foram inicialmente reconhecidas e descritas em 1966 pelo pediatra austríaco Andreas Rett. Ele observou um recorte de casos de garotas com o padrão normal de desenvolvimento e ausência de anomalias ao nascimento. Elas apresentaram estagnação, seguida de regressão do desenvolvimento aos 6 a 18 meses do nascimento, marcante estereotipia das mãos e perda de marcos do desenvolvimento, como fala e habilidades motoras do uso das mãos (Rett A, 1966; Hagberg et al, 1983).

A RTT é principalmente causada por mutações em heterozigose do gene *MECP2*, que produz a *methyl-CpG 2 binding repressor protein* (MECP2) (Amir et al, 1999). A MECP2 é uma proteína ubíqua, versátil e importante para o correto funcionamento dos neurônios. Além de participar de processos moleculares, como repressão gênica, ativação transcricional, manutenção de heterocromatina, *splicing* alternativo de proteínas, vias metabólicas (Good et al, 2021).

1.1 Diagnóstico e Sintomatologia

A relação genótipo/fenótipo entre o gene *MECP2* e a RTT pode não estar em concordância, como observado pela *RettSeach members* em 2010, que estabeleceram critérios diagnósticos (quadro 01) e a nomenclatura para desambiguação ao nomear entidades similares a RTT, atualmente em uso. Assim, os casos com manifestação clínica clássica foram enquadrados na classificação de RTT típica/clássica e os casos com manifestação clínica que divergiam em determinados critérios, foram categorizados como RTT atípica (Neul et al, 2010).

A evolução dos casos RTT pode ser apresentada em estágios, sendo: desenvolvimento neurológico normal; fase em que pode se observar sutil atraso de desenvolvimento nos primeiros 6 a 18 meses do nascimento; estagnação precoce (estágio I) por volta de 6 a 18 meses; regressão rápida (estágio II) entre 1 a 4 anos de vida; período pseudo-estacionário (estágio III) em torno dos 2 anos, em que, inicialmente, a criança deambula e tem estabilização da regressão; deterioração motora (estágio IV) a partir dos 10 anos, que pode evoluir para a incompleta capacidade para andar (figura 01) (Hagberg et al, 2002).

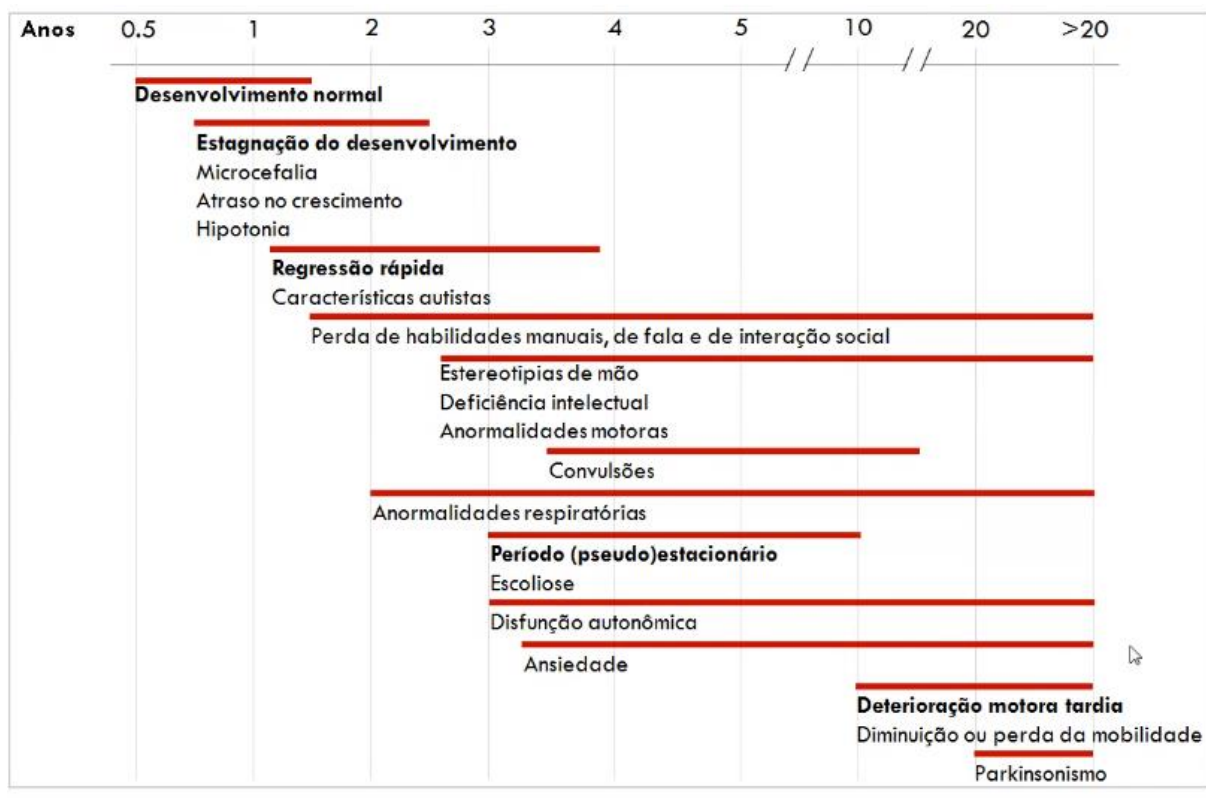


Figura 2 Relação temporal em anos e os eventos clínicos principais na RTT organizados em estágios de I a IV. Os estágios são melhor condizentes com a forma RTT típica (adaptado de Kyle et al, 2018).

Outros achados clínicos, como convulsões e episódios epiléticos podem surgir precocemente; distúrbios cardiovasculares (aumento da onda QT no eletrocardiograma) e respiratórios, (irregularidade da frequência respiratória); problemas no trato gastrointestinal (TGI) e nutricionais são frequentes devido a dificuldade para mastigar, asfixia e prolongado períodos de jejum; problemas relacionados ao peristaltismo na forma de refluxo gastroesofágico, constipação e inchaço; má nutrição, que contribui para o baixo peso e uma pequena parcela dos

casos pode apresentar doenças do trato biliar. Além disso, é frequente em casos de RTT a presença de pés e mãos frios e incomumente pequenos (Dowwns et al, 2010; Pini et al, 2016; Schultz et al, 1993). O denominado “olhar Rett” também é uma manifestação clínica representada por uma comunicação intensa com os olhos; crises de choro ou risos sem motivo (Goldman et al, 2012). As evidências apontam que estes achados clínicos devem ser resultado direto de neurônios disfuncionais do SNC e sistema nervoso autônomo como consequência da deficiência de MECP2, em especial o tronco cerebral e medula espinhal, principalmente, em relação aos achados cardiovasculares, respiratórios e no TGI (Ramirez et al, 2013; Wahba et al, 2016; Kumar et al, 2017).

A deficiência de MECP2 está presente em muitos tecidos, com sinais e sintomas que afetam diversos sistemas. Foram relatados casos de disfunção do metabolismo do colesterol em uma parcela dos casos de RTT e isso está relacionado com determinadas mutações no *MECP2* (Kyle et al, 2018). A escoliose e cifose são frequentes e podem estar relacionados com a incapacidade de andar, embora existam evidências de baixa mineralização, diminuição da espessura óssea e baixa densidade óssea relacionadas a ausência de MECP2 (Caffarelli et al, 2020). O problema endócrino mais comum em RTT é deficiência de vitamina D, que tem relação com a dismotilidade intestinal (Wahba et al, 2016). Alterações musculares são observadas antes da fase de regressão na forma de hipotonia e em fases tardias são observadas anomalias no tônus muscular, atrofia muscular sem sinais de distrofia e baixa massa muscular. Parte desses achados podem estar relacionados a anormalidades morfológicas de número e tamanho das mitocôndrias, observados na RTT (Cardaioli et al, 1999).

O comportamento semelhante ao do transtorno do espectro autista (TEA) pode ser aparente, surgindo, geralmente, no processo de regressão e a socialização é preservada na fase adulta. Além disso, RTT foi reclassificado no DSM V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), que anteriormente incluía RTT no grupo de doenças do desenvolvimento (assim como o TEA) (Katz et al, 2016; Schwartzman et al, 2015). A Síndrome de Angelman e o TEA são importantes diagnósticos diferenciais. O primeiro apresenta a fácies sindrômicas que a distingue de RTT e o segundo apresenta preservação das habilidades motoras. É importante salientar que podem ocorrer casos raros de TEA com mutação no gene *MECP2* e sem clínica de

RTT, sendo estes denominados de “Autismo com mutação no *MECP2*” (Neul et al, 2010; Schonewolf-Greulich et al, 2016).

Os critérios diagnósticos para RTT obrigatoriamente devem contemplar todos os seguintes critérios principais: perda parcial ou total de habilidades manuais com as mãos; perda total ou parcial da linguagem; anormalidade de marcha, incluindo dispraxia ou ausência de função de marcha e estereotipia das mãos. A RTT atípica é diagnosticada quando apresenta: período de regressão seguido de estabilização; dois dos quatro critérios principais e cinco de onze critérios de apoio (**quadro 01**) (Neul et al, 2010).

Quadro 01 – Critérios para o diagnóstico de Síndrome de Rett (RTT) de acordo com os critérios revisados de Neul et al, 2010.

RTT típico ou clássico	Critérios auxiliares
✓ Um período de regressão seguido de um período de estabilização ou recuperação; ✓ Cumprir todos os critérios principais e todos os de exclusão; ✓ Os critérios de apoio não são indispensáveis embora seja frequente na RTT típica.	✓ Anomalias respiratórias ao acorda ✓ Bruxismo ao acorda ✓ Padrão de sono irregular ✓ Anomalia do tônus muscular ✓ Anomalia vasomotora periférica ✓ Escoliose/cifose ✓ Atraso do crescimento ✓ Pés e mãos pequenos e gelados ✓ Inapropriados crises de risos ou gritos ✓ Respostas diminuída a dor ✓ Intensa comunicação visual
RTT atípico ou variante RTT	
✓ Um período de regressão seguido de um período de estabilização ou recuperação; ✓ Mínimo de 2 critérios principais; ✓ 5 critérios de 11 critérios auxiliares.	
Critérios principais	
✓ Perda parcial ou completa de habilidades consciente do uso das mãos; ✓ Perda parcial ou completa de habilidades relativas à linguagem*; ✓ Anormalidade da marcha: dispraxia ou ausência de marcha; ✓ Estereotipia de movimentos das mãos**.	
Critérios de exclusão para RTT típico	
✓ Danos ao cérebro peri- ou pós-natal secundários a trauma, doenças neurometabólicas ou infecciosas***; ✓ Clara percepção de anomalias no desenvolvimento psicomotoras nos primeiros 6 meses de vida#.	

*A perda de habilidade da fala não se restringe ao uso de palavras ou altos níveis de organização de discurso, inclui também a intensão de fala, como o balbuciar que lembra remotamente palavras conhecidas;

**Incluem estalar de dedos/bater de mãos, torção/aperto das mãos, fricção ou o automatismo como se estivesse lavando as mãos;

***Necessita de clara evidência por exames de neurologia ou oftalmológico que inclui exames de imagem como ressonância magnética ou tomografia computadorizada que permita presumir a disfunção neurológica;

#Aqui inclui a não aquisição de habilidades de marcos normais do desenvolvimento (controle da cabeça, engolir, sorriso social). Hipotonia é um achado que pode visto, mas é comum e normal nos primeiros 6 meses de vida e não deve ser considerado como critério de exclusão.

Essa distinção é importante, pois se correlaciona com a evolução clínica e os achados genéticos. Assim, a RTT típica é causada em 95-97% por mutações no gene *MECP2* enquanto que na RTT atípica, a mutação neste gene é responsável por 50-

70% das mutações. Além disso, a RTT atípica pode apresentar certas particularidades que clinicamente podem ser divididas em variantes atípicas (**quadro 02**): variante com preservação de fala; variante com epilepsia precoce e variante congênita (Neul et al, 2010).

Quadro 02 – Principais particularidades entre a forma típica e as formas atípicas de RTT de acordo com os critérios de Neul et al, 2010.

Variante com fala preservada (Variante Zappella)	Variante convulsiva precoce (Variante Hanefeld)	Variante congênita (Variante Rolando)
Apresentação clínica: ✓ Regressão em 1-3 anos, prolongado platô ✓ Retêm maior uso das mãos ✓ Recupera a linguagem após fase de regressão ✓ Menor comprometimento intelectual (QI >50) Diminuição da frequência das seguintes características vistas na RTT típica: - Episódios de epilepsia são raros - Disfunção autonômica são mais leves - Escoliose e cifose menos severas - Circunferência craniana normal - Peso e altura normais na maioria dos casos Achados moleculares: - Mutações no gene <i>MECP2</i> é predominante.	Apresentação clínica: ✓ Aspectos das convulsões - Antes dos 5 meses de vida - Espasmódico - Epilepsia mioclônica refratária - Convulsões antes da regressão ✓ Diminuição da frequência de características clínicas vistas na RTT típica Achados moleculares: - Mutações no gene <i>MECP2</i> são raras - Investigação no gene <i>CDKL5</i> deve ser realizada	Apresentação clínica: ✓ Perceptível atraso do desenvolvimento - Severo atraso psicomotor - Incapacidade de deambular - Severa microcefalia pós-natal antes dos 4 meses ✓ Regressão nos primeiros 5 meses de vida - Pés e mãos pequenos e frios - Alteração vasomotora periférica - Anormalidades respiratórias ao acordar ✓ Movimentos atípicos específicos - Discinesia - Estereotipia de língua Achados moleculares: - Mutações no gene <i>MECP2</i> são raras - Investigação do gene <i>FOXP1</i> deve ser realizada

Para realizar o diagnóstico assertivo, é necessário que a equipe multidisciplinar esteja atenta aos sinais, em especial, aos indícios de regressão como o início da verbalização com balbucios. Outro sinal que pode ser indicativo para RTT é a manutenção da circunferência craniana reduzida, que evolui para microcefalia. Porém, como nem todas as crianças evoluem com esse achado, a microcefalia não mais configura critério diagnóstico. No entanto, ainda é considerado um sinal que levanta suspeitas (Neul et al, 2010).

As variantes atípicas são causadas, principalmente, por mutações nos genes *FOXP1* e *CDKL5* (Weaving et al 2004; Ariani et al, 2008). Dessa forma, as condições clínicas de RTT com mutações no *CDKL5* podem levar à variante epilética e mutações no *FOXP1*, podem levar à variante precoce. Assim, estas formas clínicas podem afetar igualmente indivíduos do sexo feminino e masculino, pois os genes envolvidos estão localizados em cromossomos autossômicos (Mitter et al, 2017; Fehr et al, 2013).

As doenças que possuem clínica similar a RTT, com mutações em genes que não o *MECP2*, são denominadas de síndromes RTT-like (Neul et al, 2010; Lopes et al, 2010). Além disso, existem causas genéticas com condições clínicas que podem ser relacionadas à fenótipos RTT-like, como: síndrome de Pitt-Hopkins (*TCF4*, *CNTNAP2*, *NRXN1*), síndrome de Cornelia de Lange (*SMC1A*), síndrome de Phelan-McDermid (*SHANK3*), síndrome de Kleefstra (*EHMT1*), Síndrome de deficiência intelectual ligada ao X tipo Chrisianson (*SLC9A6*), síndrome de Angelman (*UBE3A*) e síndrome de Glass (*SATB2*), além de genes ligados a encefalopatia epiléticas (*STXBP1*, *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *HCN1*, *SLC6A1*, *KCNA2*, *EEF1A2* e *KCNB1*) (Allou et al, 2016; Lopes et al, 2016; Saian et al, 2016; Lucariello et al, 2016; Lebrum et al, 2015; Olson et al, 2015). Os esforços para estabelecer as causas genéticas dos casos de síndromes RTT-like foram facilitados com o uso de painéis genéticos para DI e epilepsia (Schönewolf-Greulich et al, 2017).

1.2 Prevalência e Epidemiologia

A prevalência mundial estimada da RTT é de 1/10.000 a 1/15.000 em meninas. Essa frequência é uma estimativa e muda de acordo com a população estudada e com a idade dos pacientes. Assim, na Austrália, por exemplo, a estimativa é de 1/9.000, com idade de diagnóstico de 37 anos; nos EUA é estimada em 1/10.000 entre 0-18 anos; na Itália de 0,96/10.000 entre 6-18 anos; na Suécia é de 1/10.000 casos; na Noruega é de 2,17/10.000 entre 3-19 anos e no Japão é de 0,22-0,5/10.000 de 6-14 anos (Burd et al, 1991; Fehr et al, 2011; Hagberg & Hagberg, 1986; Suzuki et al, 1989; Skjeldal et al, 1997). O estudo de Petriti e colaboradores (2023) unificou os estudos mais recentes de prevalência em uma metanálise, que resultou na prevalência global para a RTT de 5 a 10 casos em 100.000 pessoas do sexo feminino.

Infelizmente, o Brasil não possui estimativas de prevalência sobre RTT e é digno de nota que a trabalhos iniciais de uma família brasileira permitiu a descoberta que as mutações no gene *MECP2* são responsáveis pela RTT. Ademais, estudos em pacientes com epilepsia refratária têm elevada frequência de mutações nesse gene em meninas com encefalopatia crônica de causa desconhecida: 72,7% delas apresentavam mutações para RTT em uma instituição de referência (Pereira et al, 2019; Pozzi & Rosemberg, 2003).

Há poucos estudos longitudinais a respeito da evolução e sobrevivência das pacientes com a RTT. Todavia, Anderson e colaboradores (2014) apresentaram uma extensa casuística e monitoraram as pacientes com a RTT por 20 anos na Austrália e no mundo. A estimativa de sobrevida foi de 77,6% aos 20 anos e 59,8% aos 37 anos. Os principais desafios à longevidade nessas pacientes foram as seguintes: infecções respiratórias (36,8%); asfixia/aspiração (31,6%); falha respiratória, que se relaciona à morte súbita (14%) e sequelas atribuídas à convulsão (5,3%) (Anderson et al, 2014).

A epilepsia é um achado prevalente (82%-93%), uma vez que 64% precisavam do uso de anticonvulsivante e 36,1% cursam com convulsões de difícil controle. Em relação à mobilidade, 18% conseguiam andar e 43% conseguiam com o auxílio de assistência. A escoliose foi identificada em 86% dos casos e responsável pela necessidade de cirurgia corretiva (40%). Os distúrbios no TGI foram prevalentes: constipação (83%), inchaço (53%) e infecção/inflamação na vesícula (5%). Os distúrbios do sono foram representados por 63% dos casos (Vignoli et al, 2012; Anderson et al, 2014).

1.3 Da Genética à função de *MECP2*

O *MECP2* é evolutivamente conservado, em especial, em vertebrados, nos quais a regulação gênica por meio da metilação é importante. Esse gene está localizado no cromossomo X, na banda Xq28 e de acordo com o NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*) versão genoma GRCh38.p14 (GCF_000001405.40) esse gene possui 21 transcritos conhecidos. Todavia, dois desses são traduzidos na proteína MeCP2: *MECP2_e1* e *MECP2_e2*. O gene *MECP2* está organizado em 4 éxons e a transcrição do éxon 1 aos éxons 3 e 4 resulta na

isoforma MECP2_e1 (486 aminoácidos), enquanto MECP2_e2 (498 aminoácidos) provém da transcrição dos éxons 2, 3 e 4 (figura 01) (Kyle et al. 2018).

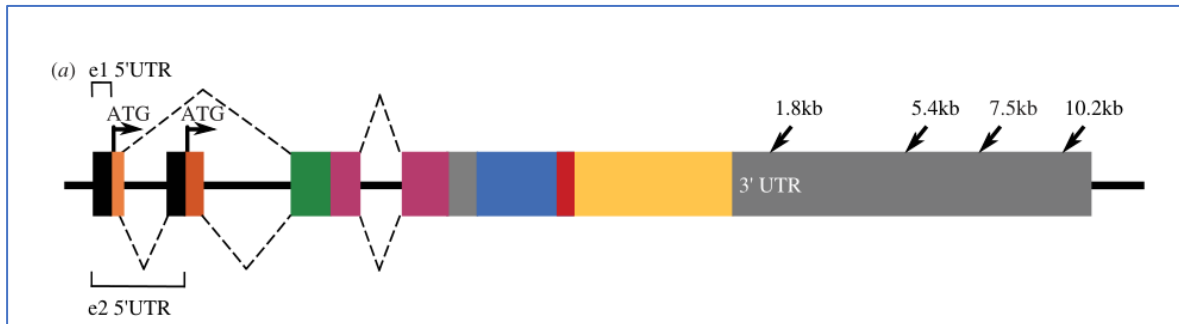


Figura 2 Visão do gene MECP2 e suas isoformas do splicing alternativo. O controle de expressão na região 5'-UTR é regulada por diversas demandas celulares enquanto que em 3'-UTR apresenta quatro sítios de poliadenilação que guarda relação ao turnover da proteína sendo que em neurônio as sequências de poliadenilação são mais curtas podendo indicar mais regulação para expressão (Kyle et al, 2018).

Devido à importância dessa proteína para diversos processos neuronais, é natural que a MECP2 seja altamente regulada no nível de transcrição, pós-transcrição e tradução (Kyle et al, 2018). Todas essas modificações afetam o nível de atividade, e a interação com outras proteínas eleva a complexidade desta, que atua em sintonia com os processos moleculares e celulares (Good et al, 2021). Os processos resultantes dessa intrincada rede de regulação resultam em mudanças morfológicas neuronais, como a rede de arborização dos dendritos; expansão e funcionamento da rede neuronal, desenvolvimento e manutenção de neurônios e das sinapses (Ehrhart et al, 2016).

Em relação ao controle de expressão do *MECP2*, existe uma baixa correlação entre a quantidade da proteína e o nível de transcrito do gene, em virtude dos níveis de regulação gênica, como modificações pós-traducionais, *splicing* alternativo e poliadenilação (polyA). A isoforma MECP2_e1 é 15 vezes mais expressa no cérebro que a isoforma MECP2_e2 devido a um regulador *upstream* ATG mais eficiente presente no éxon 1, que não transcreve o éxon 2 (Martínez de Paz et al, 2019). A maior diferença entre as duas isoformas é a maneira como regulam sua expressão no contexto celular, pois os éxons 1 e 2 não são traduzidos (Rodrigues et al, 2020). Apesar disso, os estudos focam na isoforma MECP2_e2, que foi a primeira a ser descoberta. Não está claro como cada isoforma repercute na clínica da RTT, a exemplo da ausência de registro de mutações patológicas no éxon 2 implicando em RTT. É importante considerar mutações no éxon1 interferem indiretamente na síntese

da isoforma e2 (Mnatzakanian et al, 2004; Saxena et al, 2006; Martínez de Paz et al, 2019).

A isoforma e2 possui maior afinidade e estabilidade de se ligar ao DNA metilado e aos ribossomos, em comparação à e1 (Martínez de Paz et al, 2019). Por outro lado, a ligação da e1 à tubulina é mais forte, corroborando com sua associação à neuroplasticidade (Delepine et al, 2013). A interpretação para esses achados é que as isoformas apresentam sobreposição de funções, porém são capazes de se especializar para o funcionamento correto em vias específicas (Rodrigues et al, 2020).

A MECP2 é classificada estruturalmente como sendo uma proteína intrinsecamente desordenada (IDP), pois seus domínios funcionais passam a se estruturar em suas formas secundárias e terciárias após se ligarem ao DNA ou a outras proteínas. O domínio MBD (*methyl binding domain*) é exceção, pois é estavelmente estruturado (Dunker et al, 2001). É possível, porém, classificar esta proteína em domínios bem definidos: NTD (N-terminal domain), MBD, ID (intervening domain); TRD (transcription repression domain); NID (NCoR interaction domain) e CTD (C-terminal domain). A vantagem desta organização é o que garante múltiplas interações da MeCP2 com outras proteínas (Ghosh et al, 2008). Além disso, a MECP2 pode sofrer modificações pós-traducionais, como fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, acetilação, que regulam os níveis e momentos corretos para a função dessa proteína. Assim, é possível que a MECP2 possa ativar ou desativar a transcrição de outros genes, a depender do contexto celular, atribuindo a ela a função de modulador transcricional (Ausio, 2016). Por exemplo, a fosforilação inativa impede a proteína de se ligar ao DNA, o que ocorre em neurônios despolarizados, durante as sinapses, em decorrência do influxo de Ca^{+2} . Quando esse mecanismo é inativado em camundongos, ocorre o fenótipo de RTT (Gonzales et al, 2012).

Uma das principais funções da MECP2 é reconhecer de citosinas metiladas (5-MeCyt), por meio do seu domínio MBD (*methyl binding domain*) nas formas de metilação única e simétrica de metil-citosina metilada (mCpG) e hidroximetilada (5OHMeCyt) das sequências CAC, em neurônios, possibilitando a função dessa proteína de se ligar a dinucleotídeo e trinucleotídeos metilados. Essa característica molecular não é encontrada em outros membros da família de proteínas de ligação ao DNA metilado (Ballestar et al, 2000). A fim de demonstrar a importância da metilação,

cerca de 1% do DNA é metilado, concentrado em estruturas ricas nos dinucleotídeos CpG, que são denominadas de ilhas CpG, presentes em 60% dos promotores gênicos em humanos (Chahrour et al, 2008). Comparativamente, existe em média uma proteína MeCP2 para cada nucleossomo no DNA. Surpreendentemente, em modelo de camundongo da RTT, houve a remissão completa do fenótipo RTT deles com a suplementação dos domínios de ligação ao metil (MBD-TRD) (Guy et al, 2007).

A função da MECP2 se completa com o recrutamento das proteínas SIN3A, NCOR1 e SMRT através da interação com o seu domínio TRD, que contém o NID, cuja função é posicionar a proteína histona desacetilase (HDAC) sobre a 5-MeCyt para remover o grupo acetil da histona e promover a condensação da cromatina, a fim de reprimir a expressão gênica (figura 02) (Lyst et al, 2013). Por outro lado, a MECP2 parece também agir como um ativador transcricional ao recrutar CREB1 à 5OHMeCyt, que é um marcador de genes ativos em neurônios. Concomitantemente, ela forma um complexo com a proteína TET1, que opera a primeira reação de remoção de metil da citosina (Chahrour et al, 2008; Cartron et al, 2013).

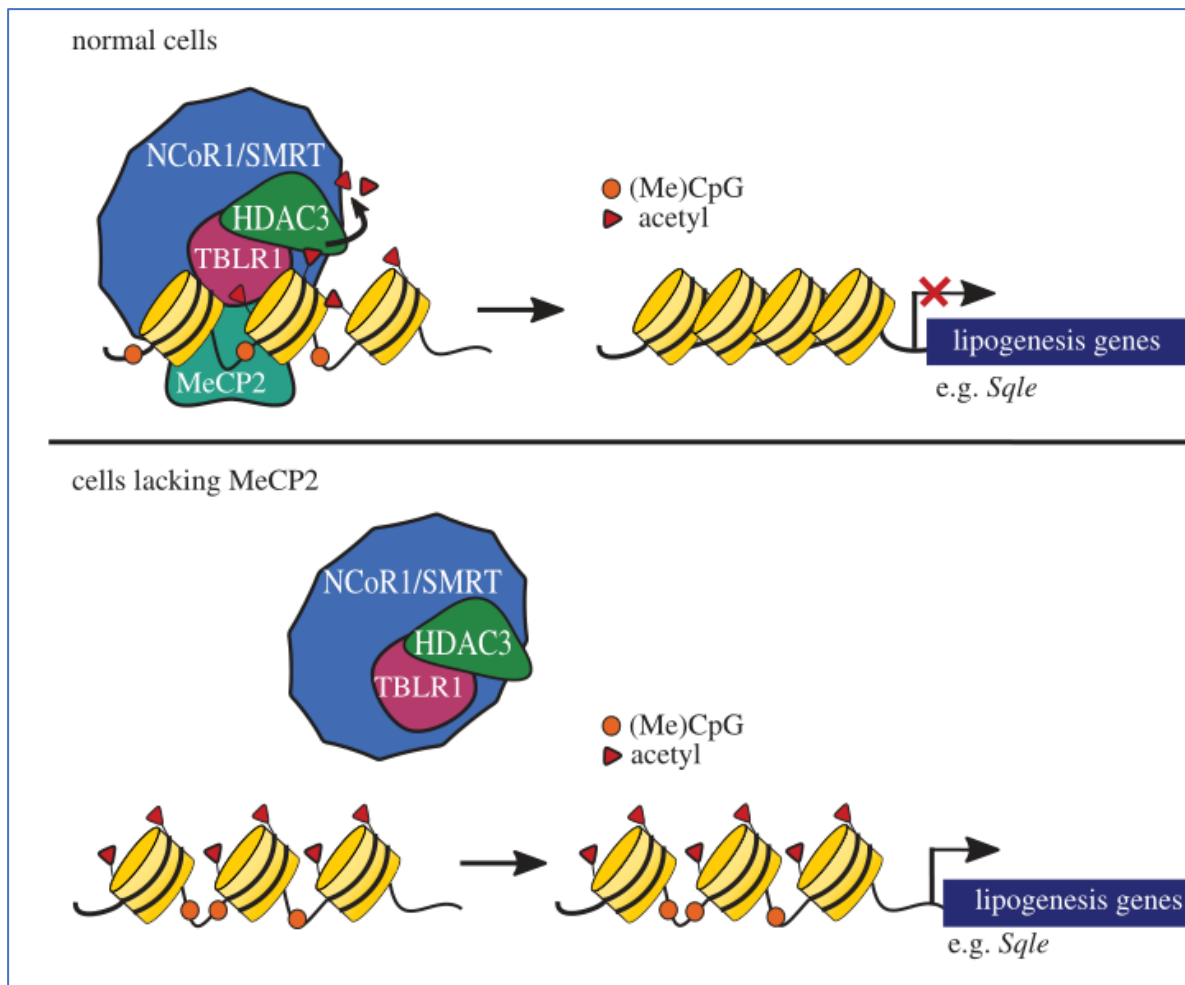


Figura 3 Atuação funcional de MECP2 no processo de silenciamento gênico em marcações de sítio contendo 5Me-Cyt no DNA. MECP2 funciona como um leitor de DNA metilado e uma ponte para a montagem de complexo de silenciamento gênico em específico para que a proteína HDAC possa realizar a desacetilação de DNA e histonas (adaptado de Kyle et al, 2018).

1.4 Variantes patogênicas no gene *MECP2* e suas interações com o fenótipo clínico

As mutações que causam danos ao gene *MECP2* podem ser de ponto (missense, nonsense), deleções, frameshift, sítio de *splicing* e no códon de iniciação (Sung et al, 2001). De acordo com o HGMD (*The Human Gene Mutation Database*), há o registro de 579 mutações para a RTT e, quando incluso os dados do banco de dados RettBASE, o número de mutações descritas sobe para mais de 1000 (Bedogni et al, 2014). Apesar disso, oito mutações são responsáveis por 70% dos casos da RTT: p.Arg106Trp, p.Arg133Cys, p.Thr158Met, p.Arg168*, p.Arg255*, p.Arg270*, p.Arg294* e Arg306Cys. Fisiopatologicamente, essas mutações estão localizadas em regiões críticas, pois afetam os domínios NTD, MBD (45% total dos casos) e TRD (figura 04) (Bedogni et al, 2014).

Foi estimado que cerca de 99,5% das mutações no gene *MECP2* sejam *de novo* e, destas, 70% sejam devido a mutações do tipo transição C>T. A hipótese é que essas mutações ocorram preferencialmente na linhagem paterna, nos gametas, por causa do elevado conteúdo CpG metilados no cromossomo X dos espermatozoides (Cheadle et al, 2000).

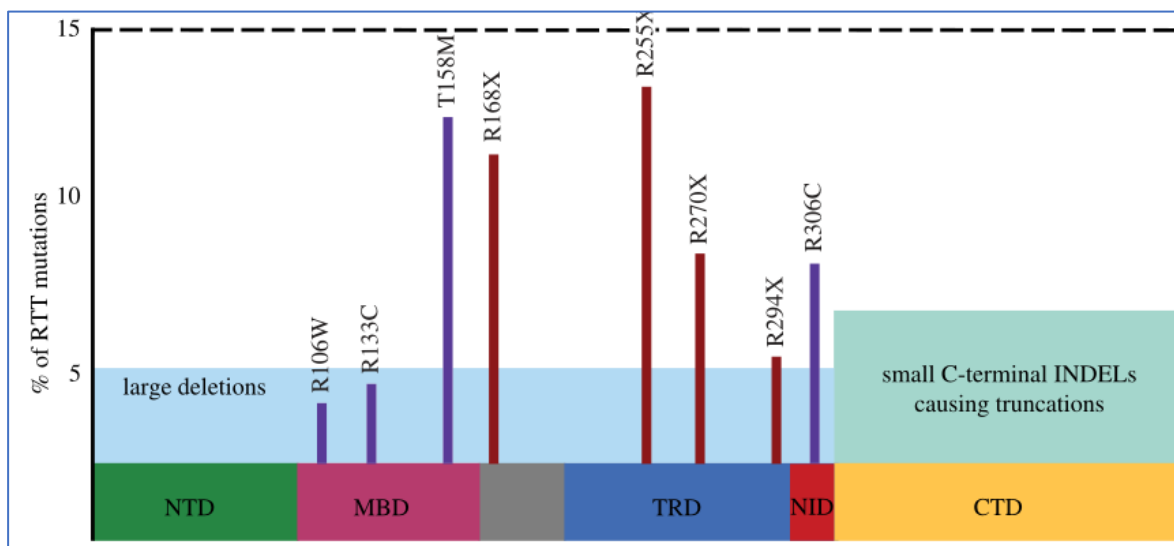


Figura 4 Relação entre as principais lesões moleculares envolvidas em RTT de acordo com a porcentagem/domínio funcional (adaptado de Kyle et al, 2018).

As mutações no gene *MECP2* inativam quase a totalidade, mas não completamente, sua função de interagir com a 5-MeCyt de modo dose dependente e são altamente danosas e não toleradas pelo organismo, o que explica a letalidade das mutações em meninos, pois são hemizogotos, enquanto as meninas, por possuírem duas cópias do gene, sobrevivem. Dessa maneira, a haploinsuficiência é central para o entendimento patológico da RTT (Topçu et al, 2002). De fato, o correto nível de expressão da proteína é importantíssimo para o correto funcionamento neuronal, considerando que a duplicação do *MECP2* causa a síndrome da duplicação de *MECP2* e afeta principalmente meninos (Neul et al, 2019). Por outro lado, há mutações, que prejudicam parcialmente a função da MeCP2, sendo mais severa nos meninos e evoluindo com encefalopatia grave e baixa expectativa de vida. Os casos raríssimos da RTT em meninos foram associados ao mosaicismo e à síndrome de Klinefelter (Villard et al, 2000;).

As mutações no *MECP2* apresentam considerável relação genótipo/fenótipo, pois as mutações que não atingem os domínios MBD e TRD (NID) são associadas a quadros clínicos mais atenuados, a exemplo das deleções ou mutações nonsense que ocorrem na porção CTD, com melhor prognóstico, incluindo o uso das mãos e mobilidade, como p.Arg294* ou p.Arg133Cys, que mantém probabilidade de preservar a fala e o andar (Leonard et al, 2011; Bao et al, 2013; Jian et al, 2007; Mackay et al, 2017; Bebbington et al, 2008; Cuddapah et al, 2014).

A associação da mortalidade a determinadas mutações genéticas não *MECP2* foi investigada e revelou que existe um risco 3,11 vezes maior de morte para grandes deleções; de 3,05 para a mutação p.Arg270*; de 2,24 para p.Arg106Trp e 2,66 para p.Arg306Cys, enquanto a mutação p.Arg255* possuía menor risco de morte (0,52). Presumivelmente, a mortalidade está diretamente associada ao nível de função residual da proteína (Anderson et al, 2014).

Além disso, a inativação randômica do cromossomo X (XCI) acrescenta outra variável fenotípica, pois mesmo entre pacientes com a mesma mutação, a gravidade pode variar amplamente (Ishii et al, 2001). Assim, é possível encontrar casos em que a portadora de mutação grave tenha mais de 90% dos genes expressando a proteína normal enquanto as cópias do *MECP2*, com a variante patogênica, estão restritas nos cromossomos X inativos, levando a um fenótipo mais brando. Assim, existe a possibilidade raríssima de casos de RTT herdável (Hoffbuhr et al, 2002). Portanto, é estimado que 99% dos casos de RTT devam ser esporádicos e 1% seja herdável (Chahrour et al, 2008).

1.5 Abordagens moleculares para o diagnóstico

Os estudos moleculares podem orientar a conduta terapêutica por meio do uso do genótipo do paciente para o prognóstico. A investigação deve ser iniciada nos genes *MECP2*, *CDKL5* e *FOXG1* com o sequenciamento direto e *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) que permitem identificar deleções tão grandes quanto a de um éxon (Erlandson et al, 2003). A pesquisa de mutações nos éxons 3 e 4 do gene *MECP2* é a estratégia preconizada, pois são os únicos éxons codificantes dessa proteína (Leonard et al, 2017).

Caso essas metodologias não encontrem alterações, é recomendado o sequenciamento de exoma completo (WES) que, inclusive, tem o poder de mudar a primeira impressão diagnóstica. Adicionalmente, a hibridização genômica (array-CGH) é uma importante ferramenta para deleções ou duplicações subcromossômicas e recomendada para casos de pacientes com atraso do desenvolvimento, TEA, deficiência intelectual e dimorfismo. Caso seja inconclusiva ou normal, a abordagem WES é mais adequada. A metodologia NGS é promissora por permitir realizar o sequenciamento exoma e genomas e encontrar novas mutações e genes que causem o fenótipo RTT-like (Lucariello et al, 2016).

1.6 Vias metabólicas, genes e processos afetados que causam o fenótipo RTT

A complexidade de se estabelecer o papel da proteína MECP2 foi possível por meio de estudos em modelo animal para a RTT, análise *in vitro* das interações e sítios de ligação da proteína MECP2 ao DNA e, anteriormente, aos estudos de autópsia. Os modelos de RTT utilizam camundongos machos, pois devido à XCI em fêmeas, a complexidade de interpretação dos resultados seria aumentada (Armstrong, 1997; Guy et al, 2001).

O perfil de expressão gênica na ausência da MECP2 demonstrou uma elevação na transcrição de genes cujos produtos são: BDNF, DLX5, DLX6, FKBP5, FXYP1, GATM, MPP1 e SGK1 e a diminuição da expressão de UBE3A e GRID1 (Bienvenu et al, 2006). BDNF é o fator de crescimento mais estudado em RTT. Apesar da elevação de expressão, funcionalmente está prejudicado, afetando sobremaneira a formação das sinapses (Li & Pozzo-Miller, 2014). GATM tem função sobre o metabolismo da creatina e parece ter relação com os sintomas respiratórios de alguns pacientes com RTT (Halbach et al, 2012). FXYP1 é um modulador de uma bomba Na⁺/K⁺ que, quando superexpresso, inibe o crescimento neuronal e a arborização dendrítica (Deng et al, 2007).

Geralmente, a MECP2 parece agir como um modulador global do processo de transcrição de neurônios e atividades dependentes de ativação que repercutem em diversas vias no citoplasma (Skene et al, 2010). Todavia, a comparação entre o perfil de expressão RTT e controles normais não encontrou diferenças críticas do nível de

expressão indicando, ainda que sutis, numerosas desregulações de vias, que parecem responder pelo fenótipo RTT (Ehrhart et al, 2016).

Adicionalmente, a RTT causa alterações neuromorfológicas associadas ao menor crescimento de certas regiões do cérebro, resultando em microcefalia com repercussão funcional, a exemplo dos processos de aprendizagem e função motora. Podem ser tamanhos e peso do cérebro menores; menor melanização da substância *nigra pars compact* (indica hipofunção de neurônios dopaminérgicos); redução no tamanho de neurônios e compactação das suas conexões, arborização de dendritos do córtex (em especial nas camadas III e V), presença de gliose e menor mielinização, especialmente, no tálamo, núcleos da base, cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (Armstrong, 1997). A anatomia patológica não localizou processos de neurodegeneração ou morte celular, em vez disso, a anatomia é mais compatível com atraso no crescimento, que impacta na migração neuronal, neurotransmissão e imaturidade dos dendritos (Armstrong et al, 1995).

Funcionalmente, a falta da MECP2 resulta em desregulação de neurotransmissores, neuromoduladores e da função sináptica. Por exemplo, a desativação de *MECP2* em neurônios gabaérgicos causou fenótipo grave de RTT e é um aspecto importante para as crises convulsivas nas pacientes (Chao et al, 2010). Além disso, a síntese de catecolaminas (dopamina, serotonina e norepinefrina) são reduzidos, resultando no desenvolvimento disfuncional de neurônios a nível de SNC e suprarrenal na de catecolaminas, além da elevação do catabolismo dessas substâncias (Panayotis et al, 2011). Fisiologicamente, a transmissão dopaminérgica, serotoninérgica e da norepinefrina são responsáveis pela fosforilação da MeCP2 e a ausência desta modificação pós-traducional foi associada ao fenótipo RTT (Hutchinson et al, 2012; Bedogni et al, 2014).

Além disso, há hiperativação de neurônios glutamatérgicos, que resulta em perturbações do ciclo do sono, maior produção de glutamina e a maiores demandas energéticas do metabolismo (Viola et al, 2007). Assim, há forte inativação adaptativa dos receptores de glutamato (GRID1) e este é responsável por funções sinápticas e pela diferenciação neuronal. Os baixos níveis de GRID1 podem estar relacionados à ativação da via BDNF, que é diretamente regulado pela MECP2 (Ballas et al, 2009). As perturbações dos sistemas de inibição e excitação neuronal que foram

documentadas na RTT também foram observadas no TEA e na doença de Parkinson e compartilham características como atraso no desenvolvimento e anomalias motoras (Ehrhart et al, 2016).

De forma simultânea, a proteína MECP2 age em neuroblastos e neurônios jovens como ativador transcricional, enquanto em neurônios maduros é preferencialmente um repressor (Li et al, 2013). A expressão embrionária de MeCP2 é basal, eleva-se no pós-natal e estabiliza-se por volta dos 10 anos e é responsável pela sinaptogênese, neuroplasticidade e crescimento de neurônios. Portanto, a função neurológica de MECP2 é essencial no amadurecimento cerebral, explicando a ausência do fenótipo da RTT antes dos 6-18 meses de vida (Monteggia et al, 2009; Kishi et al, 2004; Ehrhart et al, 2016). A formação de sinapses e a sua manutenção dependem da reorganização do citoesqueleto e é evidenciado que MECP2 está envolvida nesse processo por meio das proteínas BDNF e FXTD1 (Bedogni et al, 2014). Em modelo animal, foi possível abolir os achados neurológicos da RTT com a normalização dos níveis de expressão de MeCP2, reforçando que esta é uma síndrome neurológica ao contrário do que inicialmente foi preconizado quando a RTT era vista como uma síndrome que afetava o desenvolvimento, de maneira sintética (Guy et al, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

O estado do Pará possui uma população com limitações socioeconômicas e grande extensão territorial, que constituem uma barreira importante de acesso aos serviços especializados de saúde. É fato que pacientes que necessitem de investigações mais detalhadas precisam se deslocar para o centro de referência para o adequado atendimento. Assim, os casos contabilizados provavelmente refletem os casos da população da região metropolitana e do interior do Estado. Como consequência, ocorre o atraso do diagnóstico clínico e, em muitos casos, a patologia molecular subjacente não chega a ser investigada (Iriart et al, 2019).

Do ponto de vista de gestão, se os casos não são investigados e registrados, não são reconhecidos como um problema a ser trabalhado. Portanto, para garantir que a população com RTT seja adequadamente assistida, é necessário que seja realizado o diagnóstico. Segundo a estimativa de prevalência mundial de RTT de 1:15.000 e o tamanho da população feminina paraense de 4.334.094 pessoas, é esperado que existam pelo menos 280 pessoas afetadas por RTT no Estado (IBGE, 2022; Burd et al, 1991). Os cuidados para essa síndrome incluem particularidades que necessitam do diagnóstico para o correto acompanhamento. Ademais, apesar do mosaicism, existe boa concordância entre o fenótipo e genótipo dessa síndrome, de modo que o correto diagnóstico pode favorecer a independência e aprendizado das pacientes RTT (Tillptson et al, 2017).

Apesar de não existir ainda tratamento específico para a síndrome, muitos estudos estão avançando, permitindo o vislumbre, ainda que distante para novas drogas ou terapia gênica. Dessa forma, manter uma casuística de pacientes RTT seja como participante de pesquisas clínica ou como beneficiário direto da inovação, trará muitos benefícios em especial para melhoria da qualidade de vida das pacientes e da família (Associação Brasileira de Síndrome de Rett, 2022).

3. OBJETIVO

Avaliar o impacto das mutações no gene *MECP2* para o diagnóstico de pacientes com fenótipos e evolução clínica compatível à Síndrome de Rett em serviços especializados.

3.1 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar mutações nos éxons 3 e 4 do gene *MECP2*;
- Investigar associação do genótipo encontrado e o fenótipo clínico da Síndrome de Rett;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

A amostra foi composta por indivíduos na faixa etária entre 0 e 10 anos incompletos encaminhados pelos ambulatórios de Genética e Neurologia do Hospitalar Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS) (Campus Belém- UFPA), da Unidade de Referência Especializada Materno-Infantil e Adolescente (UREMIA) e da Secretaria de Saúde de Belém (SESMA), todos localizados na região metropolitana de Belém-PA, durante o período compreendido entre março de 2017 e julho de 2019. O diagnóstico de RTT inicialmente fazia parte de estratégia de triagem de condições genéticas para diagnóstico de TEA e DI, os casos positivos eram encaminhados para realização de sequenciamento do gene *MECP2*.

4.2 Aspectos éticos

O presente estudo levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. As famílias dos pacientes que aceitaram participar deste estudo receberam um termo de consentimento livre e esclarecido, além de informações sobre os objetivos da pesquisa. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA (protocolo 0101.0.073.000-11). Os representantes legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido desta pesquisa (Apêndice A).

4.3 Caracterização clínica dos pacientes com suspeita de Síndrome de Rett

Foi aplicado formulário clínico considerando os critérios diagnósticos, histórico pessoal e familiar, anomalias congênitas, tratamento atual e exames complementares que estejam disponíveis. Foram avaliados mediante prontuários e informações de formulários para RTT que inclui aplicação do algoritmo diagnóstico (Rodríguez, 2014) baseado nos últimos critérios diagnósticos propostos por Neul et al. (2010) (Apêndice B), escala de gravidade clínica (Kerr et al., 2001) (Apêndice C).

4.4. Coleta de material biológico

Dos pacientes selecionados, foram coletados 5,0 mL de sangue periférico em tubos com EDTA, dos quais uma alíquota de 1,0mL foi destinada para extração de DNA.

4.5 Isolamento e quantificação de DNA

Para isolar o DNA foi utilizado o Kit comercial para o Library Builder™ System (Thermo Fisher®). A quantificação do DNA total foi realizada no equipamento Qubit® 2.0.

4.6 Investigação de variantes nos éxons 3 e 4 do gene *MECP2* mediante sequenciamento em pacientes com fenótipo RTT.

Após a extração de DNA, foi realizada a reação de cadeia de polimerase (PCR) com kit comercial Invitrogen® de acordo a padronização de cada reação (Tabela 1).

4.6.1 Amplificação do Exon 3

Para a PCR do Exón 3, foi utilizado o protocolo previamente padronizado, com as seguintes concentrações finais: 0,75 ng/μL de DNA, 0,5X de Tampão de Reação 10X PCR (Invitrogen), 1,875mM/μL de MgCl₂ 50mM (*Invitrogen*), 0,02mM/μL de DNTPs 0,125mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 mM/μL de cada iniciador (MECPE3F e MECPE3R) e 0,05U/μL de Taq Platinum DNA Polimerase (*Invitrogen*) em 11,25μL de Água Ultrapura. O volume final de cada reação foi 20,0μL.

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 8 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, pareamento a 61°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, seguido de mais 22 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C durante 50 segundos. A extensão final foi de 72°C durante 10 minutos. O tamanho do fragmento amplificado correspondeu a 600 pb.

4.6.2 Amplificação do Éxon 4

As reações foram conduzidas em um termociclador Veriti (*Thermal Cycler*) em um volume final de 25µL. A concentração final de 0,6 ng/µL de DNA, 1X de Tampão de Reação 5X PCR (Promega), 1 mM/µL de MgCl₂ 25 mM (*Promega*), 0,01mM/µL de DNTP a uma concentração de 0,125 mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (*Invitrogen*), 0,4mM/µL de cada iniciador de MECPE4F e MECPE4R e 0,6 U/µL de Taq Platinum DNA Polimerase (*Promega*) em 13,7 µL de Água Ultrapura.

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 54°C por 15 segundos e extensão a 72° C por 40 segundos e extensão final a 72°C durante 30 minutos. Os produtos amplificados possuem tamanho aproximado de 1310 pb.

4.6.3 Amplificação do Éxon 4A

Para a PCR do éxon 4A foi utilizado o protocolo com concentração final de 3,2ng/µL de DNA, 14,00 µL de Água Ultrapura, 1X/ul de Tampão de Reação 10X PCR (Invitrogen), 3mM/µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 0,0025 mM/µL de DNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 mM/µL de cada iniciador (MECPE4AF e MECPE4AR) e 0,1 U/µL de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen). O volume final de cada reação é de 25µL.

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, pareamento a 59,7°C por 45 segundos e extensão a 72° C por 50 segundos, a extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os produtos amplificados têm aproximadamente 368 pb.

4.6.4 Amplificação do Éxon 4B

Para a PCR do Exón 4B foram utilizados na concentração final: 0,65ng/µL de DNA, 1,09X/ul de Tampão de Reação 10X PCR (Invitrogen), 3,26 mM/µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 0,0027mM/µL de DNTPs 0,125mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,043mM/ µL de cada iniciador (MECPE4BF e MECPE4BR) e 0,065 U/µL de Taq

Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) em 15,20µL de Água Ultrapura, O volume final de cada reação é de 23µL.

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, pareamento a 59,6°C por 45 segundos e extensão a 72° C por 60 segundos, a extensão final a 72°C durante 6 minutos. Os produtos amplificados têm aproximadamente 366 pb.

4.6.5 Amplificação do Éxon 4C

Para a PCR do Exón 4C foram utilizados 0,65ng/µL de DNA, 1,09X/µL de Tampão de Reação 10X PCR (Invitrogen), 2,17 mM/µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 0,0027 mM/µL de DNTPs 0,125mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,43mM/µL de iniciadores (MECPE4BF e MECPE4BR) e 0,087 U/µL de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), em 15,60 µL de Água Ultrapura com um volume final de 23µL.

As condições de ciclagem utilizadas foram as mesmas do Éxon 4B, e o produto amplificado tem aproximadamente 349 pb.

4.6.6 Amplificação do Éxon 4D

Para a PCR do éxon 4D foram utilizados em concentração final 0,6 ng/µL de DNA, 0,5X/µL de Tampão de Reação 5X PCR (Promega), 1 mM/µL de MgCl₂ 25mM (Promega), 0,0625 mM/µL de DNTPs 0,125mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 mM/µL de cada iniciador (MECPE4DF e MECPE4DR) e 0,06 U/µL de Taq DNA Polimerase (Promega), em 14,30 µL de Água Ultrapura, com um volume final de 25µL.

As condições de ciclagem utilizadas foram de desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min; pareamento a 61°C por 45 segundos e extensão a 72° C por 60 segundos e a extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os produtos amplificados têm aproximadamente 377 pb.

4.6.7 Amplificação do Éxon 4E

As reações terão um volume final de 23 µL, e serão utilizados as seguintes concentrações finais 0,65ng/µL de DNA, 1,09X/µL de Tampão de Reação 10X PCR (Invitrogen), 3,26mM µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,0027mM/µL de DNTP a uma concentração de 0,125 mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen), 0,43mM/µL de cada iniciador e 0,065 U/µL de 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) em 15,45 µL de Água Ultrapura As condições de ciclagem utilizadas serão: desnaturação inicial: 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 60,5°C por 45 segundos e extensão a 72° C por um minuto e extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os produtos amplificados terão aproximadamente 327 pb.

Tabela 01: Sequências dos primers e tamanho dos fragmentos amplificados dos éxons 3 e 4 do gene *MECP2*

Éxon	Tamanho (pb)	Sequência Primers
Éxon 3	611	MECPE3F: CAGGAAACAGCTATGACCTCTGAGTGTATGATGGCCTGG MECPE3R: TGTA AACGACGGCCAGTCATTTCAAGCACACCTGGTCT
Éxon 4	1310	MECPE4F: CGCTCTGCCCTATCTCTGAC MECPE4R: TTCTTGTTGGTTTGCTTTGC
Éxon 4 ^a	368	RETT-4AF: TTTGTCAGAGCGTTGTCACC RETT-4AR: TTTCTCCAGGACCCTTTTCA
Éxon 4B	366	RETT-4BF: CAAATCTCCCAAAGCTCCAG RETT-4BR: TCCTGCACAGATCGGATAGA
Éxon 4C	349	RETT-4CF: CAGGCCATTCCCAAGAAAC RETT-4CR: CCTTTGGGGACTCTGAGTGG
Éxon 4D	377	RETT-4DF: GAGAAGAGCGGGAAAGGACT RETT-4DR: TCCCCTCGGTGTTTGTACTT
Éxon 4E	327	RETT-4EF: AGCGTCTGCAAAGAGGAGAA RETT-4ER: AATCGGGAAGCTTTGTCAGA

Fonte: POP-LEIM-UFPA

4.7 Verificação e purificação dos produtos da PCR

Após a PCR, todos os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com Syber Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). A visualização dos géis foi feita por meio de luz ultravioleta. A concentração dos produtos foi estimada visualmente com a utilização do marcador Low DNA Mass Ladder e 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). A purificação dos produtos de PCR foi feita com as enzimas Exonuclease I (GE Healthcare) (EXO) e Fosfatase Alcalina (GE Healthcare) (SAP), segundo especificações do fabricante.

4.8 Reação de sequenciamento

Para todas as reações de sequenciamento (Exon 3, 4, 4A, 4B, 4C, 4D e 4E) foram utilizados 1,5 µL de DNA (produto de PCR), 5,0 µL de Água Ultrapura, 1,5 µL de Tampão BigDye (ThermoFisher), 1 µL de BigDye® Terminator (ThermoFisher), 1 µL de iniciadores. As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial por 96°C durante 10 segundos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 57°C por um minuto e extensão a 60° C por um minuto e meio. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na tabela 2.

As reações de sequenciamento foram submetidas à eletroforese de capilar no sequenciador automático ABI 3500XL no Centro de Inovações Tecnológicas do Instituto Evandro Chagas.

4.9 Edição e análise das sequências

As sequências obtidas foram editadas manualmente com o auxílio do programa Sequencher ® Versão 5.4.6. O alinhamento dos contigs foi feito com sequências referências de DNA genômico, da isoforma 2 (NM_001110792.1) (mais comum na população) obtidos no RettBase (<http://MECP2.chw.edu.au/>). Também foi utilizada a ferramenta BLAST na plataforma online Ensembl, para determinar a posição das alterações no genoma.

Tabela 02: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento dos éxons 3 e 4 do gene *MECP2*.

Éxons	Primers	Sequências dos Primers
3	M13Fseq	CAGGAAACAGCTATGACC
	M13Rseq	TGTAAAACGACGGCCAGT
	MECPE4.1Rseq	CCGGCCTCTGCCAGTTC
	MECPE4.2Fseq	GGTAGGCGACACATCC
4	MECPE4.2Rseq	ACCGTCTCCCGGGTCTT
	MECPE4.3Fseq	GGTCCTGGAGAAAAGTCC
	MECPE4.3Rseq	CTCTCCAGTGAGCCTCCTCT
	MECPE4.4Fseq	AGAAGGAGCACCA
4 ^a	MECPE4.ARseq	TTTGTGAGAGCGTTGTCACC
	MECPE4.AFseq	TTTCTCCAGGACCCCTTTCA
4B	MECPE4.BRseq	CAAATCTCCCAAAGCTCCAG
	MECPE4.BFseq	TCCTGCACAGATCGGATAGA
4C	MECPE4.CRseq	CAGGCCATTCCCAAGAAAC
	MECPE4.CFseq	CCTTTGGGGACTCTGAGTGG
4D	MECPE4.DRseq	GAGAAGAGCGGGAAAGGACT
	MECPE4.DFseq	TCCCCTCGGTGTTTGTACTT
4E	MECPE4.ERseq	AGCGTCTGCAAAGAGGAGAA
	MECPE4.EFseq	AATCGGGAAGCTTTGTCAGA

4.10 Análise das mutações

Foi realizada a investigação da patogenicidade das mutações encontradas na ferramenta online Clinvar (NCBI). Em caso de mutação não patogênica, se procedeu a investigação da frequência da mutação ou polimorfismo na população, por meio da ferramenta online dbSNP (NCBI). Caso a mutação não tenha sido reportada previamente, seria estimada a sua patogenicidade *in silico* mediante a ferramenta online Mutation Taster® (SCHWARZ et al., 2014).

4.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram procedidas com auxílio do programa BioEstat® (AYRES et al., 2013) de acordo com o tamanho amostral e tipo de variável. A comparação da gravidade clínica entre RTT típico e atípico e diferentes variantes no gene *MECP2* foi realizada pelo teste de Mann Whitney U. A comparação do tipo de

RTT e os achados moleculares (patogênicos, não patogênicos ou de significado incerto) foi realizada pelo teste de Exato de Fisher. Finalmente, a paridade do tipo de variante se estabeleceu mediante o teste T de Student. Para todas as comparações foram consideradas variantes com significância estatística quando $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

No total, foram encaminhados e avaliados 17 pacientes do sexo feminino e dois pacientes do sexo masculino no período de 2017 a 2019 para a investigação dos éxons 3 e 4. Os dados clínicos e de exame complementares, bem como a avaliação clínica, foram recuperados por meio de coleta transversal dos prontuários e avaliação clínica, que permitiu diagnosticar 12 pacientes com RTT conforme a ficha de avaliação clínica e incluiu um menino (anexo I). Os principais motivos da investigação molecular dos pacientes foi DI e TEA, que foram encaminhados com a suspeita diagnóstica de RTT.

Após avaliação clínica dos critérios diagnósticos de Neul et al, 2010, 70,6% (12/17) tiveram o diagnóstico de RTT, sendo que destes, 58% (7/12) dos casos foram diagnosticados com RTT típico e 42% (5/12) com RTT atípico, distribuídos nas idades da mediana de 7,8 anos (intervalo interquartil: 5,4-8,8) para o RTT clássico e mediana de 3,8 anos (intervalo interquartil: 1,9-8,3) para RTT atípico na época do encaminhamento.

Todos os casos de RTT típica cumpriram os quatro critérios principais de diagnóstico. Na RTT atípica, todos os pacientes apresentaram ausência de habilidades da linguagem ou rudimentar relativo à idade e alteração de marcha ou mesmo sem o desenvolvimento do andar; n=4 (80%) apresentavam estereotipia das mãos e a perda do uso das mãos foram n=2 (40%). Em relação aos critérios secundários, tanto o bruxismo ao acordar quanto à linguagem inapropriada (risos ou gritos) foram os mais frequentes (100%) em RTT típica e RTT atípica. Em ambos os grupos, cifose/escoliose e atraso do crescimento não foram frequentes (**tabela 01**).

Tabela 03 Critérios principais e secundários dos pacientes diagnosticados com RTT.

Critérios	Número absoluto dos pacientes RTT	
	Clássico	Atípico
Principais		
Perda parcial ou completa de uso das mãos	7 (100%)	2 (40,0%)
Perda parcial ou completa da linguagem	7 (100%)	5 (100%)
Anormalidade da marcha	7 (100%)	5 (100%)
Estereotipia de movimentos das mãos	7 (100%)	4 (80,0%)
Secundários		
Anomalias respiratórias ao acordar	5 (71,4%)	2 (28,5%)
Bruxismo ao acordar	7 (58,3%)	5 (41,6%)
Padrão de sono irregular	5 (55,5%)	4 (44,4%)
Anomalia do tônus muscular	6 (54,5%)	5 (45,4%)
Anomalia vasomotora periférica	4 (66,6%)	2 (33,3%)
Escoliose/cifose	2 (66,6%)	1 (33,3%)
Atraso do crescimento*	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Pés e mãos pequenos e gelados	5 (71,4%)	2 (28,5%)
Crises inapropriadas de risos ou gritos	7 (58,3%)	5 (41,6%)
Respostas diminuída à dor	6 (66,6%)	3 (33,3%)
Intensa comunicação visual	6 (60,0%)	4 (40,0%)
Anomalias respiratórias ao acordar	5 (71,4%)	2 (28,5%)
Bruxismo ao acordar	7 (58,3%)	5 (41,6%)
Padrão de sono irregular	5 (55,5%)	4 (44,4%)
Anomalia do tônus muscular	6 (54,5%)	5 (45,4%)

*sem dado de um sintoma do paciente RTT típico.

A escala de gravidade de Kerr para a avaliação clínica dos pacientes como um todo resultou na média de 20 (DP=4,3). Quando foi avaliado por tipo de RTT, o teste de Mann Whitney U ($p=0,2353$) não mostrou diferença significativa em relação à gravidade do fenótipo entre RTT clássico (mediana de 21,5) e o RTT atípico (mediana de 18) em relação à pontuação total para cada grupo. Não houve diferença significativa entre a pontuação para cada um dos parâmetros das formas clínicas RTT clássica e RTT atípica. Em relação à epilepsia, não houve diferença significativa entre os grupos clínicos RTT clássica e RTT atípica, condição clínica apresentada por 83% (9/12) no total (figura 05).

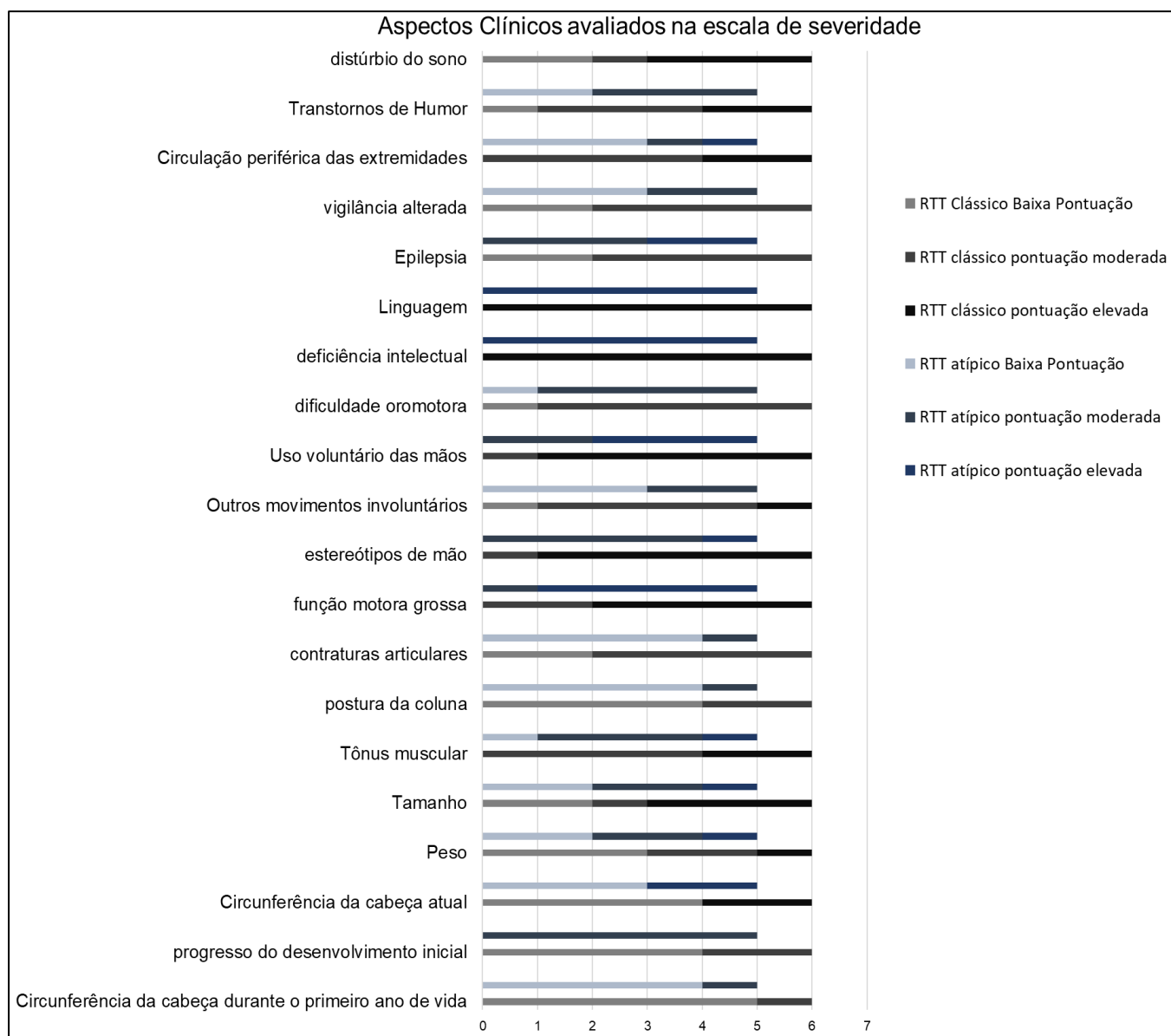


Figura 5 Pontuações agrupadas em baixa (0), média (1) e alta (2) na escala de severidade de Kerr para pacientes RTT clássico e RTT atípico. Uma paciente com RTT clássico foi excluída por não ter alguns dados clínicos.

A investigação de variantes foi realizada através de sequenciamento dos produtos amplificados dos éxons 3 e 4 do gene *MECP2* de 12 pacientes. Destes, 25% (3/12) das pacientes apresentaram mutações patogênicas: duas pacientes com a variante p.Arg294* e uma para p.Arg168* (figura 06).

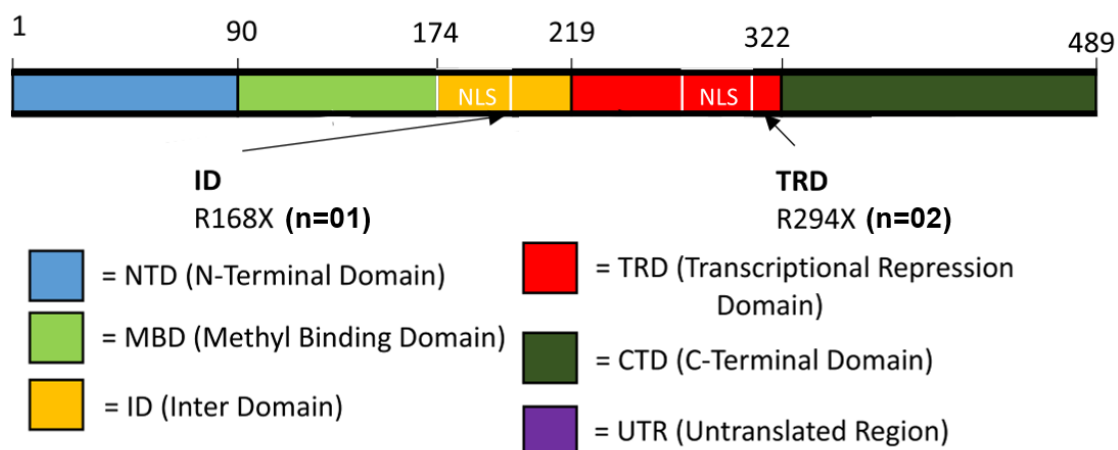


Figura 6 Localização dos domínios perdidos da proteína MECP2 devido ao término prematuro causado pelas variantes patogênicas nos éxons 3 e 4 do gene *MECP2*.

Segundo o teste exato de Fisher, não houve diferença significativa entre RTT clássico e o RTT atípico quanto à presença das variantes patogênicas encontradas (tabela 04).

Tabela 04 – Tipo clínico de RTT em relação às mutações.

Variáveis	Pacientes com mutação	Pacientes sem mutação	P-valor
Clássico	3 (42,9%)	4 (57,1%)	0,20
Atípico	0(0%)	5(100%)	

Além dos resultados supracitados, a análise de sequenciamento permitiu a identificação do SNP rs3027928 no éxon 4 do gene *MECP2*, encontrado na maioria dos pacientes e seus pais, sendo 66,7% (8/12) em heterozigose ou homozigose. A frequência alélica nas famílias foi de 0,378 superior a encontrada (0,0326) no 1000 Genomes, que representa a frequência mundial do alelo. Pelo teste t a diferença foi considerada significativa ($p < 0,0001$). O resultado do *Odds ratio* (OR=1,3) indicou não haver associação entre a gravidade de RTT e este polimorfismo.

7. DISCUSSÃO

A Síndrome de Rett é fundamentalmente uma entidade clínica, de modo que mesmo na ausência de detecção de mutação, os sinais clínicos são suficientes para o fechamento do diagnóstico. Em conformidade à estratégia de triagem genética, a pesquisa de mutações no gene *MECP2* para meninas com fenótipo TEA-like e deficiência intelectual é aplicada com resultados exitosos e úteis para o diagnóstico diferencial (Xiang et al, 2000; Schuch et al, 2015; Navarro-Pardo et al, 2021).

Neste estudo, obteve-se o diagnóstico clínico de três pacientes com mutação e com apresentação clínica de RTT clássica, representando 25% dos casos com diagnóstico molecular. Essa porcentagem é normalmente maior em outros estudos com pacientes com suspeita clínica de RTT (Lima et al, 2009). Por outro lado, o diagnóstico de RTT pelo sequenciamento exclusivo dos éxons 3 e 4 concordou com o estudo de Philippe e colaboradores (2005), que encontraram 121 com mutação no gene *MECP2* (28,5%) em um total de 424 pacientes com RTT, frequência similar a encontrada em nosso estudo (3/12; 25%). A ampliação das regiões de estudo no gene *MECP2* pode aumentar a capacidade de detecção de mutações em pacientes RTT, como no trabalho de Monerat e colaboradores (2009), que investigaram a região 3' UTR, éxons 2, 3 e 4, resultando em uma frequência de 61,3% (49/80) de mutações em pacientes com RTT.

A continuação da análise molecular deve ser realizada para investigar a presença de mutações nos éxons 1 e 2 do *MECP2*, e dos genes *CDK5* e *FOXG1*, pesquisa de microdeleções em array-CGH e WES. Os estudos de NGS permitiram investigar o espectro de genes potencialmente causadores de fenótipo RTT-like, o que possibilita explicar a presença de um paciente do sexo masculino com o referido fenótipo (Vidal et al, 2019).

As mutações encontradas foram a p.Arg168* e a p.Arg294* que são classificadas como causadoras da síndrome de Rett e constam no RettBase como sendo a segunda e a sexta mutações mais frequentes, respectivamente. Pelo seu caráter esporádico, não é esperado que os progenitores sejam portadores de mutação no gene *MECP2* e assim foi observado no sequenciamento dos pais da paciente. As formas atípicas dessa condição são associadas às variantes em outros genes além do *MECP2*. Então são esperadas diferenças entre pacientes com a forma clássica e

com mutação neste gene em relação às outras formas clínicas, porém, em nosso estudo, não houve diferença significativa, concordando com o estudo de Lima e colaboradores (2009), que avaliaram 105 pacientes e não encontraram diferença significativa e as pacientes com mutação encontrada apresentaram a clínica compatível com a RTT clássica.

A média de gravidade de RTT avaliados pela escala de Kerr foi similar à encontrada no trabalho de Colvin e colaboradores (2003), que avaliaram 131 meninas (média de 22,9; SD=4,8). A avaliação genótipo-fenótipo das pacientes com mutação, pelo critério de gravidade proposto por Kerr, permitiu categorizar a gravidade global moderada nas pacientes. Os critérios de gravidade permitem realizar uma avaliação clínica e de possível conduta terapêutica que revelam a progressão, regressão ou estagnação da condição, em que, quanto menor a pontuação, melhor as condições gerais de um total de 37 pontos, que é considerado o mais grave (Kerr et al, 2001).

As pacientes com as mutações p.Arg168* e a p.Arg294* apresentaram pontuação de 20 e 17, respectivamente. A mutação p.Arg168* é associada a um fenótipo grave, pois há perda de todo o domínio TRD (figura 06), porém é fortemente influenciado pelo padrão de inativação do cromossomo X enquanto a p.Arg294* é mais branda e tem prognóstico favorável (Archer et al, 2007; Bebbington et al, 2008; Cuddapah et al, 2014).

As mutações encontradas nesse trabalho foram do tipo nonsense, cujo fenótipo é associado a casos mais graves por produzir uma proteína truncada. Todavia, a maneira mais eficiente de prever o fenótipo é por meio da avaliação dos domínios afetados (Huppke et al, 2002). No presente estudo, todas as variantes patogênicas foram localizadas no éxon 4 na região TRD do gene *MECP2*. Devido a diferenças funcionais nesse domínio, é padrão separá-lo em TRD e TRD-NID. As variantes patogênicas encontradas estão localizadas nas posições c.502C>T (p.Arg168Ter), que prejudica o domínio IR (perdendo os domínios TRD e TRD-NID), e em c.880C > T (p.Arg294Ter), que afeta o domínio TRD (Philippe et al, 2006).

Assim, a perda do NID (p.Arg168*) foi associada a falha de endereçamento da proteína MECP2 ao núcleo, que prejudica sua capacidade de repressão transcricional enquanto que a mutação p.Arg294*, que perde parte do TRD após o NID, consegue manter parte de sua capacidade de repressão preservada. Logo, as pacientes com

RTT portadores da variante p.Arg294* têm um fenótipo mais leve (Leonard et al, 2011). A paciente com a variante patogênica p.Arg168* apresentou microcefalia, alterações articulares e o uso voluntário das mãos ausente, condições clínicas não apresentada nas pacientes com a p.Arg294*. A menor perda das atividade motoras manuais voluntária foi associada à variante p.Arg294*, resultado que está de acordo com estudos prévio (Leonard et al, 2011; Colvin et al, 2004).

A iniciativa pioneira de ofertar este serviço diagnóstico no Pará traz consigo limitações próprias da região somadas à raridade da doença, como: o número limitado de profissionais para diagnóstico clínico; geográfico, com a perda de seguimento dos casos e logísticos por conta das limitações socioeconômicas e a baixa demografia da população (Fehr et al, 2011; Lopes et al, 2018). Um importante indicador desta realidade é a idade média de diagnóstico e, em especial, para os casos RTT clássico, cuja clínica demanda atenta observação e acompanhamento em relação à forma atípica, que apresenta fenótipo mais distinto, embora nesse presente estudo não tenha sido encontrado diferença significativa entre a forma clássica e atípica quanto a gravidade do fenótipo. A mediana de idade de diagnóstico para a RTT clássica foi de 7,8 anos nesse estudo, enquanto a estimativa global foi estimada em 2,5 anos. Quanto à RTT atípica a mediana de idade de diagnóstico foi de 3,8 anos para RTT atípica, concordando como a estimativa mundial de 3,8 anos (Tarquinio et al, 2015).

Assim, os casos selecionados foram aqueles encaminhados com clínica fortemente sugestiva e centrados na elucidação da deficiência intelectual. A busca em uma população com epilepsia poderia ser mais representativa para o diagnóstico de casos de RTT, contrastando com a atual casuística. Por exemplo, no estudo de Pereira e colaboradores (2019), a presença de mutações em pacientes com epilepsia representou 83% dos casos. Em concordância, outro estudo mostrou mutações em 62% das meninas com epilepsia crônica e concorda com estudos em que a ocorrência de mutação no *MECP2* pode chegar a 72,3%. Uma investigação nesse sentido está em andamento pelo grupo em um projeto maior. Estes desafios podem explicar em parte a casuística baixa (Rodriguez et al, 2020).

Além das variantes patogênicas, a investigação molecular identificou a variante benigna rs3027928, inclusive presente nas três pacientes com as variantes patogênicas no éxon 4 do gene *MECP2* já supracitadas. A elevada frequência da

variante rs3027928 (c.1269C>T; p.Ser423=) neste trabalho não demonstrou ter relevância clínica à RTT (OR = 1,3), aparentando ser um achado prevalente próprio da população. Para responder a esta hipótese, estudos de ancestralidade, associação e avaliação de mais variáveis são recomendados.

8. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi realizado o processo de investigação da Síndrome de Rett no estado do Pará e, para tanto, procedimentos de diagnóstico genético. Três pacientes foram caracterizados molecularmente. As mutações encontradas (p.Arg168* e a p.Arg294*) são prevalentes na RTT e esses achados moleculares concordam com o fenótipo encontrado em pacientes com RTT clássica. Em contrapartida, a variante mais prevalente (rs3027928), não demonstrou possuir relevância clínica nesse trabalho, embora seja interessante realizar estudos populacionais para, de fato, entender se ela configura uma variante regional. São necessárias investigações adicionais nos pacientes com clínica compatíveis à da síndrome de RTT, sem mutações encontradas. Por fim, estudos com pacientes com RTT permitem identificar prováveis candidatos a tratamentos para estabelecer a abordagem terapêutica com maiores ganhos de qualidade de vida e suscitar medidas para políticas públicas que visem contemplar estes pacientes.

9. REFERÊNCIAS

- Allou, L.; Julia, S.; Amsallem, D.; El Chehadeh, S.; Lambert, L.; Thevenon, J.; Duffourd, Y.; Saunier, A.; Bouquet, P.; Pere, S.; et al. Rett-like Phenotypes: Expanding the Genetic Heterogeneity to the KCNA2 Gene and First Familial Case of CDKL5 -related Disease. *Clin. Genet.* **2017**, *91*, 431–440, doi:10.1111/cge.12784.
- Amir, R.E.; Van den Veyver, I.B.; Wan, M.; Tran, C.Q.; Francke, U.; Zoghbi, H.Y. Rett Syndrome Is Caused by Mutations in X-Linked MECP2, Encoding Methyl-CpG-Binding Protein 2. *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 185–188, doi:10.1038/13810.
- Amir, R.E.; Van den Veyver, I.B.; Wan, M.; Tran, C.Q.; Francke, U.; Zoghbi, H.Y. Rett Syndrome Is Caused by Mutations in X-Linked MECP2, Encoding Methyl-CpG-Binding Protein 2. *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 185–188, doi:10.1038/13810.
- Anderson, A.; Wong, K.; Jacoby, P.; Downs, J.; Leonard, H. Twenty Years of Surveillance in Rett Syndrome: What Does This Tell Us? *Orphanet J. Rare Dis.* **2014**, *9*, 87, doi:10.1186/1750-1172-9-87.
- Archer, H.; Evans, J.; Leonard, H.; Colvin, L.; Ravine, D.; Christodoulou, J.; Williamson, S.; Charman, T.; Bailey, M.E.S.; Sampson, J.; et al. Correlation between Clinical Severity in Patients with Rett Syndrome with a p.R168X or p.T158M MECP2 Mutation, and the Direction and Degree of Skewing of X-Chromosome Inactivation. *J. Med. Genet.* **2006**, *44*, 148–152, doi:10.1136/jmg.2006.045260.
- Ariani, F.; Hayek, G.; Rondinella, D.; Artuso, R.; Mencarelli, M.A.; Spanhol-Rosseto, A.; Pollazzon, M.; Buoni, S.; Spiga, O.; Ricciardi, S.; et al. FOXP1 Is Responsible for the Congenital Variant of Rett Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *83*, 89–93, doi:10.1016/j.ajhg.2008.05.015.
- Armstrong, D.; Dunn, J.K.; Antalffy, B.; Trivedi, R. Selective Dendritic Alterations in the Cortex of Rett Syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1995**, *54*, 195–201, doi:10.1097/00005072-199503000-00006.
- ARMSTRONG, D.D. Review of Rett Syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1997**, *56*, 843–849, doi:10.1097/00005072-199708000-00001.
- Ausió, J. MECP2 and the Enigmatic Organization of Brain Chromatin. Implications for Depression and Cocaine Addiction. *Clin. Epigenetics* **2016**, *8*, 58, doi:10.1186/s13148-016-0214-5.
- Ballas, N.; Liroy, D.T.; Grunseich, C.; Mandel, G. Non-Cell Autonomous Influence of MECP2-Deficient Glia on Neuronal Dendritic Morphology. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 311–317, doi:10.1038/nn.2275.
- Ballestar, E.; Yusufzai, T.M.; Wolffe, A.P. Effects of Rett Syndrome Mutations of the Methyl-CpG Binding Domain of the Transcriptional Repressor MECP2 on Selectivity for Association with Methylated DNA. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7100–7106, doi:10.1021/bi0001271.

- Bao, X.; Downs, J.; Wong, K.; Williams, S.; Leonard, H. Using a Large International Sample to Investigate Epilepsy in Rett Syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* **2013**, *55*, 553–558, doi:10.1111/dmcn.12093.
- Bebbington, A.; Anderson, A.; Ravine, D.; Fyfe, S.; Pineda, M.; de Klerk, N.; Ben-Zeev, B.; Yatawara, N.; Percy, A.; Kaufmann, W.E.; et al. Investigating Genotype-Phenotype Relationships in Rett Syndrome Using an International Data Set. *Neurology* **2008**, *70*, 868–875, doi:10.1212/01.wnl.0000304752.50773.ec.
- Bedogni, F.; Rossi, R.L.; Galli, F.; Cobolli Gigli, C.; Gandaglia, A.; Kilstrup-Nielsen, C.; Landsberger, N. Rett Syndrome and the Urge of Novel Approaches to Study MECP2 Functions and Mechanisms of Action. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2014**, *46*, 187–201, doi:10.1016/j.neubiorev.2014.01.011.
- Bienvenu, T.; Chelly, J. Molecular Genetics of Rett Syndrome: When DNA Methylation Goes Unrecognized. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 415–426, doi:10.1038/nrg1878.
- Burd, L.; Randall, T.; Martsolf, J.T.; Kerbeshian, J. Rett Syndrome Symptomatology of Institutionalized Adults with Mental Retardation: Comparison of Males and Females. *Am. J. Ment. Retard.* **1991**, *95*, 596–601.
- Caffarelli, C.; Gonnelli, S.; Pitinca, M.D.T.; Camarri, S.; Al Refaie, A.; Hayek, J.; Nuti, R. Methyl-CpG-Binding Protein 2 (MECP2) Mutation Type Is Associated with Bone Disease Severity in Rett Syndrome. *BMC Med. Genet.* **2020**, *21*, 21, doi:10.1186/s12881-020-0960-2.
- Cardaioli, E.; Dotti, M.T.; Hayek, G.; Zappella, M.; Federico, A. Studies on Mitochondrial Pathogenesis of Rett Syndrome: Ultrastructural Data from Skin and Muscle Biopsies and Mutational Analysis at MtDNA Nucleotides 10463 and 2835. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **1999**, *31*, 301–304.
- Cartron, P.-F.; Nadaradjane, A.; LePape, F.; Lalier, L.; Gardie, B.; Vallette, F.M. Identification of TET1 Partners That Control Its DNA-Demethylating Function. *Genes Cancer* **2013**, *4*, 235–241, doi:10.1177/1947601913489020.
- Chahrour, M.; Jung, S.Y.; Shaw, C.; Zhou, X.; Wong, S.T.C.; Qin, J.; Zoghbi, H.Y. MECP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. *Science (80-.)*. **2008**, *320*, 1224–1229, doi:10.1126/science.1153252.
- Chahrour, M.; Jung, S.Y.; Shaw, C.; Zhou, X.; Wong, S.T.C.; Qin, J.; Zoghbi, H.Y. MECP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. *Science (80-.)*. **2008**, *320*, 1224–1229, doi:10.1126/science.1153252.
- Chao, H.-T.; Chen, H.; Samaco, R.C.; Xue, M.; Chahrour, M.; Yoo, J.; Neul, J.L.; Gong, S.; Lu, H.-C.; Heintz, N.; et al. Dysfunction in GABA Signalling Mediates Autism-like Stereotypies and Rett Syndrome Phenotypes. *Nature* **2010**, *468*, 263–269, doi:10.1038/nature09582.

- Cheadle, J.P. Long-Read Sequence Analysis of the MECP2 Gene in Rett Syndrome Patients: Correlation of Disease Severity with Mutation Type and Location. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, 9, 1119–1129, doi:10.1093/hmg/9.7.1119.
- Colvin, L. Describing the Phenotype in Rett Syndrome Using a Population Database. *Arch. Dis. Child.* 2003, 88, 38–43, doi:10.1136/ad.88.1.38.
- Cuddapah, V.A.; Pillai, R.B.; Shekar, K. V; Lane, J.B.; Motil, K.J.; Skinner, S.A.; Tarquinio, D.C.; Glaze, D.G.; McGwin, G.; Kaufmann, W.E.; et al. Methyl-CpG-Binding Protein 2 (MECP2) Mutation Type Is Associated with Disease Severity in Rett Syndrome. *J. Med. Genet.* **2014**, 51, 152–158, doi:10.1136/jmedgenet-2013-102113.
- Delépine, C.; Nectoux, J.; Bahi-Buisson, N.; Chelly, J.; Bienvenu, T. MECP2 Deficiency Is Associated with Impaired Microtubule Stability. *FEBS Lett.* **2013**, 587, 245–253, doi:10.1016/j.febslet.2012.11.033.
- Deng, V.; Matagne, V.; Banine, F.; Frerking, M.; Ohliger, P.; Budden, S.; Pevsner, J.; Dissen, G.A.; Sherman, L.S.; Ojeda, S.R. FXYD1 Is an MECP2 Target Gene Overexpressed in the Brains of Rett Syndrome Patients and MECP2 -Null Mice. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, 16, 640–650, doi:10.1093/hmg/ddm007.
- Donzel-Javouhey A, Thauvin-Robinet C, Cusin V, et al. A new cohort of MECP2 mutation screening in unexplained mental retardation: careful re-evaluation is the best indicator for molecular diagnosis. *Am J Med Genet A* 15-7- 2006;140(14):1603e7.
- Downs, J.; Bebbington, A.; Jacoby, P.; Williams, A.-M.; Ghosh, S.; Kaufmann, W.E.; Leonard, H. Level of Purposeful Hand Function as a Marker of Clinical Severity in Rett Syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* **2010**, 52, 817–823, doi:10.1111/j.1469-8749.2010.03636.x.
- Dunker, A.K.; Lawson, J.D.; Brown, C.J.; Williams, R.M.; Romero, P.; Oh, J.S.; Oldfield, C.J.; Campen, A.M.; Ratliff, C.M.; Hipps, K.W.; et al. Intrinsically Disordered Protein. *J. Mol. Graph. Model.* **2001**, 19, 26–59, doi:10.1016/S1093-3263(00)00138-8.
- Erlandson, A.; Samuelsson, L.; Hagberg, B.; Kyllerman, M.; Vujic, M.; Wahlström, J. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Detects Large Deletions in the MECP2 Gene of Swedish Rett Syndrome Patients. *Genet. Test.* **2003**, 7, 329–332, doi:10.1089/109065703322783707.
- Fehr, S.; Bebbington, A.; Nassar, N.; Downs, J.; Ronen, G.M.; De Klerk, N.; Leonard, H. Trends in the Diagnosis of Rett Syndrome in Australia. *Pediatr. Res.* **2011**, 70, 313–319, doi:10.1203/PDR.0b013e3182242461.
- Fehr, S.; Wilson, M.; Downs, J.; Williams, S.; Murgia, A.; Sartori, S.; Vecchi, M.; Ho, G.; Polli, R.; Psoni, S.; et al. The CDKL5 Disorder Is an Independent Clinical Entity Associated with Early-Onset Encephalopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, 21, 266–273, doi:10.1038/ejhg.2012.156.
- Ghosh, R.P.; Horowitz-Scherer, R.A.; Nikitina, T.; Gierasch, L.M.; Woodcock, C.L. Rett Syndrome-Causing Mutations in Human MECP2 Result in Diverse Structural Changes

- That Impact Folding and DNA Interactions. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 20523–20534, doi:10.1074/jbc.M803021200.
- Goldman, S.; Temudo, T. Hand Stereotypies Distinguish Rett Syndrome from Autism Disorder. *Mov. Disord.* **2012**, 27, 1060–1062, doi:10.1002/mds.25057.
- Gonzales, M.L.; Adams, S.; Dunaway, K.W.; LaSalle, J.M. Phosphorylation of Distinct Sites in MECP2 Modifies Cofactor Associations and the Dynamics of Transcriptional Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, 32, 2894–2903, doi:10.1128/MCB.06728-11.
- Good, K. V.; Vincent, J.B.; Ausió, J. MECP2: The Genetic Driver of Rett Syndrome Epigenetics. *Front. Genet.* **2021**, 12, doi:10.3389/fgene.2021.620859.
- Guy, J.; Gan, J.; Selfridge, J.; Cobb, S.; Bird, A. Reversal of Neurological Defects in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Science* (80-.). **2007**, 315, 1143–1147, doi:10.1126/science.1138389.
- Guy, J.; Hendrich, B.; Holmes, M.; Martin, J.E.; Bird, A. A Mouse MECP2-Null Mutation Causes Neurological Symptoms That Mimic Rett Syndrome. *Nat. Genet.* **2001**, 27, 322–326, doi:10.1038/85899.
- Hagberg, B. Clinical Manifestations and Stages of Rett Syndrome. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **2002**, 8, 61–65, doi:10.1002/mrdd.10020.
- Hagberg, B.; Aicardi, J.; Dias, K.; Ramos, O. A Progressive Syndrome of Autism, Dementia, Ataxia, and Loss of Purposeful Hand Use in Girls: Rett's Syndrome: Report of 35 Cases. *Ann. Neurol.* **1983**, 14, 471–479, doi:10.1002/ana.410140412.
- Hagberg, B.; Hagberg, G. Rett Syndrome: Epidemiology and Geographical Variability. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **1997**, 6 Suppl 1, 5–7.
- Hagberg, B.A.; Skjeldal, O.H. Rett Variants: A Suggested Model for Inclusion Criteria. *Pediatr. Neurol.* **1994**, 11, 5–11, doi:10.1016/0887-8994(94)90082-5.
- Halbach, N.S.J.; Smeets, E.E.J.; Bierau, J.; Keularts, I.M.L.W.; Plasqui, G.; Julu, P.O.O.; Engerström, I.W.; Bakker, J.A.; Curfs, L.M.G. Altered Carbon Dioxide Metabolism and Creatine Abnormalities in Rett Syndrome. In; 2011; pp. 117–124.
- Hanefeld, F. The Clinical Pattern of the Rett Syndrome. *Brain Dev.* **1985**, 7, 320–325, doi:10.1016/S0387-7604(85)80037-1.
- Hoffbuhr, K.C.; Moses, L.M.; Jerdonek, M.A.; Naidu, S.; Hoffman, E.P. Associations Between MECP2 Mutations, x-Chromosome Inactivation, and Phenotype. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **2002**, 8, 99–105, doi:10.1002/mrdd.10026.
- Hutchinson, A.N.; Deng, J. V; Aryal, D.K.; Wetsel, W.C.; West, A.E. Differential Regulation of MECP2 Phosphorylation in the CNS by Dopamine and Serotonin. *Neuropsychopharmacology* **2012**, 37, 321–337, doi:10.1038/npp.2011.190.

- Huppke P, Held M, Hanefeld F, Engel W, Laccone F. Influence of mutation type and location on phenotype in 123 patients with Rett syndrome. *Neuropediatrics* 2002;33:63–8.
- Iriart, J.A.B.; Nucci, M.F.; Muniz, T.P.; Viana, G.B.; Aureliano, W. de A.; Gibbon, S. Da Busca Pelo Diagnóstico Às Incertezas Do Tratamento: Desafios Do Cuidado Para as Doenças Genéticas Raras No Brasil. *Cien. Saude Colet.* **2019**, 24, 3637–3650, doi:10.1590/1413-812320182410.01612019.
- Ishii, T.; Makita, Y.; Ogawa, A.; Amamiya, S.; Yamamoto, M.; Miyamoto, A.; Oki, J. The Role of Different X-Inactivation Pattern on the Variable Clinical Phenotype with Rett Syndrome. *Brain Dev.* **2001**, 23, S161–S164, doi:10.1016/S0387-7604(01)00344-8.
- Jeffrey L. Neul; Kaufmann, W.E.; Glaze, D.G.; Christodoulou, J.; Clarke, A.J.; Bahi-Buisson, N.; Leonard, H.; Bailey, M.E.S.; Schanen, N.C.; Zappella, M.; et al. Rett Syndrome: Revised Diagnostic Criteria and Nomenclature. *Ann. Neurol.* **2010**, 68, 944–950, doi:10.1002/ana.22124.
- Jian, L.; Nagarajan, L.; de Klerk, N.; Ravine, D.; Christodoulou, J.; Leonard, H. Seizures in Rett Syndrome: An Overview from a One-Year Calendar Study. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2007**, 11, 310–317, doi:10.1016/j.ejpn.2007.02.008.
- Kalman, L. V.; Tarleton, J.C.; Percy, A.K.; Aradhya, S.; Bale, S.; Barker, S.D.; Bayrak-Toydemir, P.; Bridges, C.; Buller-Burckle, A.M.; Das, S.; et al. Development of a Genomic DNA Reference Material Panel for Rett Syndrome (MECP2-Related Disorders) Genetic Testing. *J. Mol. Diagnostics* 2014, 16, 273–279, doi:10.1016/j.jmoldx.2013.11.004.
- Katz, D.M.; Bird, A.; Coenraads, M.; Gray, S.J.; Menon, D.U.; Philpot, B.D.; Tarquinio, D.C. Rett Syndrome: Crossing the Threshold to Clinical Translation. *Trends Neurosci.* **2016**, 39, 100–113, doi:10.1016/j.tins.2015.12.008.
- Kishi, N.; Macklis, J.D. MECP2 Is Progressively Expressed in Post-Migratory Neurons and Is Involved in Neuronal Maturation Rather than Cell Fate Decisions. *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, 27, 306–321, doi:10.1016/j.mcn.2004.07.006.
- Kleefstra, T.; Yntema, H.G.; Nillesen, W.M.; Oudakker, A.R.; Mullaart, R.A.; Geerdink, N.; van Bokhoven, H.; de Vries, B.B.; Sistermans, E.A.; Hamel, B.C. MECP2 Analysis in Mentally Retarded Patients: Implications for Routine DNA Diagnostics. *Eur. J. Hum. Genet.* 2004, 12, 24–28, doi:10.1038/sj.ejhg.5201080.
- Kucukkal, T.G.; Yang, Y.; Uvarov, O.; Cao, W.; Alexov, E. Impact of Rett Syndrome Mutations on MECP2 MBD Stability. *Biochemistry* **2015**, 54, 6357–6368, doi:10.1021/acs.biochem.5b00790.
- Kumar, A.; Jaryal, A.; Gulati, S.; Chakrabarty, B.; Singh, A.; Deepak, K.K.; Pandey, R.M.; Gupta, N.; Sapra, S.; Kabra, M.; et al. Cardiovascular Autonomic Dysfunction in Children and Adolescents With Rett Syndrome. *Pediatr. Neurol.* **2017**, 70, 61–66, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2017.01.010.

- Kyle, S.M.; Vashi, N.; Justice, M.J. Rett Syndrome: A Neurological Disorder with Metabolic Components. *Open Biol.* **2018**, *8*, 170216, doi:10.1098/rsob.170216.
- Lebrun, N.; Lebon, S.; Jeannet, P.-Y.; Jacquemont, S.; Billuart, P.; Bienvenu, T. Early-Onset Encephalopathy with Epilepsy Associated with a Novel Splice Site Mutation in SMC1A. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2015**, *167*, 3076–3081, doi:10.1002/ajmg.a.37364.
- Leonard, H. Patients with the R133C Mutation: Is Their Phenotype Different from Patients with Rett Syndrome with Other Mutations? *J. Med. Genet.* **2003**, *40*, 52e – 52, doi:10.1136/jmg.40.5.e52.
- Li, Y.; Wang, H.; Muffat, J.; Cheng, A.W.; Orlando, D.A.; Lovén, J.; Kwok, S.; Feldman, D.A.; Bateup, H.S.; Gao, Q.; et al. Global Transcriptional and Translational Repression in Human-Embryonic-Stem-Cell-Derived Rett Syndrome Neurons. *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 446–458, doi:10.1016/j.stem.2013.09.001.
- Lima, F.T. de; Brunoni, D.; Schwartzman, J.S.; Pozzi, M.C.; Kok, F.; Juliano, Y.; Pereira, L. da V. Genotype-Phenotype Correlation in Brazilian Rett Syndrome Patients. *Arq. Neuropsiquiatr.* **2009**, *67*, 577–584, doi:10.1590/S0004-282X2009000400001.
- Lopes, F.; Barbosa, M.; Ameer, A.; Soares, G.; de Sá, J.; Dias, A.I.; Oliveira, G.; Cabral, P.; Temudo, T.; Calado, E.; et al. Identification of Novel Genetic Causes of Rett Syndrome-like Phenotypes. *J. Med. Genet.* **2016**, *53*, 190–199, doi:10.1136/jmedgenet-2015-103568.
- Lopes, M.T.; Koch, V.H.; Sarubbi-Junior, V.; Gallo, P.R.; Carneiro-Sampaio, M. Difficulties in the Diagnosis and Treatment of Rare Diseases According to the Perceptions of Patients, Relatives and Health Care Professionals. *Clinics* **2018**, *73*, e68, doi:10.6061/clinics/2018/e68.
- Lucariello, M.; Vidal, E.; Vidal, S.; Saez, M.; Roa, L.; Huertas, D.; Pineda, M.; Dalfó, E.; Dopazo, J.; Jurado, P.; et al. Whole Exome Sequencing of Rett Syndrome-like Patients Reveals the Mutational Diversity of the Clinical Phenotype. *Hum. Genet.* **2016**, *135*, 1343–1354, doi:10.1007/s00439-016-1721-3.
- Lyst, M.J.; Bird, A. Rett Syndrome: A Complex Disorder with Simple Roots. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 261–275, doi:10.1038/nrg3897.
- Lyst, M.J.; Ekiert, R.; Ebert, D.H.; Merusi, C.; Nowak, J.; Selfridge, J.; Guy, J.; Kastan, N.R.; Robinson, N.D.; de Lima Alves, F.; et al. Rett Syndrome Mutations Abolish the Interaction of MECP2 with the NCoR/SMRT Co-Repressor. *Nat. Neurosci.* **2013**, *16*, 898–902, doi:10.1038/nn.3434.
- Mackay, J.; Downs, J.; Wong, K.; Heyworth, J.; Epstein, A.; Leonard, H. Autonomic Breathing Abnormalities in Rett Syndrome: Caregiver Perspectives in an International Database Study. *J. Neurodev. Disord.* **2017**, *9*, 15, doi:10.1186/s11689-017-9196-7.
- Martínez de Paz, A.; Khajavi, L.; Martin, H.; Claveria-Gimeno, R.; Tom Dieck, S.; Cheema, M.S.; Sanchez-Mut, J. V.; Moksa, M.M.; Carles, A.; Brodie, N.I.; et al. MECP2-E1 Isoform Is a Dynamically Expressed, Weakly DNA-Bound Protein with Different

- Protein and DNA Interactions Compared to MECP2-E2. *Epigenetics Chromatin* **2019**, 12, 63, doi:10.1186/s13072-019-0298-1.
- Mitter, D.; Pringsheim, M.; Kaulisch, M.; Plümacher, K.S.; Schröder, S.; Warthemann, R.; Abou Jamra, R.; Baethmann, M.; Bast, T.; Büttel, H.-M.; et al. FOXP1 Syndrome: Genotype–Phenotype Association in 83 Patients with FOXP1 Variants. *Genet. Med.* **2018**, 20, 98–108, doi:10.1038/gim.2017.75.
- Mnatzakanian, G.N.; Lohi, H.; Munteanu, I.; Alfred, S.E.; Yamada, T.; MacLeod, P.J.M.; Jones, J.R.; Scherer, S.W.; Schanen, N.C.; Friez, M.J.; et al. A Previously Unidentified MECP2 Open Reading Frame Defines a New Protein Isoform Relevant to Rett Syndrome. *Nat. Genet.* **2004**, 36, 339–341, doi:10.1038/ng1327.
- Monerat, L. S.; Moreira, A. S.; Alves, M. C. V; Bonvicino, C. R; Vargas, F. R. Identification and characterization of novel sequence variations in MECP2 gene in Rett syndrome patients *Brain & Development* 32 **2010** 843–848.
- Moeschler JB, Shevell M. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics* 2014;134(3):e903e18.
- Monteggia, L.M.; Kavalali, E.T. Rett Syndrome and the Impact of MECP2 Associated Transcriptional Mechanisms on Neurotransmission. *Biol. Psychiatry* **2009**, 65, 204–210, doi:10.1016/j.biopsych.2008.10.036.
- Nan, X.; Campoy, F.J.; Bird, A. MECP2 Is a Transcriptional Repressor with Abundant Binding Sites in Genomic Chromatin. *Cell* **1997**, 88, 471–481, doi:10.1016/S0092-8674(00)81887-5.
- Navarro-Pardo, E.; López-Ramón, M.F.; Alonso-Esteban, Y.; Alcantud-Marín, F. Diagnostic Tools for Autism Spectrum Disorders by Gender: Analysis of Current Status and Future Lines. *Children* 2021, 8, 262, doi:10.3390/children8040262.
- Neul, J.L.; Benke, T.A.; Marsh, E.D.; Skinner, S.A.; Merritt, J.; Lieberman, D.N.; Standridge, S.; Feyma, T.; Heydemann, P.; Peters, S.; et al. The Array of Clinical Phenotypes of Males with Mutations in Methyl-CpG Binding Protein 2. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **2018**, ajmg.b.32707, doi:10.1002/ajmg.b.32707.
- Olson, C.O.; Zachariah, R.M.; Ezeonwuka, C.D.; Liyanage, V.R.B.; Rastegar, M. Brain Region-Specific Expression of MECP2 Isoforms Correlates with DNA Methylation within MECP2 Regulatory Elements. *PLoS One* **2014**, 9, e90645, doi:10.1371/journal.pone.0090645.
- Olson, H.E.; Tambunan, D.; LaCoursiere, C.; Goldenberg, M.; Pinsky, R.; Martin, E.; Ho, E.; Khwaja, O.; Kaufmann, W.E.; Poduri, A. Mutations in Epilepsy and Intellectual Disability Genes in Patients with Features of Rett Syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2015**, 167, 2017–2025, doi:10.1002/ajmg.a.37132.
- Panayotis, N.; Ghata, A.; Villard, L.; Roux, J.-C. Biogenic Amines and Their Metabolites Are Differentially Affected in the MECP2-Deficient Mouse Brain. *BMC Neurosci.* **2011**, 12, 47, doi:10.1186/1471-2202-12-47.

- Pereira, J.L.P.; Pedroso, J.L.; Barsottini, O.G.P.; Meira, A.T.; Teive, H.A.G. Rett Syndrome: The Brazilian Contribution to the Gene Discovery. *Arq. Neuropsiquiatr.* **2019**, *77*, 896–899, doi:10.1590/0004-282x20190110.
- Philippe, C.; Villard, L.; De Roux, N.; Raynaud, M.; Bonnefond, J.P.; Pasquier, L.; Lesca, G.; Mancini, J.; Jonveaux, P.; Moncla, A.; et al. Spectrum and Distribution of MECP2 Mutations in 424 Rett Syndrome Patients: A Molecular Update. *Eur. J. Med. Genet.* **2006**, *49*, 9–18, doi:10.1016/j.ejmg.2005.04.003.
- Petazzi, P.; Sandoval, J.; Szczesna, K.; Jorge, O.C.; Roa, L.; Sayols, S.; Gomez, A.; Huertas, D.; Esteller, M. Dysregulation of the Long Non-Coding RNA Transcriptome in a Rett Syndrome Mouse Model. *RNA Biol.* **2013**, *10*, 1197–1203, doi:10.4161/rna.24286.
- Petriti, U.; Dudman, D.C.; Scosyrev, E.; Lopez-Leon, S. Global Prevalence of Rett Syndrome: Systematic Review and Meta-Analysis. *Syst. Rev.* **2023**, *12*, 5, doi:10.1186/s13643-023-02169-6.
- Pini, G.; Bigoni, S.; Congiu, L.; Romanelli, A.M.; Scusa, M.F.; Di Marco, P.; Benincasa, A.; Morescalchi, P.; Ferlini, A.; Bianchi, F.; et al. Rett Syndrome: A Wide Clinical and Autonomic Picture. *Orphanet J. Rare Dis.* **2016**, *11*, 132, doi:10.1186/s13023-016-0499-7.
- Pozzi, C.M.; Rosenberg, S. Rett Syndrome: Clinical and Epidemiological Aspects in a Brazilian Institution. *Arq. Neuropsiquiatr.* **2003**, *61*, 909–915, doi:10.1590/S0004-282X2003000600004.
- Ramirez, J.-M.; Ward, C.S.; Neul, J.L. Breathing Challenges in Rett Syndrome: Lessons Learned from Humans and Animal Models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2013**, *189*, 280–287, doi:10.1016/j.resp.2013.06.022.
- Rett, A. [On a Unusual Brain Atrophy Syndrome in Hyperammonemia in Childhood]. *Wien. Med. Wochenschr.* **1966**, *116*, 723–726.
- Rodrigues, D.C.; Mufteev, M.; Ellis, J. Regulation, Diversity and Function of MECP2 Exon and 3'UTR Isoforms. *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, R89–R99, doi:10.1093/hmg/ddaa154.
- Rodriguez, L.M.; Percy, A.K.; Cutter, G.R. Rett Syndrome: Novel Correlations Linking >96% Genotype, Disease Severity, and Seizures. *Transl. Sci. Rare Dis.* **2021**, *5*, 131–141, doi:10.3233/TRD-200047.
- Rolando, S. Rett Syndrome: Report of Eight Cases. *Brain Dev.* **1985**, *7*, 290–296, doi:10.1016/S0387-7604(85)80030-9.
- Sajan, S.A.; Jhangiani, S.N.; Muzny, D.M.; Gibbs, R.A.; Lupski, J.R.; Glaze, D.G.; Kaufmann, W.E.; Skinner, S.A.; Annese, F.; Friez, M.J.; et al. Enrichment of Mutations in Chromatin Regulators in People with Rett Syndrome Lacking Mutations in MECP2. *Genet. Med.* **2017**, *19*, 13–19, doi:10.1038/gim.2016.42.
- Saxena, A. Lost in Translation: Translational Interference from a Recurrent Mutation in Exon 1 of MECP2. *J. Med. Genet.* **2006**, *43*, 470–477, doi:10.1136/jmg.2005.036244.

- Schönewolf-Greulich, B.; Tejada, M.-I.; Stephens, K.; Hadzsiev, K.; Gauthier, J.; Brøndum-Nielsen, K.; Pfundt, R.; Ravn, K.; Maortua, H.; Gener, B.; et al. The MECP2 Variant c.925C>T (p.Arg309Trp) Causes Intellectual Disability in Both Males and Females without Classic Features of Rett Syndrome. *Clin. Genet.* **2016**, *89*, 733–738, doi:10.1111/cge.12769.
- Schuch, J.; Mariath, L.; Roman, T.; Schuler-Faccini, L. The Genetic Basis of Autism Spectrum Disorder. In *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*; Robinson-Agramonte, M., Ed.; Springer: Cham, Germany, 2015.
- Schultz, R.J. The Pattern of Growth Failure in Rett Syndrome. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **1993**, *147*, 633, doi:10.1001/archpedi.1993.02160300039018.
- Schwartzman, J.S.; Velloso, R. de L.; D'Antino, M.E.F.; Santos, S. The Eye-Tracking of Social Stimuli in Patients with Rett Syndrome and Autism Spectrum Disorders: A Pilot Study. *Arq. Neuropsiquiatr.* **2015**, *73*, 402–407, doi:10.1590/0004-282X20150033.
- Sirianni, N.; Naidu, S.; Pereira, J.; Pillotto, R.F.; Hoffman, E.P. Rett Syndrome: Confirmation of X-Linked Dominant Inheritance, and Localization of the Gene to Xq28. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 1552–1557, doi:10.1086/302105.
- Skene, P.J.; Illingworth, R.S.; Webb, S.; Kerr, A.R.W.; James, K.D.; Turner, D.J.; Andrews, R.; Bird, A.P. Neuronal MECP2 Is Expressed at Near Histone-Octamer Levels and Globally Alters the Chromatin State. *Mol. Cell* **2010**, *37*, 457–468, doi:10.1016/j.molcel.2010.01.030.
- Skjeldal, O.H.; von Tetzchner, S.; Aspelund, F.; Aas Herder, G.; Løfterød, B. Rett Syndrome: Geographic Variation in Prevalence in Norway. *Brain Dev.* **1997**, *19*, 258–261, doi:10.1016/S0387-7604(97)00572-X.
- Sung Jae Lee, S.; Wan, M.; Francke, U. Spectrum of MECP2 Mutations in Rett Syndrome. *Brain Dev.* **2001**, *23*, S138–S143, doi:10.1016/S0387-7604(01)00339-4.
- Suzuki, H.; Hirayama, Y.; Arima, M. [Prevalence of Rett Syndrome in Tokyo]. *No to hattatsu = Brain Dev.* **1989**, *21*, 430–433.
- Tarquinio, D.C.; Hou, W.; Neul, J.L.; Lane, J.B.; Barnes, K. V.; O'Leary, H.M.; Bruck, N.M.; Kaufmann, W.E.; Motil, K.J.; Glaze, D.G.; et al. Age of Diagnosis in Rett Syndrome: Patterns of Recognition Among Diagnosticians and Risk Factors for Late Diagnosis. *Pediatr. Neurol.* **2015**, *52*, 585–591.e2, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2015.02.007.
- Tejada MI, Penagarikano O, Rodriguez-Revenga L, et al. Screening for MECP2 mutations in Spanish patients with an unexplained mental retardation. *Clin Genet* **2006**;70(2):140e4
- Tillotson, R.; Selfridge, J.; Koerner, M. V.; Gadalla, K.K.E.; Guy, J.; De Sousa, D.; Hector, R.D.; Cobb, S.R.; Bird, A. Radically Truncated MECP2 Rescues Rett Syndrome-like Neurological Defects. *Nature* **2017**, *550*, 398–401, doi:10.1038/nature24058.

- Topçu, M.; Akyerli, C.; Sayı, A.; Törüner, G.A.; Koçoğlu, S.R.; Cimbış, M.; Özçelik, T. Somatic Mosaicism for a MECP2 Mutation Associated with Classic Rett Syndrome in a Boy. *Eur. J. Hum. Genet.* **2002**, *10*, 77–81, doi:10.1038/sj.ejhg.5200745.
- Vidal, S.; Xiol, C.; Pascual-Alonso, A.; O’Callaghan, M.; Pineda, M.; Armstrong, J. Genetic Landscape of Rett Syndrome Spectrum: Improvements and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3925, doi:10.3390/ijms20163925.
- Vignoli, A.; La Briola, F.; Peron, A.; Turner, K.; Savini, M.; Cogliati, F.; Russo, S.; Canevini, M.P. Medical Care of Adolescents and Women with Rett Syndrome: An Italian Study. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2012**, *158A*, 13–18, doi:10.1002/ajmg.a.34367.
- Villard, L.; Kpebe, A.; Cardoso, C.; Chelly, J.; Tardieu, M.; Fontes, M. Two Affected Boys in a Rett Syndrome Family: Clinical and Molecular Findings. *Neurology* **2000**, *55*, 1188–1193, doi:10.1212/WNL.55.8.1188.
- Viola, A.; Saywell, V.; Villard, L.; Cozzone, P.J.; Lutz, N.W. Metabolic Fingerprints of Altered Brain Growth, Osmoregulation and Neurotransmission in a Rett Syndrome Model. *PLoS One* **2007**, *2*, e157, doi:10.1371/journal.pone.0000157.
- Wahba, G.; Schock, S.C.; Cudd, S.; Grynspan, D.; Humphreys, P.; Staines, W.A. Activity and MECP2-Dependent Regulation of NNOS Levels in Enteric Neurons. *Neurogastroenterol. Motil.* **2016**, *28*, 1723–1730, doi:10.1111/nmo.12873.
- Weaving, L.S.; Christodoulou, J.; Williamson, S.L.; Friend, K.L.; McKenzie, O.L.D.; Archer, H.; Evans, J.; Clarke, A.; Pelka, G.J.; Tam, P.P.L.; et al. Mutations of CDKL5 Cause a Severe Neurodevelopmental Disorder with Infantile Spasms and Mental Retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *75*, 1079–1093, doi:10.1086/426462.
- Wong, K.; Downs, J.; Ellaway, C.; Baikie, G.; Ravikumara, M.; Jacoby, P.; Christodoulou, J.; Elliott, E.J.; Leonard, H. Impact of Gastrostomy Placement on Nutritional Status, Physical Health, and Parental Well-Being of Females with Rett Syndrome: A Longitudinal Study of an Australian Population. *J. Pediatr.* **2018**, *200*, 188-195.e1, doi:10.1016/j.jpeds.2018.04.050.
- Xiang, F. Mutation Screening in Rett Syndrome Patients. *J. Med. Genet.* **2000**, *37*, 250–255, doi:10.1136/jmg.37.4.250.
- Zappella, M. The Rett Girls with Preserved Speech. *Brain Dev.* **1992**, *14*, 98–101, doi:10.1016/S0387-7604(12)80094-5.
- Zhao, X.; Ueba, T.; Christie, B.R.; Barkho, B.; McConnell, M.J.; Nakashima, K.; Lein, E.S.; Eadie, B.D.; Willhoite, A.R.; Muotri, A.R.; et al. Mice Lacking Methyl-CpG Binding Protein 1 Have Deficits in Adult Neurogenesis and Hippocampal Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 6777–6782, doi:10.1073/pnas.1131928100.

10. APÊNDICES

10.1 Apêndice A: Termo de consentimento para pacientes com RTT



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROJETO: " **Caracterização Clínica e Molecular de pacientes com suspeita de Síndrome de Rett e Encefalopatia epiléptica: um enfoque na atividade do gene *MECP2***"

Nome do voluntário: -----

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo determinar a correlação entre o fenótipo, genótipo e expressão do gene *MECP2* em pacientes com síndrome de Rett e Encefalopatia epiléptica através de técnicas de biologia molecular que envolve a coleta de uma amostra de sangue periférico.

A Síndrome de Rett (RTT) é um distúrbio neurológico cuja prevalência global é de 1: 10.000 a 1: 15.000 para mulheres e 1: 100.000 para homens. Caracteriza-se por regressão psicomotora, comportamento autista, desaceleração do crescimento da cabeça (microcefalia pós-natal), convulsões, perda de funções proposicionais das mãos e movimentos repetitivos estereotipados das mãos. A etiologia genética de Rett é considerada heterogênea, mutações em diferentes genes, tais como *MECP2*, *CDKL5*, *FOXP1*, *NTNG1*, *MEF2C*, *IQSEC2* e *KCNA2*, estão associadas ao quadro clínico da doença. No entanto, a maioria dos casos de RS está relacionada à alterações no gene *MECP2* que codifica a proteína MECP2; diversos estudos vem sendo desenvolvidos para demonstrar a correlação entre as mutações e a maior ou menor gravidade da síndrome. Por outro lado, as convulsões são um sintoma comum em pacientes atendidos por geneticistas; os centros de Controle e Prevenção de Doenças estimam uma prevalência de 2 milhões Americanos afetados pela epilepsia e mais da metade de todas as epilepsias foram atribuídas a causa genética. As encefalopatias epiléticas infantis são definidas como convulsões muito frequentes ou graves, ou atividade interictal paroxística subcontínua contribuindo para a perturbação progressiva da função cerebral. Estas síndromes graves que se apresentam durante os primeiros 12 meses de vida podem ser divididas em várias categorias entre elas a síndrome de Dravet, síndrome de Ohtahara, e síndrome de West. Entre os genes associados na etiologia das encefalopatias epiléticas estão o *CDKL5*, *STXBP1*, *ARX*, *SLC25A22*, *KCNQ2*, *SCN1A*, *PCDH19*, *KCNT1*. Devido que as mutações no gene *CDKL5* podem originar fenótipos variados, incluindo RTT e alguns tipos de Encefalopatia epiléptica ambas as síndromes poderiam compartilhar mais de uma etiologia genética comum mediada pela proteína MECP2.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

1 OBJETIVO DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivo determinar a correlação entre o fenótipo, genótipo e expressão do gene *MECP2* em pacientes com síndrome de Rett e Encefalopatia epiléptica tratados no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (Belém – PA) e Hospital Divina Providencia (Marituba – PA) através de técnicas de biologia molecular.

2 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra de sangue periférico. A coleta de material será feita por pessoal técnico do Laboratório de Erros Inatos do metabolismo (ICB- UFPA). Essa amostra será submetida a um estudo de sequenciamento do material genético para identificar as alterações no gene *MECP2*, sua expressão e padrão de metilação em alguns genes alvos da proteína MECP2 (Outros genes poderiam ser estudados caso o estudo inicial no *MECP2* não reporte nenhuma alteração patogênica). Essa técnica permite detectar as mutações nos genes que queremos estudar para correlacionar os resultados com o quadro clínico do paciente. O material isolado da amostra será armazenado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (ICB-UFPA), após a utilização do mesmo para os procedimentos relacionados a este projeto. Se você concordar em participar deste projeto de pesquisa os pesquisadores participantes também consultarão seus registros médicos para obter dados que podem ser importantes para compreender a correlação entre o fenótipo, genótipo e expressão do gene *MECP2* em pacientes com síndrome de Rett e Encefalopatia epiléptica

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Sua participação nesse estudo é totalmente voluntária. Você não é obrigado(a) a participar do estudo.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. E é importante que você saiba dos riscos implicados na coleta de uma amostra de sangue por punção periférica (10 ml) da veia do antebraço. Existe um desconforto, e será de leve sensação dolorosa no momento da coleta de sangue por punção justificada para que se possa realizar o procedimento tal. Riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar esses riscos. Não se espera qualquer dano imediato ou tardio a sua saúde ou a saúde do(a) seu (sua) filho (a) decorrente deste estudo.

BENEFÍCIOS

Você não terá benefícios com os resultados dessa pesquisa. Entretanto, os resultados gerados por ela poderão ajudar a compreender melhor o Síndrome de Rett e as Encefalopatias epiléticas e auxiliar no tratamento do mesmo, no futuro, para outros(as) pacientes.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

É importante que você saiba que o seu tratamento será o mesmo, caso aceite ou não participar desse projeto. É que você tem direito de saber qualquer informação gerada nessa pesquisa relacionada à sua doença. Essa pesquisa é coordenada pela Profa. Dra. Bárbara Borges, Profa. Dra. Maria Helena Thomaz M., doutoranda Fernanda J. Rodríguez Ramos, qualquer dúvida que tenha respeito pode ser sanada entrando em contato pelo telefone (91) 982664068.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Hospital Divina Providencia e equipe de pesquisadores envolvidos nesse estudo. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo do sistema unificado de saúde (SUS). Seu tratamento e acompanhamento médico são independentes da sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para você pela sua participação nesse estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Caso você decida interromper sua participação no estudo, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta e o uso das amostras para os fins relativos ao estudo serão imediatamente interrompidos.

O pesquisador responsável pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização. Caso isso aconteça o motivo será comunicado a você.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Profa. Dra. Bárbara Borges no telefone (91) 99994-1592 ou para a MS. Fernanda J. Rodriguez Ramos no telefone (91) 982664068.

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que será coletada uma amostra de sangue periférica e que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Autorizo o uso do material coletado para outros projetos com a finalidade de Pesquisa:

☐ SIM

☐ NÃO

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento

_____/_____/_____
(Assinatura do Paciente ou representante) dia mês ano

(Nome do Paciente e/ou representante – letra de forma) RG: _____

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo à paciente.

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Nome: Bárbara do Nascimento Borges

End: Laboratório de Biologia Molecular -ICB-UFPA

Fone: (91) 99994-1592

Reg. Conselho: CRBIO-6 16636/06-D

Belém, ____/____/____

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Nome: Fernanda J. Rodriguez Ramos

End: LEIM-ICB-UFPA

Fone: (91) 982664068

Belém, ____/____/____

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

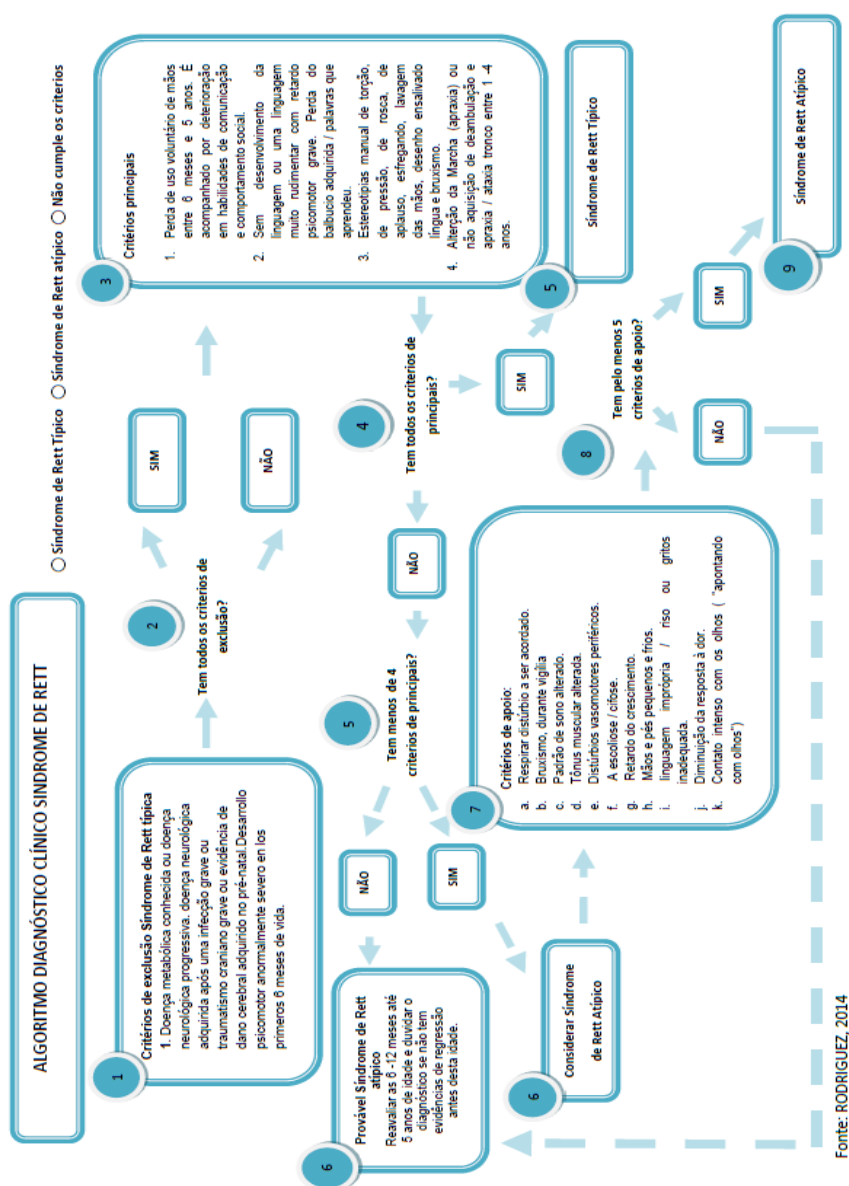
Nome: Maria Helena T. Maia

End: LEIM-ICB-UFPA

Fone: (91) 32018030

Belém, ____/____/____

10.2 Apêndice B: ALGORITMO DIAGNÓSTICO (Deve cumprir período de regressão psicomotora entre 6-18 meses, exceto para a variante congênita)



10.3 Apêndice C: ESCALA DE SEVERIDADE DE KERR

Parâmetro	Característica clínica	Pontuação dos Parâmetros	Pontuação obtida
Perímetro cefálico durante o primeiro ano de vida	Sob percentil 3	2	
	Normal no nascimento, mas desacelerando	1	
	Normal no nascimento sem desaceleración	0	
Progresso no desenvolvimento precoce (0-12 meses)	Nenhum progresso	2	
	Progresso abaixo do ideal	1	
	Progresso normal	0	
Perímetro cefálico atual	Sob percentil 3	2	
	Entre os percentil 3 e 10	1	
	Superior ao percentil 3	0	
Peso	Sob percentil 3	2	
	Entre os percentil 3 e 10	1	
	Superior ao percentil 10	0	
Altura	Sob percentil 3	2	
	Entre os percentil 3 e 10	1	
	Superior ao percentil 10	0	
Tônus muscular	Hipotonía severa, distonía ou hipertonia	2	
	Tônus moderadamente anormal	1	
	Normal	0	
Postura da coluna vertebral	Escoliose severa	2	
	Escoliose moderada	1	
	Sem desvios	0	
Contraturas articulares	Contracturas severas	2	
	Contracturas menores	1	
	Nenhum	0	
Função motora grossa	Não pode caminhar sem apoio	2	
	Afetação para caminhar	1	
	Camina normal	0	
Estereotípias das Mãos	Dominante ou constante	2	
	Moderada ou intermitente	1	
	Nenhum	0	
Outros movimentos involuntários (Tremor, distonia, coreia, atetose)	Dominante o constante	2	
	Moderado o intermitente	1	
	Nenhum	0	
Destreza manual voluntária (Exmp: alimentar)	Nenhum	2	
	Reduzido ou pobres	1	
	Normal	0	
Dificuldade oro-motora	Severa (aversão por comida, náuseas, sonda nasogástrica ou gastrostomia.	2	
	Leve (atraso na comida, mastigação)	1	
	Nenhum	0	
Deficiência Intelectual (aprendizagem – Retardo)	Aparentemente profunda (nível infantil)	2	
	Qualquer exceto profunda	1	
	Sem deficiência	0	
linguagem	Atualmente, usa palavras sem significado real	2	
	Atualmente usa palavras reais com significado	1	
	Normal	0	

Epilepsia	Não controlada ou difíceis de lidar	2	
	Convulsões anteriores ou tratamento controlado	1	
	Nunca	0	
Alteração no ritmo da respiração durante a vigília	Severa, com muda da coloração	2	
	Moderada, com muda da coloração	1	
	Normal	0	
Circulação periférica das extremidades	Frio ou pálido com alterações atróficas	2	
	Frio ou pálido sem alterações atróficas	1	
	Normal em color e temperatura	0	
Distúrbios do humor	Proeminente ou agitação / chorando	2	
	Tendência anormal de agitação	1	
	Normal	0	
Distúrbio do sono	Notoria sonolência diurna ou despertares noturnos	2	
	Presente, mas não perceptível	1	
	Padrão de sono normal	0	

11. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO/ACEITE DE ARTIGO CIENTÍFICO

