



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

CAMILY ERICA DE FREITAS RODRIGUES

TRIAGEM MOLECULAR DE PACIENTES COM TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA ATRAVÉS DE MUTAÇÕES DO GENE *MECP2*

BELÉM – PA
2017

CAMILY ERICA DE FREITAS RODRIGUES

TRIAGEM MOLECULAR DE PACIENTES COM TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA ATRAVÉS DE MUTAÇÕES DO GENE *MECP2*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção de grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.Dr^a Maria Helena
Thomaz Maia

BELÉM – PA
2017

CAMILY ERICA DE FREITAS RODRIGUES

TRIAGEM MOLECULAR DE PACIENTES COM TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA ATRAVÉS DE MUTAÇÕES DO GENE *MECP2*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção de grau de
Bacharel em Biomedicina, aprovado com
o conceito

Belém (PA), 16 de fevereiro de 2017

Banca Examinadora:

Orientadora: Prof. Dr^a Maria Helena Thomaz Maia – ICB - UFPA

Avaliador 1: Prof.Dr. Luis Francisco Heredero Baute – ICB - UFPA

Avaliador 2: Dr^a Janaina Mota de Vasconcelos Massafra - IEC

Suplente: Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena – ICB- UFPA

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais, Fabio e Edilene, por toda a dedicação e incentivo mesmo com os todas as renúncias e dificuldades (e foram tantas) sempre estiveram ao meu lado. Agradeço também a minha irmã Fabienne por tantas vezes que me acompanhou até altas horas da noite em meio a tantos trabalhos e provas durante a graduação. Obrigada por dividirem esse sonho comigo.

Aos avós, Anésio e Raimunda, por todo carinho e apoio imensurável que recebi até que chegasse aqui. Serei eternamente grata a vocês.

Às minhas tias Helen e Edna e meu tio Juracy que sempre incentivaram os meus estudos. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu amor e melhor amigo, Bruno, por todo o apoio, companheirismo e paciência (de Jó) que teve comigo sempre me incentivando a não desistir dos meus sonhos.

À minha orientadora, Maria Helena, por toda a paciência, confiança, exemplo de pessoa e por me contagiar com sua paixão pela ciência a cada dia. Obrigada pela oportunidade e por todos os momentos em que não mediu esforços para dividir comigo seus conhecimentos.

À toda equipe do LEIM em especial ao Prof. Luis Heredero (por todos os ensinamentos, orientação acadêmica e pelas experiências compartilhadas ao longo desse período), Higo, Karol, Daniel, André e principalmente à Beatriz que tanto me ajudou a finalizar esse trabalho.

À equipe médica do Serviço Caminhar do Hospital Bettina Ferro que também tornaram possível a realização deste trabalho.

A todos os pacientes que consentiram a utilização de seu DNA para a realização do estudo.

Ao Instituto Evandro Chagas pela contribuição e suporte nesse trabalho.

À Universidade Federal do Pará e órgãos financiadores desse projeto.

RESUMO

O Autismo ou Transtorno do Espectro Autista (TEA) é caracterizado por um conjunto de alterações comportamentais e intelectuais cuja etiologia é heterogênea e/ou desconhecida. A manifestação desse conjunto de sintomas varia em intensidade e gravidade dentro do espectro. Os casos de TEA Síndrômica, também conhecidos como Autismo secundário estão comumente associados a condições médicas bem estabelecidas, sendo a Síndrome de Rett (SR) exemplo clássico dessa categoria. A SR foi descrita como uma condição caracterizada por uma deterioração neuromotora em crianças do sexo feminino sendo a segunda causa mais grave de deficiência intelectual no sexo feminino. Mutações no gene 2-metil CpG de ligação (MECP2) foram identificadas como etiologia genética principal para a SR. Dessa forma, o estudo de TEAs síndrômicos contribui para apoiar o papel de uma etiologia genética em TEA e constituem o desafio para a compreensão da base molecular subjacente ao TEA e como auxílio no diagnóstico. O objetivo principal foi realizar triagem molecular para Síndrome de Rett utilizando o gene MECP2 em pacientes com TEA atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS) a partir da padronização do protocolo de sequenciamento dos exons 2, 3 e 4 do gene MECP2 para detectar variações que possam estar associadas. Foram investigadas 17 pacientes do sexo feminino atendidas no HUBFS diagnosticadas inicialmente com TEA de acordo com os critérios do DSM-IV. A média de idade das pacientes foi de 7,71. O intervalo foi de 2 meses e 23 anos, sendo observadas maiores quantidades de pacientes com faixas etárias entre 0 a 5 anos (9) e na faixa etária entre 6 a 10 anos. Para o exon 2 a reação de sequenciamento não atingiu um grau de otimização adequado. A análise das 17 pacientes do exon 3 resultou em sequências que incluíam as 351 bases correspondentes a sequência já descrita para o exon 3 do gene MECP2 e, em média 150 bases dos introns 2 e 3. Nenhuma mutação foi encontrada nas amostras analisadas, nem na região codificante, nem na região intrônica. A análise do exon 4, para uma das pacientes, revelou um ponto de heterozigose resultante da presença de uma citosina e uma timina na mesma posição representando uma mutação sinônima localizada no domínio CTS (p.411) na posição 1233 da sequência codificante do gene *MECP2* (c.1233C>T). No presente trabalho foram padronizadas parcialmente as técnicas de amplificação e sequenciamento para triagem molecular dos exons 2, 3 e 4 do gene *MECP2*. A análise molecular dos exon 3 e 4 do gene *MECP2* não permitiu a identificação de alterações patogênicas que expliquem o quadro clínico do TEA ou que possam ser diagnosticadas como possíveis portadores de Síndrome de Rett. Somente após a finalização da triagem clínica juntamente com o estudo molecular do exon 2 será possível estabelecer associações relevantes e que possam servir de auxílio para diagnóstico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 SÍNDROME DE RETT.....	3
1.1.1 Etiologia Molecular.....	4
1.1.2 Clínica de Rett.....	8
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 MATERAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 AMOSTRAS.....	13
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE MECP2.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 AMOSTRAGEM.....	16
4.2 ANÁLISE MOLECULAR.....	17
4.2.1 Padronização do Sequenciamento do Exon 2.....	17
4.2.2 Padronização do Sequenciamento do Exon 3.....	19
4.2.3 Padronização do Sequenciamento do Exon 4.....	21
5 CONCLUSÃO.....	26
6 REFERÊNCIAS.....	27
ANEXO I.....	37
ANEXO II.....	38

1 INTRODUÇÃO

O Autismo é caracterizado por um conjunto de alterações comportamentais e intelectuais cuja etiologia é heterogênea e/ou desconhecida (MARSHALL et al., 2008). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV-TR), o transtorno autista é considerado um transtorno invasivo do desenvolvimento (TID) (APA, 2000). Sob essa classificação se descrevem diferentes transtornos que têm em comum as funções do desenvolvimento afetadas qualitativamente, que além do autismo fazem parte: Síndrome de Rett, Síndrome ou Transtorno de Asperger, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação (APA, 2000). No entanto, de acordo com a nova versão do manual, o DSM-V, surge uma nova classificação para o diagnóstico clínico do autismo denominada de Transtorno do Espectro Autista (TEA) (APA, 2014).

Em 1966, Victor Lotter realizou o primeiro estudo epidemiológico sobre o TEA na Inglaterra. Nesse estudo, ele relatou um índice de prevalência de 4,5/10.000 crianças de 8 a 10 anos. Uma pesquisa baseada em 19 estudos epidemiológicos mais recentes mostrou que a prevalência desta síndrome aumentou consideravelmente na população mundial comparada ao estudo de Lotter, passando para uma taxa de 10/10.000 (FOMBONNE, 2003). De acordo com a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), 70 milhões de pessoas no mundo têm o transtorno. No Brasil, a estimativa é de que este número alcance dois milhões de pessoas (BRASIL, 2014).

A prevalência também está relacionada com o sexo, pois é menor em crianças do sexo feminino do que em crianças do sexo masculino, com uma proporção de aproximadamente 1:4 (RUTTER, 1985; MATTILA et al., 2007). Entretanto, meninas com TEA tendem a apresentar QI mais baixo do que os meninos (LORD & SCHOPLER, 1985). Isto pode explicar porque o sexo feminino tende a ser mais severamente afetado (WING, 1996).

Por muitos anos o TEA foi rotulado de “esquizofrenia infantil”, entretanto, esses números estão mudando ao longo dos anos (RAPOPORT et al, 2009). Essas

mudanças devem-se principalmente às alterações nos sistemas de classificação (FOMBONNE, 2005a, 2005b). A saber, crianças com TEA com um perfil cognitivo diferenciado em algumas das áreas de testes padronizados representam 30% dos casos diagnosticados (BOSA, 2002).

Clinicamente, os pacientes diagnosticados com TEA se caracterizam pelo comprometimento comportamental, envolvendo dificuldades na interação social, comunicação e a apresentação de movimentos repetitivos (BILL e GESCHWIND, 2009). A manifestação desse conjunto de sintomas é bastante heterogênea, variando em intensidade e gravidade dentro do espectro (GESCHWIND, 2011).

Como já citado anteriormente, o TEA possui uma grande variabilidade de manifestações clínicas (PERSICO e BOURGERON, 2006) ainda ocorrem muitas polêmicas e discordâncias quanto ao diagnóstico preciso, embora haja objetividade e universalização da classificação atual e a grande quantidade de estudos realizados por pesquisadores clínicos.

O TEA é classificado como uma doença complexa uma vez que sua etiologia é pouco conhecida na maioria dos casos, podendo ser resultado da interação entre fatores ambientais e genéticos (ADAMS et al., 2009). No entanto, é possível classificar os pacientes com TEA em dois tipos: os portadores de TEA idiopáticos, cuja causa não é possível definir e que representam quase 90% dos casos, e os portadores de TEA sindrômicos, cuja etiologia da doença é claramente identificada como resultante de agentes ambientais, alterações cromossômicas e mutações em genes específicos (JIANG et al., 2014).

Os casos de TEA Sindrômica, também conhecidos como Autismo secundário (PERSICO e BOURGERON, 2006), estão comumente associados a condições médicas bem estabelecidas como Síndrome de X-Frágil, Síndrome de Rett, Esclerose Tuberosa, Neurofibromatose, Síndrome de Down e alterações cromossômicas já descritas como fortemente associadas à desordem (CORNISH et al., 2005). Segundo JIANG et al. (2014), há um número crescente de estudos do autismo como uma característica clínica de diferentes síndromes genéticas sendo a Síndrome de Rett e Síndrome de X-Frágil exemplos clássicos dessa categoria. Dessa forma, o estudo de TEAs sindrômicos contribui não apenas para apoiar o papel de uma etiologia genética em TEA, mas também constituem o desafio para a

compreensão da base molecular subjacente ao TEA corroborando com dados de que a maioria de casos de TEA, aproximadamente 70%, permanece ainda desconhecida (JIANG et al., 2014).

Portanto, a realização de avaliações clínicas precisas e testes moleculares adequados para a definição da etiologia do TEA são fundamentais para o devido seguimento do paciente e sua família. Portanto esse estudo abordará os aspectos associados ao diagnóstico diferencial de Síndrome de Rett em pacientes com TEA e a importância da triagem molecular para a definição do diagnóstico.

1.1 SÍNDROME DE RETT

A Síndrome de Rett foi descrita pela primeira vez em 1966 por Andreas Rett como uma condição caracterizada por uma deterioração neuromotora em crianças do sexo feminino, tendo-o descrito como uma "Atrofia Cerebral Associada à Hiperamonemia" (SCHWARTZMAN, 2003).

Em 1983, Hagberg e colaboradores propuseram definições para descrever mais amplamente os pacientes com Síndrome de Rett (REICHOW et al., 2015), caracterizando os aspectos clínicos (PANTALÉON e JUVIER, 2015). A partir deste estudo, a condição descrita por Andreas Rett passou a ser melhor conhecida além no qual foi sugerido o epônimo de Síndrome de Rett (SCHWARTZMAN, 2003).

A prevalência atual da Síndrome de Rett é estimada entre 1:10.000 e 1:15.000 meninas. No Brasil, identificada inicialmente por Rosemberg et al. no período 1986 e 1987 (VEIGA et al., 2002).

A condição é a segunda causa mais grave de deficiência intelectual no sexo feminino, sendo reportado em mais de 40 países em todo mundo (BLANCO et al., 2015) com grave comprometimento cognitivo e motor (BIENVENU et al., 2000).

O quadro clínico é bastante variável com desenvolvimento psicomotor aparentemente normal até 6-18 meses de idade, no entanto, é seguida por um

rápida regressão com perda de habilidades motoras, cognitivas e linguísticas adquiridas (PECORELLI et al., 2015).

O diagnóstico por muito tempo era exclusivamente clínico, porém, a identificação de alterações genéticas na maioria dos casos sugere a importância da análise molecular como auxílio para diagnóstico (SCHWARTZMAN, 2003).

1.1.1 Etiologia molecular

No ano de 1999, Amir e colaboradores identificaram mutações no gene 2-metil CpG de ligação (*MECP2*) como etiologia genética principal para a Síndrome de Rett (ZHANG et al., 2012). A partir desse estudo, vários trabalhos passaram a relatar outras mutações genéticas implicadas na Síndrome de Rett que incluem o gene Cinase dependente de ciclina 1 (*CDKL5*) (SCALA et al., 2005; SARTORI et al., 2009; ZHAO et al., 2014) e o gene *FOXG1* (VAN DER AA et al., 2010; LE GUEN et al., 2011).

Nesse trabalho abordaremos a estudo de mutações no gene *MECP2* para triagem de pacientes com TEA. Sabe-se que as mutações decorrentes neste gene ocorrem de forma esporádica em mais de 95% dos casos e o risco da mãe ter outro filho afetado é menor que 1%, apesar de casos recorrentes em famílias já terem sido relatados (BIENVENU et al., 2000). Além disso, as mutações resultantes possuem padrão de herança dominante (OMIM 312750).

O gene *MECP2* está localizado no cromossomo Xq28 (OMIM 312750). Está envolvido com processos de metilação do DNA e desta forma, no controle de diversos genes (PANTALÉON e JUVIER, 2015).

O gene *MECP2* codifica a proteína MECP2 (2-metil CpG de ligação) (OMIM 312750). Esta, por sua vez, é um polipeptídeo de ligação cromossômica abundante, ubiquamente expressa, porém é verificada uma maior expressão dessa proteína no tecido nervoso, principalmente nos neurônios do cérebro (Coy et al., 1999; Akbarian et al., 2001; Shahbazian et al., 2002). Possui função reguladora e funciona como um repressor transcricional já que se liga à regiões CpG metilados

nas regiões promotoras de DNA (SANTOS, 2004). É responsável pela manutenção e modulação das sinapses, sendo de extrema importância que seja submetida há uma estrita regulação (PANTALÉON e JUVIER, 2015).

A MECP2 faz parte de uma família de proteínas nucleares denominadas proteínas com domínios de ligação à metilcitosina (MBD), as quais podem, indiretamente, limitar o acesso dos fatores de transcrição aos elementos reguladores ao se ligar às ilhas CpG (MEECHAN ET AL., 1989; LEWIS ET AL., 1992; HENDRICH & BIRD, 1998; NEWELL-PRICE ET AL., 2000).

Possui duas isoformas chamadas de MECP2_E1 e MECP2_E2 que se diferenciam na sequência de suas extremidades amino-terminais, codificadas pelos éxons 1, 3 e 4 e 2, 3 e 4 respectivamente (GADALLA et al., 2011). Apresenta quatro domínios funcionais: (1) domínio de ligação funcional (MBD), que consiste em 85 aminoácidos e é essencial para a ligação 5-metilcitosina; (2) domínio de repressão transcricional (TRD), com 104 aminoácidos de comprimento responsável pelo recrutamento de co-repressores transcricionais (SIN3a), histonas desacetiladas (HDACs) e proteínas de remodelação; (3) e um domínio carboxi terminal (CTS), que facilita a ligação do DNA e interações proteína-proteína (SANTOS, 2004) e (4) Domínio WW que está envolvido com processos de interação proteína-proteína (BIENVENU e CHELL, 2006) (Figura 1).

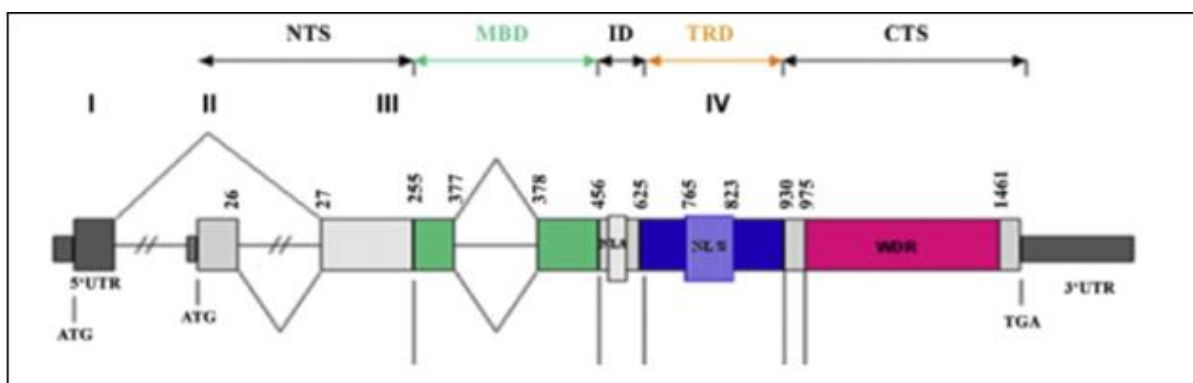


Figura 1. Esquema do gene *MECP2* e seus 4 domínios funcionais. Os motivos da proteína estão ilustrados acima indicados por: NTS (domínio N-terminal), MBD (domínio de ligação funcional), ID (Interdomínio), TRD (domínio de repressão transcricional) e CTS (domínio carboxi-terminal). O WDR corresponde ao local onde estão presentes proteínas de ligação ao domínio WW (presente no domínio CTS) e NLS (domínio de sinalização nuclear) presente no domínio TRD. Os números

indicam a região codificante da isoforma E2, que exclui o exon 1. Abaixo está representado o gene *MECP2* e seus quatro exons de acordo com a localização em cada domínio correspondente. Fonte: Adaptado de Fabio et al (2014).

O mecanismo de repressão transcricional da proteína envolve complexos de desacetilação de histonas (SANTOS, 2004). Ao se ligar a regiões promotoras CpG metiladas, a MECP2 atua recrutando um complexo co-repressor, o fator Sin3A, através do domínio de repressão transcricional (TDR); além de histonas desacetilases (HDAC), esta última é responsável pela desacetilação das histonas H3 e H4 nos nucleossomos (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Ng & Bird, 1999). As HDACs removem o grupamento acetil das histonas tornando cromatina compacta e inacessível aos ativadores transcricionais (SANTOS, 2004). Dessa forma, o complexo formado é responsável pela compactação da cromatina e supressão da transcrição gênica dos promotores submetidos ao seu controle (BANERJEE et al., 2011).

No entanto, quando mutações ocorrem em algum dos domínios funcionais da proteína MECP2 ou impedem que ela seja expressa isso pode impactar na transcrição dos genes alvo de repressão de transcrição, ausente e não consegue se ligar às regiões CpG metiladas ou não ocorre o recrutamento do co-repressor Sin3A e desacetilases de histonas, não havendo repressão estável da transcrição de genes alvos de forma parcial ou total (SANTOS, 2004). A cromatina pode adotar um estrutura mais aberta e mais adequada à transcrição gênica (NG & BIRD, 1999; NAKAO et al., 2001).

Além disso, vários trabalhos têm mostrado a partir de mapeamento dos sítios de união ao DNA que parte dos promotores submetidos ao controle da MECP2 não estão metilados, podendo ainda se ligar à regiões específicas em íntrons e interações com mRNA, o que indica que possa haver outras funções da proteína além do silenciamento da transcrição (PANTALÉON e JUVIER, 2015).

Segundo Pantaléon e Juvier (2015), existem mais de 225 mutações no gene *MECP2* já foram identificadas, no entanto, apenas 8 mutações em 70% dos casos foram encontradas em pacientes que apresentaram completamente os critérios.

As mutações são distribuídas ao longo de todo o gene e compreendem mutações missense, nonsense, inserções e deleções, mutações que afetam mecanismos de splicing e ainda, menos frequente, rearranjos genômicos complexos (Miltenberger-Miltenyi e Laccone, 2003). A maior parte das mutações patogênicas já descritas estão localizadas nos éxons 3 e 4 (SPLENDORE et al., 2012). Tais mutações tem como principal consequência sinaptogênese anormal em diferentes etapas do desenvolvimento com alteração na formação e maturação das sinapses devido a não supressão da expressão dos genes que deveriam ter sido silenciados por conta do gene *MECP2* estar mutado (PANTALÉON e JUVIER, 2015).

Dentre as mutações identificadas, oito delas são mais comuns e representam mais de 79% de todos os indivíduos com Síndrome de Rett, que são: R106W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X e R306C) tomando destaque ainda para a mutação R270X, comumente presente em pacientes com Síndrome de Rett (LOURENÇO, 2011).

Segundo Splendore et al. (2012), a taxa de mutação em *MECP2* é muito maior na meiose paterna do que na materna, sendo uma das hipóteses para a ocorrência da síndrome exclusivamente em meninas. Meninos que apresentam mutações no gene podem apresentar fenótipo extremamente variável com quadros totalmente distintos do quadro clínico clássico da síndrome de Rett em (SCHWARTZMAN, 2003).

O fenótipo dos pacientes com mutações no gene *MECP2* são influenciados por diferentes fatores genéticos que incluem o tipo e localização da mutação e do padrão de inativação do cromossomo X (LIMA et al., 2009).

A Inativação do cromossomo X pode influenciar no fenótipo da doença, já que em cada célula apenas um cromossomo está ativo. Se na linhagem celular que dá origem às células nervosas a inativação for favorável, ou seja, o cromossomo X contendo o alelo mutante é inativado, então propõe-se é provável que os sintomas da doença sejam mais brandos (inclusive assintomáticos), ao passo que quando ocorre uma inativação desfavorável, ou seja, quando na linhagem de neurônios o cromossomo X inativado é o portador do alelo normal, os sintomas são mais graves (AMIR et al., 2000). Sendo assim, o fenótipo da Síndrome de Rett não depende

apenas da presença da mutação em *MECP2*, mas também da razão de inativação do cromossomo X (SPLENDORE, 2012). Alterações no domínio carboxila terminal parecem conduzir a um fenótipo menos severo (BEBBINGTON et al., 2010).

1.1.2 Clínica de Rett

O quadro clínico é bastante variável o que dificulta o diagnóstico na maioria dos casos (KOK, 2012). A síndrome pode se apresentar na forma típica, também conhecida como forma clássica, ou na forma atípica (ZHANG et al., 2012). Os aspectos clínicos podem variar tanto para a forma clássica como para as manifestações atípicas o que pode dificultar o diagnóstico clínico na maioria dos casos (LOURENÇO, 2011).

Segundo Lourenço (2011), o diagnóstico definitivo só deve ser realizado com segurança por volta dos quatro anos de idade, pois nesse período já estão presentes os sintomas mais críticos da doença, como a perda do uso intencional das mãos.

Como já mencionado, as manifestações clínicas de pacientes com síndrome de Rett clássica se desenvolvem na maioria dos casos entre os 6-18 meses de idade (BISGARD et al., 2015).

Após esse período, uma regressão no neurodesenvolvimento se inicia com perda gradual da fala e as habilidades manuais podendo ocorrer perda habilidades adquiridas (tais como fala, deambulação e uso propositado das mãos e surgem as estereotipias manuais características da doença (MONNERAT, 2009). O contato visual é bastante limitado semelhante a pacientes com autismo (CAMPOS-CASTELO et al., 2007). Segundo Pantaléon e Juvier (2015), no início da doença alguns pacientes podem ter aparentes distúrbios neurológicos tais como: ataxia do tronco, escoliose neurogênica, convulsões, dificuldades respiratórias, perturbações gastrointestinais, disfunção piramidal, perda de audição neurosensorial leve e neuropatia periférica. Além disso, é muito comum problemas respiratórios, crises

epiléticas e morte súbita durante o sono o que contribui para a baixa expectativa de vida (MONTEIRO et al., 2005). Segundo Hagberg et al. (2002), apenas nove entre 130 indivíduos (7%) ultrapassam a idade de 40 anos.

Segundo Monnerat (2009), a evolução clínica da forma clássica da SR é dividida em quatro estágios, são eles: (1) desaceleração precoce – surge entre 6 meses e 1 ano e meio de idade, com duração de alguns meses; (2) deterioração rápida – ocorre entre 2 e 4 anos de idade, com duração de semanas ou poucos meses; (3) pseudo-estacionário – ocorre entre os 4 e 10 anos, com duração de meses ou anos; (4) deterioração motora tardia – a partir dos 10 anos (Figura 2).

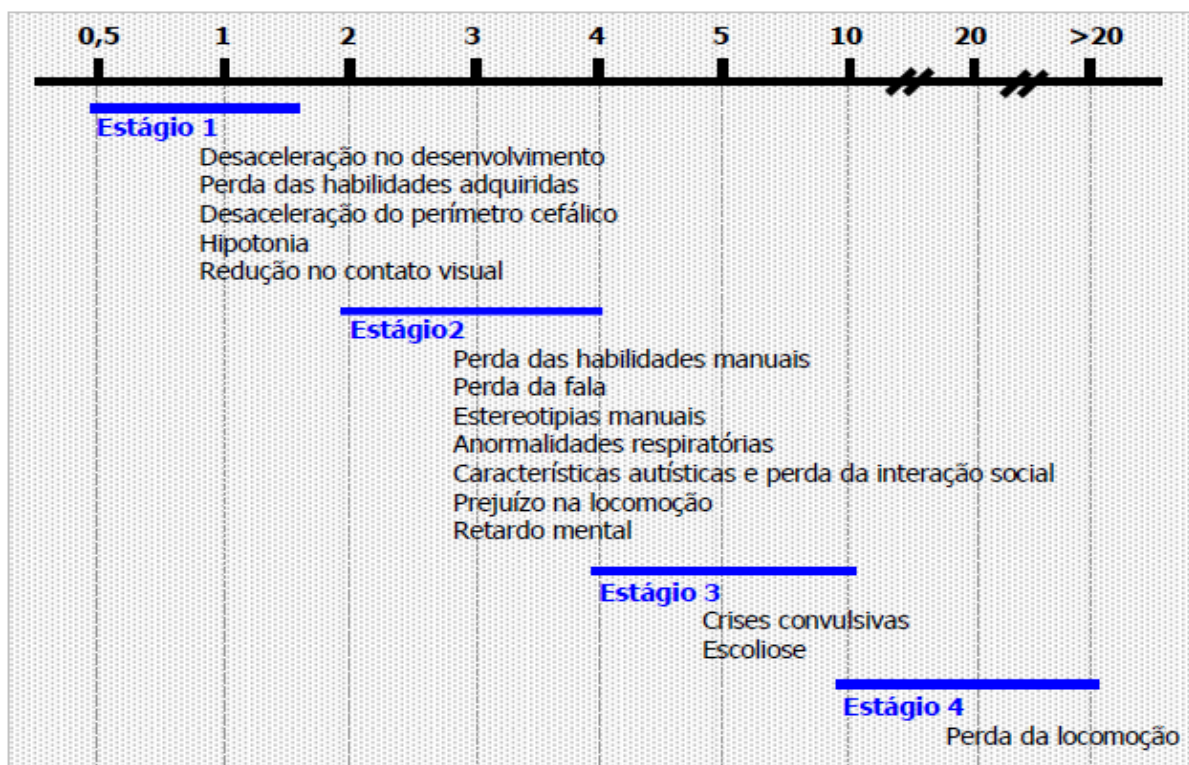


Figura 2. Diagrama esquemático da progressão clínica da Síndrome de Rett em função da idade. Escala superior indica idade (em anos). Fonte: Adaptado de Chahrour e Zoghbi (2007)

As formas atípicas não possuem estágios bem definidos e nem todos os sintomas são observados. Porém, é possível estabelecer alguns critérios específicos

além daqueles manifestados na forma clássica que auxiliam no diagnóstico, são estes:

Critérios para as variáveis atípicas (PANTALÉON e JUVIER, 2015):

- Síndrome de Rett com regressão tardia: A regressão do desenvolvimento psicomotor ocorre tardiamente, geralmente depois de 4 anos de idade, e forma mais gradual.
- Síndrome de Rett com linguagem preservada: Depois da fase de regressão os pacientes conseguem pronunciar algumas palavras que foram aprendidas antes de ficar doente (nunca depois da fase de regressão).
- Síndrome de Rett com epilepsia precoce: Pacientes preenchem os critérios da forma clássica, porém, começam antes dos meses de idade e apresentação clínica inicial é dominada por convulsões que mascaram o diagnóstico.
- Variante congênita da Síndrome de Rett: Não há período de desenvolvimento psicomotor normal, mas se cumprem os critérios da síndrome de Rett clássica. Cada vez mais casos de variante congênita da Síndrome de Rett estão sendo descritos.

Logo após essa descoberta, vários estudos de triagem de mutações nos quatro exons do gene *MECP2* foram realizados em pacientes diagnosticados com a forma clássica ou atípica de Rett (SPLENDORE et al., 2012). De acordo com TEMUDO et al. (2011), pouco mais de 90% de pacientes com Síndrome de Rett clássica apresentam mutações no gene *MECP2* e cerca de 30% de pacientes com síndrome de Rett típica.

De acordo com o DSM-V, a síndrome de Rett pode estar associada como uma condição genética ao Transtorno do Neurodesenvolvimento, que inclui o transtorno do espectro autista. Estima-se que cerca de 50 % das meninas brasileiras afetadas pela síndrome de Rett tenham sido diagnosticadas inicialmente com outras patologias, principalmente autismo (MONNERAT, 2009).

De acordo com Monnerat (2009), a Síndrome de Rett compartilha características comuns com outras doenças, síndromes além de doenças neurológicas principalmente no estágio 1 no qual as características marcantes da síndrome, aparentemente, ainda não são manifestadas o que torna o diagnóstico

complicado. Dessa forma, predomina nos primeiros estágios um transtorno generalizado do desenvolvimento capaz de similar o autismo (CAMPOS-CASTELO et al., 2007). O pequeno número de casos notificados pode ser decorrente do diagnóstico diferencial associado à baixa prevalência da doença principalmente na América Latina (BORGES-GONZALEZ et al., 2002).

Devido a essa problemática, o diagnóstico clínico nem sempre é conclusivo e a análise molecular consiste uma importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico da doença. Além disso, o estabelecimento do diagnóstico molecular é importante para o aconselhamento genético.

1. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho possui como objetivo principal realizar triagem molecular para Síndrome de Rett utilizando o gene *MECP2* em pacientes com Transtorno do Espectro Autista atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o protocolo de sequenciamento dos exons 2, 3 e 4 do gene *MECP2*
- Sequenciar os éxons 2, 3 e 4 gene *MECP2* para detectar variações descritas ou não descritas que possam estar associadas com o quadro clínico dos pacientes com TEA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Neste trabalho, foram investigadas 17 (dezessete) pacientes do sexo feminino atendidas no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza e diagnosticadas inicialmente com Transtorno do Espectro Autista (TEA), de acordo com os critérios do DSM-IV. Todas as pacientes foram triadas clinicamente pelas médicas do Serviço Caminhar, Dr^a Amira Figueiras, Isabel Neves e Suely Fernandes em um projeto desenvolvido sob a coordenação do Prof. Dr Luiz Carlos Santana da Silva, também coordenador do Laboratório Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) da Universidade Federal do Pará onde esse estudo foi desenvolvido.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos CEP-ICS/UFGA (Anexos I), do Instituto em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. Todos os procedimentos foram realizados após os pacientes ou seus representantes legais serem informados e esclarecidos dos objetivos do trabalho (Anexo II).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE *MECP2*

O protocolo utilizado nesse estudo foi baseado desenvolvido e validado pelo Centro de Genética Preditiva e Preventiva, Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto, para a identificação de mutações no gene *MECP2*. O referido Laboratório é coordenado pelo Prof. Dr Jorge Sequeiros.

Na tabela 1 estão descritas as sequencias dos iniciadores utilizados na Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos exon 2, 3 e 4 do gene *MECP2*.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores para amplificação dos exon do gene MECP2

Iniciador	Sequência do primer*	Tamanho (pb)
MECPE2F	CAGGAAACAGCTATGACCCAGACTCACCAGTTCCTGCTT	276
MECPE2R	TGTAAAACGACGGCCAGTGGCACAGTTTGGCACAGTTATG	
MECPE3F	CAGGAAACAGCTATGACCTCTGAGTGTATGATGGCCTGG	611
MECPE3R	TGTAAAACGACGGCCAGTCATTTCAAGCACACCTGGTCT	
MECPE4F	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCCAGGCAGTGTGACT	1310
MECPE4R	TGTAAAACGACGGCCAGTGGAAGCTTTGTCAGAGCCCTA	

*Em negrito, estão sequencias genéricas que foram inseridas nos iniciadores como adaptadores para a reação de sequenciamento, as chamadas caudas M13.

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 sob luz ultravioleta. A concentração dos produtos foi estimada visualmente com a utilização do marcador *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen)*.

A purificação dos PCR foi feita com as enzimas Exonuclease I (GE Healthcare) (EXO) e Fosfatase Alcalina (GE Healthcare) (SAP) segundo especificações do fabricante e a reação de sequenciamento foi feita utilizando kit de dideoxinucleotídeos BigDye Terminator V3.0 ® (Applied Biosystems).

Para o sequenciamento direto, foram amplificados por PCR seis fragmentos do gene *MECP2*, que cobrem a maior parte de sua sequência codificadora: exon 2 (um fragmento) exon 3 (um fragmento) e exon 4 (4 fragmentos) (Figura 3). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados com a utilização de iniciadores descritos na tabela 2 e figura 3. As reações de sequenciamento foram submetidas à eletroforese de capilar em Sequenciador automático ABI 3500XL no Centro de Inovações tecnológicas do Instituto Evandro Chagas, coordenado pelo Dr. João Vianez.

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador foram analisados com o auxílio dos programas Sequencher ® e Bioedit. Toda a alteração encontrada foi

confirmada na ferramenta online Clinvar/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>), que é uma fonte de livre acesso onde são encontradas uma série de variações genótípicas e fenotípicas humanas e até mesmo descrição do significado clínico permitindo verificar se as alterações encontradas são polimórficas, patogênicas ou ainda não descritas.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos para sequenciamento.

Exon	Primer	Sequência do primer
2 e 3	M13Fseq	CAGGAAACAGCTATGACC
	M13Rseq	TGTAAAACGACGGCCAGT
	MECPE4.1Rseq	CCGGCCTCTGCCAGTTC
	MECPE4.2Fseq	GGTAGGCGACACATCC
4	MECPE4.2Rseq	ACCGTCTCCCGGGTCTT
	MECPE4.3Fseq	GGTCCTGGAGAAAAGTCC
	MECPE4.3Rseq	CTCTCCAGTGAGCCTCCTCT
	MECPE4.4Fseq	AGAAGGAGCACCACCA

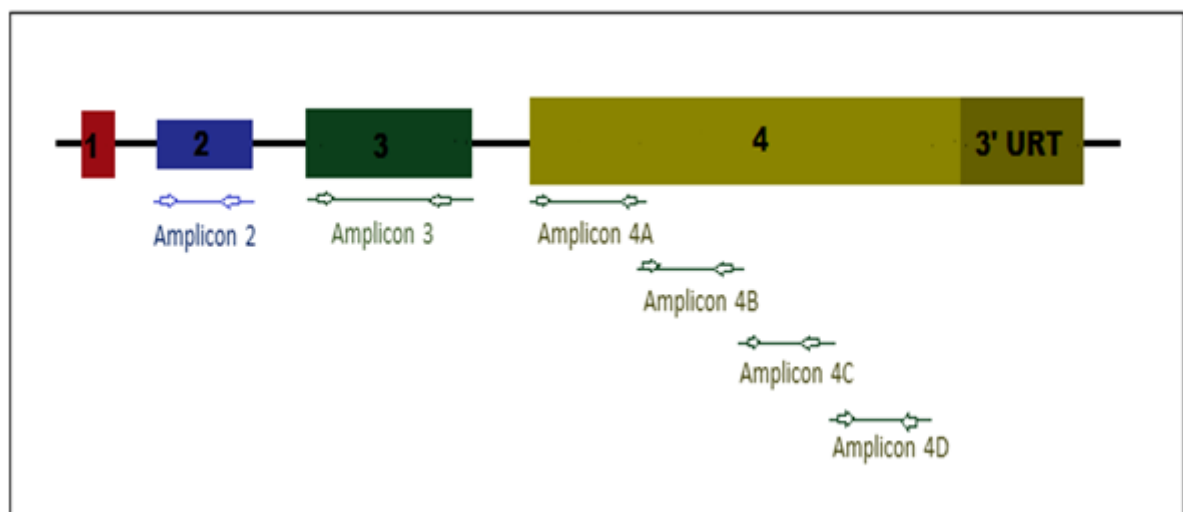


Figura 3. Representação esquemática das regiões de anelamento dos pares de iniciadores utilizados para amplificação dos exons 2, 3 e 4 do gene *MECP2*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AMOSTRAGEM

Foram obtidas 17 amostras de pacientes do sexo feminino diagnosticadas com TEA que já haviam sido coletadas e extraídas pela equipe responsável do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo. A média de idade das pacientes foi de 7,71. O intervalo foi de 2 meses e 23 anos, sendo observadas maiores quantidades de pacientes com faixas etárias entre 0 a 5 anos (9) e na faixa etária entre 6 a 10 anos (6) (Figura 4).

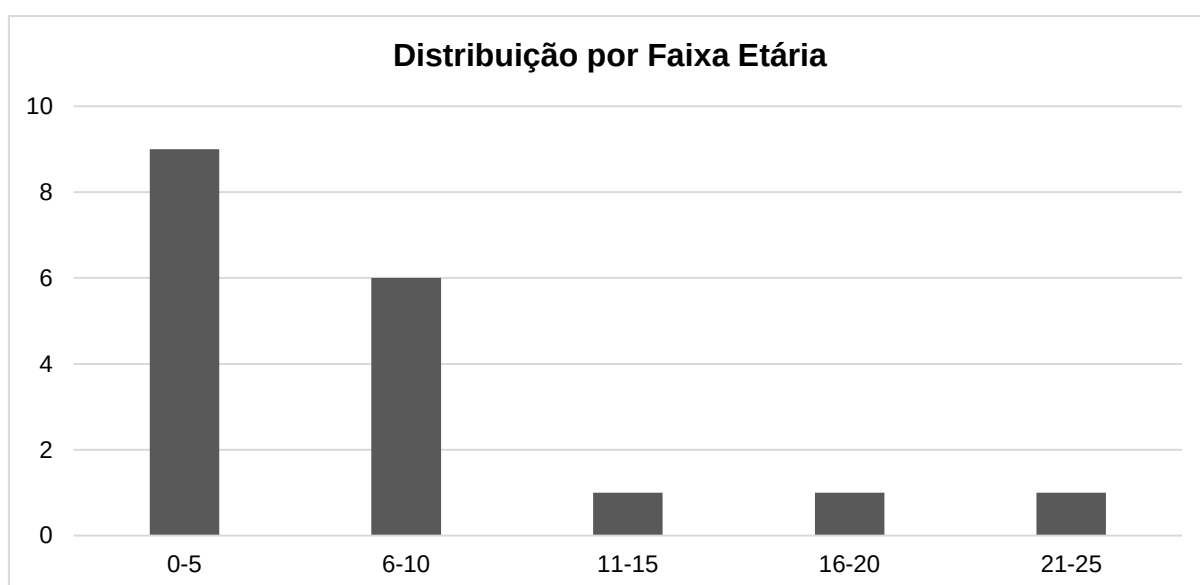


Figura 4. Distribuição por faixa etária nas amostras estudadas.

O Serviço Caminhar, sediado no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, atende crianças com atraso no desenvolvimento, síndromes genéticas e alterações no crescimento até os 12 (doze) anos de idade, o que explicaria a média de idade das pacientes atendidas no serviço.

Dados clínicos adicionais sobre os pacientes estão sendo coletados e representam uma dificuldade logística uma vez que se faz necessária a reavaliação

clínica dos pacientes e, muitas vezes, seus dados pessoais estão desatualizados e não é possível contatá-los.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

No presente trabalho foi realizada a padronização para amplificação dos exons 2, 3 e 4 do gene *MECP2* seguida pela análise das sequências obtidas, etapas fundamentais para a implementação de um dos principais testes diagnósticos para Síndrome de Rett. As etapas consistiram na padronização do sequenciamento dos exons 2, 3 e 4.

4.2.1 Padronização do Sequenciamento do Exon 2

A padronização do exon 2 ocorreu em duas etapas. Na primeira os *primers* utilizados para na PCR e reação de sequenciamento foram construídos de acordo com os iniciadores utilizados para o teste de diagnóstico de *MECP2* no Centro de Genética Preditiva e Preventiva do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto. No entanto, obtivemos dificuldades técnicas na padronização e no sequenciamento das amostras. Para dar continuidade ao estudo as sequências dos primers sofreram adaptações baseadas na sequência da disponível no *GeneBank* para o gene *MECP2* (Número de referência: AF030876.2) levando a uma segunda etapa de padronização representados na tabela 3.

Para ambas as etapas os protocolos de amplificação sofreram adaptação ao longo do processo. Tais como gradiente de temperatura e de concentração de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) e tempo de ciclagem (tabela 4).

Tabela 3. Primers adaptados para amplificação e sequenciamento

Exon	Primer	Sequência
Amplificação		
2	MECPE2F	CAATGGGGGCTTTCAACTTA
	MECPE2R	GGCGACCAAGTAACCCTACA
4	MECPE4F	CAGCCAGGCAGTGTGACT
	MECPE4R	GGAAGCTTTGTCAGAGCCCTA
Sequenciamento		
2	MECPE2Fseq	CAGACTCACCAGTTCCTGCTT
	MECPE2Rseq	GGCACAGTTTGGCACAGTTATG
4	MECPE4.1Fseq	CGCTCTGCCCTATCTCTGAC
	MECPE4.4Rseq	TTCTTGTTGGTTTGCTTTGC

Tabela 4. Gradiente para amplificação dos exons 2, 3 e 4

Exon	Temperatura de Anelamento (°C)	Concentração de MgCl ₂ (μl)	Nº de ciclos	DMSO* (μl)	DNA(μl)
2	53/ 64/ 65	0,25 e 0,75	30 e 35		
3	54 e 64	0,25 e 0,75	30 e 35		
4	53/ 58 e 60	0,25/ 0,5 e 0,75	30 e 35	0,1	1/1,5

*Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) é utilizado para facilitar o anelamento dos primers, o que aumenta a amplificação. Fonte: Lorenz (2012).

A partir disso, as reações foram conduzidas em um termociclador Veriti (*Thermal Cycler*) em um volume final de 20μl. Foram utilizados 1,0μl de DNA, 11,25μl de Água Ultrapura, 2μl de Tampão de Reação 10X PCR Rxn (Invitrogen), 0,75μl de MgCl₂ 0,5mM (Invitrogen), 3,2μl de dNTPs 0,125mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,8μl de iniciadores (MECPE2F e MECPE2R) e 0,2μl de 1U de *Taq Platinum DNA Polimerase* (Invitrogen).

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial: 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos,

(MECPE3F e MECPE3R) e 1U de *Taq Platinum DNA Polimerase* (Invitrogen). O volume final de cada reação foi 20µl e processadas no termociclador Veriti (*Thermal Cycler*).

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial: 95°C de 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, 644°C por 30 segundos e extensão a 72°C durante 50 segundos. A extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos amplificados obtiveram tamanho de peso molecular de aproximadamente 600pb.

Ao final do processo de sequenciamento, foram analisadas as sequencias obtidas para as 17 pacientes envolvidas no presente trabalho (Figura 6).

As sequencias obtidas incluíam as 351 bases correspondentes a sequência já descrita para o exon 3 do gene MECP2 e, em média 150 bases dos introns 2 e 3.

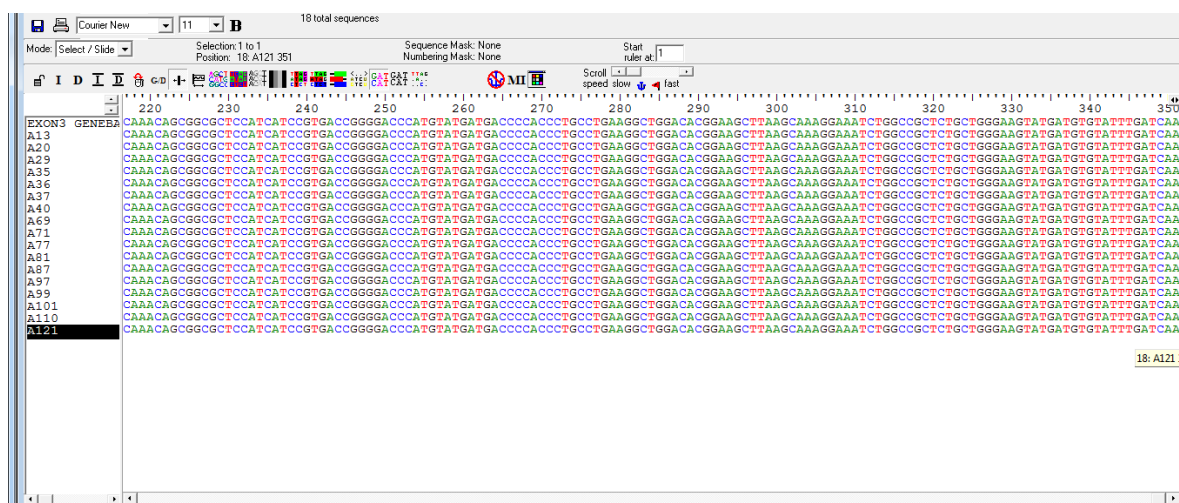


Figura 6. Alinhamento das sequências do exon 3 do MECP2 de pacientes com TEA

Nenhuma mutação foi encontrada nas amostras analisadas, nem na região codificante, nem na região intrônica.

Importante ressaltar que o exon 3, tanto para a isoforma E1, quanto para a isoforma E2 da proteína, codifica o domínio de ligação funcional da MECP2 com a região de ilhas CpG (Figura 7) e, alterações nesse sítio são consideradas potencialmente patogênicas, algumas descritas como frequentemente associadas a síndrome de Rett da proteína que contém parte do sitio de ligação da molécula com o DNA e que, alterações nesse motivo são potencialmente patogênicas (GADALLA et al. 2011)

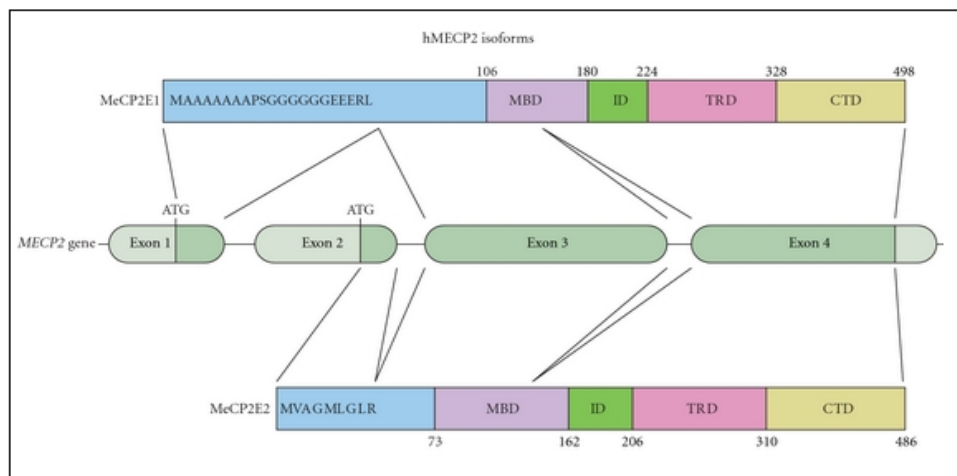


Figura 7. Relação entre os éxons do gene MECP2 e as duas possíveis isoformas geradas para a proteína MECP2. Fonte: Zachariah & Rastegar (2012).

5.2.3 Padronização do sequenciamento do Exon 4

Todo o processo ocorreu em duas diferentes etapas, seguindo o mesmo processo já descrito para o exon 2. Inicialmente foi utilizado um par de iniciadores para a PCR primers para o sequenciamento já utilizados pelo Centro de Genética Preditiva e Preventiva e, em seguida, foi necessária adaptação desses primers para dar continuidade ao estudo (tabela 3).

Por se tratar de um fragmento maior (1300 pb), além da utilização de gradiente de temperatura e concentração de $MgCl_2$, também foi alterada a concentração de DNA e a lançou-se mão da utilização de *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) para facilitar a amplificação da região. Ao final de vários testes, obtivemos o

protocolo final para amplificação e dar continuidade ao processo de sequenciamento (tabela 4).

A partir disso, as reações foram conduzidas em um termociclador Veriti (*Thermal Cycler*) em um volume final de 20µl. Foram utilizados 1,0µl de DNA, 12,3µl de Água Ultrapura, 2µl de Tampão de Reação 10X PCR Rxn (Invitrogen), 0,5µl de $MgCl_2$ 0,5mM (Invitrogen), 3,2µl de dNTPs 0,125mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen), 0,8µl de iniciadores de MECPE2F e MECPE2R (DTT) e 0,2µl de 1U de *Taq Platinum DNA Polimerase* (Invitrogen).

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial: 95°C de durante 15 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, pareamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 72° C por 40 segundos, e extensão final a 72°C durante 30 minutos.

Os produtos amplificados obtiveram tamanho de peso molecular de aproximadamente 1300pb.

Das 17 amostras utilizadas para esse estudo, apenas para 4 obtivemos grau de otimização adequado para análise. Para o restante, foi possível obter sequências de qualidade para realização das análises.

Para uma das pacientes, foi identificado um ponto de heterozigose na posição 321 do cromatograma com os contigs gerados durante o sequenciamento do exon 4 do gene MECP2, resultante da presença de uma citosina e uma timina na mesma posição (Figura 8).

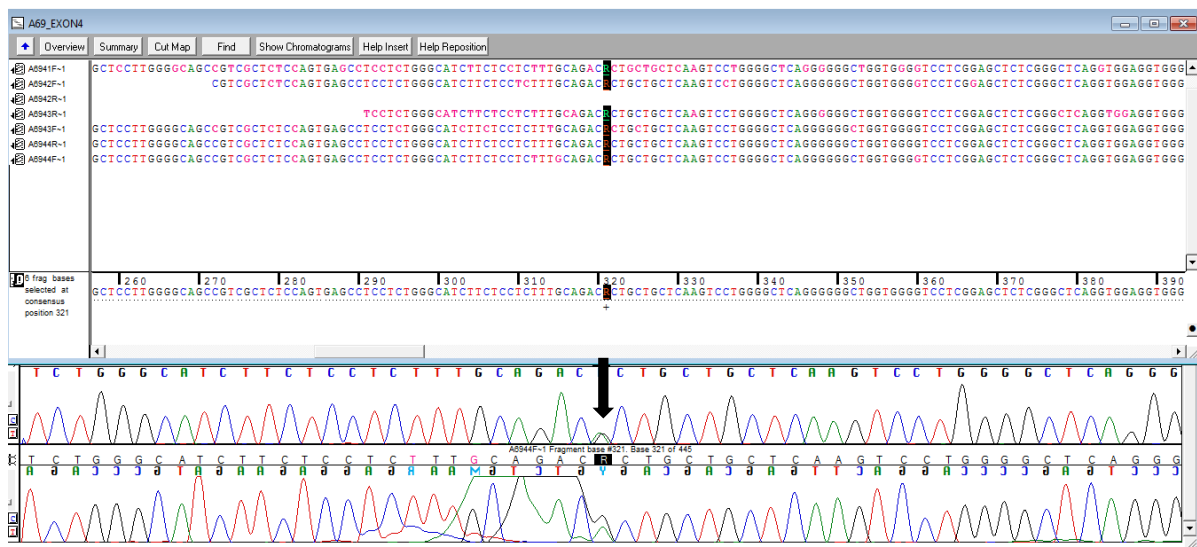


Figura 8. Cromatograma da sequenciamento do exon 4 do gene *MECP2*. É possível a observação do ponto de heterozigose na posição 321 indicado pela seta.

Após o alinhamento das sequências foi observado que este ponto representa uma mutação sinônima localizada no domínio CTS na posição 1233 da sequência codificante do gene *MECP2* que resulta na troca de uma citosina para timina (c.1233C>T) (Figura 9).

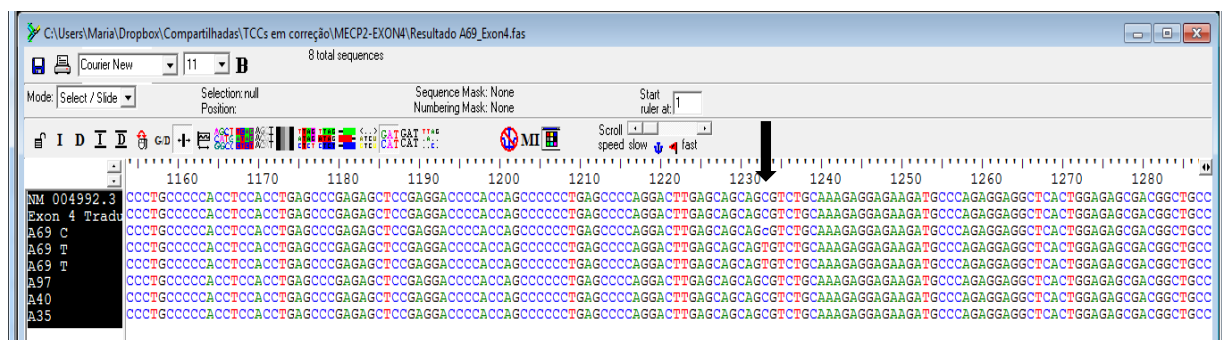


Figura 9. Alinhamento das sequências analisadas do exon 4. Observa-se a diferença na posição 1233 da amostra A69 onde há uma troca de C para T indicada pela seta.

A troca do nucleotídeo ocorre na terceira posição de um códon que codifica uma serina (p.411). Importante ressaltar que foi utilizada a isoforma E2, a mais frequente da proteína *MECP2*, para a análise das sequências.

Por se tratar de um trabalho que visa o estabelecimento de um método diagnóstico eficaz para a determinação molecular de uma síndrome genética comumente associada ao autismo, o processo de padronização teve que ser lento e cuidadoso e ainda não está finalizado.

É importante ressaltar que o processo para validação de diagnóstico molecular é dependente de uma série de aspectos importantes. Ao longo do processo do estabelecimento da análise molecular uma série de metodologias devem ser testadas e validadas para a legitimação do diagnóstico do gene *MECP2* para auxílio do diagnóstico clínico até mesmo a utilização de outras técnicas. Além disso, a triagem do gene base como o gene *MECP2*, exclui os casos genéticos mais frequentes de atraso intelectual e de atraso no neurodesenvolvimento psicomotor em meninas o que também pode auxiliar no diagnóstico bem como o aumento no número amostral.

No presente estudo, optamos por investigar crianças previamente diagnosticadas com transtorno do espectro autista, porém sem diagnóstico preciso da etiologia de suas doenças. A investigação clínica das principais causas de deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento podem ser desafiadoras quando o espectro de sintomas é tão vasto. Os testes genéticos, nesse contexto, podem servir de auxílio para o diagnóstico e tratamento adequado dos pacientes, além de melhor seguimento das famílias.

Vários trabalhos relatam mutações não-sinônimas em estudos de triagem molecular do gene *MECP2* em meninas. Buyse e colaboradores (2000), em um estudo com 228 meninas, encontraram em duas pacientes variantes *missenses* A44T e T203M, estando essa última presente em uma das pacientes que havia sido diagnosticada inicialmente com autismo e que posteriormente foi caracterizada com Síndrome de Rett atípica associada ao autismo. Outro estudo realizado por Orrico et al. (2000) com 42 pacientes meninas TEA, segundo o DSM-IV, mostrou que uma delas apresentou mutação não sinônima (682C>T). Após novas avaliações a paciente foi diagnosticada com variante de Síndrome de Rett associado ao comportamento autista.

Apesar de termos encontrado uma mutação sinônima, alguns trabalhos relatam que mutações sinônimas podem ter efeitos patogênicos. Segundo Chamary e Laurence (2009), mutações silenciosas podem interferir em vários estágios na

produção de proteínas, desde a transcrição do DNA até a tradução do RNAm além de efeitos na remoção adequada de íntrons.

De fato, esses estudos corroboram com a motivação do nosso trabalho, visto que mutações não sinônimas são comumente encontradas em pacientes com Síndrome de Rett associadas ao autismo. Portanto, faz-se necessária a ampliação da amostragem de pacientes autistas e a sua caracterização clínica para que possamos fazer melhores inferências sobre quaisquer relações entre genótipo e fenótipo.

Por mais baixa que seja a frequência de crianças afetadas com Síndrome de Rett ou que possam ter características autistas associadas, a triagem molecular é fundamental para o aconselhamento genético. Além disso, a triagem molecular do gene *MECP2* em pacientes com TEA no início do aparecimento das características clínicas pode auxiliar no diagnóstico diferencial para Síndrome de Rett visto que, como já citado anteriormente, nos primeiros estágios da referida condição, há compartilhamento de características com TEA o que pode mascarar o diagnóstico correto. Hammer e colegas (2002), defendem a importância da triagem de mutações no gene *MECP2* em meninas com Deficiência Intelectual por conta da sobreposição em aproximadamente 70% desta condição em pacientes com autismo corroborando com o dado já mencionado neste trabalho em que a Síndrome de Rett é a segunda maior causa de Deficiência Intelectual em meninas.

Apesar de não termos encontrado alterações patogênicas nos exons 3 e 4, esta não é a única região do gene *MECP2* implicada na etiopatologia do autismo ou da Síndrome de Rett. Portanto, para que possamos descartar definitivamente a referida síndrome como diagnóstico diferencial para as pacientes investigadas, é fundamental que os exons 1 e 2 também sejam caracterizados molecularmente assim como a continuação da análise das demais amostras para o exon 4. Além disso, a busca mais aprofundada da clínica desses pacientes pode auxiliar na triagem clínica e molecular das pacientes com TEA.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram padronizadas parcialmente as técnicas de amplificação e sequenciamento para triagem molecular dos exons 2, 3 e 4 do gene *MECP2*. A análise molecular do exon 4 permitiu a identificação de mutação sinônima em uma das pacientes com Transtorno do Espectro Autista. A análise molecular dos exon 3 e 4 do gene *MECP2* não permitiu a identificação de alterações patogênicas clássicas que expliquem o quadro clínico do Transtorno do Espectro Autista ou que possam ser diagnosticadas como possíveis portadores de Síndrome de Rett.

No entanto, somente após a finalização da triagem clínica juntamente com o estudo molecular do exon 2 será possível estabelecer associações relevantes e que possam servir de auxílio para diagnóstico.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. B.; BARAL, M.; GEIS, E. et al. The Severity of Autism Is Associated with Toxic Metal Body Burden and Red Blood Cell Glutathione Levels. *Journal of Toxicologic*, 2009.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5. 5th.ed. Washington: American Psychiatric Association, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-4. 5th.ed. Washington: American Psychiatric Association, 2000.

AMIR, R. E.; VAN DEN VEYER, I. B.; WAN, M. et al. Rett Syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2 encoding methyl-CpG binding protein 2, **Nat. Genet**, **23**: 185 e188, 1999.

AMIR R. E.; VAN DEN VEYVER I. B.; SCHULTZ R. et al. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. **Annals of neurology**, **47** (5): 670-9, 2000.

AKBARIAN, S.; CHEN, R.Z.; GRIBNAU, J. Expression pattern of the Rett syndrome gene MeCP2 in primate prefrontal cortex. **Neurobiol Dis**, **8**: 784-791, 2001.

BILL, B. R.; GESCHWIND, D. H. Genetic advances in autism: heterogeneity and convergence on shared pathways. **Current Opinion in Genetics & Development**, **19**:271–278, 2009.

BISGARD, A. M.; SCHEONEWOLF-GREULICH, B.; RAVN, K. et al. Is it possible to diagnose Rett syndrome before classical symptoms become obvious? Review of 24 Danish cases born between 2003 and 2012. **European Journal of Paediatric Neurology**, **19**: 679 – 687, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde incorpora primeiro medicamento para sintoma do autismo. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/geral/34407-ministerio-da-saude-incorpora-primeiro-medicamento-para-sintoma-do-autismo>> acesso em: 06 de fev. de 2017.

BANERJEE A.; CASTRO J.; SUR M. Rett síndrome: genes, sinapsis, circuits and therapeutichs. **Front Psychiatry**, **3**: 34, 2012.

BEBBINGTON, A.; PERCY, A.; CHRISTODOULOU, J. et al. Updating the profile of C-terminal MECP2 deletions in Rett syndrome. **J Med Genet**, **47**:242-248, 2010.

BIENVENU, T.; CHELLY, J. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. **Nature Reviews Genetics**, **7**:415-426.

BIENVENU, T.; CARRIÉ A.; ROUX, N. et al. *MECP2* mutations account for most cases of typical forms of Rett Syndrome. **Human Molecular Genetics**, **9**: 1377-1384, 2000.

BLANCO, N. M.; MANRESA, V. S.; MESCH, G. J. et al. Síndrome de Rett: Criterios Diagnosticos. **Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina**, **153**: 22-28, 2015.

BORGES-GONZALEZ S.; RODRIGUEZ-PERRETT N.; FERRANDO-POLLAK M.; Rett's syndrome: clinical description and differential diagnosis. **Revista de neurologia**, **34** (7): 698-9, 2002.

BOSA, C. A. **Autismo: atuais interpretações para antigas observações**. In: Autismo e educação: reflexões e propostas de intervenção. Baptista C. R. & Bosa C. A. (Orgs.). Porto Alegre: Artmed, p. 21-39. 2002.

BUYSE, I. M.; FANG, P.; HOON, K. T. Diagnostic Testing for Rett Syndrome by DHPLC and Direct Sequencing analysis of the MECP2 gene: Identification of Several Novel Mutations and Polymorphisms. **Am J. Hum Genet**, **67**: 1428-1436, 2000.

CAMPOS-CASTELLO J.; FERNÁNDEZ-MAYORALES D. M.; MUNOZ-JARENO N. et al. Síndrome de Rett: 50 años de historia de um trastorno aún no bien conocido. **Medicina**, **67**: 531-42, 2007.

CHAHROUR M.; ZOGHBI H. Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. **Neuron**, **56** (3):422-37, 2007.

CHAMARY, J. V.; LAURENCE, D. H. The price of silent mutations. *Scientific American*, 300: 46-53, 2009.

CLINVAR. Center for Medical Genetics Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> /> Acesso em: 07 fev. 2017.

CORNISH, K, KOGAN, C, TURK, J. et al. The emerging fragile X premutation phenotype: Evidence from the domain of social cognition. **Brain and Cognition**, **57**: 53-60, 2005.

COY, J.F.; SEDLACEK, Z.; BACHNER, D. A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenilation within the long 3'- untranslated region of the methyl-CpG- binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. **Hum Mol Genet**, **8**: 1253-1262, 1999.

FABIO, R. A.; COLOMBO, B.; RUSSO, S. et al. Recent insights into genotype-phenotype relationships in patients with Rett syndrome using a fine grain scale. **Research in Development Disabilities**, **35**: 2976-2886, 2014.

FOMBONNE, E. Epidemiological Surveys of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders: An Update. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, **33**: 4, 2003.

FOMBONNE, E. Epidemiological Studies of Pervasive Developmental Disorders. In: Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders. Volkmar, F. R., Paul, R., Klin, A. & Cohen, D. (eds.). **Volume 1: Diagnosis, Development, Neurobiology, and Behaviour**. 3^a ed. New Jersey: Wiley and Sons, 2005b, Cap.2 p. 42–69.

GADALLA, K. K. E.; BAILEY, M. E. S.; COBB, S. R. MECP2 and Rett syndrome: reversibility and potential avenues for therapy. **Biochem. J**, **439**: 1–14, 2011.

GENEBANK OVERVIEW. Center for Medical Genetics Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em: 08 fev. 2017.

GESCHWIND, D. H. Genetics of autism spectrum disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, **15**, n. 9, 2011.

HAMMER, S.; DORRANI, N.; DRAGICH, J. The phenotypic consequences of MECP2 mutations extend beyond Rett syndrome. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, 8:94-8, 2002.

HAGBERG, B.; AICARDI, J.; RAMOS, J. et al. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. **Ann Neurol**, **14**: 471-9, 1983.

HAGBERG, B.; HANEFELD, F.; PERCY, A. et al. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. **European Journal of Paediatric Neurology**, **6** (5): 293-297, 2002.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. **Mol Cell Biol**, **18**: 6538- 6547, 1998.

HOME | *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM). Center for Medical Genetics Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). Disponível em< <https://www.omim.org/entry/312750> > Acesso em: 11 fev. 2017.

JIANG Y-H., WANG Y., XIU X.; CHOY K.W.; PURSLEY, A.N.; AND CHEUNG, S.W.. Genetic diagnosis of autism spectrum disorders: The opportunity and challenge in the genomics era. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. Early Online: 1–14, 2014.

JONES, P.L.; VEENSTRA, G.J.; WADE, P.A. et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone desacetylase to repress transcription. **Nat Genet**, **19**: 187-191, 1998.

KOK, F. As Veredas da Síndrome de Rett: Do Diagnóstico Clínico aos Estudos Funcionais. **Revista Neurociencia**, **20(2)**:179-180, 2012.

NEMOS, C.; LAMBERT, L.; GIULIANO, F. Mutational spectrum of *CDKL5* in early-onset encephalopathies: a study of a large collection of French patients and review of the literature. **Clin Genet**, **76**: 357–371, 2009.

LEWIS, J.D.; MEECHAN, R.R.; HENZEL, W.J. *et al.* Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylation DNA. **Cell**, **69**: 905-914, 1992.

LIMA, F. T.; BRUNONI, D.; SCHWARTZMAN, J. S.; POZZI, M. C. *et al.* Genotype-phenotype correlation in Brazilian Rett Syndrome Patients. **Neuropsiquiatria**, **67** (3-A): 577-584, 2009.

LOURENÇO, D.H. **Epilepsia na Síndrome de Rett – Análise de uma casuística portuguesa com mutação genética identificada**. Dissertação de Mestrado. Porto. Universidade do Porto, 2011. 31p.

LORD, C. & SCHOPLER, E. Differences in sex ratio in autism as a function of measured intelligence. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, **15**: 185-193, 1985.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **J. Vis. Exp**, 63: 3998, 2012.

LOTTER, V. Epidemiology of autistic conditions in young children. **Soc Psychiatry**, **1**: 124-135, 1966.

MARSHALL, C. R.; NOOR, A.; VICENT, J. B. *et al.* Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. **The American Journal of Human Genetics**, **82**: 477–488, 2008.

MATTILA, M. L.; KIELINEN, M.; JUSSILA, K. *et al.* An epidemiological and diagnostic study of Asperger syndrome according to four sets of diagnostic criteria. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, **46**: 636–646, 2007.

MEECHAN, R.R.; LEWIS, J.D.; MCKAY S. *et al.* Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. **Cell**, **58**:499-507, 1989.

MILTENYI- MILTENBERGER, G.; LACCONE, F. Mutations and Polymorphisms in the Human Methyl CpG-Binding Protein MECP2. **Human Mutation**, **22**:107-115, 2003.

MONNERAT S. L. **Análise de mutações no gene *mecp2* em uma amostra de pacientes do sexo feminino afetadas pela síndrome de Rett na população brasileira.** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz, 2009. 107p.

MONTEIRO, C. B. M.; GRACIANI, Z.; TRRIANI-PASIN, C.; EMBIRUÇU, E. K.; KOK, F. Síndrome de Rett: Histórico, Expectativa de Vida, Genética e Habilidades Funcionais. **Fisioterapia e Neuropediatria**, 2011.

NAKAO, M.; MATSUI, S.; YAMAMOTO, S. *et al.* Regulation of transcription and chromatin by methyl-CpG binding protein MBD1. **Brain & Development**, **23**: 174-176, 2001.

NAN, X.; NG, H.H.; JOHNSON, C.A. *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone desacetylase complex. **Nature**, **393**: 386-389, 1993.

NEWELL-PRICE, J.; CLARK, A.J.; KING, P. DNA methylation and silencing of gene expression. **Trends Endocrinol Metab**, **11**:142-148, 2000.

NG, H.H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Curr Opin Genet Dev**, **9**: 158-163, 1999.

ORRICO, A.; LAM, C. W.; GALLI, L. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. **Febs Letters**, **481**: 285: 288, 2000.

PANTALÉON, G. F; JUVIER, T. R. Bases Moleculares del síndrome de Rett, uma mirada actual. **Revista Chilena de Pediatra**, **86 (3)**: 142-151, 2015.

PECORELLI, A.; CERVELLATI. F.; BELMONTE, G. et al. Cytokines profile and peripheral blood mononuclear cells morphology in Rett and autistic patients. **Cytokine**, **77**: 180–188, 2015.

PERSICO, A. M.; BOURGERON, T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. **Trends in Neurosciences**, **29 (7)**, 2006.

PHILIPPE, C.; AMSALLEM, C.; FRANCANNET, L. et al. Phenotypic variability in Rett syndrome associated with FOXP1 mutations in females. *J Med Genet*, 47: 59 e 65, 2010.

RAPOPORT, J.; CHAVEZ, A.; GREENSTEIN, D. Autism Spectrum Disorders and Childhood-Onset Schizophrenia: Clinical and Biological Contributions to a Relation Revisited. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, 48: 1, 2009

ROSEMBERG, S.; ARITA, F.; CAMPOS, C. A Brazilian girl with the Rett Syndrome. **Brain Dev**, **8**: 554-6, 1986.

ROSEMBERG G. S.; ARITA F.; CAMPOS C.; COIMBRA A. R.; ELLOVITCH S.; Geres S. Síndrome de Rett: análise dos primeiros cinco casos diagnosticados no Brasil. **Arq Neuropsiquiat**; 45:143-58, 1987.

RUTTER, M. Infantile autism. In: Shaffer, D.; Erhardt, A. & Greenhill, L. **A clinical guide to child psychiatry**. New York: Free- Press, 1985. Cap. 3, p. 48-78.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **74** (12): 5463–5467, 1977.

SANTOS, J. M. “**Rastreamento da mutação 419 C>T (A140V) no gene *MECP2*, um regulador transcricional, em portadores de disfunções neurológicas**”. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Faculdade De Ciências Médicas Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (Clinex), 2004. 84p.

SARTORI, S., DI ROSA, G., POLLI, R. et al. A novel CDKL5 mutation in a 47, XXY boy with the early-onset seizure variant of Rett syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, **149** :232–236, 2009.

SWCHWARTZMAN, J. S. Síndrome de Rett. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, **25** (2), 2003.

SHAHBAZIAN, M.D.; ANTALFFY, B.; ARMSTRONG, D.L. et al. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. **Hum Mol Genet**, **11**:115-124, 2002.

SPLENDORE, A.; ROCHA, K. M.; TAJAHASHI, V. N. V. O. et al. Centro de Estudos do Genoma Humano: Seis Anos de Experiência no Diagnóstico Molecular da Síndrome de Rett. **Revista Neurociencia I**, 2012.

TEMUDO T.; SANTOS M.; RAMOS E. Rett syndrome with and without detected *MECP2* mutations: An attempt to redefine phenotypes. **Brain Dev**, **33**: 69-76, 2011.

VAN DER AA, N.; VAN DER BERGH, M.; PONOMARENKO, N. Analysis of FOXP1 Is Highly Recommended in Male and Female Patients with Rett Syndrome. **Mol Syndromol**, **1**: 290–293, 2010.

VEIGA, M.; TORALLES, M. B. P. A expressão neurológica e o diagnóstico genético nas síndromes de Angelman, de Rett e do X-Frágil. **Jornal de Pediatria**, **78**, 2002.

WING, L. The autistic spectrum: A guide for parents and professionals. **London: Constable**, 1996.

ZACHARIAH, R. M.; RASGETAR, M. Linking Epigenetics to Human Disease and Rett Syndrome: The Emerging Novel and Challenging Concepts in MECP2 Research. **Neural Plasticity**, 2012.

ZHANG, X.; BAO, X.; ZHANG, J. et al. Molecular characteristics of Chinese patients with Rett syndrome European. **Journal of Medical Genetics**, **55**: 677- 681, 2012.

ZHAO, Y., ZHANG, X., BAO, X. Clinical features and gene mutational spectrum of CDKL5-related diseases in a cohort of Chinese patients. **BMC Medical Genetics**, **15**: 24, 2014.

ANEXO I – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

 Universidade Federal do Pará	SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS	
--	---	---

Carta Provisória: 087/11 CEP-ICS/UFPA Belém, 17 de junho de 2011.

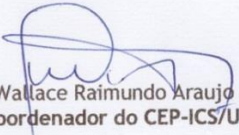
Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa **“ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA: PESQUISA DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMO EM GENES CANDIDATOS”** CAAE 0101.0.073.000-11 e parecer nº112/11 CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano CEP-ICS/UFPA, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará na reunião do dia 04 de maio de 2011.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 27 março de 2013, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Wallace Raimundo Araujo dos Santos.
Coordenador do CEP-ICS/UFPA

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres (CEP-ICS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ CCS - Sala 13 - Cidade Universitária
Professor José da Silveira Netto, nº 01, Guamá - CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel.: 3201-7735
e-mail: cepccs@ufpa.br/ Site: www.ufpa.br/ics

ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Obrigatório para pesquisa em seres humanos – Res CNS 196/96 e Res CNS 251/97 do Ministério da Saúde

ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM TRANSTORNO DE ESPECTRO AUTISTA DO ESTADO DO PARÁ: PESQUISA DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS

I. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

O Autismo é uma doença neurológica que se caracteriza por problemas de linguagem e integração social acompanhados por comportamentos repetitivos e interesses restritos. Atinge mais ou menos uma em cada 500 crianças e é causado por fatores genéticos e ambientais. Gostaríamos de convidar sua família a participar deste projeto, cujo objetivo desse trabalho é entender as algumas das possíveis causas do Autismo, o que poderá auxiliar no tratamento e prevenção dessa doença no futuro.

Para tanto, estudaremos, através de coleta de sangue, uma parte do material genético que existe no núcleo das células. Esse material, chamado de DNA contém genes que são unidades que possuem códigos responsáveis pela fabricação de várias proteínas e enzimas do organismo. Estaremos estudando genes que codificam proteínas que agem no cérebro e que podem ter alguma influência na predisposição da pessoa a desenvolver o Autismo.

II. Procedimentos que serão realizados:

Será realizado um questionário com vocês, sobre características da criança afetada, da família e da gravidez de seu filho(a).

Serão coletados do filho(a), da mãe e do pai de 5 mL de sangue. As amostras serão estudadas para análise genética relacionada com Autismo. As amostras de sangue serão armazenadas e analisadas o Laboratório de Erros inatos do Metabolismo.

As amostras de material genético serão utilizadas apenas para este estudo. Entretanto pretendemos guardar as amostras após o término do estudo. Se for de interesse da equipe de pesquisa realizar novas investigações utilizando estas amostras guardadas, isto somente será feito após novo contato e assinatura de novo termo de consentimento por parte de sua família.

III. Riscos e desconfortos potenciais:

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte.

IV. Benefícios esperados

Este estudo poderá, no futuro, beneficiar as famílias dos afetados através de aconselhamento nos quais fatores de risco genéticos poderão ser identificados, contribuindo no diagnóstico e estimativa de risco de ocorrência de outros casos nestas famílias. Sabemos, entretanto, que nenhum destes genes estudados se constitui na causa única do autismo e os resultados serão interpretados em forma de probabilidades.

V. Procedimentos alternativos:

Eu entendo que tive o direito de recusar a participar deste projeto e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira os cuidados médicos de meu filho(a) ou de minha família.

Pelo presente Consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente projeto de pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber esclarecimentos a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das minhas informações relacionadas com a minha privacidade;

Os pesquisadores responsáveis por esse projeto de pesquisa são o prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva (Fone: 91 999866137) e Nathalia Lima (Fone: 91 98197-7827/ 3201-8030).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____
declaro que após esclarecido pelos pesquisadores e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do projeto de pesquisa intitulado: “ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM TRANSTORNO DE ESPECTRO AUTISTA DO ESTADO DO PARÁ: PESQUISA DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS”

1. A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos na folha de informação em anexo, foram explicados a mim. Eu compreendo e concordo em participar.
2. Eu compreendo que poderei não ter benefício direto por participar do estudo.
3. Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconfortos e inconveniências, como foi destacado na folha de informações, foram explicados a mim.
4. Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e não serei identificado(a) a partir delas.
5. Eu compreendo que posso retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.
6. Eu compreendo que não serei remunerado financeiramente por participar deste estudo.
7. Eu concordo que o material (sangue) coletado seja utilizado no projeto acima.
8. Autorizo o armazenamento da minha amostra de DNA, obtida nesse estudo, para utilização futura. Nesse caso, porém, entendo que serei recontactado para fornecer consentimento específico.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) – Complexo de Sala de Aula/ ICS – Sala 13 – Campus Universitário, nº 01, Guamá – Cep: 66075-110 – Belém-Pará.

Tel/Fax: 3201-7735. E-mail: cepccs@ufpa.br