



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

A Origem Genética da Síndrome de Rett no Sexo Masculino

Tiago Alexandre Santana Pinto Santana

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora
Natércia Maria da Silva Conceição

2023



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologias

A Origem Genética da Síndrome de Rett no Sexo Masculino

Tiago Alexandre Santana Pinto Santana

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora
Natércia Maria da Silva Conceição

2023

A Origem Genética da Síndrome de Rett no Sexo Masculino

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright© Tiago Alexandre Santana Pinto Santana

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Expresso os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me acompanharam ao longo do meu percurso académico e que me permitiram realizar o presente trabalho:

À Professora Doutora Natércia Conceição, pela orientação que me forneceu na realização da tese de mestrado. Obrigado pela motivação e por acreditar desde o início no meu trabalho. Toda a disponibilidade prestada nos últimos meses tornou possível realizar com sucesso esta etapa.

Aos meus pais e avós, que sempre acreditaram em mim e que todos os dias se sacrificaram para poder alcançar esta etapa de vida. Obrigado pela vosso apoio incondicional ao longo da minha formação. Sem vós nada disto seria possível.

À Beatriz Talhadas, por ser a pessoa que esteve sempre presente nos bons e piores momentos. Foste o meu pilar todos os dias. Sem a tua presença contante nunca teria as forças necessárias para completar com sucesso esta etapa de vida. Obrigado por tornares todo este percurso mais alegre e completo.

A todos os amigos e colegas que a universidade me presenteou, por tornarem este percurso mais fácil e repleto de bons momentos. Obrigado pelos dias infindáveis de estudo, pelos ensinamentos e pela partilha de experiências. Todos vós moldaram o meu modo de vida e o meu modo de ser. Levo no meu coração as memórias e ensinamentos.

A todos os meus colegas do associativismo, por partilharem comigo o desejo de realizar grandes conquistas. Obrigado às diversas equipas *NECiFarm* com quem tive o privilégio de trabalhar e obrigado aos meus colegas espalhados por Portugal que com quem tive contacto através da *APEF*. Um obrigado especial à minha madrinha por me convidar para o mundo do associativismo. Todos vós partilharam à vossa maneira ensinamentos e potenciaram as minhas capacidades.

A todo o corpo docente do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, por toda a disponibilidade prestada e pela sua dedicação na transmissão dos conhecimentos necessários para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

A Síndrome de Rett (RTT) é uma doença rara diagnosticada no sexo feminino, com uma incidência de 1 em cada 15 000 nascimentos em raparigas, embora também possa ser diagnosticada com uma menor incidência no sexo masculino.

A origem da RTT é genética, uma vez que é causada maioritariamente por mutações no gene *methylCpG-binding protein 2 (MECP2)*, localizado no cromossoma X. Apesar da origem genética da patologia, o diagnóstico da RTT é baseado em critérios sintomatológicos.

Tendo em conta a grande diversidade de quadros sintomatológicos associados a esta patologia no sexo masculino, a literatura científica evidencia metodologias que procuram realizar uma correlação genótipo/fenótipo, tendo em conta as mutações identificadas no gene *MECP2* e os seus respetivos quadros clínicos associados.

Neste âmbito, a presente monografia desenvolveu um novo método, baseado no método descrito por Villard (2007), e avaliou a eficácia de ambos em realizar uma correlação genótipo/fenótipo através da classificação das mutações *missense* identificadas no sexo masculino descritas na base de dados *RettBase*.

Concluiu-se que ambos os métodos apresentam percentagens de eficácia razoáveis, o que justifica o seu uso. No entanto, o método desenvolvido pelo presente trabalho apresenta vantagens comparativamente ao método descrito por Villard (2007).

Através da análise de um conjunto de 144 casos clínicos masculinos, correspondente a 54 mutações *missense*, foi possível avaliar a distribuição e frequência das mutações *missense* identificadas ao longo do gene que codifica para a proteína MeCP2, tais como os graus de severidade dos quadros clínicos associados a estas mesmas mutações. Esta análise distingue-se das já existentes na literatura científica, devido à sua abrangente e alargada amostra de casos clínicos masculinos analisados. Isto permite dar solidez aos resultados e conclusões provenientes do presente trabalho.

Palavras-chave: Síndrome de Rett; *MECP2*; mutação; *RettBase*; gene; fenótipo

ABSTRACT

Rett syndrome (RTT) is a rare disease diagnosed in females, with an incidence of 1 in 15,000 births in girls, although it can also be diagnosed with a lower incidence in males.

The origin of RTT is genetic, since it is mostly caused by mutations in the *methylCpG-binding protein 2 (MECP2)* gene, located on the X chromosome. Despite the genetic origin, the diagnosis of RTT is based on clinical criteria.

Considering the great diversity of symptomatology associated to this pathology in males, the literature shows methods that seek to perform a genotype/phenotype correlation, taking into account the mutations identified in the *MECP2* gene and their respective associated clinical presentation.

In this context, this dissertation developed a new method, based on the method described by Villard (2007), and evaluated the effectiveness of both in performing a genotype/phenotype correlation through the classification of missense mutations identified in males described in the RettBase database.

It was concluded that both methods have reasonable percentages of effectiveness, which justifies their use. However, the method developed by the present work presents advantages compared to the method described by Villard (2007).

Through the analysis of a set of 144 male clinical cases, which correspond to 54 missense mutations, it was possible to evaluate the distribution and frequency of missense mutations identified along the gene that codes for the MeCP2 protein, as well as the severity degrees of clinical presentations associated with these mutations. This analysis differs from those already existing in the scientific literature due to its large sample of male clinical cases analyzed. This allows to give solidity to the results and conclusions obtained from the present work.

Keywords: Rett Syndrome; MECP2; mutation; RettBase; gene; phenotype

ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Contexto histórico da Síndrome de Rett	1
1.2	Manifestações clínicas da Síndrome de Rett.....	3
1.2.1	Diagnóstico.....	3
1.2.2	História natural da doença e fases da patologia	7
1.2.3	Variantes da RTT ou RTT atípica	10
1.3	A origem genética da Síndrome de Rett.....	11
1.3.1	A RTT no sexo masculino	11
1.3.2	A influência do Mosaicismo celular.....	12
1.3.3	A importância das mutações <i>de novo</i> na RTT	15
1.4	MECP2.....	17
1.4.1	O gene <i>MECP2</i>	17
1.4.2	A proteína MeCP2	18
1.4.3	A relação entre a proteína MeCP2 e a RTT	23
1.5	As mutações no gene <i>MECP2</i>	24
1.5.1	Grupos de mutações no gene <i>MECP2</i> no sexo masculino	25
2	Método	29
2.1	Objetivos.....	29
2.2	Método de classificação B	29
2.3	Mutações em estudo.....	33
2.3.1	Critérios de exclusão para o conjunto de mutações em estudo	33
2.4	Correlação genótipo fenótipo	34
2.5	Polimorfismos benignos no gene <i>MECP2</i>	35
2.6	Avaliação do método de classificação B.....	36
3	Resultados	39
3.1	Mutações nos domínios <i>5'UTR</i> , <i>3'UTR</i> , NTD e nos intrões	39
3.2	Mutações no domínio MBD.....	39
3.2.1	p.K82R (c.245 A -> G).....	39
3.2.2	p.R106W (c.316 C ->T).....	40
3.2.3	p.V122A (365 T ->C).....	43
3.2.4	p.R133C (c.397 C ->T)	45
3.2.5	p.R133H (c.398 G ->A)	48

3.2.6	p.S134C (c.401 C ->G)	50
3.2.7	p.E137G (c.410 A ->G)	52
3.2.8	p.A140V (c.419 C ->T)	54
3.2.9	p.D147E (c.441 C ->G).....	57
3.2.10	p.P152A (c.454 C ->G).....	61
3.2.11	p.F157I (c.469 T ->A).....	64
3.2.12	p.T158M (c.473 C ->T)	66
3.2.13	p.T160S (c.479 C ->G)	70
3.3	Mutações no domínio ID	73
3.3.1	p.R167W (c.499 C ->T).....	73
3.3.2	p.P172S (c.514 C ->T).....	75
3.3.3	p.P176R (c.527 C ->G).....	76
3.3.4	p.A181V (c.542 C ->T)	78
3.3.5	p.T196S (c.587 C ->G)	80
3.3.6	p.T197M (c.590 C ->T)	82
3.3.7	p.A201V (c.602 C ->T)	84
3.3.8	p.T203M (c.608 C ->T)	86
3.3.9	p.G206A (c.617 G ->C)	88
3.4	Mutações no domínio TRD	90
3.4.1	p.P225L (c.674 C ->T).....	90
3.4.2	p.T228S (c.683 C ->G)	93
3.4.3	p.S229L (c.686 C ->T)	95
3.4.4	p.P251L (c.752 C ->T).....	96
3.4.5	p.P272L (c.815 C ->T).....	99
3.4.6	p.K284E (c.850 A ->G).....	101
3.4.7	p.R309W (c.925 C ->T).....	102
3.5	Mutações no domínio CTD	105
3.5.1	p.P322S (c.964 C ->T).....	105
3.5.2	p.K331R (c.992 A ->G).....	107
3.5.3	p.R344W (c.1030 C ->T).....	109
3.5.4	p.A358T (c.1072 G ->A).....	113
3.5.5	p.S359P (c.1075 T ->C).....	115
3.5.6	p.P376S (c.1126 C ->T).....	117
3.5.7	p.A378V (c.1133 C ->T)	119
3.5.8	p.P381A (c.1141 C ->G).....	121
3.5.9	p.P387L (c.1160 C ->T).....	123

3.5.10	p.E394K (c.1180 G ->A).....	125
3.5.11	p.E397K (c.1189 G ->A).....	127
3.5.12	p.P399L (c.1196 C ->T).....	128
3.5.13	p.S401N (c.1202 G ->A)	130
3.5.14	p.P402L (c.1207 C ->T).....	132
3.5.15	p.P405L (c.1214 C ->T).....	133
3.5.16	p.K417M (c.1250 A ->T).....	136
3.5.17	p.G428S (c.1282 G ->A)	138
3.5.18	p.P430S (c.1288 C ->T).....	141
3.5.19	p.A443T (c.1327 G ->A).....	143
3.5.20	p.A444T (c.1330 G ->A).....	145
3.5.21	p.R453Q (c.1358 G ->A).....	147
3.5.22	p.R458H (c.1373 G ->A)	149
3.5.23	p.T479M (c.1436 C ->T)	151
3.5.24	p.P480S (c.1438 C ->T).....	153
3.5.25	p.R484T (c.1451 G ->C).....	154
4	Discussão	157
4.1	Avaliação do método de classificação B.....	157
4.1.1	Comparação do método A com o método B.....	159
4.1.2	Eficácia do método B nos domínios funcionais da proteína MeCP2.....	161
4.2	Distribuição e frequência das mutações no gene <i>MECP2</i>	167
4.3	Severidade dos fenótipos analisados ao longo da proteína MeCP2	168
4.4	Limitações do estudo.....	176
5	Conclusão.....	181
6	Bibliografia.....	185

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1 - Critérios de diagnóstico da RTT	5
Quadro 1.2 - As quatro fases da Síndrome de Rett	7
Quadro 1.3 - As variantes da RTT ou RTT atípicas.....	11
Quadro 1.4 - Método A	28
Quadro 1.5 - Método B	32
Quadro 3.1 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K82R, através do método A	40
Quadro 3.2 - Classificação da mutação p.K82R, através do método B.....	40
Quadro 3.3 - Classificação do caso 1 com a mutação p.R106W, através do método A.....	41
Quadro 3.4 - Classificação dos casos 2 e 3 com a mutação p.R106W, através do método A.....	42
Quadro 3.5 - Classificação da mutação p.R106W, através do método B.....	43
Quadro 3.6 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.V122A, através do método A	44
Quadro 3.7 - Classificação da mutação p.V122A, através do método B.	44
Quadro 3.8 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R133C, através do método A	46
Quadro 3.9 - Classificação da mutação p.R133C, através do método B.....	47
Quadro 3.10 - Classificação do fenótipo, referido na <i>RettdBase</i> , com a mutação p.R133H, através do método A	48
Quadro 3.11 - Classificação do segundo caso com a mutação p.R133H, tendo em conta o método A	49
Quadro 3.12 - Classificação da mutação p.R133H, através do método B.....	50
Quadro 3.13 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S134C, através do método A	51
Quadro 3.14 - Classificação da mutação p.S134C, através do método B.	52
Quadro 3.15 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.E137G, através do método A	53
Quadro 3.16 - Classificação da mutação p.E137G, através do método B.....	53
Quadro 3.17 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A140V, através do método A	56
Quadro 3.18 - Classificação da mutação p.A140V, através do método B	57
Quadro 3.19 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.D147E, através do método A	60
Quadro 3.20 - Classificação da mutação p.D147E, através do método B.....	61
Quadro 3.21 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P152A, através do método A.....	63

Quadro 3.22 - Classificação da mutação p.P152A, através do método B	64
Quadro 3.23 - Classificação do fenótipo com a mutação p.F157I, através do método A	65
Quadro 3.24 - Classificação da mutação p.F157I, através do método B.....	65
Quadro 3.25 - Classificação do primeiro grupo de fenótipos masculinos com a mutação p.T158M, através do método A.....	68
Quadro 3.26 - Classificação do segundo grupo de fenótipos masculinos com a mutação p.T158M, através do método A.....	69
Quadro 3.27 - Classificação da mutação p.T158M, através do método B	70
Quadro 3.28 - Classificação do fenótipo com a mutação p.T160S, através do método A	72
Quadro 3.29 - Classificação da mutação p.T160S, através do método B.....	72
Quadro 3.30 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R167W, através do método A	74
Quadro 3.31 - Classificação da mutação p.R167W, através do método B	74
Quadro 3.32 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P172S, através do método A	75
Quadro 3.33 - Classificação da mutação p.P172S, através do método B.....	76
Quadro 3.34 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P176R, através do método A	77
Quadro 3.35 - Classificação da mutação p.P176R, através do método B	78
Quadro 3.36 - Classificação do fenótipo com a mutação p.A181V, através do método A	79
Quadro 3.37 - Classificação da mutação p.A181V, através do método B	79
Quadro 3.38 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T196S, através do método A	81
Quadro 3.39 - Classificação da mutação p.T196S, através do método B.....	81
Quadro 3.40 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T197M, através do método A.....	83
Quadro 3.41 - Classificação da mutação p.T197M, através do método B	84
Quadro 3.42 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A201V, através do método A	85
Quadro 3.43 - Classificação da mutação p.A201V, através do método B	86
Quadro 3.44 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T203M, através do método A.....	87
Quadro 3.45 - Classificação da mutação p.T203M, através do método B	87
Quadro 3.46 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.G206A, através do método A	89
Quadro 3.47 - Classificação da mutação p.G206A, através do método B	90

Quadro 3.48 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P225L através do método A	92
Quadro 3.49 - Classificação da mutação p.P225L, através do método B.....	92
Quadro 3.50 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T228S, através do método A	94
Quadro 3.51 - Classificação da mutação p.T228S, através do método B.....	94
Quadro 3.52 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S229L, através do método A	95
Quadro 3.53 - Classificação da mutação p.S229L, através do método B.....	96
Quadro 3.54 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P251L, através do método A	98
Quadro 3.55 - Classificação da mutação p.P251L, através do método B.....	98
Quadro 3.56 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P272L, através do método A	100
Quadro 3.57 - Classificação da mutação p.P272L, através do método B.....	101
Quadro 3.58 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K284E, através do método A	101
Quadro 3.59 - Classificação da mutação p.K284E, através do método B	102
Quadro 3.60 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R309W através do método A	104
Quadro 3.61 - Classificação da mutação p.R309W, através do método B.....	105
Quadro 3.62 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P322S, através do método A	106
Quadro 3.63 - Classificação da mutação p.P322S, através do método B.....	107
Quadro 3.64 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K331R, através do método A	108
Quadro 3.65 - Classificação da mutação p.K331R, através do método B.....	109
Quadro 3.66 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R344W, através do método A	111
Quadro 3.67 - Classificação da mutação p.R344W, através do método B.....	113
Quadro 3.68 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A358T, através do método A	114
Quadro 3.69 - Classificação da mutação p.A358T, através do método B.....	115
Quadro 3.70 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S359P, através do método A	116
Quadro 3.71 - Classificação da mutação p.S359P, através do método B.....	117
Quadro 3.72 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P376S, através do método A	118
Quadro 3.73 - Classificação da mutação p.P376S, através do método B.....	119
Quadro 3.74 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A378V, através do método A	120

Quadro 3.75 - Classificação da mutação p.A378V, através do método B	121
Quadro 3.76 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P381A, através do método A.....	122
Quadro 3.77 - Classificação da mutação p.P381A, através do método B	122
Quadro 3.78 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P387L, através do método A	124
Quadro 3.79 - Classificação da mutação p.P387L, através do método B.....	124
Quadro 3.80 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.E394K, através do método A	126
Quadro 3.81 - Classificação da mutação p.E394K, através do método B	126
Quadro 3.82 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.E397K, através do método A	127
Quadro 3.83 - Classificação da mutação p.E397K, através do método B	128
Quadro 3.84 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P399L, através do método A	129
Quadro 3.85 - Classificação da mutação p.P399L, através do método B.....	130
Quadro 3.86 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S401N, através do método A.....	131
Quadro 3.87 - Classificação da mutação p.S401N, através do método B	131
Quadro 3.88 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P402L, através do método A	132
Quadro 3.89 - Classificação da mutação p.P402L, através do método B.....	133
Quadro 3.90 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P405L, através do método A	135
Quadro 3.91 - Classificação da mutação p.P405L, através do método B.....	135
Quadro 3.92 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K417M através do método A	136
Quadro 3.93 - Classificação da mutação p.K417M, através do método B	137
Quadro 3.94 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.G428S através do método A.....	140
Quadro 3.95 - Classificação da mutação p.G428S, através do método B	141
Quadro 3.96 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P430S, através do método A	142
Quadro 3.97 - Classificação da mutação p.P430S, através do método B.....	143
Quadro 3.98 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A443T, através do método A	144
Quadro 3.99 - Classificação da mutação p.A443T, através do método B	145
Quadro 3.100 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A444T, através do método A	146
Quadro 3.101 - Classificação da mutação p.A444T, através do método B	147

Quadro 3.102 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R453Q, através do método A	148
Quadro 3.103 - Classificação da mutação p.R453Q, através do método B.....	148
Quadro 3.104 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R458H, através do método A	150
Quadro 3.105 - Classificação da mutação p.R458H, através do método B.....	150
Quadro 3.106- Classificação dos fenótipos com a mutação p.T479M, através do método A.....	152
Quadro 3.107 - Classificação da mutação p.T479M, através do método B	152
Quadro 3.108 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P480S, através do método A	153
Quadro 3.109 - Classificação da mutação p.P480S, através do método B.....	154
Quadro 3.110 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R484T, através do método A.....	155
Quadro 3.111 - Classificação da mutação p.R484T, através do método B	156
Quadro 4.1 – Listagem das mutações excluídas da amostra em estudo	157
Quadro 4.2 – Eficácia dos métodos A e B na classificação das mutações em estudo e respetivos fenótipos	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Número de diagnósticos de RTT ao longo dos anos	2
Figura 1.2 - Localização do gene <i>MECP2</i>	2
Figura 1.3 - O desenvolvimento de uma criança com RTT.....	10
Figura 1.4 - Inativação do Cromossoma X (XCI) ou Lionização.....	13
Figura 1.5 - Mosaicismo Celular devido a uma mutação <i>de novo</i>	13
Figura 1.6 - O mosaicismo celular.....	14
Figura 1.7 - Gametogénese masculina e feminina.....	16
Figura 1.8 - Ilustração gráfica do gene <i>MECP2</i> e dos seus respetivos transcritos.....	18
Figura 1.9 - Os domínios funcionais da MeCP2.....	19
Figura 1.10 - Regulação da transcrição genética através da MeCP2.....	20
Figura 1.11 - Complexo MeCP2 / NCoR/SMRT.....	21
Figura 1.12 - Complexo MeCP2 / CREB.....	21
Figura 1.13 - Representação da base nitrogenada citosina e dos locais de ligação da proteína MeCP2 no ADN.....	23
Figura 1.14 - As oito mutações mais comuns identificadas no gene <i>MECP2</i>	25
Figura 2.1 – Avaliação da capacidade do método B	37
Figura 4.1 – Distribuição das mutações classificadas ineficazmente através do método B.	166
Figura 4.2 – Distribuição e frequência dos casos masculinos analisados	168
Figura 4.3 – Distribuição do grau de severidade dos fenótipos analisados ao longo da proteína MeCP2	169
Figura 4.4 – Graus de severidade associados aos domínios funcionais da proteína MeCP2	170
Figura 4.5 - Distribuição do grau de severidade dos fenótipos analisados com mutações patogénicas ao longo da proteína MeCP2.....	171
Figura 4.6 – Distribuição das mutações patogénicas ao longo da proteína MeCP2.....	171
Figura 4.7 – Distribuição das mutações benignas ao longo da proteína MeCP2	172
Figura 4.8 – Proporção entre mutações patogénicas e mutações benignas	172

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ADN** - Ácido desoxirribonucleico
- ADOS** - Programa de observação diagnóstica do autismo
- CARS** - Escala de pontuação para autismo infantil
- CDKL-5** - *Cyclin-dependent kinase-like 5*
- CREB** - *cAMP response element-binding protein*
- CTD** - Domínio *C-Terminal*
- DNMT** - ADN metiltransferases
- EEG** - Eletroencefalografia
- FOXP1** - *Forkhead box protein G1*
- HDAC** - Desacetilases de histonas
- ID** - *Inter-Domain*
- IDP** - Proteína intrinsecamente desordenada
- INDEL** – Mutações derivadas de deleções e/ou inserções
- IRSF** - Fundação Internacional da Síndrome de Rett
- MBD** - *Methyl-Binding Domain*
- MECP2** - *MethylCpG-binding protein 2*
- NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*
- NCoR** - *Nuclear receptor corepressor*
- NID** - Domínio de interação com *NCoR*
- NTD** - Domínio *N-Terminal*
- PolyPhen-2** - *Polymorphism Phenotyping v2*
- PTM** - *Post-transcriptional modifications*
- RTT** – Síndrome de Rett
- SIFT** - *Sorting Intolerant From Tolerant*
- SK** - Síndrome de Klinefelter
- SMRT** - *Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*
- SNC** - Sistema nervoso central
- TRD** - *Transcriptional Repression Domain*
- UTR** - Região não traduzida
- XCI** - Inativação do cromossoma X
- XLMR** - Atraso mental inespecífico associado ao cromossoma X

1 Introdução

1.1 Contexto histórico da Síndrome de Rett

A Síndrome de Rett (RTT) foi descoberta por mero acaso, em 1965, em Viena, pelo clínico pediatra Andreas Rett, que tinha como objeto de estudo crianças com problemas mentais. Este teve a oportunidade de observar, duas raparigas com movimentações idênticas involuntárias e estereotipadas das mãos. Intrigado com este acontecimento Andreas Rett conseguiu encontrar mais raparigas com estas exatas movimentações estereotipadas nas mãos (1,2). Posteriormente verificou uma história clínica idêntica entre este grupo de jovens. Todas estas jovens tinham tido um período de estagnação no seu desenvolvimento após alguns meses de vida, seguido de um período de regressão, com a respetiva perda de capacidade motoras e capacidades de comunicação. Após esta observação, Rett começou, no ano de 1966, a descrever esta descoberta em artigos publicados em língua alemã (2,3). No entanto, estes artigos não favoreceram muito a divulgação do conhecimento sobre esta nova Síndrome junto da comunidade científica, devido à falta de evidência sobre esta descoberta em língua inglesa (1,4).

Hagberg, um pediatra sueco, e outros identificaram pela Europa, este mesmo quadro clínico em mais grupos de raparigas. Assim, em Toronto, no ano de 1981, por ocasião de uma conferência, Hagberg teve a oportunidade de debater estas descobertas com Andreas Rett. A partir desta data Hagberg, como forma de reconhecimento ao trabalho realizado por Andreas Rett, passou a intitular esta nova Síndrome como a Síndrome de Rett (1–3).

Deste modo, em 1983 Hagberg publicou um artigo em inglês sobre as suas descobertas e a RTT. Este artigo deu a conhecer à comunidade científica esta patologia. A partir deste momento os pediatras de todo o mundo e toda a comunidade científica ficaram alertadas para esta nova patologia (1–4).

No mesmo ano, em 1983, foi fundada, por um grupo de pais de crianças com RTT a Fundação Internacional da Síndrome de Rett (IRSF) (1,2,5). Nos anos seguintes o conhecimento e o entendimento sobre esta patologia foi crescendo junto da comunidade científica e junto dos familiares dos doentes com RTT, como ilustra a figura 1.1 (1,3,4).

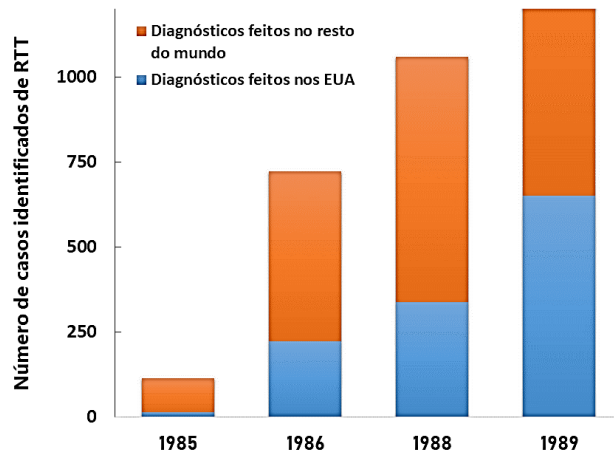


Figura 1.1 - Número de diagnósticos de RTT ao longo dos anos - O número de diagnósticos de RTT nos EUA e no mundo aumentou, devido ao crescente conhecimento e entendimento sobre a patologia. Figura adaptada de Haas (1)

Foram precisos mais de 15 anos para se encontrar a causa para esta patologia. Este feito foi conseguido por Amir *et al*, em 1999, ao identificar o gene *methylCpG-binding protein 2* (*MECP2*) como a principal causa para o aparecimento da RTT. Esta descoberta abriu diversas oportunidades de estudo e possibilitou um novo olhar para esta patologia (4,6–8). A figura 1.2 ilustra a localização do gene *MECP2* no cromossoma X, evidenciando a estrutura do gene.

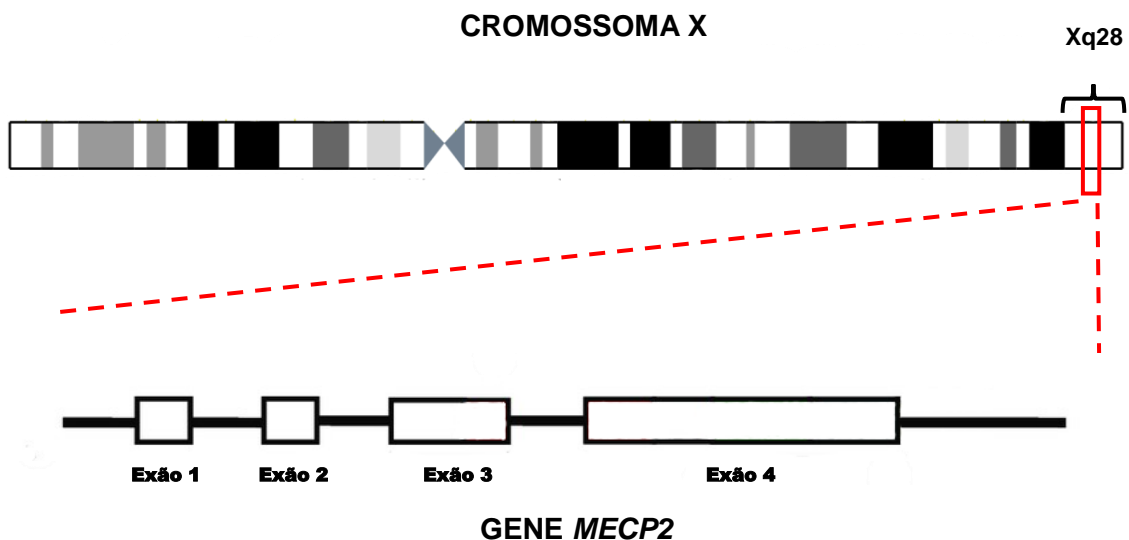


Figura 1.2 - Localização do gene *MECP2* - O gene *MECP2* está localizado no braço longo (q) do cromossoma X, no locus Xq28, sendo este constituído por quatro exões. Os exões não estão ilustrados à escala. Figura adaptada de Verhoeven *et al* (9)

Muito antes da descoberta do gene responsável pela RTT, acreditava-se que esta patologia estaria correlacionada com uma mutação no cromossoma X. Isto porque se verificava que a síndrome parecia surgir quase exclusivamente em raparigas, e por se acreditar que rapazes com a patologia, tendem a ter uma alta taxa de letalidade muito precoce (10–13).

1.2 Manifestações clínicas da Síndrome de Rett

1.2.1 Diagnóstico

A RTT é uma doença rara, que afeta o desenvolvimento neurológico. É diagnosticada no sexo feminino, com uma incidência de 1 em cada 15 000 nascimentos em raparigas, embora também possa ser diagnosticada, com uma menor incidência, no sexo masculino. Esta patologia apresenta um leque variado de manifestações clínicas e desde a sua descoberta que tem sido difícil para os clínicos e pediatras realizar o seu diagnóstico, uma vez que apresenta uma grande diversidade de fenótipos (4,14–16).

Ao longo dos anos e à medida que o conhecimento sobre a patologia foi aumentando, novas manifestações clínicas foram identificadas (2,17). Apesar desta diversidade e da origem da patologia ser genética, o diagnóstico da RTT é baseado em critérios clínicos (18,19). Os critérios de diagnóstico da RTT foram revistos pela última vez em 2010, por Neul *et al.*, e estão representados no Quadro 1.1 (7).

A origem da RTT é genética, uma vez que surge maioritariamente através de mutações no gene *methylCpG-binding protein 2 (MECP2)*, localizado no cromossoma X. Apesar da origem genética, o diagnóstico da RTT é baseado em manifestações clínicas, considerando que a existência de mutações no gene *MECP2* não é critério suficiente nem necessário para que a patologia se manifeste. Verificou-se que as mutações no gene *MECP2* contribuem para 95% a 97% dos casos de RTT típica, e que nos casos da variante da RTT ou RTT atípica a prevalência das mutações é de 50% a 70% dos casos. Verifica-se ainda casos onde se verificou a existência da mutação no gene *MECP2* mas não se verificou o fenótipo característico da RTT (7,20,21). Esta última situação, em raparigas, pode ser explicada por uma tendência favorável na inativação do cromossoma X mutado, sendo que o cromossoma X mutado é maioritariamente inativado. Por outro lado, em rapazes, esta situação pode ser explicada devido à existência da síndrome de Klinefelter (SK) ou de mosaicismo (3,20,21).

Foram também identificados novos genes para além do *MECP2* responsáveis pelo surgimento do fenótipo da RTT, tais como o gene *FOXG1* (*Forkhead box protein G1*) e o gene *CDLK5* (*Cyclin-dependent kinase-like 5*) (21,22). Contudo, o diagnóstico desta patologia é ainda realizado através de critérios clínicos (Quadro 1.1), sendo os testes genéticos apenas usados para confirmar o diagnóstico (7).

Quadro 1.1 - Critérios de diagnóstico da RTT. Adaptado de Neul *et al* (7)

Critérios requeridos para o diagnóstico da RTT típica
1. Existência de um período de regressão no desenvolvimento, seguido por um período de estabilização ou melhoria (a)
2. Presença de todos os critérios principais e ausência de qualquer critério de exclusão
3. Os critérios de suporte não são necessários para o diagnóstico, embora estejam geralmente presentes nos casos de RTT típica
Critérios requeridos para o diagnóstico da RTT atípica ou variante da RTT
1. Existência de um período de regressão no desenvolvimento, seguido por um período de estabilização ou melhoria (a)
2. Presença de pelo menos 2 dos 4 critérios principais
3. Presença de pelo menos 5 dos 11 critérios de suporte
Critérios principais
1. Perda total ou parcial do controlo motor das mãos (b)
2. Perda total ou parcial da capacidade de comunicar verbalmente (b)
3. Anomalias na capacidade de locomoção: presença de dispraxia ou incapacidade de locomoção
4. Movimentos estereotipados nas mãos (torcer os mãos e/ou dedos, bater palmas, bater com as mãos, levar a mão à boca, etc)
Critérios de exclusão para o diagnóstico da RTT típica
1. Dano cerebral, com capacidade de provocar problemas neurológicos, causado por trauma peri ou pós-natal, por doença neurometabólica ou por infeção severa (c)
2. Anomalias profundas e expressivas no desenvolvimento psicomotor da criança nos primeiros 6 meses de vida (d)
Critérios de suporte para o diagnóstico da RTT atípica (e)
1. Distúrbios na respiração (f)
2. Bruxismo (f)
3. Padrão de sono anormal ou defetivo
5. Distúrbios vasomotores periféricos
6. Escoliose ou Cifose
7. Desaceleração do crescimento
8. Mãos e pés pequenos e frios
9. Risos/gargalhadas/gritos/berros inapropriados
10. Resposta diminuída ao estímulo da dor
11. Intensa comunicação com os olhos – “apontar com os olhos”
Deve-se considerar o diagnóstico quando se verifica uma desaceleração no crescimento da cabeça da criança - microcefalia

- (a) Como as mutações no gene *MECP2* são dos poucos sinais passíveis de identificar antes do início do período de regressão, pode-se dar um “possível” diagnóstico da RTT a crianças com menos de 3 anos, com sinais clínicos sugestivos de RTT, mas que ainda não tenham perdido qualquer capacidade ou aptidão característica do período de regressão. Estas crianças devem ser constantemente reavaliadas num período de 6 a 12 meses para despistar qualquer regressão clínica. Se se manifestar a regressão clínica, o diagnóstico deve ser alterado para um diagnóstico definitivo de RTT. No entanto, se a criança não mostrar qualquer evidência de regressão até aos 5 anos de idade, o diagnóstico da RTT deve ser questionado.
- (b) Na perda na capacidade do controlo motor das mãos e na perda da capacidade de comunicação verbal é necessário que se verifique uma prévia aquisição dessas capacidades. Na perda da capacidade de comunicação verbal deve-se ter como meio de comparação a melhor capacidade de comunicação verbal previamente adquirida, e não se basear apenas na aquisição da capacidade de parafrasear ou de proferir palavras. Assim, se o indivíduo adquiriu a capacidade de comunicar através do ato de balbuciar, mas verifica-se que perdeu essa capacidade, então deve-se considerar a perda da capacidade de comunicar verbalmente.
- (c) Deverá existir uma clara evidência (exame oftalmológico ou neurológico e Ressonância Magnética ou Tomografia computadorizada) que permita concluir que a disfunção neurológica tem como causa as circunstâncias mencionadas
- (d) Anomalias profundas e expressivas que afetem marcos gerais do desenvolvimento (capacidade de deglutir, de desenvolver um sorriso, ou de possuir o controlo motor da cabeça). Sintomas, como uma leve hipotonia generalizada, ou outra manifestação ligeira, nos primeiros 6 meses de vida, que já tenham sido previamente descritas como características da RTT (23), são comuns no quadro da patologia e não constituem um critério de exclusão.
- (e) Se um indivíduo apresenta ou apresentou alguma das manifestações clínicas listadas, então é considerado como um critério de suporte. Muitas das manifestações clínicas são dependentes da idade e, por isso, a sua probabilidade de se manifestarem estão correlacionadas com determinados intervalos de idade. Deste modo, verifica-se que o diagnóstico da RTT atípica é mais fácil em indivíduos mais velhos, comparativamente a indivíduos mais novos. Assim, no caso de indivíduos mais novos (com menos de 5 anos de idade), é possível associar um “possível” diagnóstico de RTT atípica, caso não apresente o requerimento de apresentar cinco dos onze critérios de suporte, mas apresente um período de regressão e dois ou mais critérios principais de diagnóstico. Indivíduos que apresentem este “possível” diagnóstico de RTT atípica devem ser constantemente reavaliados considerando a sua idade e os critérios de diagnóstico expostos.
- (f) Quando o doente com RTT se encontra acordado.

1.2.2 História natural da doença e fases da patologia

Na RTT foi, desde logo muito cedo, observada, na evolução natural da doença, distintas fases ou períodos (1). Ao analisar-se os critérios de diagnóstico da RTT, descritos por Neul et al., evidenciados no Quadro 1.1, é necessário que haja obrigatoriamente um período de regressão no desenvolvimento da criança e que haja, posteriormente, uma fase de estabilização ou melhoria (7). Desta forma pode-se identificar quatro fases distintas ao longo da evolução clínica em doentes com RTT (Quadro 1.2).

Quadro 1.2 - As quatro fases da Síndrome de Rett

FASE I	<p>Também denominada como a fase de estagnação ou estagnação precoce no desenvolvimento, esta fase decorre geralmente entre os 6 e os 18 meses de idade e pode durar semanas a meses (20,22).</p> <p>Após os primeiros meses de idade aparentemente normais da criança, é possível observar uma desaceleração no desenvolvimento cognitivo e motor. A criança com RTT geralmente não consegue apresentar as competências esperadas de uma criança numa determinada idade (18,22).</p> <p>Durante esta fase os sintomas mais evidentes são a desaceleração do crescimento da cabeça (microcefalia) e a diminuição do tónus muscular, com a conseqüente diminuição da resistência ao movimento passivo (hipotonia). O desinteresse ou apatia por parte da criança a estímulos e a interações sociais, também pode ser observado (18,20).</p> <p>Nesta fase não existe propriamente uma deterioração, mas uma estagnação ou desaceleração no desenvolvimento, o que torna difícil um diagnóstico precoce, pois as manifestações clínicas podem ser pouco evidentes ou desvalorizadas numa criança com poucos meses de idades e em desenvolvimento (24,25). Quando evidentes, os sintomas podem ser associados a outras patologias, como a Perturbação do Espectro do Autismo, encefalopatias, Síndrome de Angelman, existindo, deste modo, um diagnóstico precoce e errado (18,21,22).</p>
---------------	---

<p>FASE II</p>	<p>Esta segunda fase é designada como a fase de regressão ou fase da deterioração. Caracteriza-se pela rápida deterioração do desenvolvimento da criança, com a perda de capacidades motoras e cognitivas (20,22).</p> <p>Esta fase surge geralmente entre o primeiro e quarto ano de vida e pode durar semanas a meses. A criança perde capacidades motoras previamente adquiridas, como a perda do controlo motor das mãos, existindo uma perda generalizada da função praxica. É um período dramático e extremamente deteriorante do estado clínico do doente que padece desta patologia. Torna-se óbvia a evolução da RTT na criança (18,24).</p> <p>Sintomatologia semelhante à Perturbação do Espectro do Autismo predominam nesta fase, com a perda da comunicação verbal e não verbal, existindo uma falta de interesse na criança pelo ambiente que a circunda. Os sinais de atraso mental tornam-se também bastante claros nesta fase de regressão ou deterioração. O sintoma característico da RTT costuma surgir durante esta fase, nomeadamente, os movimentos estereotipados nas mãos (18,22,25).</p> <p>Sintomas como espasmos epiléticos, episódios de hiperventilação e episódios de apneias podem também surgir ao longo desta segunda fase (18,21,24,25).</p>
<p>FASE III</p>	<p>Este terceiro período da RTT é denominado como a fase pseudo-estacionária, e surge entre o segundo e o décimo ano de vida, quando acaba o período de regressão ou deterioração do estado clínico. Esta fase é caracterizada como um período de estabilização na deterioração do estado clínico, onde existem alguns progressos a nível motor e social (20–22,25).</p> <p>A fase pseudo-estacionária tende a durar anos ou décadas. Durante este período existem melhorias na comunicação verbal, na comunicação não-verbal e nas interações sociais do doente. Também as capacidades motoras progridem com a melhoria e a aquisição de novas aptidões (18,20,25).</p> <p>Apesar das melhorias que acompanham este período, continua a existir uma disfunção motora generalizada e notáveis traços de atraso mental. Doentes com RTT, durante a fase pseudo-estacionária apresentam dispraxia, com a consequente dificuldade ou incapacidade de caminhar, e mantem a</p>

	<p>incapacidade total ou parcial de controlo motor das mãos (18,20,24).</p> <p>Os movimentos estereotipados nas mãos (torcer os mãos e/ou dedos, bater palmas, bater com as mãos, levar a mão à boca, etc) permanecem e revelam-se um sintoma proeminente. Outros sintomas notáveis nesta terceira fase da patologia são a escoliose (assimetria postural), ataques epiléticos ou espasmos, e irregularidades na respiração, como episódios de hiperventilação e apneias (18,20,24).</p>
<p>FASE IV</p>	<p>Pode surgir a partir dos dez anos de idade, e denomina-se como a fase da deterioração motora tardia. Se o doente evoluir para esta último período irá decorrer novamente um acentuado decréscimo na mobilidade motora, ficando este severamente debilitado. O doente com RTT, que apresentava a capacidade de caminhar, passa a estar incapacitado de o fazer, e passa a estar dependente de uma cadeira de rodas (18,22,25).</p> <p>Os sintomas proeminentes, para além dos observados na fase anterior, são as deformidades distais, a bradicinesia, escoliose, fraqueza muscular, espasticidade e uma incapacidade motora severa e generalizada (18,20,24).</p>

Embora estejam definidas estas quatro fases da patologia é importante ter em conta que existe uma grande diversidade de fenótipos e de sintomas nos diversos doentes com RTT, e que por vezes pode ser difícil distinguir de forma clara estes diferentes períodos da patologia (20,22). Na figura 1.3 pode-se observar esquematicamente o desenvolvimento de uma criança que apresenta RTT, comparativamente ao normal desenvolvimento de uma criança sem a patologia, realçando-se as quatro fases da patologia.

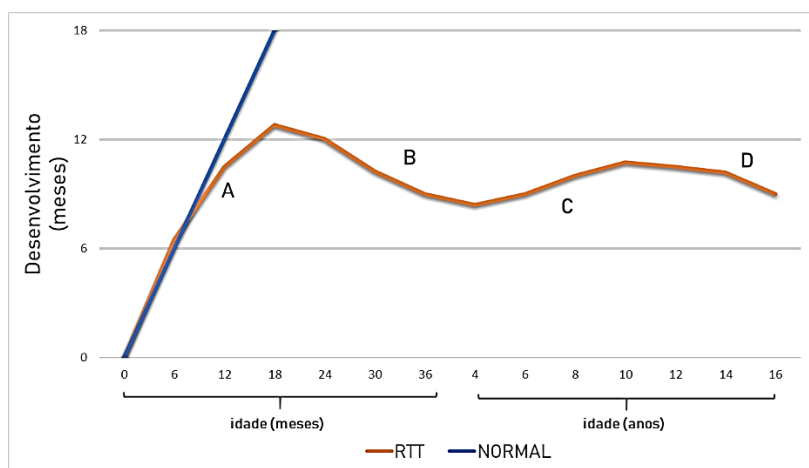


Figura 1.3 - O desenvolvimento de uma criança com RTT - O percurso no desenvolvimento da criança com Síndrome de Rett (RTT), comparativamente ao desenvolvimento de uma criança normal. As letras indicam os quatro períodos característicos na história natural da patologia. A: Fase I, B: Fase II, C: Fase III e D: Fase IV, Figura adaptada de Haas (1)

1.2.3 Variantes da RTT ou RTT atípica

Considerando a diversidade fenotípica característica dos indivíduos com RTT, classificou-se a Síndrome de Rett como típica ou clássica e atípica. Algumas variantes apresentam características únicas e por esse motivo distinguem-se claramente da RTT típica. Estas não apresentam todos os critérios de diagnóstico necessários para ser considerada RTT típica (Quadro 1.1) (7,22).

As variantes de RTT devem obedecer aos critérios de diagnóstico de Neul *et al* (2010), nomeadamente, os critérios para a RTT atípica. Estes podem variar em grau de severidade, existindo quadros clínicos mais severos que outros. O Quadro 1.3 ilustra as principais variantes da RTT e as suas características (7,22).

Quadro 1.3 - As variantes da RTT ou RTT atípicas

<p>Variante da preservação da linguagem ou variante Zappella</p>	<p>Esta variante apresenta um quadro clínico menos severo. Desenvolvem-se sintomas característicos da RTT, mas existe, após a fase da regressão, a recuperação da comunicação verbal. Os pacientes conseguem, após o período de regressão, comunicar através de palavras isoladas ou através de frases completas (7,20,22).</p>
<p>Variante congénita ou variante Rolando</p>	<p>Nesta variante existe a manifestação grave e severa dos sintomas da RTT numa fase muito precoce de vida. Os pacientes desenvolvem diversos sintomas severos nos primeiros meses de vida. Mutações no gene <i>FOXG1</i>, localizado no cromossoma X, são a principal causa para a manifestação desta variante (7,20,22).</p>
<p>Variante com convulsões precoces ou variante Hanefeld</p>	<p>Esta variante é geralmente identificada em indivíduos com mutações no gene <i>CDKL5</i>, localizado no cromossoma X. Caracteriza-se pela presença de convulsões ou ataques epiléticos que surgem a partir do primeiro mês de vida e geralmente antes dos cinco meses de idade (7,20,22).</p>

1.3 A origem genética da Síndrome de Rett

1.3.1 A RTT no sexo masculino

Desde que se começou a investigar a RTT que se considerou que esta patologia estaria associada ao cromossoma X, devido à grande incidência da RTT no sexo feminino, e à quase inexistência de casos no sexo masculino (17,26). Pensava-se que os indivíduos do sexo masculino, por serem hemizigotos para os genes do cromossoma X, padeciam da patologia de uma forma mais agravada, potenciando assim uma morte prematura (18,27,28). Desta forma a

possibilidade se existir a RTT no sexo masculino sempre foi tópico de debate, muito antes de se descobrir o gene *MECP2*, como o gene responsável pela manifestação da doença (13,29,30).

Contudo, localizou-se, em diversos indivíduos do sexo masculino, com atraso mental e outros sintomas característicos da RTT, mutações no gene *MECP2*, que originam no sexo feminino o fenótipo da RTT. O quadro clínico no sexo masculino, derivado de mutações no gene *MECP2*, é também diversificado e manifesta-se em diferentes graus de severidade (31–33). Pode-se manifestar em quadros menos graves, através de um atraso mental na idade adulta, ou com uma encefalopatia neonatal severa e morte prematura, no caso de quadros clínicos mais severos (28,34,35).

Deste modo, reforça-se a necessidade de considerar um possível diagnóstico da RTT no sexo masculino em situações de atraso mental inespecífico e em casos de encefalopatia neonatal, acompanhado sempre do respetivo diagnóstico molecular ou teste genético (28,35). Estima-se que a frequência de mutações no gene *MECP2*, como agente causal de atraso mental na população masculina, seja de 1,3% a 1,7% (27,28,35). Espera-se que a identificação de mais casos de pacientes do sexo masculino, com fenótipos característicos de mutações no gene *MECP2*, possa resultar numa maior compreensão da RTT e de outras patologias que afetam o desenvolvimento neurológico (28,32,34).

Nos dias de hoje o fenótipo da RTT no sexo feminino, apesar de diversificado, encontra-se bem descrito e detalhado na literatura, uma vez que se verifica ser a grande maioria dos casos diagnosticados da patologia. Por outro lado, ao analisar-se o fenótipo no sexo masculino, derivado de mutações no gene *MECP2*, a correlação genótipo/fenótipo é bastante diferente do que seria de esperar se a mutação ocorresse no sexo feminino (28,35).

1.3.2 A influência do Mosaicismo celular

O fenómeno do mosaicismo celular responde a duas questões peculiares, que surgem da observação dos fenótipos existentes na RTT. O mosaicismo celular do cromossoma X paterno e materno nas mulheres pode explicar a grande diversidade fenotípica existente na RTT no sexo feminino (36,37). Este fenómeno encontra-se ilustrado na figura 1.4. Por outro lado, o mosaicismo celular de células mutadas e não mutadas pode explicar a existência de casos de RTT no sexo masculino com um quadro semelhante ao encontrado no sexo feminino (35). Este último fenómeno encontra-se ilustrado na figura 1.5.

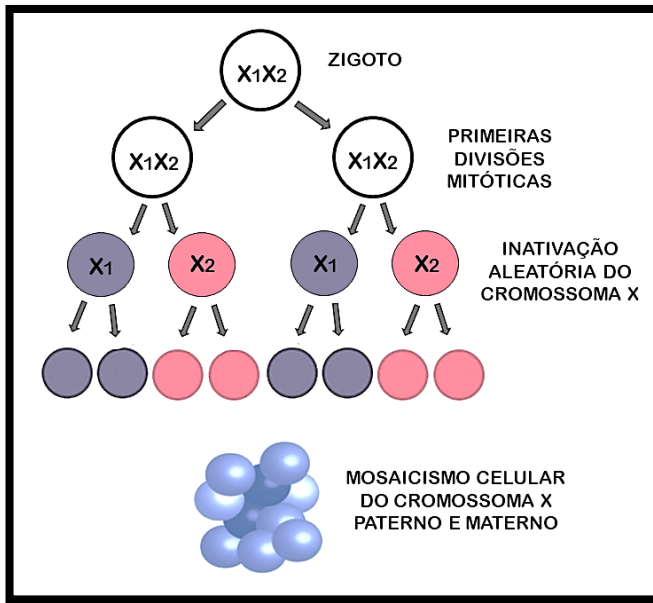


Figura 1.4 - Inativação do Cromossoma X (XCI) ou Lionização - No início do desenvolvimento embrionário, ocorre o fenómeno de XCI ou Lionização. Este fenómeno ocorre como forma de compensação da expressão dos genes no sexo feminino, uma vez que cópias extras de genes ou cromossomas podem afetar o normal desenvolvimento. Como as mulheres herdam dois cromossomas X, um paterno e outro materno, ocorre a inativação de um dos cromossomas X ainda nas células embrionárias. Este processo é aleatório, sendo que o cromossoma X inativado é sempre selecionado aleatoriamente. Assim uma

mulher apresenta geralmente um mosaïcismo celular relativamente ao cromossoma X, pois metade das suas células somáticas expressam os genes do cromossoma X paterno, e a outra metade das suas células, expressam os genes do cromossoma X materno (36). Figura adaptada de Berletch *et al* (38)

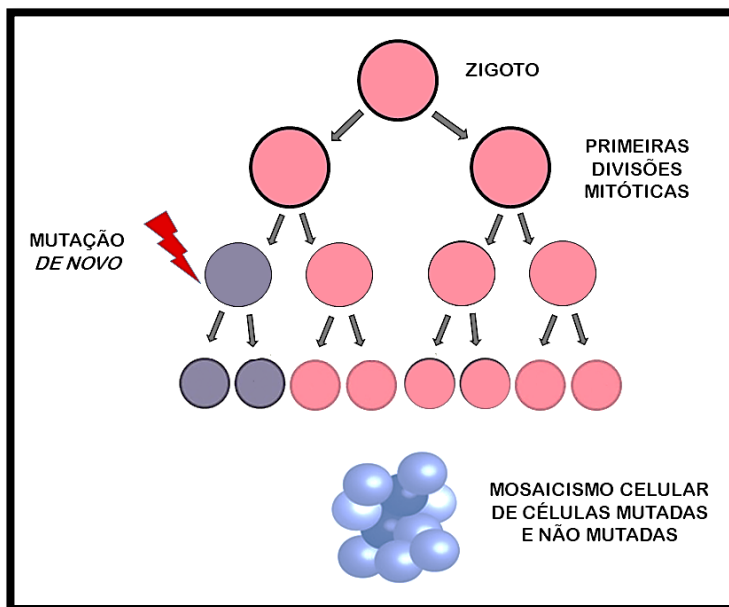


Figura 1.5 - Mosaïcismo Celular devido a uma mutação de novo - A maioria das mutações no gene *MECP2*, que originam a RTT, são mutações *de novo*. Estas não são hereditárias e, por isso, não estão presentes nos progenitores. Este tipo de mutação pode ocorrer durante o desenvolvimento embrionário, durante as diversas divisões mitóticas. Assim, todas as células descendentes de uma determinada célula somática mutada irão apresentar a mutação, originando no organismo um mosaïcismo de células mutadas e células não

mutadas (37). Figura adaptada de Pescatore *et al* (39)

Os fenómenos ilustrados nas figuras 4 e 5, nomeadamente o mosaïcismo do cromossoma X no sexo feminino e o mosaïcismo de celular mutadas e não mutadas, podem ser enviesados.

A existência de um mosaïcismo enviesado pode ter muitas implicações no fenótipo e quadro clínico da RTT. O fenómeno do mosaïcismo enviesado encontra-se ilustrado na figura 1.6.

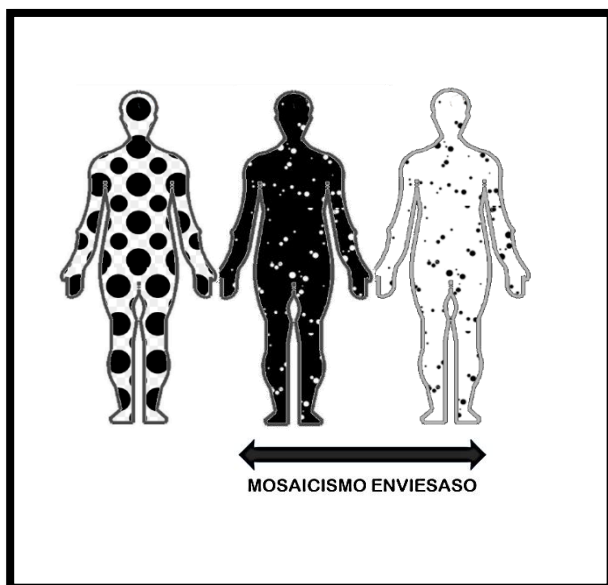


Figura 1.6 – O mosaïcismo celular - O mosaïcismo ocorre devido à presença de conjuntos de células, provenientes do mesmo zigoto, com diferente constituição genética. Assim uma mulher geralmente apresenta um mosaïcismo celular para o cromossoma X, uma vez que a mulher apresenta metade das suas células somáticas com o cromossoma X paterno inativado e a outra metade com o cromossoma X materno inativado. Pode existir um mosaïcismo celular enviesado, onde estes diferentes conjuntos de células, com diferentes constituições genéticas, não estão uniformemente distribuídas pelo organismo ou não se apresentam no mesmo rácio. Isto pode ocorrer por diversos motivos, sendo um deles, o processo de

XCI não ser totalmente aleatório e, por isso, existir a inativação preferencial de um cromossoma X parental em relação ao outro (36). Figura adaptada de Gajecka (40)

A fase em que ocorre uma mutação *de novo* no desenvolvimento embrionário pode favorecer um mosaïcismo mais ou menos enviesado. Isto porque se a mutação *de novo* ocorrer numa fase mais tardia do desenvolvimento embrionário, o rácio de número de células mutadas no indivíduo irá ser muito menor ou até mesmo estar confinado a uma linhagem celular específica, dando origem a um mosaïcismo enviesado (37).

A ocorrência de um mosaïcismo enviesado pode ser um fator importante em doenças com origem genética como a RTT, pois pode definir o fenótipo da doença. Espera-se que um rácio elevado de células mutadas no gene *MECP2* dê origem a um fenótipo mais severo, enquanto um rácio de células mutadas menor dê origem a fenótipos de RTT com sintomas ligeiros ou mesmo assintomáticos. Este fator pode ser importante quando se considera a grande diversidade de fenótipos existentes na RTT, mesmo quando se compara fenótipos que têm origem na mesma mutação (36,37).

1.3.3 A importância das mutações de novo na RTT

Apesar da explicação mais aceita, para a grande prevalência da RTT no sexo feminino, basear-se na expressão de uma forma severa da patologia no sexo masculino, existem estudos que explicam outra hipótese para esta grande discrepância entre os dois sexos no que toca aos diagnósticos de RTT (41,42).

Esta hipótese tem em conta o facto de mutações *de novo* serem as mutações principais responsáveis pelo surgimento da RTT. As mutações *de novo* podem surgir durante o desenvolvimento embrionário (figura 1.5) ou durante a gametogénese, sendo que neste último caso a mutação é transportada através das células germinativas dos progenitores (41,43).

Tendo em conta a importância das mutações *de novo* na RTT, existem diversos estudos que evidenciam uma proporção elevada de mutações *de novo* nas células germinativas masculinas, comparativamente às células germinativas femininas. Isto deve-se às características próprias dos dois processos de gametogénese (44,45).

Ao comparar a espermatogénese, processo de formação de gâmetas masculinos, com a oogénese, processo de formação de gâmetas femininos, verificam-se diferenças nas divisões mitóticas necessárias para gerar, respetivamente, um espermatozoide e um óvulo (figura 1.7). Isto porque a meiose, processo pela qual se formam células haploides, e por consequente, as células germinativas, ocorre, no sexo feminino, num determinado espaço de tempo, ainda durante a fase embrionária, num número limitado de células. Por outro lado, a meiose no sexo masculino ocorre continuamente, ao longo da vida adulta, em inúmeras células (28,44).

Deste modo, esta hipótese evidencia que o número de divisões mitóticas necessárias para formar um espermatozoide é diferente quando se compara as divisões mitóticas necessárias para formar um ovócito, sendo que no caso do espermatozoide o número de divisões aumenta com a idade (41,44).

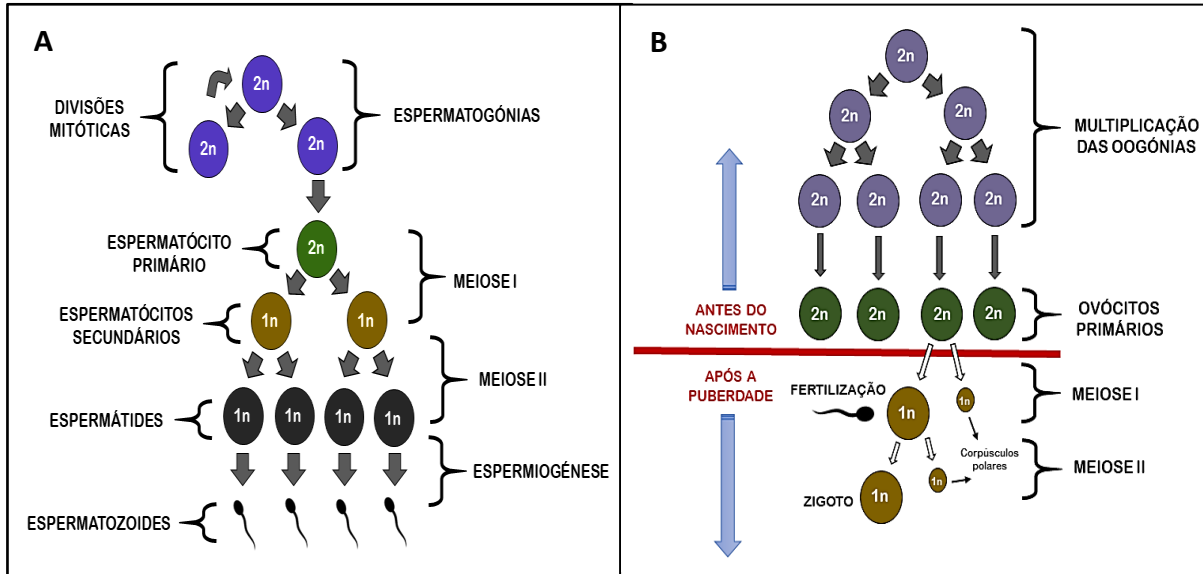


Figura 1.7 – Gametogénese masculina e feminina. **A)** A espermatogénese inicia-se com a fase da espermatocitogénese. Nesta existe a formação contínua de espermatogónias, que se renovam ao longo da vida do indivíduo através de divisões mitóticas, de forma a formar continuamente os espermatócitos. Na segunda fase existe a formação dos espermatócitos primários, através das espermatogónias. Os espermatócitos sofrem a primeira divisão da meiose dando origem aos espermatócitos secundários, células haploides, que por consequente sofrem a segunda divisão da meiose, originando os espermátides. Por fim existe a fase da espermiogénese, onde ocorre a maturação dos espermátides, de forma a gerar os espermatozoides. Figura adaptada de Crow (44) **B)** A oogénese tem início logo na fase embrionária, com o desenvolvimento dos ovários. Nesse momento, as oogónias proliferam e multiplicam-se. Posteriormente, estas oogónias diferenciam-se em ovócitos primários. Estes permanecem neste estado até à puberdade, sendo que, uma rapariga quando nasce apresenta já todos os seus ovócitos primários formados. Na puberdade, a cada ciclo menstrual, ocorre a maturação de um ovócito primário, sendo que este sofre a primeira divisão da meiose, dando origem ao ovócito secundário. Posteriormente, este ovócito secundário completa a segunda divisão da meiose, caso haja a fertilização. Figura adaptada de Clark *et al* (46).

Tendo em conta a formação de espermatozoides ao longo de toda a vida adulta, e a necessidade da renovação constante das espermatogónias, através de divisões mitóticas, é possível inferir que a probabilidade de ocorrer uma mutação *de novo* nas células germinativas, durante a replicação do ADN (ácido desoxirribonucleico), é mais provável na espermatogénese. Considerando que a mutação *de novo* no gene *MECP2* tem maior probabilidade de ocorrer no cromossoma X paterno, devido às características próprias da gametogénese, esta hipótese supõe então que o sexo masculino fica, de algum modo, privilegiado, pois não herda o cromossoma X paterno. (28,41) Esta hipótese explicaria a elevada discrepância entre os dois sexos no que toca ao diagnóstico da RTT, tendo como base a importância das mutações *de novo* na patologia. Apesar de existirem estudos que mostram que não existe uma correlação direta entre a idade e

a probabilidade de ocorrer uma mutação *de novo*, existem dados que mostram que a probabilidade de encontrar uma mutação *de novo* no gene *MECP2* é maior no cromossoma X paterno. Esta é uma alternativa à hipótese da mortalidade precoce no sexo masculino, como causa para os poucos diagnósticos de RTT nos rapazes (41,42,45).

1.4 MECP2

1.4.1 O gene *MECP2*

O gene *MECP2* é responsável por codificar a proteína MeCP2, e é constituído por quatro exões e três intrões. Este gene codifica, através do *splicing* alternativo, duas isoformas distintas da proteína *MeCP2*: a isoforma MeCP2_e1 e a isoforma MeCP2_e2. Ao comparar as duas isoformas da MeCP2 observa-se que o rácio entre as duas varia entre os tecidos, mas constata-se que a isoforma MeCP2_e1 é dez vezes mais abundante no cérebro humano (20,47,48). A MeCP2_e1 e a MeCP2_e2 diferem apenas no início do domínio *N-Terminal* (NTD), e embora apresentem praticamente os mesmos domínios, estas apresentam as suas próprias características, parceiros de interação e expressões celulares distintas. Existem estudos que evidenciam que apenas mutações na isoforma MeCP2_e1 têm capacidade para originar um fenótipo de RTT (47,49). A figura 1.8 ilustra a estrutura do gene *MECP2* e os seus respetivos transcritos, e a figura 1.9 ilustra os diversos domínios da proteína MeCP2.

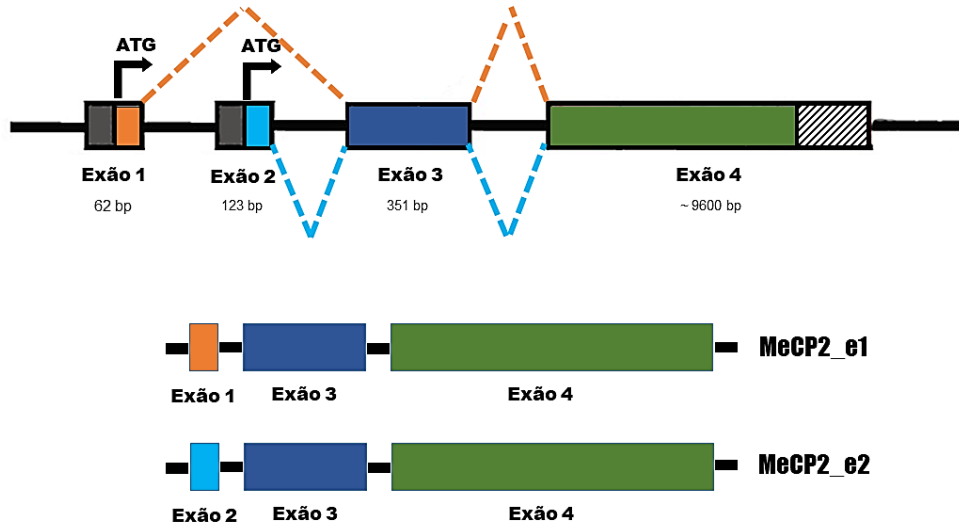


Figura 1.8 - Ilustração gráfica do gene *MECP2* e dos seus respetivos transcritos. A) O gene *MECP2* é constituído por quatro exões. A área a cinzento indica a região não traduzida 5' (5'UTR), as áreas coloridas indicam as regiões codificantes, e a área a tracejado indica a região não traduzida 3' (3'UTR). Diferentes cores ilustram diferentes exões: laranja, exão 1; azul-claro, exão 2; azul-escuro, exão 3; verde, exão 4. Por sua vez a linha tracejada laranja indica as regiões transcritas que originam a isoforma MeCP2_e1 através de *splicing* alternativo, e a linha tracejada azul indica as regiões transcritas que originam a isoforma MeCP2_e2, através de *splicing* alternativo. As setas no exão um e no exão dois indicam, respetivamente, os codões de iniciação (ATG) da isoforma MeCP2_e1 e MeCP2_e2. Os valores numéricos ilustrados abaixo dos exões indicam o tamanho dos mesmos em pares de base (bp) B) Ilustração das duas isoformas criadas pelo *splicing* alternativo. A isoforma MeCP2_e1 é codificada pelos exões 1, 3 e 4, enquanto a isoforma MeCP2_e2 é codificada pelos exões 2, 3 e 4. Figura adaptada de Vuu *et al* (50)

1.4.2 A proteína MeCP2

A proteína MeCP2 é uma proteína multifuncional que regula a transcrição genética e pertence a uma família de proteínas que tem a capacidade de se ligar ao ADN metilado, nomeadamente, através de dinucleótidos de citosina metilada precedidas de guanina (*CpG* metilada). Após esta ligação, a proteína MeCP2 recruta diversas proteínas para formar complexos que têm a capacidade de reprimir ou ativar a transcrição genética (16,49). O domínio *Methyl-Binding Domain* (MBD) é o domínio que permite à proteína MeCP2 ligar-se ao ADN nos locais *CpG* metilados, e o domínio *Transcriptional Repression Domain* (TRD) permite à MeCP2 interagir com outras proteínas e recrutar co-repressores de forma a reprimir a transcrição genética (20,49). A figura 1.9 ilustra os diversos domínios funcionais da proteína MeCP2.

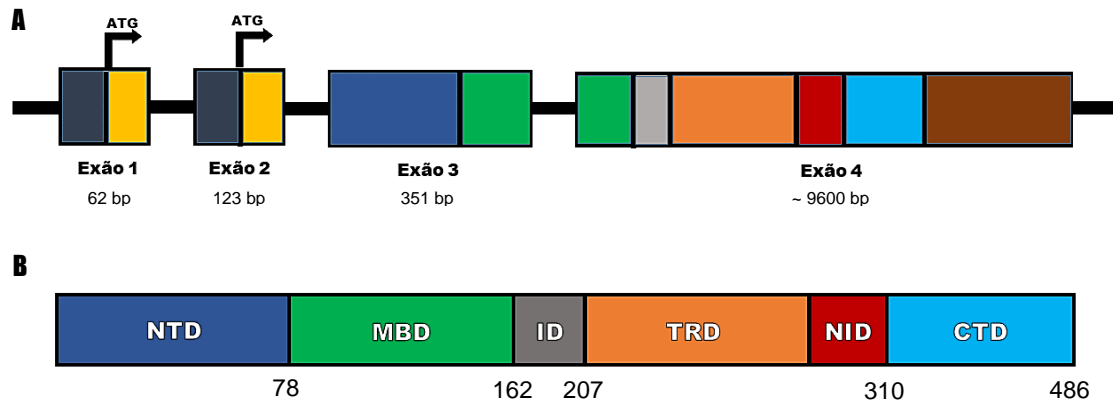


Figura 1.9 – Os domínios funcionais da MeCP2 - Diferentes cores indicam diferentes domínios funcionais: amarelo, regiões que codificam para o início do domínio *N-Terminal* das duas isoformas da MeCP2; azul-escuro, domínio *N-Terminal* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento-claro, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); vermelho, domínio de interação com NCoR (NID); azul-claro, domínio *C-Terminal* (CTD); cinzento-escuro, região não traduzida 5' (*5'UTR*); castanho, região não traduzida 3' (*3'UTR*). **A**) Ilustração das regiões codificantes para os diversos domínios funcionais da proteína no gene *MECP2*. Os valores numéricos ilustrados abaixo dos exões indicam o tamanho dos mesmos em pares de base (bp) (50) **B**) Ilustração dos diversos domínios funcionais da proteína num transcrito do gene *MECP2*. Os valores numéricos indicam os respectivos aminoácidos da proteína, tendo como referencia a isoforma MeCP2_e2 (50). Figura adaptada de Kyle *et al* (20)

Um dos mecanismos pelo qual a proteína MeCP2 regula a transcrição genética é através da desacetilação das histonas, provocando uma maior condensação da cromatina, que dá origem a repressão da transcrição genética, uma vez que a condensação da cromatina torna impossível que a maquinaria e os complexos necessários para a transcrição tenham acesso e se liguem aos respetivos genes (6,18,20). Este mecanismo de repressão genética está ilustrado na figura 1.10.

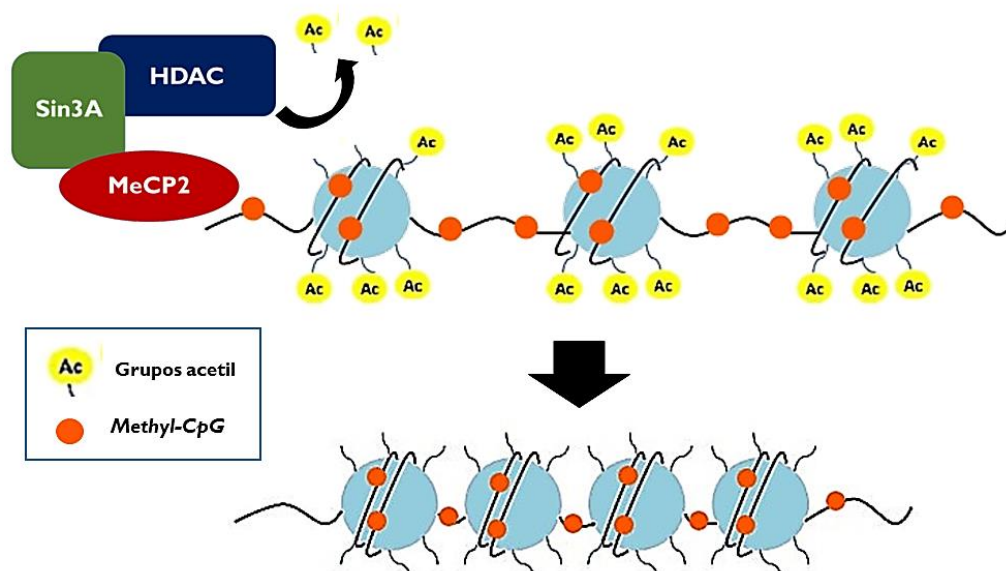


Figura 1.10 – Regulação da transcrição genética através da MeCP2 - A proteína MeCP2 liga-se ao ADN metilado através do domínio MBD. O domínio TRD interage com o co-repressor Sin3A, e este último recruta as desacetilases das histonas (HDAC), que possuem a capacidade de remover os grupos acetil das histonas, tornando a estrutura da cromatina mais compacta contribuindo assim para a repressão genética. Figura adaptada de Das *et al* (51)

A proteína MeCP2 interage também com o complexo NCoR/SMRT, um complexo formado pela proteína *Nuclear Receptor Corepressor* (NCoR) e pelo *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors* (SMRT). Este complexo é um co-repressor, e é recrutado com o objetivo de reprimir a transcrição. A MeCP2 apresenta na sua estrutura um domínio específico que permite que esta interaja e se ligue ao complexo NCoR/SMRT. Este domínio é denominado como domínio de interação com NCoR (NID) (16,20,21). Este mecanismo está ilustrado na figura 1.11. Existem estudos relevantes que evidenciam a importância da interação MeCP2-NCoR/SMRT. Isto porque observou-se que mutações *missense*, na região codificante para o domínio NID (e.g. R306C), originam um fenótipo de RTT. Estas mutações no domínio NID podem comprometer a interação e a ligação entre a proteína MeCP2 e o complexo NCoR/SMRT, evidenciando assim a relevância desta interação para a patologia da RTT (20,21,47).

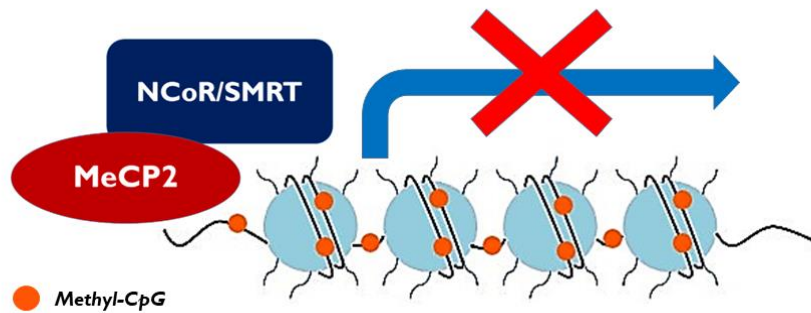


Figura 1.11 – Complexo MeCP2 / NCoR/SMRT - Envolvimento do co-repressor NCoR/SMRT na repressão da transcrição genética. Figura adaptada de Kyle *et al* (20)

Por ser uma proteína multifuncional, moduladora da transcrição, a MeCP2 não se limita apenas a inibir a transcrição genética. Esta apresenta também a capacidade, de em algumas situações, promover a transcrição. Existem estudos que evidenciam que a MeCP2 atua como um ativador transcricional quando interage com o complexo *cAMP response element-binding protein* (*CREB*) (21,52). Este mecanismo está ilustrado na figura 1.12.

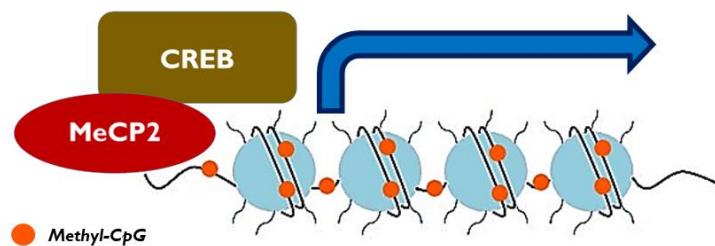


Figura 1.12 – Complexo MeCP2 / CREB - Promoção da transcrição genética através da interação entre a MeCP2 e o CREB. Figura adaptada de Bedogn *et al* (53).

A proteína MeCP2 é uma proteína muito versátil, pois consegue interagir com uma grande variedade de proteínas. A MeCP2 pode sofrer uma série de modificações pós-transcrição (PTM's), do inglês *Post-transcriptional Modifications*, e estas PTM's permitem, que após o processo de tradução da proteína, ocorram modificações químicas e estruturais na cadeia polipeptídica da MeCP2, o que lhe confere esta versatilidade de interagir com uma grande variedade de proteínas. A MeCP2 pode ser sujeita a uma variedade de PTM's, desde acetilações, fosforilações, ubiquitinação, permitindo regular a atividade da MeCP2 (20,47). Um exemplo de regulação da atividade da MeCP2 através das PTM's é a regulação da interação da MeCP2 com o complexo NCoR/SMRT. Esta interação é possível devido a uma PTM

potenciada pela atividade neuronal da célula, nomeadamente, uma fosforilação no aminoácido T308 da MeCP2 (21).

De forma a adicionar outra camada de versatilidade na regulação da atividade da MeCP2, esta é caracterizada como uma Proteína Intrinsecamente Desordenada (*IDP*), do inglês *Intrinsically disordered proteins*, uma vez que não apresenta uma estrutura tridimensional fixa ou estável. Estas *IDP*'s são caracterizadas por terem uma flexibilidade estrutural que lhes permite adotar diferentes conformações em resposta a diferentes estímulos ou interações (20,54). Esta característica permite à MeCP2 interagir com múltiplas proteínas, sendo que ao considerar também as PTM's, considera-se a função reguladora da MeCP2 como complexa e dependente do ambiente em que se encontra. Existem aos dias de hoje diversos estudos que evidenciam e comprovam o papel da MeCP2 em diversas outras funções, como a modulação do processo *splicing* e a modulação da síntese proteica (49,55).

Existem estudos que evidenciam que a MeCP2 não apresenta somente afinidade para os dinucleótidos *CpG* metilados, mas também apresenta afinidade para se ligar a hidroximetilcitosinas precedidas de guanina (*hmCG*), e a dinucleótidos de citosina metiladas ou hidroximetiladas precedidas de adenina (*mCA* ou *hmCA*) (52,56,57). Na figura 1.13 está ilustrada a base nitrogenada citosina metilada e hidroximetilada.

1.4.2.1 A MeCP2 e as modificações epigenéticas

A MeCP2, por apresentar o domínio MBD e por fazer parte da família de proteínas que tem a capacidade de se ligar ao ADN metilado, está intrinsecamente correlacionada com modificações epigenéticas. Isto porque a metilação do ADN, uma das principais modificações epigenéticas, ocorre nas citosinas precedidas de guaninas (*CpG*) (21,57). Esta metilação está ilustrada na figura 1.13. As ADN metiltransferases (*DNMT*'s), são as enzimas que permitem metilar o ADN nestas regiões, e originar as bases *CpG* metiladas, de forma a que haja uma regulação genética em todas as células de forma contínua (52,56,57).

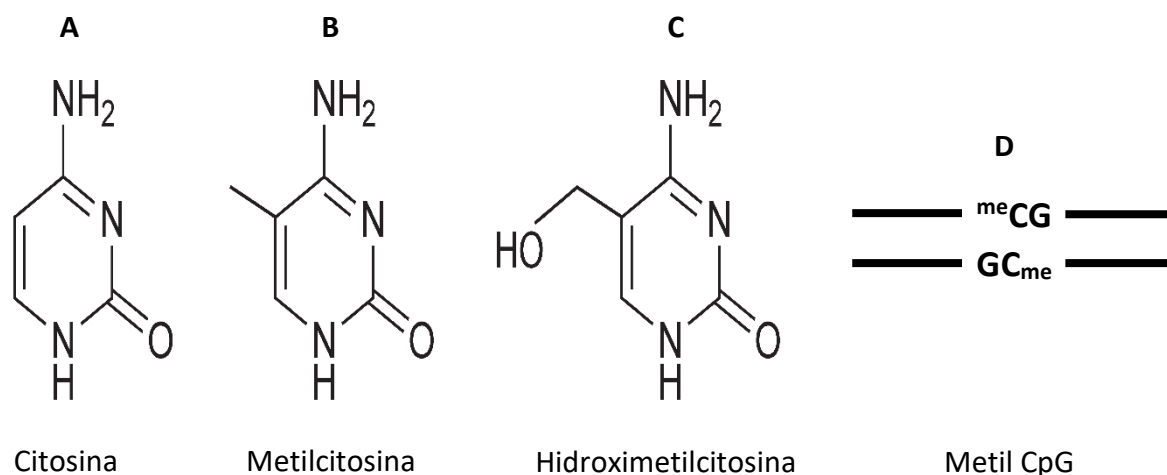


Figura 1.13 - Representação da base nitrogenada citosina e dos locais de ligação da proteína MeCP2 no ADN. A) Base nitrogenada citosina B) Citosina metilada C) Citosina hidroximetilada D) Representação de uma cadeia dupla de ADN contendo um dinucleótido de citosina metilada precedidas de guanina (metil CpG). Figura adaptada de Ku *et al* (58)

Existem no ADN regiões denominadas as ilhas CpG. Nestas regiões encontram-se com mais frequência do que o esperado as bases CpG. Estas ilhas CpG são características do genoma dos mamíferos e localizam-se geralmente nas regiões promotoras dos genes, ou seja, no início dos genes, onde a maquinaria responsável pela transcrição genética se liga ao ADN. A metilação destas ilhas CpG geralmente é sinónimo do silenciamento do gene em questão devido à função das proteínas MeCP2 e MeCP1. Estas ligam-se ao ADN através do domínio MBD e provocam o silenciamento do gene através do seu domínio TRD (59,60).

1.4.3 A relação entre a proteína MeCP2 e a RTT

A proteína MeCP2 está presente em todos os tecidos, mas é predominantemente expressa no cérebro e nas células nervosas. Considera-se que a perda da sua função, devido a mutações no gene *MECP2*, origine alterações na expressão genética, que é dependente da atividade celular. Poderá existir então a inapropriada expressão de genes com um efeito nocivo para a atividade celular (21,47,49,55).

Diversos estudos demonstraram que a função da MeCP2 está relacionada com a conectividade dendrítica e função sináptica, sendo que a expressão de MeCP2 está correlacionada com processos de manutenção do Sistema Nervoso Central (SNC) e de diferenciação neuronal (16,20,21).

O mecanismo fisiopatológico pelo qual a perda de função da MeCP2 origina a RTT ainda não foi totalmente esclarecido devido à sua versatilidade de interações, à sua afinidade pelo ADN e devido à sua expressão ubiquitária em todos os tecidos, estando por isso interligada a diversas cascatas de regulação (16,21,47).

1.5 As mutações no gene *MECP2*

A RTT está associada a centenas de mutações no gene *MECP2*. Essas mutações podem ser de diversos tipos, como mutações *missense*, *nonsense*, pequenas e grandes deleções ou inserções (*INDEL*'s), o que pode criar uma grande diversidade de fenótipos. No entanto, existem mutações que surgem com mais frequência no gene *MECP2*, nomeadamente as mutações do tipo *missense* e *nonsense*. Oito mutações representam cerca de 70% dos casos responsáveis por originar RTT, nomeadamente quatro mutações *missense* (R106W, R133C, T158M, R306C) e quatro mutações *nonsense* (R168X, R255X, R270X, R294X) (20,47,48). De um modo geral, as mutações *missense* localizam-se na sua maioria no domínio MBD, e as mutações do tipo *nonsense* ou *frameshift* localizam-se a jusante do domínio MBD, afetando o domínio TRD ou o domínio CTD. Estas oito mutações estão esquematicamente ilustradas na figura 1.14. Observou-se também que as mutações *de novo* são responsáveis por mais de 90% dos casos de RTT, e que 70% das mutações responsáveis por originar RTT são transições de citosina --> timina (20,21,47,48).

A localização da mutação pode afetar aspetos funcionais específicos da proteína, pois mutações no domínio MBD afetam geralmente a ligação da MeCP2 ao ADN. Ao analisar as mutações responsáveis pelo fenótipo da RTT conclui-se que mutações precoces, que conduzem à terminação precoce da proteína (codão stop), o que resulta numa proteína truncada (R168X, R255X, R270X) e grandes mutações *INDEL*'s, originam fenótipos de RTT severos, enquanto mutações *missense* e mutações tardias do tipo *nonsense*, que conduzem à terminação da proteína no domínio CTD, originam fenótipos de RTT intermédios. Estas últimas mutações permitem que os domínios MBD e TRD mantenham grande parte da sua estrutura funcional. No entanto esta correlação genótipo-fenótipo não é sempre linear devido à XCI enviesada (16,18,20,47).

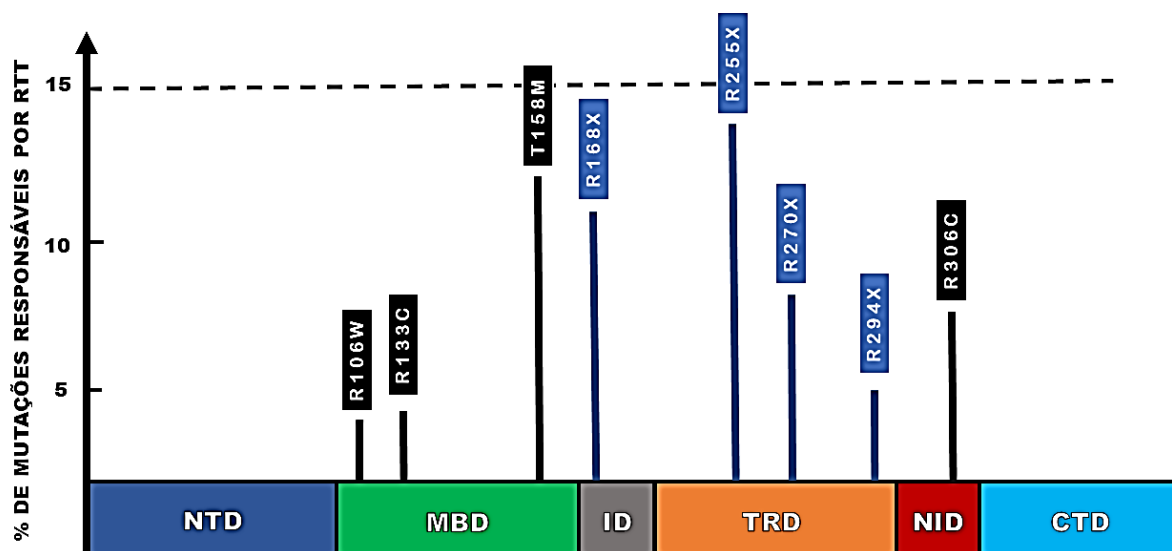


Figura 1.14 – As oito mutações mais comuns identificadas no gene *MECP2*. Diferentes cores indicam diferentes domínios funcionais: azul-escuro, *N-Terminal Domain* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); vermelho, *NCoR Interaction Domain* (NID); azul-claro, *C-Terminal Domain* (CTD). No eixo das ordenadas está indicada a percentagem da frequência das mutações responsáveis pelo surgimento da RTT. Estas oito mutações representam aproximadamente cerca de 70% das mutações identificadas que originam RTT. As mutações do tipo *missense* estão indicadas a cor preta e as mutações do tipo *nonsense* estão indicadas a cor azul. Figura adaptada de Kyle *et al* (20)

1.5.1 Grupos de mutações no gene *MECP2* no sexo masculino

Ao analisar as mutações presentes no sexo masculino, e ao correlacionar estas com os respetivos fenótipos, pode-se dividir as mutações no gene *MECP2* encontradas no sexo masculino em quatro categorias (20,35).

A primeira categoria são as mutações que também estão presentes no sexo feminino. Estas dão origem a um quadro de RTT típica no sexo feminino mas no sexo masculino o fenótipo de RTT é muito mais severo e dramático. Deste modo, neste primeiro grupo ocorrem casos de RTT típica nas raparigas, enquanto nos rapazes ocorrem sintomas como encefalopatia neonatal severa e problemas respiratórios graves, existindo uma morte prematura. Rapazes com este tipo de mutações no gene *MECP2* são muito raros, pois são geralmente vítimas de um aborto ou geralmente morreram antes de atingirem dois anos de idade (20,35).

No caso de crianças do sexo masculino, por serem hemizigotas (46, XY), e por possuírem um único alelo no cromossoma X, padecem sempre, para este primeiro grupo de

mutações no gene *MECP2*, de um fenótipo severo e precoce de RTT. Por outro lado, o sexo feminino, por apresentar o cariotipo 46, XX, e porque ocorre no embrião a XCI (figura 1.4), as raparigas que apresentam este primeiro grupo de mutações no gene *MECP2*, têm um quadro de RTT típica, com uma esperança média de vida perfeitamente compatível com a idade adulta (35). Existe no sexo feminino uma diluição das células que expressam o cromossoma X mutado pelas células que expressam o cromossoma X não mutado no gene *MECP2*.

Na segunda categoria encontram-se as mutações que originam no sexo masculino casos de RTT clássico e que são acompanhadas por SK ou outro tipo de mosaicismo (figuras 1.4 e 1.5) (28). A SK é caracterizada como uma anomalia cromossómica, onde o indivíduo do sexo masculino apresenta dois ou mais cromossomas X em conjunto com o cromossoma Y, ao invés de apenas um cromossoma X. A existência concomitante de mosaicismo ou SK com mutações no gene *MECP2*, permite que haja um quadro clínico da RTT menos severo e dramático no sexo masculino, existindo assim um fenótipo de RTT típica, similar ao encontrado em raparigas. A presença de um destes fenómenos permite que haja uma “diluição” das células mutadas entre as células sem a mutação no gene *MECP2*, existindo por isso um quadro de RTT típica, com uma esperança média de vida superior à esperada e igual à encontrada no sexo feminino (28,35).

A terceira categoria de mutações no gene *MECP2* no sexo masculino são mutações que não estão identificadas no sexo feminino, mas que originam casos com sintomas neuropsiquiátricos em rapazes. O efeito destas mutações são menos severos, com anomalias motoras e atraso mental ligeiro a severo, equivalente ao observado em raparigas com RTT. Considerando o mosaicismo celular do cromossoma X no sexo feminino, com a respetiva “diluição” das células mutadas, e considerando simultaneamente o efeito menos severo destas mutações, a terceira categoria de mutações no gene *MECP2* originam casos assintomáticos ou com sintomas ligeiros nas raparigas, não existindo, geralmente, por este motivo, a identificação destas mutações no sexo feminino (20,35).

Pode-se ainda considerar uma quarta categoria para as mutações presentes no sexo masculino no gene *MECP2*. Esta última categoria é gerada a partir de duplicações do gene e origina um fenótipo no sexo masculino que abrange sintomas característicos da RTT, como a hipotonia infantil, atraso mental, perda parcial e/ou total da comunicação verbal e/ou capacidade motora, convulsões, rigidez muscular e infeções respiratórias recorrentes (20,27,35).

Deste modo, conclui-se que as mesmas mutações no gene *MECP2* causam fenótipos muito distintos no sexo feminino e no sexo masculino. Estima-se que esta diferença significativa se deva em grande parte aos cariótipos diferentes nos dois sexos, uma vez que, há uma diluição das células mutadas com as células não mutadas no sexo feminino, com o cariótipo 46, XX. Em contrapartida o sexo masculino, com o cariótipo 46, XY, não apresenta essa diluição, sendo que todas as suas células se encontram mutadas, a não ser que esteja presente o fenómeno da SK ou de mosaicismo celular. Tendo isto em conta é possível agrupar os fenótipos criados por mutações no gene *MECP2* em quatro categorias nos casos de indivíduos do sexo masculino. Esta forma de classificar estes fenótipos, doravante designado método de classificação A, encontra-se ilustrada no quadro 1.4 (20,28,35).

Quadro 1.4 - Método A – Este método ilustra quatro categorias para classificar fenótipos criados por mutações no gene *MECP2* no sexo masculino. Adaptado de Villard (35)

CATEGORIA DO FENÓTIPO	FENÓTIPO
<p>Fenótipos com mutações identificadas no sexo feminino e no sexo masculino (A1)*¹</p>	<p>No sexo masculino: Quadro clínico severo e raro. Encefalopatia severa. Aborto espontâneo. Problemas respiratórios graves. Esperança de vida inferior a 2 anos de idade.</p> <p>No sexo feminino: Quadro de RTT</p>
<p>Fenótipos com mutações acompanhadas de Síndrome de Klinefelter ou de Mosacismo Celular (A2)*¹</p>	<p>No sexo masculino: Quadro com sintomas típicos de RTT, semelhantes ao encontrado no sexo feminino.</p>
<p>Fenótipos pouco significativos no sexo feminino; Fenótipos menos severos no sexo masculino (A3)*¹</p>	<p>No sexo masculino: Anomalias motoras e/ou atraso mental ligeiro a severo.</p> <p>No sexo feminino: Sintomas pouco significativos. Quadros assintomáticos.</p>
<p>Fenótipos criado por duplicações no gene <i>MECP2</i></p>	<p>No sexo masculino: Hipotonia infantil, atraso mental, perda parcial e/ou total da comunicação verbal e/ou capacidade motora, convulsões, rigidez muscular e infecções respiratórias recorrentes</p>
<p>*¹ – As expressões A1, A2 e A3 são usadas ao longo do ponto 3, para referenciar as categorias de classificação de fenótipos, tendo em conta o método de classificação A</p>	

2 Método

2.1 Objetivos

A identificação, análise e classificação das mutações *missense* no gene *MECP2*, identificadas no sexo masculino e presentes na base de dados *RetBase*, teve como principais objetivos:

1. Estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo;
2. Comparar a severidade dos fenótipos apresentados nos dois sexos para as mutações em estudo;
3. Identificar, analisar e comparar, entre os dois sexos, a frequência das mutações em estudo no gene *MECP2* e nos seus respectivos domínios;
4. Testar e analisar a capacidade dos métodos de classificação das mutações no gene *MECP2* e os seus respectivos fenótipos;
5. Analisar a abrangência e as informações contidas na base de dados *RetBase*, relativas às mutações *missense*, identificadas no sexo masculino, tendo em conta a literatura científica;
6. Identificar e analisar a possível existência de uma correlação entre os domínios da proteína MeCP2 e a severidade dos quadros clínicos apresentados.

2.2 Método de classificação B

Neste trabalho é apresentado um novo método para classificar as mutações identificadas no gene *MECP2* no sexo masculino, o método B. Este método é apresentado pela primeira vez neste trabalho e não se encontra mencionado na literatura científica. Este tem em conta os fenótipos criados nos dois sexos, de forma a estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo. Sabe-se que para uma determinada mutação, é expectável que o fenótipo observado no sexo masculino seja, geralmente, sempre mais severo, quando comparado com o quadro clínico no sexo feminino (35). Com esta linha de pensamento é possível categorizar as mutações segundo o grau de gravidade dos quadros clínicos a que dão origem, possibilitando o estabelecimento de uma correlação genótipo/fenótipo. O método B baseia-se no método proposto por Villard (2007) (35), mas procura completá-lo. Isto porque os fenótipos apresentados pelas mutações

MECP2 são muito diversificados, com quadros clínicos de severidade diversa (32,33). Deste modo, o método B procura contextualizar e prever esta mesma diversidade. Este novo método de classificar as mutações no gene *MECP2* está ilustrado no quadro 1.5.

O método A afirma que sem a presença de fatores que influenciam a severidade dos fenótipos (SK e mosaicismo), os fenótipos no sexo masculino resumem-se apenas a duas categorias: a categoria A1 e A3 (35). O método B procura categorizar estas mutações, através de uma classificação mais ampla de forma a responder à diversidade encontrada nos quadros sintomatológicos apresentados pelas mutações no gene *MECP2*. Para isso, categoriza as mutações segundo o grau de severidade dos fenótipos a que dão origem, tendo em conta que os fenótipos identificados, para a mesma mutação, no sexo masculino são sempre mais severos quando comparados com os fenótipos no sexo feminino. O método B deve-se ajustar quando existem interferências de outros fatores modeladores da severidade dos fenótipos, como a SK, o mosaicismo para a mutação, e uma XCI enviesada, uma vez que o método B não considera a presença de nenhum destes fatores.

O método B ao ter em conta a grande diversidade de fenótipos apresentados pelas mutações no gene *MECP2* considera a existência de categorias intermédias. Considerando que as categorias B1, B2, B3 e B4 pretendem quantificar a severidade dos quadros clínicos apresentados pelas mutações no gene *MECP2*, torna-se necessário a criação de categorias intermédias que preveem fenótipos com severidades intermédias. Estas categorias intermédias estipulam fenótipos que partilham características sintomatológicas de duas categorias adjacentes, ou seja, apresenta uma severidade intermédia entre as severidades estipuladas para as duas categorias adjacentes em questão. Estas categorias estão representadas no quadro 1.5. No ponto 3 o método B é colocado à prova de forma a avaliar a capacidade do mesmo para contextualizar e prever a realidade dos quadros sintomatológicos reportados para as mutações no gene *MECP2*.

O método B enquadra na sua classificação dois fenótipos distintos da RTT, mas muito característicos de mutações no gene *MECP2*. Estes são o fenótipo de atraso mental inespecífico associado ao cromossoma X (XLMR) e o fenótipo associado à perturbação do espectro de autismo (7,35,61). Como estes fenótipos não apresentam necessariamente os sintomas extremamente incapacitantes e necessários para o diagnóstico de RTT, o método B categoriza estes dois fenótipos como menos severos comparativamente à severidade dos quadros clínicos de RTT. Estão englobados nos sintomas principais para o diagnóstico de RTT, referidos

anteriormente, a perda total ou parcial da capacidade motora, as anomalias na locomoção, os distúrbios na respiração, tremores, convulsões, epilepsia e distúrbios no sono. O método B quando se refere ao fenótipo XLMR considera um fenótipo caracterizado por um quadro de atraso mental, sem outros sintomas significativos de RTT associados. Isto porque os fenótipos com quadros de atraso mental, associados a outros sintomas típicos de RTT estão enquadrados na categoria B3 e B4 para o sexo masculino e feminino, respetivamente (7,25).

Quadro 1.5 - Método B - O método B ilustra sete categorias de mutações no gene *MECP2* no sexo masculino, considerando o fenótipo criado nos dois sexos. Este método tem em conta a gravidade dos sintomas criados pelas diversas mutações. As setas indicam que o fenótipo encontrado no sexo masculino numa dada categoria, corresponde ao fenótipo encontrado no sexo feminino da categoria subsequente. Quanto maior o número da categoria, maior será a gravidade dos sintomas associados à presença da mutação. As categorias nas linhas amareladas correspondem a categorias intermédias. Esta forma de correlação genótipo/fenótipo não tem em conta a presença da SK, de mosaicismo para a mutação ou a inativação enviesada do cromossoma X

FENÓTIPO		CATEGORIA DA MUTAÇÃO *1
MASCULINO	FEMININO	
Assintomático	Assintomático / Não existem casos identificados	B1
Quadros clínicos com sintomas pouco severos ou pouco significativos, típicos da RTT. Fenótipo de XLMR e/ou de Autismo	Assintomático / Não existem casos identificados	B2
Quadros clínicos com sintomas típicos da RTT.	Quadros clínicos com sintomas pouco severos ou pouco significativos, típicos da RTT Fenótipo de XLMR e/ou de Autismo	B3
Quadros clínicos com sintomas típicos da RTT severos e extremamente incapacitantes, geralmente incompatíveis com a vida. Existe uma morte prematura com poucos anos de idade.	Quadros clínicos com sintomas típicos da RTT.	B4
Fenótipos que partilham características sintomatológicas da categoria B1 e categoria B2		B1-B2 *2
Fenótipos que partilham características sintomatológicas da categoria B2 e categoria B3		B2-B3 *2
Fenótipos que partilham características sintomatológicas da categoria B3 e categoria B4		B3-B4 *2
* 1 - As expressões B1, B2, B3, B4, B1-B2, B2-B3 e B3-B4 são usadas ao longo do ponto 3, para referenciar as categorias de mutações, tendo em conta o método de classificação B		
* 2 - Categorias intermédias		

2.3 Mutações em estudo

Para cumprir os objetivos propostos procedeu-se à identificação e recolha de todas as mutações *missense* no gene *MECP2* identificadas no sexo masculino e presentes na base de dados *RettBase* (62), utilizando a opção “*Advanced Search*” disponibilizada pela base de dados. A recolha e análise das mutações através da base de dados *RettBase* decorreu entre o mês de dezembro de 2022 e o mês de maio de 2023.

A isoforma MeCP2_e2 foi a primeira a ser identificada, pelo que, na literatura, geralmente, as mutações descritas têm como referência esta isoforma (63). Assim, ao longo desta monografia utilizou-se esta isoforma como referência.

2.3.1 Critérios de exclusão para o conjunto de mutações em estudo

Tendo em conta o conjunto de mutações em estudo - as mutações *missense* identificadas no gene *MECP2* no sexo masculino e presentes na base de dados *RettBase* - excluíram-se deste conjunto as mutações que apresentassem algum dos seguintes critérios de exclusão:

1. Mutações que não são acompanhadas de um artigo publicado que cita a mutação em estudo;
2. Mutações identificadas em indivíduos mas o sexo do indivíduo não é especificado;
3. Mutações em que no artigo científico em que a mesma é citada não são apresentados os dados clínicos suficientes para a análise do fenótipo.

Estes critérios de exclusão têm em conta os objetivos propostos, que pretendem estudar apenas as mutações identificadas no sexo masculino e a análise dos fenótipos criados pelas mutações em estudo, de forma a identificar uma correlação entre genótipo/fenótipo, sendo que para este último são necessários dados clínicos.

As informações sintomatológicas contidas na *RettBase* são muito limitadas. Por isso foram excluídas as mutações sem nenhum artigo publicado. Como se pretende classificar as mutações em estudo segundo os métodos de classificação A e B, é necessário confirmar o sexo do indivíduo no qual a mutação está presente, sendo por isso excluídas as mutações identificadas em indivíduos onde o mesmo não é especificado. Também é igualmente

importante ter descrições completas dos quadros sintomatológicos, de forma a possibilitar uma análise da severidade do quadro clínico, sendo que esta análise é condição necessária para classificar as mutações em estudo através dos métodos A e B. Por isso foram excluídas mutações onde existe uma descrição incompleta dos quadros sintomatológicos.

Após proceder-se à identificação e recolha de todas as mutações *missense* no gene *MECP2*, identificadas no sexo masculino e presentes na base de dados *RetBase* (62), e após a exclusão das mutações com base nos critérios de exclusão acima apresentados, estabeleceu-se uma amostra de 54 mutações.

2.4 Correlação genótipo fenótipo

Para a realização de uma correlação genótipo/fenótipo procedeu-se à classificação das mutações identificadas segundo os métodos de classificação evidenciadas nos quadros 1.4 e 1.5. Deste modo, analisaram-se os fenótipos associados às mutações em estudo, tanto no sexo masculino como no sexo feminino. Para a análise dos fenótipos utilizou-se os casos descritos na base de dados *RetBase* e na literatura científica.

Classificaram-se primeiramente os fenótipos identificados para cada mutação segundo o método A. Para este método podem existir diversas categorias para apenas uma mutação. Isto porque, no método A, a mesma mutação pode originar dois fenótipos completamente diferentes dependendo da presença da SK ou de mosaicismo. Assim, para a mesma mutação pode-se originar uma encefalopatia severa (categoria A1), ou originar um quadro menos severo (categoria A2), na presença de mosaicismo ou SK (35).

Posteriormente, classificou-se cada mutação segundo o método B, tendo em conta os quadros clínicos apresentados. O método B assume como princípio, para a classificação das mutações, a ausência de fatores que possam influenciar a severidade do fenótipo, nomeadamente a SK, o mosaicismo e a inativação enviesada do cromossoma X. Admitindo que não existe esta influência, uma mutação no gene *MECP2* origina um fenótipo com uma severidade estipulada, sendo possível a atribuição de uma categoria B1, B2, B3, B4, B1-B2, B2-B3 e B3-B4. Deste modo, é possível realizar uma correlação genótipo/fenótipo tendo em conta os quadros clínicos apresentados nos dois sexos.

2.5 Polimorfismos benignos no gene *MECP2*

Ao longo da análise procedeu-se à identificação de mutações que provocam um efeito desconhecido na estrutura e função da proteína MeCP2. Estas mutações podem ser não patogénicas ou polimorfismos genéticos raros (64,65). Como indica também a literatura científica, quadros clínicos típicos de mutações no gene *MECP2*, como o quadro de RTT, podem ter origem através de mutações noutros genes, como o gene *FOXG1* ou o gene *CDKL5* (7,21).

Como este estudo pretende analisar uma grande amostra de casos identificados com mutações no gene *MECP2* e estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo através da análise, torna-se importante conferir se as mutações no gene *MECP2* são a real causa para a origem dos fenótipos identificados. Para este efeito, utilizou-se o programa *Polymorphism Phenotyping v2* (*PolyPhen-2*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), um programa que permite prever o impacto de mutações *missense* na estrutura e estabilidade das proteínas. Assim, o *PolyPhen-2* permite avaliar, com base neste impacto, a probabilidade de uma mutação ser ou não patogénica, através de uma escala (*score*) de 0 a 1, onde os valores perto de 0 significam que a mutação não é patogénica, e valores perto de 1 significam que a mutação é prevista ser patogénica (66). Usou-se o modelo *HumDiv* do programa *PolyPhen-2* para realizar as avaliações da patogenicidade das mutações em estudo. Deste modo, classificou-se as mutações identificadas como não patogénicas quando obedecem às duas premissas seguintes:

- ❖ **1ª premissa:** O(s) artigo(s) científico(s) que identifica(m) a mutação em estudo deve(m) identificar uma elevada probabilidade de a mutação ser não patogénica. Para isso o(s) artigo(s) deve(m) identificar a mutação em um ou mais casos masculinos assintomáticos;
- ❖ **2ª premissa:** O programa *PolyPhen-2* deve classificar a mutação como “benigna” ou “possivelmente patogénica”.

As mutações que cumpram simultaneamente as duas premissas anteriores são consideradas como não patogénicas, e por isso são classificadas, ao longo deste estudo, com a categoria B1 do método B. A categoria B1 enquadra-se nesta classificação, uma vez que segundo os critérios de classificação da categoria B1, a mutação origina fenótipos assintomáticos nos dois sexos. Por outro lado, o método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas, uma vez que só contempla fenótipos com

sintomatologia associada. Assim, o método A não classificou estes fenótipos portadores de polimorfismos benignos no gene *MECP2*.

A metodologia descrita acima permite evitar que se classifiquem polimorfismos raros no gene *MECP2* como mutações patogénicas, através dos métodos A e B em indivíduos que apresentem quadros clínicos com sintomatologia associada (35).

2.6 Avaliação do método de classificação B

Considerando a referência a um novo método de classificação para as mutações no gene *MECP2* no sexo masculino, o método B, desenvolvido neste trabalho, e não tendo sido anteriormente testado ou referido na literatura científica, foi realizado uma avaliação do método. Esta avaliação pretende avaliar a capacidade do método B para realizar uma correlação genótipo/fenótipo, tendo em conta os fenótipos identificados nos dois sexos. Para isso, foram analisados os diversos quadros clínicos apresentados pelas mutações em estudo nos dois sexos, sendo que após esta análise, foi alocada, se possível, uma categoria B1, B2, B3, B4, B1-B2, B2-B3 ou B3-B4 às mutações em estudo.

Desta forma, estabeleceu-se que se é possível alocar uma categoria à mutação, cumprindo simultaneamente os critérios sugeridos para as categorias do método B indicados no quadro 1.5 e a metodologia indicada no presente estudo, o método recebe automaticamente uma classificação “Eficaz”. Se não é possível, de nenhuma forma, usar as categorias do método B para realizar uma correlação genótipo/fenótipo, o método é classificado como “Ineficaz”. Para cada mutação são apresentados os argumentos e observações que foram tidos em conta na categorização das mutações e na avaliação do método.

No final, realizou-se uma avaliação global do método B, tendo em conta a sua eficácia e capacidade para realizar uma correlação genótipo/fenótipo. Para a realização desta avaliação global foi realizado o somatório das classificações atribuídas a cada mutação, tendo em consideração as duas formas de avaliar o método B. No final foi analisado esse valor numérico tendo em conta a amostra das mutações em estudo (54 mutações). Esta metodologia usada para a avaliação global do método B está ilustrada na Figura 2.1.

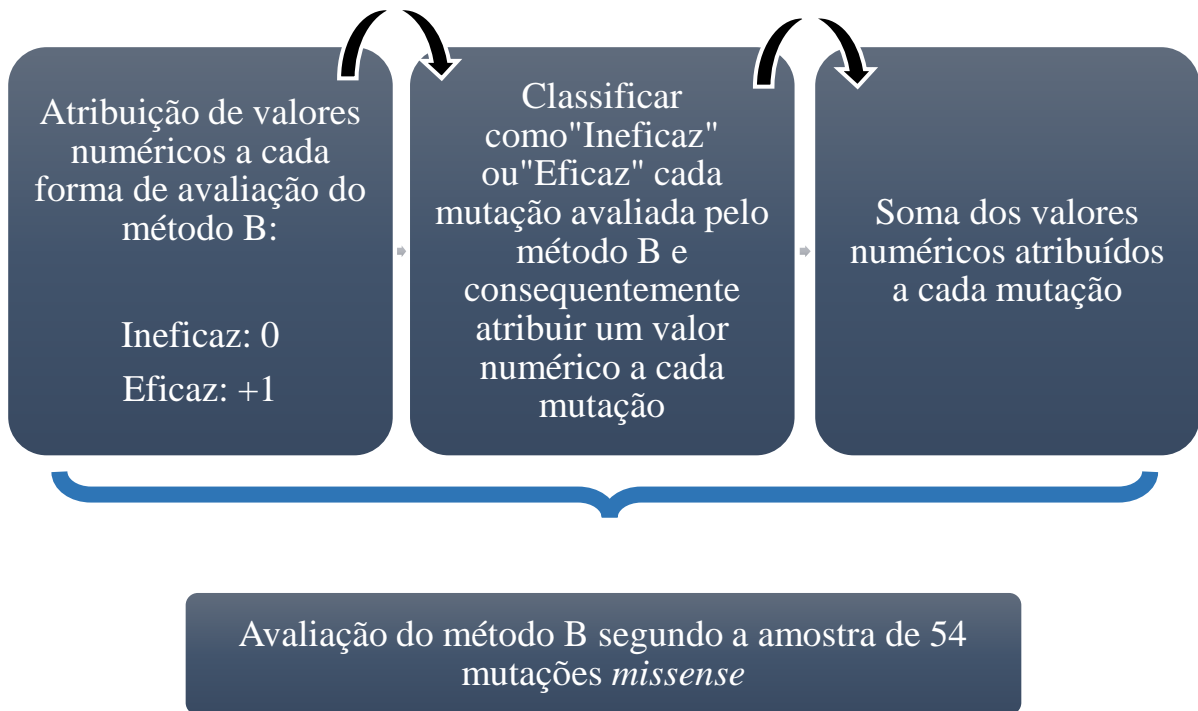


Figura 2.1 – Avaliação da capacidade do método B - Metodologia adotada para avaliar a capacidade do método B para realizar uma correlação genótipo/fenótipo tendo em conta os fenótipos identificados nos dois sexos para as mutações em estudo

3 Resultados

3.1 Mutações nos domínios 5'UTR, 3'UTR, NTD e nos intrões

Não são referidas mutações nas regiões 3'UTR, 5'UTR e nos intrões, uma vez que não existem casos de mutações nestas zonas na base de dados *RettBase*. Esta base de dados refere duas mutações *missense* no domínio NTD, no entanto, estas duas mutações foram excluídas da amostra em estudo, uma vez que ambas estavam englobadas pelos critérios de exclusão (Quadro 4.1).

3.2 Mutações no domínio MBD

3.2.1 p.K82R (c.245 A -> G)

A mutação K82R foi identificada durante um estudo relativo a variações na sequência do gene *MECP2*. Verificou-se a presença desta mutação num rapaz caucasiano saudável, sem história familiar de doenças neuropsiquiátricas, sendo por isso incluído no grupo controlo do estudo. Por esta razão, considerou-se que a presença desta mutação não é patogénica (67).

Não se encontrou referência, para além deste estudo, de mais nenhum caso identificado para a mutação K82R, sendo que no sexo feminino esta mutação nunca foi identificada. No resíduo K82 origina-se uma PTM, nomeadamente uma ubiquitinação, que poderá regular a atividade da proteína MeCP2 (68,69). De qualquer modo, a mutação K82R não altera as propriedades da cadeia peptídica, e por isso não altera a estrutura secundária da MeCP2. É por este motivo que se infere a não patogénica da mutação e a inexistência de mais casos identificados com esta mutação (70). Ao utilizar o programa *PolyPhen-2* para analisar a capacidade patogénica da mutação, o mesmo classifica a mutação K82R como “benigna” com um *score* de 0,384. Este caso foi analisado segundo os critérios de classificação do método A. Esta análise está ilustrada no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K82R, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	Este método só tem em conta mutações que originam fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).

N/A – Não aplicável

3.2.1.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.K82R segundo o método de classificação B (Quadro 3.2), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.2 - Classificação da mutação p.K82R, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B1	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria B1. Não se encontrou casos identificados no sexo feminino, e no sexo masculino dá origem a quadros assintomáticos

3.2.2 p.R106W (c.316 C ->T)

Para esta mutação foram identificados três casos no sexo masculino, sendo que dois destes casos eram irmãos. Todos eles apresentavam um cariótipo normal 46, XY. O primeiro caso evidencia um quadro clínico intermédio devido à presença de mosaicismo somático para a mutação em estudo. Por sua vez, os dois irmãos apresentavam um quadro clínico bastante

severo. O irmão mais novo morreu com 17 meses de idade, e o irmão mais velho morreu com 30 meses de idade, devido aos seus sintomas respiratórios graves (71,72).

Caso 1: Referente a um rapaz de 14 anos com um quadro clínico de severidade intermédia. Este desenvolveu-se normalmente até aos 18 meses de idade, até que foi identificada uma encefalopatia e sintomas associados à Perturbação do Espectro do Autismo. Surgiram posteriormente os movimentos estereotipados nas mãos, a perda da comunicação verbal previamente adquirida e comportamento disruptivo. Apesar do seu quadro clínico, este rapaz apresentava a capacidade de pronunciar palavras soltas e de ler frases simples, tendo conseguido finalizar a escola primária especializada em alunos com necessidades especiais. Após se verificar que a mãe não apresentava a mutação R106W, concluiu-se que a mutação era do tipo *de novo*, surgindo numa fase pós-zigótica (figura 1.5), o que poderá explicar o mosaïcismo celular para a mutação no rapaz (72). O Quadro 3.3 ilustra a classificação deste caso segundo o método A.

Quadro 3.3 - Classificação do caso 1 com a mutação p.R106W, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A2	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A2. Existe a presença de mosaïcismo para a mutação, com um quadro clínico intermédio. Esta mutação, quando presente no sexo feminino, origina um quadro de RTT clássico (6).

Casos 2 e 3: Dois irmãos, ambos com quadros clínicos muito severos. O irmão mais novo, pouco tempo depois de nascer, apresentava apneia, sendo internado na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais. Foram detetados sintomas como encefalopatia, respiração irregular, refluxo gastroesofágico, hipotonia, incapacidade de sustentar a cabeça, eletroencefalografia (EEG) anormal e um desenvolvimento psicomotor profundamente atrasado. Aos 8 meses de idade foi necessário a colocação de uma sonda nasogástrica e, aos 11 meses, surgiram os movimentos estereotipados na cabeça, sendo que este último sintoma era proeminente, ao ponto de causar uma fratura na mandíbula. Os problemas respiratórios agravaram-se aos 13 meses de idade, sendo necessária a colocação de uma máscara nasal. Aos 16 meses padecia de uma severa bradicardia, sendo que devido a esta última situação, a criança faleceu aos 17 meses de idade. O irmão mais velho apresentou uma história clínica muito semelhante, com um quadro igualmente severo, acabando por falecer aos 30 meses de idade

devido a complicações respiratórias (71). O Quadro 3.4 ilustra a classificação destes dois casos através do método A, tendo em conta os fenótipos identificados nos dois irmãos.

Quadro 3.4 - Classificação dos casos 2 e 3 com a mutação p.R106W, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A1	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A1. Esta mutação, quando presente no sexo feminino, origina um quadro de RTT clássico (6). Tendo isto em conta, esta mutação origina no sexo masculino um fenótipo bastante severo, geralmente incompatível com a vida, com sintomas a surgirem numa fase muito precoce da vida da criança, e uma esperança média de vida de aproximadamente 2 anos de idade.

Ao analisar esta mutação pode-se concluir que esta apresenta a capacidade para originar quadros clínicos bastante severos no sexo masculino, com sintomas severos a surgirem numa fase muito precoce da vida da criança. A esperança média de vida nestes casos é inferior a três anos de idade, considerando o historial clínico dos dois irmãos. O primeiro caso referenciado apresenta uma história clínica bastante diferente, em grande parte, devido à presença do mosaïcismo somático para a mutação R106W, permitindo deste modo a existência de um quadro clínico menos severo e a sobrevivência do rapaz.

3.2.2.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.R106W segundo o método de classificação B (Quadro 3.5), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B4.

Quadro 3.5 - Classificação da mutação p.R106W, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B4	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria B4. Esta mutação, quando presente no sexo feminino, origina um quadro de RTT clássico (6). Tendo isto em conta, esta mutação origina no sexo masculino um fenótipo bastante severo, geralmente incompatível com a vida, com sintomas a surgirem numa fase muito precoce da vida da criança, e uma esperança média de vida de aproximadamente dois anos de idade. No entanto, no sexo feminino origina quadros típicos de RTT com severidade intermédia.

3.2.3 p.V122A (365 T ->C)

Identificou-se a mutação V122A em diversos membros de uma família com traços sintomatológicos típicos da RTT. A mutação foi primeiramente identificada num rapaz com atraso mental. Este caso foi objeto de estudo para esta mutação. O seu quadro clínico agravou-se aos 16 anos de idade, ao perder a capacidade de caminhar e ao apresentar espasticidade nos quatro membros, epilepsia, discinesia e sintomas extrapiramidais. Foi observado também atrofia cerebral e uma EEG anormal. O seu quadro clínico agravou-se ao longo dos meses, acabando por falecer com 19 anos de idade devido a um quadro de pneumonia (73).

A mãe deste rapaz era portadora da mutação e apresentava esquizofrenia e um ligeiro atraso mental. Por fim, o último membro desta família que apresentava também a mutação V122A era a tia do rapaz, irmã da sua mãe. A tia apresentava apenas um atraso mental ligeiro e tinha dois filhos. Apesar de não ter sido possível confirmar a presença da mutação nos dois filhos, estes apresentaram um quadro clínico muito semelhante ao seu primo, o rapaz objeto deste estudo. Estes dois irmãos acabaram por morrer devido à deterioração do seu quadro clínico, tal como o seu primo, aos 9 e aos 14 anos de idade, respetivamente (73).

Conclui-se que esta mutação esteve no seio desta família e foi transmitida à descendência através da mãe do rapaz em estudo. Ao analisar-se os fenótipos, pode-se observar que os familiares do sexo masculino, o rapaz e os seus dois primos, apresentaram um quadro clínico mais severo, acabando por morrerem numa idade muito precoce, devido à deterioração dos seus quadros clínicos. Por outro lado, ao analisar os sintomas dos familiares do sexo feminino, a mãe e a tia do rapaz, conclui-se que os seus quadros clínicos são significativamente menos severos, com apenas traços ligeiros de atraso mental e a presença de esquizofrenia na mãe do rapaz (73). Não houve mais nenhum caso descrito para esta mutação nos dois sexos para além destes casos identificados neste agregado familiar. Assim, foi com base nestes casos familiares que o Quadro 3.6 ilustra a classificação dos presentes fenótipos segundo o método A.

Quadro 3.6 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.V122A, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Esta classificação tem em conta os quadros pouco severos ou pouco significativos na mãe e na tia do rapaz usado como objeto de estudo, e os sintomas mais graves, típicos da RTT, nos rapazes deste agregado familiar (73)

3.2.3.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.V122A segundo o método de classificação B (Quadro 3.7), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B3.

Quadro 3.7 - Classificação da mutação p.V122A, através do método B. O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B3	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria B3. Os quadros clínicos identificados nos rapazes apresentam sintomas típicos da RTT, enquanto os casos identificados no sexo feminino são de quadros clínicos pouco significativos (73)

3.2.4 p.R133C (c.397 C ->T)

Esta mutação foi referida em dois rapazes, sendo que ambos os casos apresentavam um quadro clínico severo, com sintomas típicos de RTT, embora apenas um tivesse sido diagnosticado com a RTT, devido à falta de critérios de diagnóstico suficientes. Ambos os rapazes apresentavam um cariótipo normal 46, XY. Também foram realizados, em ambos os casos, estudos para a detecção de mosaicismo celular, não tendo este sido detetado (74,75).

O primeiro caso caracteriza um rapaz com idade de 10 anos, com hipotonia. Neste caso as convulsões surgiram aos quatro anos de idade e os movimentos estereotipados nas mãos aos cinco anos de idade. Apresentava uma respiração irregular e uma perda da locomoção progressiva, sendo que aos sete anos de idade ficou acamado devido à incapacidade total de locomoção. Aos dez anos houve a necessidade de realizar a alimentação via sonda. Por sua vez, o segundo caso identificado para esta mutação, no sexo masculino, era de um rapaz de dois anos de idade, com movimentos estereotipados nas mãos, perda parcial da capacidade motora nas mãos e perda total da locomoção devido a tremores e convulsões severas (74,75).

Estes casos identificados no sexo masculino para a mutação p.R133C são bastante severos. Apresentam sintomas típicos de RTT mas com uma severidade muito acentuada. Por outro lado, esta mesma mutação origina no sexo feminino um quadro clínico com sintomas característicos de RTT, associada à variante Zappella ou variante da preservação da linguagem (ver Quadro 1.3), onde o quadro clínico é menos severo. Existem casos, no sexo feminino, em que esta mutação origina quadros clínicos assintomáticos, ou quadros clínicos de RTT típica, dependendo do enviesamento da XCI.

Ao comparar os quadros sintomatológicos apresentados por esta mutação nos dois sexos, verifica-se que o fenótipo no sexo masculino é mais severo quando comparado com o fenótipo no sexo feminino. Como o fenótipo no sexo feminino para esta mutação é um quadro de RTT menos severo, devido à associação desta mutação com a variante Zappella, pode-se inferir que no sexo masculino esta mutação também poderá originar um quadro menos severo. O método A afirma que para uma mutação que origina um quadro de RTT no sexo feminino, é expectável que o quadro clínico no sexo masculino seja bastante severo, com problemas respiratórios graves e uma esperança média de vida inferior a dois anos de idade. Por sua vez, seguindo o estabelecido para o método B, uma mutação que origina um quadro de RTT no sexo feminino, é expectável que o quadro clínico no sexo masculino seja bastante severo e

extremamente incapacitante, geralmente incompatível com a vida, existindo por isso uma morte com poucos anos de idade.

Ambos os métodos extrapolam para o sexo masculino um quadro clínico bastante severo com uma morte prematura devido aos sintomas incapacitantes. Apesar dos quadros sintomatológicos bastante severos nos dois casos masculinos, ambos permanecem vivos, sendo que o primeiro caso aqui apresentado apresenta 10 anos de idade, ou seja, uma idade superior à esperança média de vida descrita e expectável para os métodos A e B. Com isto, pode-se concluir que a severidade dos quadros clínicos associada a esta mutação não é tão severa como demonstram os critérios das categorias A1 e B4, dos métodos A e B, respetivamente, uma vez que não origina no sexo masculino sintomas incompatíveis com a vida. Assim pode-se afirmar que esta mutação não obedece aos critérios descritos pelas categorias A1 e B4, do método A e B, respetivamente.

Ao analisar-se a categoria adjacente do método B, a categoria B3, não se pode afirmar que os sintomas apresentados por esta mutação sejam pouco significativos no sexo feminino, porque, apesar de menos severos, existem casos identificados de RTT típica e atípica no sexo feminino para esta mutação. Deve-se aplicar nesta mutação a categoria intermédia B3-B4. Ao analisar-se, através do método A, esta mutação, não se consegue categorizar segundo os critérios descritos pelas categorias A1 e A3, uma vez que a severidade dos quadros clínicos associados a esta mutação nos dois sexos é de severidade intermédia entre as categorias A1 e A3 do método A. O Quadro 3.8 ilustra a classificação efetuada segundo o método A para a mutação p.R133C.

Quadro 3.8 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R133C, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Entre A1 e A3 (ineficaz)	Não se pode afirmar que esta mutação faz parte da categoria A1, pois apesar do quadro clínico bastante severo nos casos identificados no sexo masculino, a esperança média de vida observada é superior à expectável para a categoria A1. Por outro lado, não se pode aplicar a categoria A3 pois esta mutação causa quadros clínicos significativos nos casos identificados no sexo feminino, com quadros de RTT típica e atípica (74–78).

Estes casos evidenciam a ambiguidade da classificação desta mutação entre a categoria A1 e A3, através dos critérios de classificação do método A, uma vez que a mutação origina um quadro clínico, nos dois sexos, com uma severidade intermédia entre estas duas categorias. O método B tem isto em conta e espera classificar estas mutações segundo a severidade expectável nos quadros sintomatológicos criados pelas mutações em estudo, pretendendo criar categorias que possam quantificar esta mesma severidade. Este caso suporta a importância de ter em conta, na classificação das mutações, o fator severidade, e a importância de quantificá-lo considerando os quadros sintomatológicos identificados para estas mutações.

3.2.4.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.R133C segundo o método de classificação B (Quadro 3.9), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria intermédia B3-B4.

Quadro 3.9 - Classificação da mutação p.R133C, através do método B - O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B3-B4	EFICAZ (+1)	Esta mutação está entre as categorias B3-B4 pelas razões expostas anteriormente. Apesar do quadro clínico bastante severo nos casos identificados no sexo masculino, a esperança média de vida observada é superior à expectável para a categoria B4. Por outro lado, não se pode aplicar a categoria B3 pois esta mutação causa quadros clínicos significativos nos casos identificados no sexo feminino, com quadros de RTT típica e atípica, apesar de menos severos (74–78).

3.2.5 p.R133H (c.398 G ->A)

Existe na *RettBase* um caso no sexo masculino com a mutação R133H, referente a um rapaz de 14 anos. Este foi diagnosticado com RTT típica, através dos critérios de diagnóstico do Grupo de Trabalho de 1988 (79). Este rapaz apresentava oito dos nove critérios principais, nomeadamente um período peri-natal normal, neurodesenvolvimento normal até aos doze meses de idade, microcefalia adquirida, perda do controlo motor previamente adquirido nas mãos, perda da capacidade previamente adquirida de comunicar verbalmente, movimentos estereotipados nas mãos e dispraxia. Não apresentava nenhum dos critérios de exclusão e tinha sete dos oito critérios de suporte: ataques epiléticos, irregularidades na respiração, EEG anormal, espasticidade, disfunção vasomotora, escoliose e atraso no crescimento. Com 13 anos este rapaz possuía ainda a capacidade de locomoção e de caminhar (80,81). É importante referir que neste caso foi identificado um mosaïcismo somático para a mutação R133H, o que influencia significativamente o fenótipo da RTT. Pode-se, por isso, inferir que o fenótipo expectável para a mutação R133H, no sexo masculino, seria um fenótipo mais severo do que o exposto anteriormente (80,81). Esta mutação é bastante rara, mas nos casos identificados no sexo feminino origina quadros de RTT com severidade intermédia (82–84). Considerando os fenótipos apresentados no sexo feminino e o quadro clínico identificado no sexo masculino na *RettBase* para esta mutação, é possível classificar este caso através do método A. O Quadro 3.10 ilustra esta classificação.

Quadro 3.10 - Classificação do fenótipo, referido na *RettBase*, com a mutação p.R133H, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A2	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A2. Neste caso existe um mosaïcismo para a mutação em estudo o que permite atenuar o quadro sintomatológico. Deste modo, é possível encontrar um quadro clínico semelhante ao encontrado no sexo feminino. Esta mutação origina quadros de RTT, com severidade intermédia no sexo feminino (82–84).

Existe na literatura a referência a mais um segundo caso masculino identificado com a mutação R133H, embora este não esteja presente na *RettBase*. Para este caso não existe nenhuma menção de mosaïcismo, pelo que se verifica um quadro clínico significativamente

mais severo que o caso mencionado anteriormente (85). Este último caso apresentou, desde o nascimento, hipotonia e desenvolveu convulsões aos seis meses de idade. Apresentava também atrasos no seu desenvolvimento, um EEG anormal, hipoplasia cerebral e encefalopatia. Realizou medicação com ácido valpróico, clonazepam e fenobarbital para controlar os ataques convulsivos, que ocorreram mais de cem vezes num período de 2 anos. Aos vinte e seis meses de idade a dificuldade respiratória agravou-se e teve episódios recorrentes de pneumonia por aspiração, sendo por isso realizada uma traqueostomia e subsequentemente o uso de um ventilador. Outros sintomas incluem movimentos estereotipados nas mãos, risos/gargalhadas/berros inapropriados, resposta diminuída ao estímulo da dor, mãos e pés pequenos e frios, padrão de sono anormal e distúrbios na respiração (85). O Quadro 3.11 ilustra a classificação para este último caso, segundo o método A.

Quadro 3.11 - Classificação do segundo caso com a mutação p.R133H, tendo em conta o método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A1	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A1. Existe um quadro sintomatológico bastante severo, com sintomas graves a surgirem numa fase muito precoce da vida da criança. No sexo feminino o quadro clínico encontrado é de RTT típica com severidade intermédia (82–84).

Ao analisar estes dois quadros clínicos observa-se que o último é significativamente mais grave, em grande parte, devido à presença do mosaicismo celular para a mutação no primeiro caso descrito.

3.2.5.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.R133H segundo o método de classificação B (Quadro 3.12), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B4.

Quadro 3.12 - Classificação da mutação p.R133H, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B4	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B4. Esta mutação é bastante rara, mas nos casos identificados no sexo feminino origina quadros de RTT, com severidade intermédia (82–84). Tendo isto em conta, é expectável que no sexo masculino origine quadros clínicos graves, o que se verifica com a descrição do último caso no sexo masculino. O caso identificado na <i>RettBase</i> não se enquadra na classificação B4 devido à presença do mosaicismo celular para a mutação em estudo, que influencia consideravelmente o fenótipo, assemelhando-se este ao do sexo feminino.

3.2.6 p.S134C (c.401 C ->G)

A *RettBase* refere um caso masculino com a mutação S134C. Este é um caso de um rapaz com diagnóstico de RTT de severidade intermédia e com um cariótipo normal 46, XY. Este apresentou um desenvolvimento normal até aos 6 meses de idade, apesar de revelar nesse período sinais de hipotonia. O rapaz ao longo dos seus primeiros meses de vida desenvolveu-se normalmente ao adquirir capacidades motoras, como a capacidade de rebolar, de se sentar e de alcançar objetos com as mãos e agarrá-los (86).

O seu desenvolvimento estagnou aos 15 meses de idade, sendo encaminhado para avaliação clínica com claros sinais de hipotonia, falta de peso e falta de equilíbrio. Aos 18 meses começaram a surgir novos sintomas, como o babar em excesso, dificuldades na alimentação, refluxo gastroesofágico, estrabismo, ataxia e contrações musculares involuntárias. Aos dois anos de idade, os tremores agravaram-se e foi verificada uma desaceleração no crescimento, com a identificação de uma microcefalia. Aos cinco anos de idade, surgiram as convulsões e foi iniciado tratamento com anticonvulsivantes, sendo que meses depois surgiram outros sinais clínicos como osteoporose, ptose na pálpebra direita, distúrbios respiratórios, distúrbios do

sono, rigidez muscular nos membros superiores e inferiores e perda da capacidade motora nas mãos com o surgimento de movimentos estereotipados nas mãos. As convulsões e os distúrbios alimentares persistiram aos dez anos de idade, sendo por isso necessário a realização de uma gastrostomia, com a colocação de uma sonda de alimentação (86).

Na literatura científica existem diversos casos de raparigas com a mutação S134C. Todos estes casos femininos são referentes a casos de RTT com uma severidade intermédia (87–92). Assim, tanto o caso masculino aqui detalhado, como os casos femininos, obedecem aos critérios de diagnóstico da RTT, originando fenótipos de igual severidade. Deste modo, a mutação S134C não obedece ao critério obrigatório para que os métodos de classificação A e B sejam eficazes na seriação das mutações no gene *MECP2* e dos seus respetivos fenótipos. Este critério afirma que os fenótipos criados no sexo masculino, para cada mutação, são sempre mais severos quando comparados com os fenótipos associados a essa mesma mutação no sexo feminino (35). O Quadro 3.13 e o Quadro 3.14 ilustram a ineficácia dos métodos A e B na classificação da mutação S134C e dos seus respetivos fenótipos. No presente trabalho, as classificações realizadas pelos métodos A e B, para a mutação S134C, assumem que o caso masculino não apresenta qualquer tipo de mosaicismo para a mutação, sendo por isso ineficazes na classificação.

No artigo presente na *RettBase*, onde vem descrito o único caso masculino identificado com a mutação S134C, não é referido nenhum estudo neste rapaz para identificar a presença de mosaicismo para a mutação (86). A presença de mosaicismo poderia explicar o fenótipo do rapaz, de igual severidade ao encontrado no sexo feminino (37). No entanto, o estudo identificou a presença da mesma mutação, S134C, na mãe e na irmã do rapaz. Por esta razão conclui-se que a mutação no rapaz foi herdada através da sua mãe, existindo assim pouca probabilidade de existir um mosaicismo (86).

Quadro 3.13 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S134C, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	O método A é ineficaz na categorização dos fenótipos, uma vez que os fenótipos apresentados nos dois sexos tem severidade semelhante (35,86).

3.2.6.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.S134C segundo o método de classificação B. Esta classificação está ilustrada no Quadro 3.14 como ineficaz.

Quadro 3.14 - Classificação da mutação p.S134C, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	O método B é ineficaz na categorização desta mutação, uma vez que os fenótipos apresentados nos dois sexos têm severidade semelhante (35,86).

3.2.7 p.E137G (c.410 A ->G)

Gendrot *et al* estudou em 1999 uma família, onde se identificou diversos membros do sexo masculino, de diferentes gerações, com um fenótipo de atraso mental inespecífico. Este estudo concluiu que estes fenótipos eram criados por uma mutação no locus Xq28, que era transmitida ao longo das diferentes gerações desta família. Estudos posteriores identificaram a mutação E137G no gene *MECP2* como a mutação responsável pelos casos de atraso mental inespecífico presentes nesta família (61,93).

Foram detalhados pelo menos sete quadros clínicos de familiares do sexo masculino, de duas gerações distintas, com o fenótipo criado pela mutação E137G. Esta mutação originou em todos estes casos masculinos um fenótipo semelhante, bastante diferente do encontrado em quadros clínicos de RTT (61,93). Este fenótipo está identificado na literatura científica como um fenótipo de atraso mental inespecífico associado ao cromossoma X (XLMR) (49,65,75,94). O quadro de XLMR difere significativamente do quadro sintomatológico de RTT, sendo o atraso mental a característica comum dos fenótipos de XLMR. Podem existir neste fenótipo sinais de disfunção motora e outros sintomas clínicos típicos de RTT. É descrito na literatura científica mutações no gene *MECP2* com capacidade para originar o quadro clínico de XLMR (95–97). Nos casos masculinos identificados nesta família, ao contrário do que sucede nos

quadros de RTT, não houve nenhum sinal de regressão clínica relativamente às capacidades adquiridas, nem nenhuma disfunção motora. Todos os familiares do sexo feminino, que eram portadores da mutação E137G, revelaram-se assintomáticos, não existindo por isso qualquer tipo de atraso intelectual (61,93).

Tendo em conta que os fenótipos associados à mutação E137G no sexo masculino é de atraso mental inespecífico (XLMR), e que no sexo feminino é de um fenótipo assintomático, pode-se concluir que esta mutação cumpre o critério basilar dos métodos de classificação A e B, nomeadamente, a presença de fenótipos mais severos no sexo masculino em comparação com os fenótipos femininos. Ambos os métodos de classificação preveem a existência do fenótipo XLMR (35,61,93). O Quadro 3.15 e o Quadro 3.16 ilustram como os métodos de classificação A e B, respetivamente, categorizam esta mutação e os seus respetivos fenótipos nos dois sexos.

Quadro 3.15 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.E137G, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A3. No sexo masculino estão presentes fenótipos de atraso mental ligeiro a severo. No sexo feminino estão presentes fenótipos assintomáticos (61,93).

3.2.7.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.E137G segundo o método de classificação B (Quadro 3.16), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B2.

Quadro 3.16 - Classificação da mutação p.E137G, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B2	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B2. No sexo masculino existe um fenótipo de XLMR, enquanto no sexo feminino existe um fenótipo assintomático (61,93).

3.2.8 p.A140V (c.419 C ->T)

A *RettBase* faz referência a diversos artigos nos quais identifica a mutação A140V em diversos casos familiares (62). Esses mesmo artigos descrevem 17 casos masculinos portadores desta mutação, todos eles afetados por quadros clínicos bastante variados, mas com algumas semelhanças. Todos estes 17 casos fazem referência a rapazes com um quadro clínico distinto do encontrado na RTT (61,97–100).

O primeiro artigo refere seis rapazes, de idades compreendidas entre os 11 e 40 anos, todos eles com atraso mental de severidade moderada. Outros sintomas foram descritos neste grupo de seis rapazes: macroorquidismo (cinco dos seis rapazes); bipolaridade e episódios recorrentes de hipomania e depressão (quatro dos seis rapazes); sintomatologia da síndrome piramidal (quatro dos seis rapazes); ligeiros tremores (três dos seis rapazes); sintomas típicos de um quadro de Parkinson (um dos seis rapazes). As respetivas mães destes seis rapazes, eram todas portadoras da mutação A140V, com uma XCI aleatória. Todas elas eram saudáveis sem qualquer sintomatologia associada (98,101).

Outro artigo identifica quatro rapazes, todos irmãos e filhos da mesma mãe portadora da mutação A140V. Estes quatro rapazes, de idades compreendidas entre os 27 e 40 anos, apresentavam um atraso mental severo, ligeiros tremores, uma linguagem expressiva desenvolvida e a capacidade de comunicar palavras e frases simples. Eram amigáveis e sem sinais de autismo. A irmã e mãe destes quatro rapazes eram portadoras da mutação e ambas apresentavam um quadro clínico semelhante de atraso mental de severidade intermédia, dificuldade na locomoção e dificuldades na comunicação verbal. Foi analisado a XCI na mãe e irmã, sendo esta aleatória em ambas (97).

Um terceiro artigo refere dois rapazes, sem relações familiares, com a mutação A140V e com um quadro clínico de atraso mental. Mais nenhum outro sintoma é descrito. As mães destes dois rapazes apresentavam-se saudáveis e eram ambas portadoras da mutação, com uma XCI aleatória (61). Um outro artigo descreve um caso familiar onde surgem quatro casos masculinos. Estes quatro casos apresentavam um quadro de atraso mental, sendo que, adicionalmente ao atraso mental, um apresentava tremores nos membros superiores, outro um comportamento hipercinético e perturbação de humor, e outros sintomas típicos de um quadro de síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann. As mães destes quatro indivíduos eram portadoras da mutação, com uma XCI aleatória, e todas se apresentavam como saudáveis (99).

Outro artigo que a *RettBase* refere, relativo à mutação A140V, descreve um rapaz de 12 anos de idade, com um quadro de esquizofrenia e dificuldade em entender e processar a linguagem verbal. Aos 12 anos este rapaz desenvolveu episódios psicóticos graves, com alucinações, ataques de ansiedade, insónias e episódios maníacos. Por esta razão, foi sujeito a terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas muito variadas, apresentando por isso períodos de flutuação relativos à sua estabilidade psicótica. Este é o único caso descrito na *RettBase*, para a mutação A140V que, apesar do seu quadro sintomatológico, não apresentava um quadro claro de atraso mental. A mãe deste rapaz apresentava também a mutação A140V, mas apresentava um fenótipo saudável (100).

Todos estes 17 casos fazem referência a rapazes com um quadro clínico distinto do encontrado na RTT (7). Estes apresentam quadros clínicos bastante variados, com algumas semelhanças, sendo a presença de atraso mental de severidade intermédia ou severa a característica comum a todos estes casos masculinos, excetuando um (61,97–101).

Relativamente aos casos femininos identificados com a mutação A140V, foram identificados os casos acima expostos, sendo estes relativos a mães e irmãs dos casos masculinos descritos (61,97–101). Adicionalmente, a *RettBase* faz referência a mais dois artigos que identificam duas raparigas portadoras da mutação A140V, com sintomatologia associada (102,103).

Um destes artigos identifica uma rapariga de 11 anos de idade com um quadro de atraso mental e dispraxia (102). Por sua vez, o outro artigo refere uma rapariga de 15 anos com um historial de regressão tardia e um transtorno de humor. Neste último caso feminino, houve um desenvolvimento normal nos primeiros anos de vida e aos seis anos de idade foi identificado atrasos relativos à aprendizagem e aquisição de conhecimentos. Aos nove anos de idade registou-se uma regressão acentuada nas suas capacidades intelectuais, e aos doze anos verificou-se um diagnóstico de bipolaridade e uma acentuação nessa mesma regressão intelectual (103).

Ao analisar-se os casos masculinos para esta mutação conclui-se que estes não apresentam a panóplia de sintomas presentes e necessários para o diagnóstico da RTT (7). Apesar destes casos não apresentarem o quadro sintomatológico da RTT, muitos destes desenvolvem outros sintomas para além do atraso mental: tremores, episódios psicóticos, macroorquidismo, sintomatologia da síndrome piramidal e perturbações na comunicação e linguagem (97,99–101). Apesar da presença destes sintomas, ao comparar a severidade destes

quadros clínicos com os quadros clínicos da RTT, pode-se inferir que os quadros criados pela mutação A140V apresentam uma severidade ligeiramente inferior (7). Isto pode ser justificado pelo facto de alguns rapazes portadores desta mutação, para além do atraso mental, característica comum nos quadros de RTT, apresentarem adicionalmente um ou dois sintomas, sendo que estes sintomas não são tão severos e incapacitantes quando comparados com os sintomas da RTT (perda da locomoção, perda da capacidade motora nas mãos, distúrbios respiratórios e espasmos epiléticos) (97,99–101).

Por outro lado, ao analisar-se os quadros apresentados no sexo feminino pode-se inferir que esta mutação origina no sexo feminino quadros assintomáticos ou um quadro de XLMR. Dos 14 casos femininos mencionados na *RettBase* em artigos, 10 casos são de fenótipos saudáveis e apenas quatro casos são de fenótipos de XLRM com outra sintomatologia associada (bipolaridade, dispraxia, perturbações da linguagem) (61,97–103). Ou seja, ao comparar estes quadros clínicos femininos com o quadro sintomatológico de RTT, pode-se inferir que este apresenta uma severidade inferior devido a inexistência de sintomas severos e incapacitantes presentes em quadros de RTT (perda da locomoção, perda da capacidade motora nas mãos, distúrbios respiratórios e espasmos epiléticos) (7). O Quadro 3.17 e o Quadro 3.18 classificam a mutação A140V e os seus respetivos fenótipos segundo os métodos de classificação A e B, respetivamente.

Quadro 3.17 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A140V, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3 (para a maioria dos fenótipos)	A categoria A3 é a categoria que descreve a maioria dos fenótipos associados à mutação. Isto porque em todos os casos masculinos a mutação origina um fenótipo de XLMR, e nos casos femininos origina, na sua maioria, casos assintomáticos (10 dos 14 casos femininos descritos) (61,97–103). De salientar que esta categoria contempla, segundo os seus critérios, no sexo feminino, fenótipos assintomáticos e pouco significativos, sendo que existem quadros de XLMR femininos, com sintomas significativos, apesar de menos severos quando comparados com os quadros sintomatológicos da RTT (7,35).

3.2.8.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.A140V segundo o método de classificação B (Quadro 3.18), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria intermédia B2-B3.

Quadro 3.18 - Classificação da mutação p.A140V, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B2-B3	EFICAZ (+1)	A categoria intermédia B2-B3 é a categoria que melhor descreve os fenótipos da mutação. Tendo em conta o conjunto de fenótipos apresentados, estes partilham de características sintomatológicas das categorias B2 e B3. Isto porque os quadros masculinos apresentam XLMR, por vezes com sintomas adicionais, menos severos que os encontrados na RTT. Os quadros femininos são maioritariamente assintomáticos ou de XLMR (7,61,97–103).

3.2.9 p.D147E (c.441 C ->G)

Segundo a *RettBase*, a mutação D147E foi identificada apenas num caso familiar, nomeadamente em dois rapazes irmãos e na sua mãe. A mutação foi transmitida aos filhos, através da mãe, que se apresentava assintomática (62,74).

O irmão mais novo apresentava dois anos e oito meses, e desenvolveu-se normalmente até ao primeiro ano de vida, adquirindo a capacidade de se sentar e de caminhar. Seguiu-se posteriormente um período de regressão ao perder estas duas últimas capacidades e com o surgimento de novos sintomas como a obstipação e disfagia. Este nunca adquiriu qualquer linguagem. Uma ressonância magnética identificou uma atrofia cerebral (74).

Por sua vez, o irmão mais velho, com sete anos de idade, apresentou nos primeiros meses de vida um desenvolvimento semelhante ao seu irmão mais novo. Adquiriu a capacidade de se sentar e caminhar e, ao contrário do seu irmão, adquiriu a capacidade de comunicar duas

palavras. O período de regressão surgiu após um ano e meio de vida, sendo que neste período perdeu a capacidade de falar, de se sentar e de reconhecer os seus pais. Outros sintomas surgiram durante este período de regressão, nomeadamente: obstipação, pouco apetite, disfagia (alimentação à base de líquidos), nistagmo (movimentos rítmicos e involuntários dos olhos), pouco contacto visual e perda da capacidade motora nas mãos, com o subsequente surgimento de movimentos estereotipados nas mãos. Aos sete anos de idade apresentava hipotonia e estava acamado sem qualquer resposta ao meio envolvente. Uma ressonância magnética identificou uma atrofia cerebral (74).

Estes dois irmãos apresentavam um cariótipo normal 46, XY, e o estudo comprovou a inexistência de mosaicismo para a mutação. A mãe não apresentava qualquer sintomatologia e a análise relativa à XCI demonstrou que esta possuía uma XCI enviesada (80% / 20%), o que pode explicar a inexistência de sintomas. O artigo que identifica estes dois casos masculinos diagnostica o fenótipo XLMR nos dois rapazes (74). Ao considerar este diagnóstico descrito no estudo é possível realizar a classificação da mutação D147E segundo o método de classificação A. Segundo o método de classificação A esta mutação seria classificada na categoria A3. Os fenótipos apresentados nos dois sexos cumprem todos os critérios da categoria A3. Esta classificação tem em consideração o fenótipo de atraso mental com distúrbios motores no sexo masculino e o fenótipo assintomático no sexo feminino. Por sua vez, ao considerar o método de classificação B, a mutação D147E deveria pertencer à categoria B2, ao considerar o diagnóstico de XLMR descrito no artigo que descreve estes dois casos masculinos (35,74).

No entanto, ao analisar os quadros sintomatológicos descritos no artigo, é possível verificar que o irmão mais velho apresenta todos os critérios principais e necessários para o diagnóstico de RTT: existência de um período de regressão; perda da capacidade motora das mãos, perda da capacidade de comunicar; incapacidade de locomoção; movimentos estereotipados nas mãos. Também é possível verificar que o artigo não descreve nem demonstra nenhum critério de exclusão para o diagnóstico de RTT. Deste modo, ao considerar exclusivamente o quadro sintomatológico, e ao descartar o diagnóstico de XLMR realizado no artigo, pode-se inferir que o quadro clínico exposto no estudo não é de XLMR, mas sim de um quadro clínico com sintomas típicos de RTT extremamente incapacitantes (7,74).

Ao analisar o quadro sintomatológico do irmão mais novo, verifica-se que este apresenta um desenvolvimento e quadro sintomatológico semelhante ao do seu irmão mais velho nos seus primeiros meses de vida. Assim, ao considerar que ambos partilham da mesma mutação, e ao

considerar os poucos anos de vida do irmão mais novo, este apresenta a possibilidade de desenvolver um quadro sintomatológico semelhante ao do seu irmão, com sintomas típicos de RTT extremamente incapacitantes ao longo da progressão do seu quadro clínico (74).

Por conseguinte, ao refletir sobre os quadros clínicos acima expostos, define-se para a mutação D147E, um quadro com sintomas clínicos típicos da RTT extremamente incapacitantes, ao considerar o estado deteriorante e incapacitante do irmão mais velho, e a probabilidade do seu irmão mais novo, partilhar de um quadro clínico semelhante, por partilhar a mesma mutação (7,74).

Tendo isto em conta, ao refletir sobre os critérios do método de classificação A, conclui-se que esta mutação continua a cumprir todos os critérios para a categoria A3: fenótipo de atraso mental com distúrbios motores no sexo masculino, e fenótipo assintomático no sexo feminino (35,74). No entanto, é importante realçar que o fenótipo feminino portador da mutação apresenta uma XCI enviesada, o que revela uma elevada probabilidade de que qualquer sintomatologia associada à patogenicidade da mutação D147E esteja ocultada neste fenótipo (8,74). Por este motivo, e ao considerar os quadros clínicos masculinos, o presente trabalho considerou que a mutação D147E originaria um quadro clínico com sintomas típicos de RTT no sexo feminino, caso se verificasse uma XCI aleatória. Tendo em conta o exposto anteriormente, os fenótipos portadores da mutação em estudo deixariam de ser classificados segundo a categoria A3, mas segundo a categoria A2 do método A. Isto porque a categoria A2 prevê um quadro clínico com sintomas típicos de RTT em ambos os sexos. Seria expectável identificar os quadros clínicos mencionados anteriormente em condições normais, ou seja, caso se verificasse no fenótipo feminino uma XCI aleatória (35,74). A categoria A2 do método A prevê quadros clínicos com a presença de fatores modeladores da severidade, como a SK e o mosaïcismo celular no sexo masculino. No entanto, existem também fatores que influenciam a severidade dos fenótipos femininos, como a XCI enviesada. O Quadro 3.19 ilustra a classificação realizada pelo método A em condições normais, nomeadamente, na presença de uma XCI aleatória no fenótipo feminino.

Por outro lado, ao refletir sobre a severidade dos fenótipos apresentados nos dois irmãos, verifica-se que a severidade dos quadros clínicos se enquadra entre as categorias B3 e B4 do método B. O fenótipo masculino apresenta sintomas de RTT extremamente incapacitantes e severos, como menciona a categoria B4. No entanto, considerando os sete anos de vida do irmão mais velho, e a inexistência de uma morte prematura, não se pode inferir que os sintomas de

RTT apresentados sejam incompatíveis com a vida, como estipulado na categoria B4. Deste modo, a categoria intermédia B3-B4 é a categoria que melhor descreve o fenótipo masculino segundo os critérios de classificação do método B (7,74).

Ao considerar a categoria intermédia B3-B4 para o sexo masculino, verifica-se uma incongruência do método B, ao tentar classificar a mutação D147E. Isto porque o fenótipo feminino identificado é de um fenótipo assintomático (mãe dos irmãos), e não um fenótipo com sintomatologia associada como indica os critérios de classificação do método B. No entanto, a incongruência do método B pode ser explicada devido à XCI enviesada, presente no único fenótipo feminino identificado para esta mutação. Isto explica a razão pela qual o fenótipo feminino se apresenta assintomático (36,74). O método de classificação B não tem em conta a presença de fatores modeladores de severidade dos fenótipos, como é o caso de uma XCI enviesada. Deste modo, é expectável que o método B não consiga correlacionar e contextualizar o fenótipo feminino, que segundo os seus critérios de classificação, deveria ser um fenótipo com sintomatologia associada. O Quadro 3.20 ilustra a classificação inconclusiva realizada pelo método de classificação B à mutação D147E.

Tendo em conta que o método B assume que para realizar uma correlação genótipo/fenótipo não deve existir interferência de fatores modeladores da severidade dos fenótipos, como uma XCI enviesada, não é possível realizar uma correlação genótipo/fenótipo para a mutação D147E através deste método. Isto porque o único fenótipo feminino identificado com a mutação é inconclusivo, devido à presença de uma XCI enviesada (36). Deste modo, não se torna possível categorizar esta mutação segundo os critérios de classificação do método B. No entanto, é importante deixar claro que apesar da impossibilidade de classificação, o fenótipo expectável para o sexo feminino, em condições normais (XCI não enviesado), seria um fenótipo com sintomatologia associada, como inferem os critérios de classificação do método B.

Quadro 3.19 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.D147E, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A2	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A3, no entanto a categoria A2 é a categoria que melhor descreve os fenótipos portadores da mutação em estudo. Apesar de na realidade se identificar fenótipos que estão abrangidos pela categoria A3, se se considerar uma XCI aleatória no fenótipo feminino, verifica-se que a categoria A2 é a categoria que melhor descreve os fenótipos para a mutação D147E (35,74).

3.2.9.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à análise da mutação p.D147E segundo o método de classificação B (Quadro 3.20), verificando-se que se torna inconclusiva qualquer tentativa de classificação da mutação.

Quadro 3.20 - Classificação da mutação p.D147E, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	N/A	INCONCLUSIVO	Não é possível categorizar esta mutação segundo os critérios de classificação do método B. O método de classificação B não tem em conta a presença de fatores modeladores da severidade dos fenótipos, como é o caso de uma XCI enviesada. O único fenótipo feminino identificado com a mutação é inconclusivo, devido à presença de uma XCI enviesada (36,74).

N/A – Não aplicável

3.2.10 p.P152A (c.454 C ->G)

A *RettBase* faz referência a um caso familiar onde foi identificada a mutação P152A na filha e no pai, ambos com sintomatologia associada. Na literatura científica não se encontrou a referência a nenhum outro caso identificado com esta mutação (62,104).

A filha de dez anos de idade, obesa, apresentava um quadro de atraso mental de severidade moderada, com sintomatologia associada à Perturbação do Espectro do Autismo e com episódios de humor disruptivo. A criança desenvolveu-se normalmente no primeiro ano de vida, e aos 12 meses de vida evidenciou sinais de hipotonia. Experimentou diversos episódios psicóticos agressivos e sentia necessidade extrema de criar uma rotina no seu quotidiano, apresentando pouca flexibilidade para sair do seu ambiente rotineiro. Possuía o controlo motor das mãos, mas em raras ocasiões apresentava movimentos estereotipados nas mãos. Não tinha

a capacidade de manter uma conversa e tinha dificuldades com a comunicação verbal e não-verbal. Apresentava ainda *genu valgum* (joelhos desalinhados e orientados para dentro), *pes planus* (pés planos), macrocefalia e uma ligeira cifose. Foi sujeita durante quatro anos a tratamento com ácido valpróico e aripiprazol para estabilização do humor. Os seus comportamentos psicóticos e as suas capacidades de socialização melhoraram significativamente após o tratamento, embora a obsessão pelo ambiente rotineiro tenha permanecido (104).

Por sua vez, o seu pai, com 28 anos de idade, obeso, saudável, sem sinais de atraso mental, apenas com uma capacidade cognitiva abaixo da média, vive de forma independente, trabalha e cuida da filha. A sua infância e adolescência foram marcadas por episódios psicóticos severos, hiperatividade e ansiedade. Teve uma educação especial devido aos seus problemas de socialização e de aprendizagem. Foi diagnosticado com perturbação de hiperatividade/déficite de atenção e distúrbio da linguagem. Recebeu tratamento com metilfenidato, e os seus transtornos psicóticos melhoraram durante a adolescência. Na sua vida adulta apresenta um transtorno da linguagem moderado e não desenvolveu mais nenhum episódio psicótico (104).

Estudos realizados sobre o pai e filha verificaram que apresentavam um cariótipo normal, nomeadamente, 46, XY e 46, XX, para o pai e filha, respetivamente. A análise da XCI da filha revelou uma XCI normal e nivelada. Uma análise ao sangue revelou a inexistência de mosaicismo para a mutação no pai. É importante referir que o estudo avaliou a patogenicidade da mutação P152A, de modo a confirmar a correlação entre a presença desta mutação e os fenótipos apresentados. Concluiu-se que a presença da mutação origina alterações num local crítico do MBD, criando uma diminuição na capacidade de associação entre a proteína MeCP2 e a heterocromatina (104). Ao analisar a capacidade patogénica da mutação P152A através do programa *PolyPhen-2*, o mesmo classifica a mutação como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,983.

Ao comparar a severidade dos dois fenótipos, verifica-se que a filha apresenta um fenótipo bastante mais severo e incapacitante, comparativamente ao seu pai. Por outro lado, a premissa necessária, para que seja possível classificar as mutações no gene *MECP2* com base nos métodos A e B, baseia-se no facto de o fenótipo masculino ser sempre mais severo, para uma determinada mutação, quando comparado com o fenótipo feminino (35,104). Tendo isto em conta, verifica-se que os métodos A e B não conseguem classificar a mutação P152A e os

seus respectivos fenótipos, uma vez que não conseguem prever e contextualizar os quadros clínicos associados à mutação em estudo.

Não é claro o motivo pelo qual a mutação P152A origina um fenótipo mais severo no sexo feminino quando comparado com o sexo masculino. No sentido de explicar o sucedido, o estudo que descreve estes dois casos analisou outros genes, com capacidade para originar fenótipos semelhantes aos encontrados. No entanto, não foram identificadas quaisquer mutações nesses mesmos genes. A confirmação da inexistência de mosaicismo para a mutação, através de uma amostra de sangue, não é irrefutável, uma vez que não está excluída a hipótese de existir mosaicismo somático para a mutação no cérebro do pai. Esta hipótese poderia explicar o fenótipo menos severo encontrado no sexo masculino. Existem outros fatores que poderiam explicar a existência de um fenótipo feminino mais severo para esta mutação. O facto de a mãe ter um historial de abuso de substâncias e problemas cognitivos poderá indicar a exposição a substâncias nocivas durante a gravidez ou a transmissão de possíveis genes deletérios da mãe. A eficácia da terapêutica farmacológica e a exposição a diversos fatores ambientais são outros fatores que poderiam explicar o quadro clínico severo encontrado no sexo feminino (35,104).

Na ausência de dados adicionais que expliquem os fenótipos apresentados, e tendo em conta as informações disponibilizadas, pode-se concluir que os métodos de classificação A e B são ineficazes ao tentar classificar a mutação P152A (35,104). O Quadro 3.21 e o Quadro 3.22 ilustram a ineficácia dos métodos A e B, respetivamente, considerando a sua capacidade para prever e contextualizar os fenótipos criados pela mutação P152A.

Quadro 3.21 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P152A, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	O método A é ineficaz na categorização dos fenótipos identificados. O fenótipo que surge no sexo feminino apresenta um quadro clínico mais severo quando comparado com o quadro clínico que surge no sexo masculino (104).

3.2.10.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P152A segundo o método de classificação B (Quadro 3.22), sendo esta ineficaz.

Quadro 3.22 - Classificação da mutação p.P152A, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	O método B é ineficaz na categorização desta mutação. O fenótipo que surge no sexo feminino apresenta um quadro clínico mais severo quando comparado ao quadro clínico que surge no sexo masculino (104).

3.2.11 p.F157I (c.469 T ->A)

A mutação F157I é apenas mencionada num caso isolado na *RettBase* (62,105). Este caso corresponde a um rapaz com apenas 25 meses de vida, sem antecedentes familiares, com sintomatologia associada a RTT. A mãe desta criança experienciou, na altura do estudo, três abortos espontâneos. Esta criança apresentou, numa fase muito precoce da sua vida, durante o período neonatal, um quadro clínico com sintomatologia associada (105). O quadro clínico desta criança aos 25 meses de idade era caracterizado por: atraso no desenvolvimento, desaceleração no crescimento do perímetro cefálico, insuficiência respiratória, microcefalia, EEG anormal, hipotonia axial, rigidez muscular nos membros, distúrbios motores severos com movimentos coreiformes proeminentes e espasmos musculares repentinos (105).

Ao refletir sobre os critérios de classificação dos métodos A e B, verifica-se que se torna impossível classificar a mutação F157I (7,35,105). O Quadro 3.23 e o Quadro 3.24 ilustram a classificação inconcludente dos métodos A e B, respetivamente. Esta classificação deve-se: a) não existir nenhum caso feminino identificado com esta mutação, que possa comprovar que a mutação origina quadros assintomáticos ou outros tipos de quadros clínicos com sintomatologia associada; b) existência de apenas um caso masculino identificado com a mutação F157I com poucos meses de vida, o que torna impossível prever a evolução do seu quadro clínico. Muitos sintomas típicos da RTT e de mutações no gene *MECP2* surgem apenas após alguns anos de vida. Deste modo, ao considerar a possibilidade do surgimento de novos sintomas, torna-se impossível avaliar a severidade do fenótipo criado pela mutação F157I (7,35,105).

Quadro 3.23 - Classificação do fenótipo com a mutação p.F157I, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Inconclusivo	Revela-se impossível realizar uma classificação para esta mutação considerando os fenótipos identificados. O facto de existir apenas um fenótipo masculino com poucos meses de vida, e o facto de não existirem casos femininos identificados com esta mutação, impossibilitam a análise da severidade dos fenótipos criados pela mutação em estudo (7,35,105).

3.2.11.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.F157I segundo o método de classificação B, sendo esta classificação inconclusiva (Quadro 3.24).

Quadro 3.24 - Classificação da mutação p.F157I, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	Inconclusivo	N/A	Revela-se impossível realizar uma classificação para esta mutação considerando os fenótipos identificados. O facto de existir apenas um fenótipo masculino com poucos meses de vida, e o facto de não existirem casos femininos identificados com esta mutação, impossibilitam a análise da severidade dos fenótipos criados pela mutação em estudo (7,35,105).

3.2.12 p.T158M (c.473 C ->T)

A *RettBase* documenta cinco artigos científicos que referem sete casos masculinos com um fenótipo associado à presença da mutação T158M (62,83,106–109). Existe outro estudo, que não é referido na *RettBase*, de um caso masculino com esta mutação (110). Ao analisar o conjunto dos fenótipos masculinos descritos, pode-se dividir estes oito quadros clínicos em dois grupos bem definidos, considerando as suas semelhanças (83,106–110).

O primeiro grupo inclui rapazes com um cariótipo normal (46, XY) e sem qualquer tipo de mosaïcismo celular para a mutação. Estes apresentam um quadro sintomatológico com sintomas bastante severos e incapacitantes numa fase muito precoce da vida. Estes sintomas, típicos de quadros de RTT, originam um quadro incompatível com a vida, e potenciam uma morte prematura com poucos anos de idade (106,109,110). Por outro lado, o segundo grupo inclui rapazes que apresentam SK ou mosaïcismo celular para a mutação T158M. Neste segundo grupo fazem parte os restantes três rapazes. Estes apresentam um quadro de RTT de severidade moderada, e ao analisar os três quadros clínicos, os mesmos cumprem os critérios necessários para o diagnóstico de RTT, com uma evolução clínica típica da patologia. Ao contrário do primeiro grupo de fenótipos, estes três fenótipos apresentam um conjunto de sintomas de severidade moderada, compatíveis com a vida. Isto deve-se à presença de fatores modificadores da severidade dos fenótipos, como a SK ou o mosaïcismo celular para a mutação (61,83,107).

O primeiro grupo de fenótipos masculinos com a mutação T158M é composto por cinco casos: um caso isolado e dois pares de irmãos com quadros clínicos idênticos. Não foi possível confirmar a presença da mutação T158M num dos irmãos, no entanto, admite-se a presença da mesma, pois confirmou-se a presença da mutação na mãe assintomática e no seu irmão, sendo que este último apresentava um quadro clínico idêntico (106). Existem características transversais a todos estes fenótipos do primeiro grupo. O primeiro aspeto comum é a morte prematura nestas cinco crianças, nomeadamente, aos nove meses, onze meses, catorze meses, vinte meses e três anos e um mês, respetivamente. O prognóstico grave e a evolução deteriorante do quadro clínico potenciou a morte dos cinco casos devido a complicações de infeções respiratórias, episódios graves de apneia, desnutrição ou septicemia (106,109,110).

A segunda característica comum neste primeiro grupo de fenótipos são os distúrbios respiratórios. As cinco crianças apresentavam ataques graves de apneia ou infeções respiratórias recorrentes, o que comprometia a sua função respiratória. Três destas crianças

faleceram devido a uma complicação de um episódio de apneia, e outra devido a uma complicação de uma infecção respiratória. Outro traço comum nestas crianças é o atraso no seu desenvolvimento. É possível verificar esta característica através da desaceleração do crescimento cefálico, da pouca interação social e da incapacidade da criança de se sentar ou de gatinhar. Em alguns casos foi possível verificar um período de regressão, com a perda de capacidades motoras previamente adquiridas. O tónus muscular anormal e a presença de hipotonia ou rigidez muscular em diversas partes do corpo é um sintoma transversal nestas cinco crianças. Em quase todos os fenótipos, as contrações involuntárias dos músculos estavam presentes (106,109,110).

Foi possível identificar, em três destes cinco fenótipos do primeiro grupo, distúrbios severos na alimentação, sendo necessário a implementação prolongada da alimentação via sonda. Mesmo após a implementação desta última técnica, foi relatada perda de peso extrema e desnutrição. Infecções recorrentes do trato urinário e respiratório foi outro traço sintomatológico presente em dois irmãos deste primeiro grupo de fenótipos. Estas infecções potenciaram o falecimento das crianças, uma devido a complicações de uma infecção respiratória, e outra devido a uma septicemia. Outros sintomas visíveis em alguns destes casos foram espasticidade nos membros, atrofia cerebral, escoliose, movimentos coreiformes, apatia sem reação a estímulos externos e opistótono (costas arqueadas e cabeça inclinada para trás, devido a contração dos músculos do tronco e pescoço) (106,109,110).

Neste primeiro grupo de fenótipos identificados é possível observar o prognóstico clínico para a mutação T158M no sexo masculino, sendo que, neste grupo, não estão presentes fatores modeladores da severidade dos quadros clínicos, tais como a SK ou o mosaicismo celular para a mutação. Pode-se assim concluir, com base na análise dos cinco fenótipos, que os casos masculinos com a mutação T158M, com um cariótipo normal 46, XY, e sem qualquer mosaicismo celular para a mutação, apresentam um prognóstico precocemente deteriorante, com sintomas extremamente severos e incapacitantes, típicos da RTT, nos primeiros meses de vida. Estes sintomas, devido à sua severidade, são incompatíveis com a vida, o que origina uma morte prematura nos primeiros meses de vida. Tendo em conta os critérios mencionados pelo método de classificação A, este primeiro grupo de fenótipos pode ser classificado segundo a categoria A1 (35,106,109,110). O Quadro 3.25 ilustra esta classificação realizada pelo método A.

Quadro 3.25 - Classificação do primeiro grupo de fenótipos masculinos com a mutação p.T158M, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A1	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A1 (35). Nos cinco fenótipos masculinos descritos com esta mutação, existe um quadro clínico severo, com problemas respiratórios graves. A esperança média de vida para estes casos é inferior a dois anos de idade, devido à gravidade dos sintomas, que se apresentam como incompatíveis com a vida. Estes cinco fenótipos masculinos classificados não apresentam quaisquer fatores modeladores da severidade dos quadros clínicos, como a SK ou o mosaicismo para a mutação (106,109,110). Por sua vez, no sexo feminino, existe, em condições normais e niveladas da XCI, um quadro sintomatológico típico da RTT (106,109–111).

Por outro lado, o segundo grupo inclui três rapazes, com 9, 11 e 13 anos de idade, respetivamente. Estes apresentam um quadro de RTT de severidade moderada, e cumprem os critérios de diagnóstico necessários para a patologia (7,83,107,108). Os quadros clínicos deste segundo grupo são caracterizados pelos sintomas típicos da RTT: hipotonia, distonia, espasmos musculares, distúrbios respiratórios, convulsões, sintomatologia associada à Perturbação do Espectro do Autismo, movimentos estereotipados nas mãos, perda de capacidades previamente adquiridas, como a capacidade de comunicar, de locomoção e a capacidade motora das mãos (83,107,108). Ao analisar os três quadros clínicos, os mesmos cumprem os critérios necessários para o diagnóstico de RTT. Tendo em conta os critérios mencionados pelo método de classificação A, este segundo grupo de fenótipos pode ser classificado segundo a categoria A2 (7,35,83,107,108). O Quadro 3.26 ilustra esta classificação realizada pelo método A.

Ao analisar-se a mutação T158M no sexo feminino, verifica-se que esta é a mutação *missense* mais recorrente no gene *MECP2* (Figura 1.14) (20,111). No entanto esta mutação origina fenótipos muito diversificados no sexo feminino, em grande parte devido ao enviesamento da XCI (62,109). A título de exemplo, nos artigos presentes na *RettBase* que documentam os casos masculinos aqui expostos com a mutação T158M, estão relatados diversos familiares do sexo feminino que apresentam esta mutação. Existem familiares do sexo feminino com o diagnóstico de RTT e outros casos que são assintomáticos e perfeitamente saudáveis (106,109,110). As que se apresentam com o diagnóstico de RTT possuem uma XCI

aleatória (106,110). Por sua vez, as que se apresentam assintomáticas, são portadoras da mutação, perfeitamente saudáveis, com uma XCI enviesada, existindo por isso, uma inativação favorável do cromossoma X mutado (109,110). É possível confirmar estes resultados na base de dados *RettBase* (62).

Quadro 3.26 - Classificação do segundo grupo de fenótipos masculinos com a mutação p.T158M, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A2	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A2 (35). Os três fenótipos masculinos descritos com a mutação, e que apresentam SK ou mosaicismo celular para a mutação, apresentam um quadro clínico idêntico ao encontrado no sexo feminino (83,106–111).

3.2.12.1 Classificação e avaliação do método B

Ao refletir sobre o método de classificação B e sobre os seus critérios, a mutação T158M enquadra-se na categoria B4. Para a realização desta categorização é analisada a severidade dos cinco fenótipos pertencentes ao primeiro grupo, uma vez que ilustram o autêntico quadro clínico da mutação, devido à inexistência da SK e de mosaicismo para a mutação (106,109,110). Estes dois últimos fatores anteriormente referidos camuflam a patogenicidade da mutação no sexo masculino, pois promovem uma “diluição” da expressão do cromossoma X mutado através da expressão de cromossomas X não mutado (20,21,28,35). O Quadro 3.27 ilustra a classificação da mutação p.T158M segundo o método B.

Quadro 3.27 - Classificação da mutação p.T158M, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B4	Eficaz (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria B4. Os cinco fenótipos masculinos, pertencentes ao primeiro grupo, são de quadros clínicos com sintomas de RTT extremamente severos e incapacitantes. Estes surgem numa fase muito precoce na vida da criança e demonstram ser incompatíveis com a vida. Por esta razão, existe uma morte prematura com poucos meses de idade (106,109,110). Por sua vez, os quadros clínicos encontrados no sexo feminino, em condições normais e niveladas da XCI, são quadros de RTT de severidade moderada (106,109–111).

3.2.13 p.T160S (c.479 C ->G)

A mutação T160S foi identificada num caso isolado masculino durante um estudo que incidiu sobre uma coorte de rapazes com sintomatologia associada ao Espectro da Perturbação do Autismo (62,112). O quadro clínico deste caso, de 12 anos de idade, não relata quaisquer sinais de atraso mental, ou quaisquer atrasos ou perturbações nas funções motoras. Este alcançou 33 pontos na Escala de Pontuação para Autismo Infantil (CARS), o que equivale a um quadro de Autismo de severidade moderada (112). Esta mutação não foi identificada em mais nenhum caso masculino, e no sexo feminino não se encontrou nenhum relato descrito de raparigas com a mutação T160S (62,112).

O estudo que descreve o caso portador da mutação T160S, relata uma gravidez e parto normal, e indica que o rapaz começou a falar aos 18 meses. Aos dois anos de idade iniciou um programa de educação especial, e a aquisição de novas palavras foi lenta, possuindo a capacidade de falar apenas 20 palavras aos quatro anos de idade. O rapaz revelou notórios problemas de socialização e a presença de movimentos repetitivos, principalmente no movimento das mãos a balancear (112). Estes movimentos são típicos de crianças com autismo,

e é uma forma de ajudar as mesmas a controlar os estímulos excessivos devido a momentos de alegria ou ansiedade (113). Aos oito anos de idade já conseguia ler e nos anos posteriores revelou ligeiras melhorias na sua capacidade de socialização (112).

Sucintamente, este caso masculino apresenta notórios problemas de socialização, movimentos repetitivos nas mãos (balancear) sem comprometer a sua capacidade motora, e alguma dificuldade em comunicar verbalmente. Todos estes sintomas são típicos da Perturbação do Espectro de Autismo (112,113). Ao comparar o quadro clínico deste rapaz com os sintomas típicos da RTT, verifica-se que o caso portador da mutação T160S não apresenta um fenótipo de RTT. Este apresenta um quadro bastante menos severo, com alguma sintomatologia associada à Perturbação do Espectro de Autismo, que por sua vez, também está presente em quadros de RTT, em associação com outros sintomas (7,112,113). Assim, pode-se considerar o fenótipo da mutação T160S no sexo masculino como um quadro clínico com sintomas pouco severos, típicos da RTT. Não é referido no artigo que descreve o caso masculino portador da mutação qualquer estudo realizado sobre o rapaz no sentido de averiguar a presença de mosaïcismo celular para a mutação ou a presença de SK. Estes dois últimos fenómenos poderiam explicar o quadro menos severo encontrado neste rapaz com a mutação T160S, uma vez que são fatores modeladores da severidade dos fenótipos (35,112). Ao analisar a capacidade patogénica da mutação através do programa *PolyPhen-2*, verifica-se que este classifica a mutação T160S como “provavelmente patogénica”, com um score de 0,983.

Ao analisar os critérios de classificação do método A, verifica-se que o fenótipo apresentado pelo indivíduo do sexo masculino portador desta mutação não está englobado pelo método. O fenótipo masculino menos severo que o método A refere é o de atraso mental ligeiro. No entanto, o caso portador da mutação T160S não apresenta sinais de atraso mental, mas sim de autismo. Por esta razão conclui-se que o método de classificação A é ineficaz na classificação do fenótipo criado pela mutação (7,35,112). O Quadro 3.28 ilustra esta classificação ineficaz realizada pelo método A.

Quadro 3.28 - Classificação do fenótipo com a mutação p.T160S, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	O fenótipo não está englobado nos critérios de classificação do método A. O fenótipo masculino menos severo englobado pelo método A é o de atraso mental ligeiro. O caso portador da mutação T160S não apresenta sinais de atraso mental, mas sim de autismo (35,112).

3.2.13.1 Classificação e avaliação do método B

Ao analisar os critérios de classificação do método B e a severidade do fenótipo apresentado pelo indivíduo do sexo masculino, conclui-se que a mutação T160S pode ser classificada com a categoria B2. Isto porque o fenótipo masculino é de um quadro clínico com sintomas pouco severos, típicos da RTT. Para a realização desta categorização considerou-se a inexistência, no único caso masculino identificado com a mutação T160S, de qualquer fator modelador da severidade de fenótipos, como a SK ou o mosaicismo celular para a mutação (7,35,112). Por sua vez, tal como os critérios da categoria B2 referem, não se identificaram casos documentados para o sexo feminino com a mutação T160S (62,112). O Quadro 3.29 ilustra a classificação realizada pelo método de classificação B.

Quadro 3.29 - Classificação da mutação p.T160S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B2	Eficaz (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria B2. Para a mutação T160S, o fenótipo masculino é de um quadro de autismo, com sintomas pouco severos, enquanto no sexo feminino, não se encontram casos relatados com esta mutação (62,112).

Ao analisar-se os dois métodos de classificação para esta mutação, verifica-se que o método B foi eficaz no estabelecimento de uma correlação genótipo/fenótipo, enquanto o método A revelou-se ineficaz. Isto revela que o método B prevê melhor a grande diversidade dos fenótipos criados pelas mutações no gene *MECP2*. Isto permite ao método B uma classificação mais abrangente, de forma a responder à diversidade sintomatológica criada por estas mesmas mutações (7,35,62,112).

3.3 Mutações no domínio ID

3.3.1 p.R167W (c.499 C ->T)

A *RettBase* menciona uma família onde são identificados quatro casos masculinos com um quadro de atraso mental. O estudo que descreve esta família apenas confirmou a presença da mutação R167W num destes indivíduos. Os autores, no entanto, concluíram que os restantes três casos masculinos presentes nesta família, por apresentarem um quadro clínico idêntico ao primeiro, apresentavam também a mutação R167W. Todos eles foram diagnosticados com XLMR (61,62).

Estes quatro indivíduos, com idades compreendidas entre os 25 e 50 anos de idade, apresentavam um quadro de atraso mental moderado, com valores de quociente de inteligência entre os 50 e 70. Todos possuíam uma pobre comunicação verbal e não-verbal. Para além do quadro de atraso mental, três destes quatro casos masculinos apresentavam tremores em repouso, e três deles apresentavam obesidade. Nenhum deles apresentava sintomatologia associada à perturbação do espectro de autismo, nem qualquer outro sintoma clínico. Também não houve evidência de um historial de regressão clínica após um desenvolvimento normal nestes casos masculinos (61).

Ao considerar a presença da mutação R167W nestes quatro casos familiares masculinos, conclui-se que nesta família existem quatro portadoras obrigatórias para esta mutação do sexo feminino. O estudo refere que foi confirmada a presença da mutação R167W numa destas quatro mulheres. Ao analisar os seus quadros clínicos, as portadoras obrigatórias, apresentavam-se todas saudáveis, com uma inteligência normal. Apenas dois destes quatro casos femininos apresentavam ligeiros tremores em repouso, um sintoma comum nos casos masculinos, embora nestes dois casos femininos com uma relevância e severidade bastante reduzida (61).

Ao refletir sobre os fenótipos identificados com a mutação R167W, é possível realizar uma correlação genótipo/fenótipo com base nos critérios de classificação dos métodos A e B. Relativamente ao método A, os fenótipos descritos cumprem os critérios referentes à categoria A3, que menciona quadros de atraso mental no sexo masculino e quadros assintomáticos ou quadros com sintomas pouco significativos no sexo feminino (35,61). O Quadro 3.30 ilustra a classificação realizada pelo método A aos fenótipos identificados com a mutação R167W.

Quadro 3.30 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R167W, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A3. No sexo masculino existe um quadro de atraso mental. Por outro lado, no sexo feminino existe um quadro assintomático (35,61).

3.3.1.1 Classificação e avaliação do método B

Segundo os critérios de classificação do método B, esta mutação cumpre os critérios referentes à categoria B2. A categoria B2 refere quadros de XLMR no sexo masculino e quadros assintomáticos para os casos femininos (35,61). O Quadro 3.31 ilustra a classificação realizada pelo método B à mutação R167W.

Quadro 3.31 - Classificação da mutação p.R167W, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B2	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B2. No sexo masculino existe um fenótipo de XLMR, enquanto no sexo feminino existe um fenótipo assintomático (35,61).

3.3.2 p.P172S (c.514 C ->T)

A mutação P172S foi identificada num rapaz brasileiro de cinco anos de idade com um quadro de atraso mental e um quadro associado à perturbação do espectro de autismo. A mãe deste rapaz era portadora assintomática da mutação. Na literatura científica não é mencionado nenhum outro caso identificado com esta mutação *missense* no gene *MECP2*. Existem, por isso, apenas dois fenótipos identificados com a mutação P172S (62,114).

É importante realçar que esta mutação ocorre num aminoácido não conservado da proteína MeCP2, e que não se identificaram estudos que comprovam a patogenicidade da mutação e o seu efeito na proteína (114). No entanto, o programa *PolyPhen-2* classifica a mutação P172S como “possivelmente patogénica”, com um *score* de 0,941. Esta mutação origina, nos dois sexos, dois fenótipos que se correlacionam com o que seria expectável para as mutações patogénicas no gene *MECP2*, uma vez que origina um fenótipo XLMR no sexo masculino e um fenótipo assintomático no sexo feminino. Estes são os fenótipos expectáveis segundo os critérios de classificação dos métodos A e B, que pretendem categorizar os fenótipos criados por mutações patogénicas no gene *MECP2* (35,114). De forma a suportar a hipótese de que a mutação P172S se apresenta como a causa para o fenótipo encontrado no rapaz brasileiro de cinco anos, o estudo que descreve este caso descartou, através de análises moleculares, a presença da síndrome de X frágil, uma causa bem conhecida e bastante comum de atraso mental (114).

Deste modo, ao considerar como causa para o fenótipo encontrado na criança a mutação P172S, é possível classificar estes dois fenótipos identificados, e a respetiva mutação, através dos métodos de classificação A e B, respetivamente. Estas classificações estão ilustradas no Quadro 3.32 e no Quadro 3.33, respetivamente.

Quadro 3.32 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P172S, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A3. No sexo masculino existe um quadro de atraso mental. Por outro lado, no sexo feminino existe um quadro assintomático (35,114).

3.3.2.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P172S segundo o método de classificação B (Quadro 3.33), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B2.

Quadro 3.33 - Classificação da mutação p.P172S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B2	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B2. No sexo masculino existe um fenótipo de XLMR, enquanto no sexo feminino existe um fenótipo assintomático (35,114).

3.3.3 p.P176R (c.527 C ->G)

A *Rettbase* faz menção a um estudo que identificou, numa coorte de indivíduos japoneses, uma rapariga com um diagnóstico de RTT. Esta era portadora da mutação P176R. O pai desta rapariga era também portador da mesma mutação, mas apresentava-se assintomático e saudável. Por esta razão, o estudo concluiu que a mutação P176R não seria patogénica, por originar um fenótipo assintomático no caso masculino (62,65).

A rapariga portadora da mutação foi sujeita a uma análise molecular no gene *MECP2*, não sendo encontrada nenhuma outra mutação no gene com capacidade para originar um fenótipo de RTT (65). Poderá, no entanto, existir outros fatores, não avaliados no estudo, com capacidade para produzir o fenótipo de RTT. Exemplos destes fatores são a existência de mutações no gene *FOXP1* ou no gene *CDKL5*. Não se identificou, na literatura científica, mais nenhum caso descrito com a mutação P176R. (7,21,22,62,65).

Como o estudo evidenciou uma probabilidade elevada da mutação P176R não ser patogénica, se este facto se confirmar, a mutação não se apresenta como a causa para o fenótipo de RTT apresentado no caso feminino. Por isso, e em conformidade com o descrito na

metodologia do presente estudo, procedeu-se à avaliação do potencial patogénico da mutação P176R com recurso do programa *PolyPhen-2*. O programa *PolyPhen-2* classifica a mutação P176R como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,969 (65). Por esta razão, e em conformidade com a metodologia indicada no ponto 2.5, rejeita-se a hipótese da mutação ser não patogénica, prosseguindo-se assim com a classificação, através dos métodos A e B, dos fenótipos e da mutação, com base nos quadros clínicos identificados.

Deste modo, não existindo dados adicionais, e à semelhança do que foi feito com as mutações anteriores, ao realizar, apenas com base nos dados disponíveis no artigo, uma classificação de forma indiscriminada aos fenótipos identificados e à respetiva mutação, fica óbvia a ineficácia de ambos os métodos de classificação A e B. Ao considerar a presença simultânea da mutação P176R e do fenótipo de RTT no caso feminino, e a presença no caso masculino do fenótipo assintomático, torna-se claro que o fenótipo encontrado no sexo feminino é mais severo quando comparado com o masculino. Isto contradiz a premissa basilar dos critérios de classificação dos métodos A e B, sendo por isso ambos ineficazes na classificação da mutação e dos fenótipos identificados (35,65). No entanto, de forma a manter a uniformidade e coerência no método de classificação, e à semelhança do que foi realizado com as mutações anteriores, procedeu-se à classificação da mutação P176R, e dos seus fenótipos, com base nos critérios dos métodos de classificação A e B, e com base nas informações disponibilizadas no estudo que descreve esta mutação (35,65). O Quadro 3.34 e o Quadro 3.35 ilustram a ineficácia na classificação da mutação P166R, e dos seus respetivos fenótipos, através dos métodos de classificação A e B.

Quadro 3.34 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P176R através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	O método A é ineficaz na categorização desta mutação. O fenótipo encontrado no sexo feminino é mais severo quando comparado com o masculino. Isto contradiz a premissa basilar dos critérios de classificação do método A. No entanto, é importante realçar que a probabilidade de a mutação P176R ser não patogénica é bastante elevada, o que pode explicar a ineficácia do método (35,65).

3.3.3.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P176R segundo o método de classificação B (Quadro 3.35), sendo esta classificação ineficaz.

Quadro 3.35 - Classificação da mutação p.P176R, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	O método B é ineficaz na categorização desta mutação. O fenótipo encontrado no sexo feminino é mais severo quando comparado com o masculino. Isto contradiz a premissa basilar dos critérios de classificação do método B. No entanto, é importante realçar que a probabilidade de a mutação P176R ser não patogénica é bastante elevada, o que pode explicar a ineficácia do método (35,65).

3.3.4 p.A181V (c.542 C ->T)

A mutação A181V é referida na *RettBase* num caso isolado. Esta referência é realizada num estudo que identificou um rapaz com uma perturbação do espectro de autismo e um ligeiro atraso mental, com um valor de quociente de inteligência de 75 (62,115). O estudo não identifica nenhum sintoma adicional e refere que o diagnóstico da perturbação do espectro de autismo foi realizado através do Programa de Observação Diagnóstica do Autismo (ADOS). Os pais deste indivíduo apresentam-se assintomáticos e não foram efetuados testes genéticos de pesquisa para a mutação (115).

O estudo refere ainda que poderá não existir uma relação causal entre a mutação A181V e o fenótipo encontrado. Isto porque, não se conhece o efeito desta mutação na estrutura da proteína MeCP2, podendo existir a possibilidade de não interferir na sua função (115). Ao analisar o impacto desta mutação na proteína MeCP2, o programa *PolyPhen-2* classificou esta mutação como “benigna”, com um *score* de 0,435. Não se encontrou na literatura científica mais nenhum caso identificado com a presente mutação.

Não existindo dados adicionais, e em concordância com o descrito no ponto 2.5, foi realizado, à semelhança do que foi feito com as mutações anteriores e apenas com base nos dados disponíveis no artigo científico, uma classificação através dos métodos A e B (35,115). Como não se identificaram mais casos com esta mutação no sexo feminino, depreende-se que esta origine quadros assintomáticos nas raparigas. Por outro lado, no sexo masculino origina um fenótipo de atraso mental ligeiro associado a sintomatologia da perturbação do espectro de autismo (115). Com base nestes dados, o Quadro 3.36 e o Quadro 3.37 ilustram a classificação efetuada pelo método de classificação A e B, respetivamente.

Quadro 3.36 - Classificação do fenótipo com a mutação p.A181V, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem todos os critérios da categoria A3 (35). No sexo masculino existe um quadro de atraso mental e de autismo. Por outro lado, no sexo feminino, como não se identificaram casos, depreende-se um quadro assintomático (115).

3.3.4.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.A181V segundo o método de classificação B (Quadro 3.37), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B2.

Quadro 3.37 - Classificação da mutação p.A181V, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B2	Eficaz (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B2 (35). No sexo masculino existe um fenótipo de XLMR associado à perturbação do espectro de autismo. No sexo feminino, por outro lado, não se identificou nenhum caso (115).

3.3.5 p.T196S (c.587 C ->G)

A *RetBase* refere um estudo que identifica a mutação T196S em diversos casos masculinos, comprovando, através destes, que a mutação T196S se apresenta como não patogénica (62,64). Este estudo analisou possíveis mutações no gene *MECP2* numa coorte de 475 rapazes com um quadro de atraso mental. Foi descartada, através de análises moleculares, a presença da síndrome de X frágil na coorte, uma causa bem conhecida e comum de atraso mental (64).

Desta análise resultou, primeiramente, uma identificação da mutação T196S em três rapazes, com um quadro de atraso mental e sem quaisquer ligações familiares entre eles. Posteriormente, o estudo analisou a presença da mutação T196S nos familiares destes três rapazes. Desta análise concluiu-se que as mães destes três indivíduos eram portadoras assintomáticas da mutação. Concluiu-se ainda que esta mutação estava presente em dois familiares do sexo masculino que se apresentavam assintomáticos e perfeitamente saudáveis. Estes dois familiares eram, nomeadamente, um avô e um tio materno de dois dos rapazes com atraso mental (64).

Adicionalmente, o estudo identificou a mutação T196S noutro caso masculino saudável, mais precisamente num indivíduo que fazia parte do grupo controlo do estudo, o que apoiou a hipótese de que esta mutação ser um polimorfismo genético raro e não patogénico. O grupo controlo era composto por 150 indivíduos do sexo masculino. Deste modo, os autores identificaram a mutação T196S em seis rapazes, sendo que metade se apresentavam assintomáticos (64). Ao usar o programa *PolyPhen-2* para analisar a capacidade patogénica da mutação, o mesmo classificou a mutação T196S como “benigna”, com um *score* de 0,010. Deste modo, conclui-se que a mutação não é patogénica, não apresentando, por isso, capacidade para originar quadros clínicos com sintomatologia associada (64). Esta conclusão está de acordo com a metodologia indicada no ponto 2.5 do presente trabalho.

Ao prosseguir com a classificação dos fenótipos identificados, verifica-se que o método A não prevê a classificação de mutações benignas. Isto porque, segundo os critérios de classificação do método A, estes preveem apenas mutações com capacidade para originar quadros clínicos com sintomatologia associada (35,64). O Quadro 3.38 ilustra a exclusão da mutação T196S por parte dos critérios de classificação do método A.

Quadro 3.38 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T196S, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogênicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Apesar de os três fenótipos com atraso mental, identificados no artigo exposto acima, poderem ser classificados com a categoria A3, esta classificação deve-se considerar inválida, por se considerar como uma mera casualidade (35,64). Isto porque, foi demonstrado, tanto no estudo como através do programa <i>PolyPhen-2</i>, que a mutação se apresenta como não patogénica, não apresentando, por isso, a capacidade para originar um fenótipo de atraso mental (35,64). Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.</p>

N/A – Não aplicável

3.3.5.1 Classificação e avaliação do método B

Por outro lado, ao realizar a classificação com recurso aos critérios de classificação do método B, o mesmo classifica a mutação com a categoria B1, referente a mutações benignas (35). Esta classificação está de acordo com o descrito no ponto 2.5, que descreve as condições no qual o método B pode categorizar diretamente como B1 as mutações benignas. O Quadro 3.39 ilustra a classificação realizada pelo método B à mutação T196S.

Quadro 3.39 - Classificação da mutação p.T196S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	EFICAZ (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1, uma vez que o estudo que identificou a mutação comprovou a não patogenicidade da mesma. O programa <i>PolyPhen-2</i> também classifica a mutação como uma mutação benigna (35,64).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.</p>

3.3.6 p.T197M (c.590 C ->T)

Na base de dados *RetBase* estão presentes dois estudos que identificam dois rapazes, ambos portadores da mutação T197M, e ambos com um quadro de atraso mental (62,114,116). Na literatura científica existe outro estudo, que não se encontra mencionado na *RetBase*, referente a um caso masculino com a mutação T197M (117). Este último apresenta um quadro de atraso mental, microcefalia e encefalopatia congénita, ou seja, um quadro clínico semelhante ao descrito na *RetBase* (116,117).

A base de dados *RetBase* refere poucos estudos que identificam a mutação T197M no sexo feminino. Verifica-se que estão referenciados na *RetBase*, com um artigo associado, três casos femininos com a mutação T197M, sendo que todos estes apresentam um fenótipo de RTT (62,83,118,119).

Os estudos expostos acima realçam que a mutação T197M ocorre num aminoácido não conservado da proteína MeCP2. Referem também que não existe evidência de que esta mutação apresenta capacidade patogénica (114,116,117). No entanto, em 2007, o estudo de Campos *et al* (2007), ao identificar a mutação num rapaz com atraso mental, identificou, através de uma análise à mãe e ao irmão deste rapaz, que estes dois últimos eram também portadores da mutação T197M. Concluíram, por isso, que a mutação presente no rapaz com atraso mental foi herdada por parte da mãe e transmitida também ao irmão. Tanto a mãe como o irmão do rapaz se apresentavam saudáveis (114). No entanto, é importante referir que este estudo não refere nenhuma tentativa de identificar uma possível presença de mosaïcismo celular para a mutação. Este fator poderia explicar a presença de um fenótipo assintomático no irmão (39,114).

De qualquer modo, o estudo de Campos *et al* (2007) permitiu descartar a hipótese de a mutação T197M ter capacidade patogénica. O facto de se ter identificado a mutação num caso masculino, sem qualquer sintomatologia associada, permitiu concluir que a mutação T197M se apresenta como um polimorfismo genético benigno (114). Ao usar o programa *PolyPhen-2* para analisar o impacto da mutação na proteína MeCP2, o mesmo classificou a mutação T197M como “benigna”, com um *score* de 0,008. Esta classificação realizada pelo programa *PolyPhen-2* permite corroborar as conclusões do estudo de Campos *et al* (2007), e considerar a mutação como não patogénica (114).

Ao prosseguir com a classificação dos fenótipos identificados, verifica-se que o método A não prevê a classificação de mutações não patogénicas. Isto porque, segundo os critérios de classificação do método A, estes preveem apenas mutações com capacidade para originar quadros clínicos com sintomatologia associada (35). O Quadro 3.40 ilustra a não abrangência dos critérios de classificação do método A aos fenótipos identificados com a mutação T197M.

Quadro 3.40 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T197M, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Não é possível estabelecer uma correlação entre a mutação e os fenótipos de atraso mental identificados, uma vez que o estudo de Mário Campos <i>et al</i> (2007) e o programa <i>PolyPhen-2</i> evidenciam que a mutação é não patogénica, não apresentando, por isso, a capacidade para originar um fenótipo de atraso mental (114). Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.</p>

N/A – Não aplicável

3.3.6.1 Classificação e avaliação do método B

Por outro lado, ao analisar a classificação com recurso aos critérios de classificação do método B, o mesmo classifica a mutação com a categoria B1, referente a mutações benignas (35). Esta classificação está de acordo com o descrito no ponto 2.5, que descreve as condições no qual o método B pode categorizar diretamente como B1 as mutações benignas. O Quadro 3.41 ilustra a classificação realizada pelo método B à mutação T197M.

Quadro 3.41 - Classificação da mutação p.T197M, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	EFICAZ (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1, uma vez que o estudo de Campos <i>et al</i> (2007) comprovou a não patogenicidade da mutação, e porque o programa <i>PolyPhen-2</i> classifica-a como uma mutação benigna (114).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.3.7 p.A201V (c.602 C ->T)

Ao pesquisar na *RettBase* através da opção “*Advanced Search*” a mutação A201V no sexo masculino, são evidenciados diversos artigos que identificam casos masculinos e femininos com a mutação. Ao analisar detalhadamente a pesquisa mencionada anteriormente, esta refere sete estudos realizados sobre coortes de indivíduos que apresentam um quadro clínico com sintomas típicos de mutações no gene *MECP2* (62,65,67,114,120–123).

Através dos sete estudos referidos anteriormente foram identificados onze rapazes e três raparigas com a mutação A201V (65,67,114,120–123). Três destes onze casos masculinos apresentavam-se saudáveis e assintomáticos. Estes três casos assintomáticos dizem respeito a familiares dos indivíduos pertencentes às coortes dos estudos. A presença da mutação A201V nestes familiares do sexo masculino, que não apresentavam quaisquer anomalias nos seus cromossomas, como a SK, permitiram concluir que a mutação A201V não é patogénica, tratando-se, por isso, de um polimorfismo genético benigno (65,121,123).

Ao utilizar o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação A201V, o programa classifica a mutação como “benigna”, com um *score* de 0,002. Ao prosseguir com a classificação dos fenótipos identificados, verifica-se que o método A não

prevê a classificação de mutações não patogénicas. Isto porque, segundo os critérios de classificação do método A, estes preveem apenas mutações com capacidade para originar quadros clínicos com sintomatologia associada (35). O Quadro 3.42 ilustra a não abrangência dos critérios de classificação do método A à mutação A201V.

Quadro 3.42 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A201V, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Apesar dos diversos fenótipos identificados, portadores da mutação, com sintomatologia associada, a correlação entre estes fenótipos e a mutação deve ser considerar inválida. Isto porque, os estudos que identificam a mutação, e o programa <i>PolyPhen-2</i>, comprovam que a mutação é não patogénica (65–67,114,120–123). Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.</p>

N/A – Não aplicável

3.3.7.1 Classificação e avaliação do método B

Por outro lado, ao realizar a classificação com recurso aos critérios de classificação do método B, o mesmo classifica a mutação com a categoria B1, referente a mutações benignas (35). Esta classificação está de acordo com o descrito no ponto 2.5 do presente trabalho, que descreve as condições no qual o método B pode categorizar diretamente como B1 as mutações benignas. O Quadro 3.43 ilustra a classificação realizada pelo método B à mutação A201V.

Quadro 3.43 - Classificação da mutação p.A201V, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	EFICAZ (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1. Isto porque os estudos que identificaram a mutação comprovaram a não patogenicidade da mesma, e porque o programa <i>PolyPhen-2</i> também classifica a mutação como benigna (65–67,114,120–123).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.3.8 p.T203M (c.608 C ->T)

A base de dados *RettBase* refere a presença de dois casos masculinos com a mutação T203M, sendo que um dos rapazes apresenta um quadro de atraso mental, distúrbios comportamentais, agressividade e perturbação de hiperatividade/défice de atenção (62,72,118,124). O segundo caso masculino portador da mutação T203M, é de um caso assintomático. Este último permitiu concluir que a mutação T203M não se trata de uma mutação patogénica, mas de um polimorfismo genético benigno (124). Por este motivo, e pelo facto de o aminoácido treonina nesta posição não ser conservado na proteína MeCP2 em outras espécies, a base de dados *RettBase* e diversos estudos classificam a mutação T203M como benigna (62,72,118,124,125).

Ao utilizar o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação, o mesmo classifica a mutação T203M como “possivelmente patogénica”, com um score de 0,784. Considerando a avaliação do programa bioinformático *PolyPhen-2*, a identificação do caso masculino assintomático, e o estabelecido nas duas premissas no ponto 2.5 do presente trabalho, considerou-se a mutação T203M como benigna, sem capacidade patogénica (116,124). O

Quadro 3.44 ilustra a não abrangência do método A, perante a classificação dos fenótipos com a mutação T203M.

Quadro 3.44 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T203M, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.</p>

N/A – Não aplicável

3.3.8.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.T203M segundo o método de classificação B (Quadro 3.45), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.45 - Classificação da mutação p.T203M, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo, e o programa <i>PolyPhen-2</i>, permitiram comprovar a não patogénica da mutação (124).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.3.9 p.G206A (c.617 G ->C)

A mutação G206A foi identificada exclusivamente no seio de uma família, onde se verificou que diversos familiares eram portadores da mutação. Destes, realça-se o único caso masculino identificado com a mutação, e o único caso com sintomas associados (62,67).

O caso masculino é referente a um rapaz com dez anos de idade, sem qualquer capacidade para comunicar verbalmente, com uma acentuada perturbação do espectro de autismo e com um quadro de atraso mental severo. Este apresentava um cariótipo normal (46 XY), e foi submetido a análises moleculares que excluíram a presença de distúrbios metabólicos e endócrinos com capacidade para originar o fenótipo encontrado. Foi também excluída, através de análises moleculares, a presença da síndrome de X frágil (67).

Neste caso masculino, observou-se movimentos estereotipados nas mãos diferentes dos encontrados na RTT, sem comprometer a capacidade motora das mãos (7,67,113). Foi ainda referido que este rapaz nasceu com baixo peso, e adquiriu a capacidade de andar ao fim de um ano de vida, sendo que ao completar o primeiro ano de vida foi possível identificar os primeiros sinais de autismo na criança. Não existe qualquer historial de regressão clínica nem registo de outros sintomas típicos da RTT, como as anomalias na coordenação motora, os distúrbios na respiração, os tremores, convulsões, epilepsia e distúrbios no sono (7,67).

Foram analisados alguns familiares deste caso masculino, e dessa análise conclui-se que a mãe e a avó materna eram portadoras assintomáticas da mutação G206A. Avaliou-se o rácio referente à XCI, verificando-se que a mãe do rapaz apresentava uma XCI ligeiramente enviesada ($\pm 30\%$ / 70%), e que a avó materna apresentava uma XCI praticamente aleatória ($\pm 40\%$ / 60%). O potencial efeito patogénico proveniente da mutação G206A deve estar mascarado nos dois casos femininos identificados nesta família, devido à expressão do alelo não mutado. Por este motivo, no sexo feminino, esta mutação não apresenta capacidade patogénica, originando fenótipos assintomáticos (67).

Por outro lado, no sexo masculino, ao existir apenas um alelo para os genes do cromossoma X, a mutação G206A origina um fenótipo de XLMR (35,67). Este quadro clínico, no entanto, comparativamente ao quadro clínico encontrado na RTT, é menos severo, pois a sintomatologia associada à perturbação do espectro de autismo, e o quadro de atraso mental,

são sintomas típicos dos quadros de RTT. Contudo, apesar do rapaz portador da mutação apresentar estes sintomas característicos dos quadros de RTT, este não apresenta os sintomas principais e necessários para o diagnóstico da patologia, como a perda total ou parcial da capacidade motora das mãos, a perda total ou parcial da capacidade motora, as anomalias na locomoção e outros sintomas típicos que acompanham os quadros de RTT (distúrbios na respiração, tremores, convulsões, epilepsia e distúrbios no sono) (7,67).

Ao avaliar a capacidade patogénica da mutação, é referido que a mutação G206A, por originar uma substituição do aminoácido glicina por alanina, altera a estrutura secundária da proteína MeCP2 e influencia a função da proteína, nomeadamente a repressão genética (67). O programa *PolyPhen-2* corrobora estas afirmações, ao classificar a mutação G206A como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,999.

Deste modo, ao prosseguir com a classificação da mutação G206A e dos seus respetivos fenótipos, através dos métodos de classificação A e B, conclui-se que o fenótipo masculino associado à mutação G206A é de XLMR e/ou de Autismo, enquadrando-se, segundo os critérios de classificação do método B na categoria B2, e segundo os critérios de classificação do método A na categoria A3 (35,67). O Quadro 3.46 e o Quadro 3.47 ilustram as classificações realizadas pelos métodos A e B, respetivamente.

Quadro 3.46 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.G206A, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem os critérios da categoria A3 (35). No sexo masculino está presente um quadro de XLMR e/ou de autismo. Por outro lado no sexo feminino existe um quadro assintomático (67).

3.3.9.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.G206A segundo o método de classificação B (Quadro 3.47), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B2.

Quadro 3.47 - Classificação da mutação p.G206A, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B2	Eficaz (+1)	Os fenótipos cumprem os critérios para a categoria B2. No sexo masculino existe um fenótipo de XLMR associado à perturbação do espectro de autismo. Por outro lado no sexo feminino existe um quadro assintomático (35,67).

3.4 Mutações no domínio TRD

3.4.1 p.P225L (c.674 C ->T)

A mutação P225L, referida na base de dados *RettBase*, foi apenas identificada num caso masculino (33,62). Este é referente a um rapaz de 21 anos de idade com um quadro severo de atraso mental e com diversos sintomas característicos de RTT. Ao analisar o seu historial clínico, verifica-se que este apresentou um nascimento sem complicações e um desenvolvimento normal nos primeiros três meses de vida. Perto dos três meses e meio de vida houve um registo de hipotonia, e nos meses consequentes verificou-se um atraso no seu desenvolvimento. Este nunca adquiriu a capacidade de se sentar e de andar autonomamente, e com dois anos de idade perdeu a capacidade de se colocar de pé com apoio (33).

Este rapaz nunca chegou a adquirir a capacidade de comunicar verbalmente e desenvolveu sintomas extrapiramidais e epilepsia. Aos 11 anos de idade estava dependente de uma cadeira de rodas devido a um quadro de tetraplegia espástica e hipotonia, com um quadro severo de assimetria pélvica e de cifoescoliose. Aos 16 anos perdeu a capacidade motora nas mãos e apresentou um quadro severo de apraxia e de contraturas nos pulsos. A última análise do seu quadro clínico foi aos 21 anos de idade, e nesta análise observou-se um rapaz com atraso mental, dependente de uma cadeira de rodas, com um quadro severo de cifoescoliose, uma luxação na anca, contraturas nas articulações dos dedos, pulsos, ombros e joelhos. Apresentava também distúrbios apneicos, alguns distúrbios no sono e uma boa comunicação visual (33).

Este caso masculino, portador da mutação P225L, apresentava um cariótipo normal 46, XY, e realizou diversas análises, nomeadamente, uma tomografia computadorizada, uma ressonância magnética, uma eletroencefalografia e uma eletromiografia, sendo que todas estas análises se apresentavam normais. O estudo que identificou este caso masculino concluiu que a mutação se originou via *de novo*, uma vez que não foi detetada a mutação na mãe e nos dois irmãos mais velhos deste rapaz (33).

A literatura científica evidência que mutações no gene *MECP2*, quando presentes no sexo masculino, criam fenótipos muito variados, que comumente desviam-se dos quadros clínicos típicos da RTT (7,33,35,49). O fenótipo deste rapaz, portador da mutação P225L, é um exemplo disso, pois apresenta um quadro clínico com sintomatologia associada a quadros de RTT, mas com diferenças significativas. As diferenças mais significativas são a existência de um período curto de desenvolvimento normal na criança (cerca de três meses) e a ausência de movimentos estereotipados nas mãos (7,33).

Contudo, ao analisar os critérios de diagnóstico da RTT, verifica-se que este caso cumpre dois dos critérios principais e alguns critérios de suporte. Os dois critérios principais de diagnóstico existentes neste caso são a perda do controlo motor nas mãos e a presença de dispraxia ou incapacidade de locomoção. Relativamente aos critérios de diagnóstico de suporte verifica-se a presença de: a) distúrbios na respiração (episódios apneicos); b) escoliose e cifose; c) desaceleração do crescimento; d) intensa comunicação visual com os olhos; e) padrão de sono anormal e f) comportamentos (berros e gritos) inapropriados, devido à propensão para agitação e ansiedade. Deste modo, é possível confirmar o diagnóstico de RTT atípica neste caso masculino (7,33).

O caso acima descrito é o único caso masculino identificado com a mutação P225L (33). O mesmo se sucede no sexo feminino, pois existe apenas um caso feminino descrito na *RettBase* portador desta mutação com um quadro de RTT (81). Assim, ao comparar os dois fenótipos com a mutação P225L, verifica-se que em ambos os sexos esta mutação origina um quadro de RTT (7,33,81). Os dados clínicos disponíveis no estudo que identifica o fenótipo feminino são escassos, mas este refere um diagnóstico de RTT realizado com base nos critérios de diagnóstico do Grupo de Trabalho de 1988 (79,81).

Deste modo, ao comparar a severidade dos dois fenótipos conclui-se que ambos apresentam uma severidade semelhante, o que contraria a premissa basilar dos métodos de classificação A e B. Esta premissa afirma que para a mesma mutação no gene *MECP2*, o quadro

clínico identificado no sexo masculino deve ser mais severo comparativamente ao quadro clínico identificado no sexo feminino. Esta premissa não está presente ao analisar os dois fenótipos portadores da mutação P225L (33,35,81). É importante realçar que o estudo que identifica o caso feminino não descreve nenhuma tentativa de analisar a presença de uma XCI enviesada. Este último fator poderia explicar o quadro clínico mais severo encontrado no sexo feminino, e poderia, por conseguinte, explicar a ineficácia dos métodos A e B (20,35,47,81). No entanto, sem a presença de informações adicionais, conclui-se que os métodos de classificação A e B são ineficazes na classificação da mutação P225L e dos seus respetivos fenótipos (33,35,81). O Quadro 3.48 ilustra a ineficácia do método de classificação A.

Quadro 3.48 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P225L através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	O método A é ineficaz na categorização dos fenótipos, uma vez que os fenótipos apresentados nos dois sexos têm uma severidade semelhante (33,35,81).

3.4.1.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P225L segundo o método de classificação B. Esta classificação está ilustrada no Quadro 3.49 e pode-se categorizar como ineficaz.

Quadro 3.49 - Classificação da mutação p.P225L, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	O método B é ineficaz na categorização desta mutação, uma vez que os fenótipos apresentados nos dois sexos têm uma severidade semelhante (33,35,81).

3.4.2 p.T228S (c.683 C ->G)

Ao utilizar a base de dados *RetBase* para analisar a frequência da mutação T228S, verifica-se que esta mutação está descrita em dois estudos que identificam dois rapazes portadores da mutação T228S. Ambos os estudos descrevem dois rapazes com um quadro de atraso mental, onde foi excluída, através de análises moleculares, a presença de síndrome de X frágil. Num dos rapazes foi confirmado a presença de um cariótipo normal, 46, XY, excluindo, por isso, a presença de SK (62,64,114).

Ao analisar os fenótipos femininos portadores da mutação T228S descritos na literatura científica, verifica-se que não existe um consenso no quadro clínico encontrado. Isto porque, estão identificados poucos casos femininos portadores da mutação, alguns assintomáticos e outros com quadros clínicos com sintomatologia associada à RTT (78,108,117).

Os estudos mencionados acima referem que a mutação T228S não apresenta capacidade patogénica, uma vez que o aminoácido T228 é um aminoácido não conservado em algumas espécies (rato, camundongo e galinha), e uma vez que diversos programas bioinformáticos avaliam o impacto da mutação na proteína MeCP2 como benigno (64,114,117). Ao usar o programa *PolyPhen-2* para avaliar o impacto desta mutação na proteína MeCP2, o mesmo classifica a mutação T228S como “benigna”, com um *score* de 0,001.

Foi possível identificar um estudo, descrito na literatura científica e não referenciado na *RetBase*, que identifica a mutação T228S no seio de uma família. Este artigo comprova, através de um caso masculino assintomático, a não patogenicidade da mutação T228S. O estudo refere que identificou a mutação T228S numa rapariga com RTT atípica, e que após analisar o pai desta, verificou-se que este também era portador assintomático da mutação (117). Este caso masculino assintomático e a classificação de “mutação benigna” por parte do programa *PolyPhen-2* comprovam a não patogenicidade da mutação T228S (117). Esta afirmação está de acordo com o ponto 2.5, que descreve as condições no qual o presente trabalho deve categorizar as mutações no gene *MECP2* como benignas. O Quadro 3.50 ilustra a não abrangência do método A, perante a classificação dos fenótipos portadores da mutação T228S.

Quadro 3.50 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.T228S, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.</p>

N/A – Não aplicável

3.4.2.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.T228S segundo o método de classificação B (Quadro 3.51), enquadrando-se esta na categoria B1.

Quadro 3.51 - Classificação da mutação p.T228S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1. Os estudos que identificaram a mutação comprovaram a não patogénicidade da mesma, e o programa <i>PolyPhen-2</i> classifica-a como uma mutação benigna (64,114,117).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.4.3 p.S229L (c.686 C ->T)

Ao analisar a frequência da mutação S229L, descrita na *RetBase*, verifica-se que esta se encontra presente em dois casos masculinos. Um destes casos é referente a um quadro de atraso mental e o outro é referente a um caso assintomático (62,64,90).

O caso masculino assintomático, apresenta uma filha, também portadora da mutação S229L, com um quadro de RTT típica. No entanto, o caso feminino referido apresenta simultaneamente outra mutação no gene *MECP2*, nomeadamente a mutação *nonsense* R168X (90). Está descrito na literatura, em diversos estudos, que a mutação *nonsense* R168X apresenta uma conhecida capacidade patogénica para originar quadros clínicos de RTT (26,90). Por esta razão, o estudo que identificou a mutação S229L no único caso feminino e no único caso masculino assintomático atribui a causa para o fenótipo de RTT à mutação *nonsense* R168X, classificando a mutação S229L como benigna (90).

Por outro lado, ao usar o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação, verifica-se que este classifica como “possivelmente patogénica” a mutação S229L, com um *score* de 0,813. Deste modo, ao considerar o caso masculino assintomático e as duas premissas estipuladas no ponto 2.5, o presente trabalho considerou a mutação S229L como um polimorfismo genético sem capacidade patogénica (90,116).

O Quadro 3.52 ilustra a não abrangência do método A na classificação dos fenótipos identificados com a mutação S229L. Não fica, no entanto, excluída a hipótese de existência de um mosaïcismo celular para a mutação no caso masculino assintomático. Este fator poderia explicar os dois fenótipos totalmente distintos identificados nos dois casos masculinos portadores da mutação S229L (35,64,90).

Quadro 3.52 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S229L, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35). Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.

N/A – Não aplicável

3.4.3.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.53 ilustra a classificação da mutação S229L através do método B, sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.53 - Classificação da mutação p.S229L, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático identificado e a classificação do programa <i>PolyPhen-2</i> permitiram considerar a mutação como benigna (90).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.4.4 p.P251L (c.752 C ->T)

A base de dados *RettBase* identifica a mutação P251L numa rapariga com um quadro de RTT e no seu pai assintomático. Não se encontrou na literatura científica mais casos identificados portadores desta mutação, para além destes dois casos familiares. O estudo que identifica estes dois casos familiares descreve que o caso feminino apresenta concomitantemente à mutação P251L, outra mutação no gene *MECP2*, nomeadamente uma mutação *frameshift* que origina uma deleção de 154 pares de bases no domínio CTD (62,126).

O estudo anterior associa o quadro de RTT, presente no caso feminino, à presença da mutação *frameshift*, uma vez que esta origina uma deleção significativa no domínio CTD, existindo, por isso, a probabilidade de afetar a função da proteína MeCP2. Por este motivo, e pelo facto de se ter identificado a mutação P251L no caso masculino assintomático, o estudo

conclui ainda que a mutação P251L não é patogénica, classificando a mesma como um polimorfismo genético benigno (126).

Por outro lado, ao utilizar o programa *PolyPhen-2*, para avaliar o potencial patogénico da mutação P251L, este programa classifica como “provavelmente patogénica” a mutação com um *score* de 0,995. Outros programas bioinformáticos, como o *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)* (<https://sift.bii.a-star.edu.sg>) e o *PMut* (<https://mmb.irbbarcelona.org/PMut/>), que também permitem prever o impacto de mutações na estrutura e estabilidade das proteínas, avaliam a mutação P251L com um elevado potencial patogénico (127). Assim, ao contrário do que o estudo de Amano *et al* (2000) sugere, não se pode excluir a hipótese de que a mutação possa ter um potencial patogénico. É importante realçar que não está totalmente excluída a hipótese da presença de mosaïcismo celular para a mutação P251L no caso assintomático masculino referido no estudo de Amano *et al* (2000) (126,127). A presença do mosaïcismo poderia explicar o quadro assintomático presente no pai desta rapariga com um quadro de RTT (35,126).

Ao considerar apenas os quadros clínicos identificados com a mutação, verifica-se que é possível classificar a mutação P251L através dos critérios de classificação do método B (35,126,127). Isto porque se for considerado as conclusões do estudo de Amano *et al* (2000), que têm como base apenas os dados dos quadros clínicos, e se se considerar a mutação P251L como benigna, esta mutação poderia ser categorizada com a categoria B1 do método B. No entanto, não é possível afirmar estas conclusões, tendo em conta os dados de diversos programas bioinformáticos, como o programa *PolyPhen-2* (35,126). Assim, e em concordância com o estipulado no ponto 2.5, o presente trabalho não pode considerar a mutação P251L como benigna.

O presente trabalho também não considera como ineficazes os métodos A e B na classificação, pois o único caso feminino portador da mutação P251L apresenta simultaneamente duas mutações no gene *MECP2*, o que impossibilita associar o seu quadro de RTT a uma das duas mutações. Isto impossibilita concluir sobre o fenótipo feminino criado pela mutação P251L, tornando inconclusiva qualquer tentativa de classificação da mutação e dos seus respetivos fenótipos identificados com a mutação P251L através dos métodos de classificação A e B (35,126). O Quadro 3.54 ilustra os motivos pelo qual o presente trabalho considera inconclusiva qualquer tentativa de classificação dos fenótipos com recurso aos critérios de classificação do método A.

Quadro 3.54 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P251L, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Inconclusivo	Considerou-se como inconclusiva qualquer tentativa de classificação dos fenótipos identificados com a mutação P251L pelos seguintes motivos: a) o único caso feminino portador da mutação apresenta simultaneamente duas mutações no gene <i>MECP2</i> , impossibilitando concluir sobre o fenótipo criado pela mutação em estudo; b) existe apenas um fenótipo portador da mutação tanto no sexo masculino como no sexo feminino (126); c) os dados clínicos provenientes dos poucos fenótipos identificados com a mutação em estudo contradizem os dados provenientes dos programas bioinformáticos (<i>PolyPhen-2</i> , <i>SIFT</i> e <i>PMut</i>) (126,127).

3.4.4.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.55 ilustra os motivos pelo qual o presente trabalho considera inconclusiva qualquer tentativa de classificação da mutação com recurso aos critérios de classificação do método B.

Quadro 3.55 - Classificação da mutação p.P251L, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	Inconclusivo	N/A	Considerou-se como inconclusiva qualquer tentativa de classificação da mutação P251L pelos seguintes motivos: a) o único caso feminino portador da mutação apresenta simultaneamente duas mutações no gene <i>MECP2</i> , impossibilitando concluir sobre o fenótipo criado pela mutação em estudo; b) existe apenas um fenótipo portador da mutação tanto no sexo masculino como no feminino (126); c) os dados clínicos provenientes dos poucos fenótipos identificados com a mutação em estudo contradizem os dados provenientes dos programas bioinformáticos (<i>PolyPhen-2</i> , <i>SIFT</i> e <i>PMut</i>) (126,127).

N/A – Não aplicável

3.4.5 p.P272L (c.815 C ->T)

A mutação P272L é referida em dois estudos, mencionados na *RetBase*, e cada estudo identifica um caso masculino e um caso feminino, portadores da mutação P272L, sendo ambos estes pares de casos referentes a casos familiares (62,121,128). O primeiro estudo, de Moog *et al* (2006), identificou um caso masculino de atraso mental com sintomas associados à RTT, e posteriormente, identificou a mesma mutação na mãe assintomática do rapaz (121). Por sua vez, o segundo estudo é de Zahorakova *et al* (2007), e este identifica a mutação P272L numa rapariga com um quadro de RTT típica e no seu pai assintomático (128). Deste modo, estão identificados no total dois casos masculinos e dois casos femininos com a mutação. No entanto, ao analisar os quadros clínicos identificados em cada sexo, verifica-se que os mesmos são totalmente distintos entre si. Dos dois casos masculinos identificados, um é assintomático e outro tem um quadro de atraso mental com sintomas associados à RTT. Por sua vez, dos dois casos femininos identificados, um é assintomático e outro é referente a uma rapariga com um quadro de RTT típico. Por isso, os fenótipos identificados para cada sexo são incoerentes (121,128).

Esta incoerência pode ser explicada pela presença de fatores modeladores da severidade dos fenótipos e devido às próprias características metodológicas dos estudos que identificam a mutação. Dos fatores moduladores da severidade dos quadros clínicos, com capacidade para originar fenótipos incoerentes, enumeram-se a presença de uma XCI enviesada no sexo feminino e a presença de mosaicismo celular para a mutação (35,121,128). Por outro lado, os métodos para identificar molecularmente mutações em genes diferem de estudo para estudo. E todos estes métodos são falíveis, o que quer dizer que existe sempre a probabilidade de algumas mutações no gene *MECP2*, ou noutros genes, não serem identificadas. Esta última variável, que demonstra a falibilidade dos métodos usados pelos estudos que estabelecem uma correlação genótipo/fenótipo, pode explicar incoerências nas severidades dos fenótipos identificados (121,128).

Ao utilizar o programa *PolyPhen-2* para avaliar o potencial patogénico da mutação P272L, este programa classifica como “provavelmente patogénica” a mutação, com um *score* de 0,998. Assim, não se pode excluir a hipótese de a mutação ter um potencial patogénico. Por este motivo, o presente trabalho, ao contrário da *RetBase* e dos artigos que identificaram a mutação, não considerou a mutação P272L como benigna (62,121,128). Assim, ao analisar, de forma independente para cada estudo, a mutação P272L e os seus respetivos fenótipos, verifica-

se que no estudo de Moog *et al* (2006), estes são categorizados com a categoria B2 do método B, e com a categoria A3 do método A, respetivamente. Estas classificações têm em conta a presença de um quadro de XLMR associado a alguns sintomas de RTT no sexo masculino, e à presença de um fenótipo assintomático no sexo feminino. Por outro lado, verifica-se que os métodos A e B são ineficazes na classificação da mutação P272L e dos seus respetivos fenótipos, tendo em conta apenas os quadro clínicos identificados pelo estudo de Zahorakova *et al* (2007). Isto porque, o quadro clínico no sexo feminino é mais severo comparativamente ao quadro clínico do sexo masculino (35,121,128).

Deste modo, ao considerar os fenótipos incoerentes identificados para cada sexo, e as classificações divergentes dos métodos A e B, provenientes dos únicos dois estudos que identificam a mutação P272L, o presente trabalho considera como ineficazes quaisquer tentativas de classificação da mutação P272L e dos seus respetivos fenótipos (35,121,128). O Quadro 3.56 ilustra os motivos pelo qual o presente trabalho considera ineficaz qualquer tentativa de classificação dos fenótipos identificados com a mutação P272L com recurso aos critérios de classificação do método A.

Quadro 3.56 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P272L, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	Classificou-se como ineficaz qualquer tentativa de categorizar os fenótipos identificados com a mutação P272L, considerando a incoerência dos quadros clínicos identificados para cada sexo (35,121,128).

3.4.5.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.57 ilustra os motivos pelo qual o presente trabalho considera ineficaz qualquer tentativa de classificação da mutação P272L com recurso aos critérios de classificação do método B.

Quadro 3.57 - Classificação da mutação p.P272L, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	Classificou-se como ineficaz qualquer tentativa de categorizar a mutação P272L considerando a incoerência dos quadros clínicos identificados para cada sexo (35,121,128).

3.4.6 p.K284E (c.850 A ->G)

A *RetBase* identifica a mutação K284E num caso masculino com um quadro de XLMR. Este estudo não identifica qualquer outro sintoma neste caso masculino para além do quadro de atraso mental. Na literatura científica não se identificou mais nenhum caso com a mutação K284E, o que faz deste caso masculino o único portador da mutação (61,62).

Ao avaliar a capacidade patogénica da mutação, através do programa *PolyPhen-2*, verifica-se que este classifica a mutação K284E como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,993. Assim, ao considerar esta classificação, e ao considerar a mutação K284E com capacidade para originar um quadro de atraso mental, prosseguiu-se com a classificação da mutação e dos seus respetivos fenótipos, com recurso aos critérios de classificação dos métodos A e B, respetivamente (35,61). O Quadro 3.58 ilustra a classificação realizada pelo método A ao fenótipo portador da mutação K284E.

Quadro 3.58 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K284E, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem os critérios da categoria A3 (35). No sexo masculino está presente um quadro de XLMR. Por outro lado, no sexo feminino não se identificaram casos, pelo que se depreende um quadro assintomático (61,62).

3.4.6.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.K284E segundo o método de classificação B (Quadro 3.59), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B2.

Quadro 3.59 - Classificação da mutação p.K284E, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B2	Eficaz (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B2 (35). No sexo masculino existe um fenótipo de XLMR. No sexo feminino, por outro lado, não se identificou nenhum caso (61,62).

3.4.7 p.R309W (c.925 C ->T)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação R309W, verifica-se que esta foi identificada num rapaz de sete anos de idade com um quadro de atraso mental, sem capacidade para comunicar, e com um significativo atraso psicomotor (62,114). Ao analisar a literatura científica, verifica-se que existe outro caso masculino, que não está referenciado na *RettBase*, e que é também portador da mutação R309W. Este último caso é referente a um rapaz com atraso mental, que perdeu a capacidade motora adquirida nas mãos, e que apresenta movimentos estereotipados transientes nas mãos. Este também apresentava bruxismo e dispraxia (28).

Por outro lado, a *RettBase* refere dois casos femininos portadores da mutação R309W (129,130). No entanto, Schönewolf-Greulich *et al* (2016) identificou mais casos femininos, portadores da mutação em estudo, não referenciados na *RettBase* (131). O conjunto de fenótipos femininos identificados são muito variados e distintos entre si, uma vez que existem casos assintomáticos, casos de XLMR, e casos com quadros clínicos associados a diversos sintomas típicos da RTT (129–131). Esta variedade fenotípica pode ser explicada pelas características

genéticas do sexo feminino, uma vez que neste sexo o gene *MECP2* está sujeito à XCI. Este, por sua vez, pode ser mais ou menos enviesado, influenciando, por isso, a severidade dos quadros clínicos e originar uma ampla variedade fenotípica no sexo feminino (35–37).

No entanto, como evidencia o estudo de Schönewolf-Greulich *et al* (2016), o resultado da avaliação da XCI nem sempre consegue explicar a variabilidade fenotípica. Este facto sucede-se ao analisar os fenótipos femininos portadores da mutação R309W, uma vez que foram identificados dois casos femininos, ambos com resultados que evidenciam uma XCI aleatória, mas um destes casos é referente a um fenótipo assintomático e outro é referente a um quadro de atraso mental com diversos sintomas típicos de quadros de RTT (movimentos estereotipados na mãos, anomalias na locomoção, distúrbios respiratórios e anomalias no tónus muscular) (131). Assim, devem existir outros fatores, para além da XCI enviesada, que possam explicar esta variabilidade fenotípica encontrada nos casos femininos portadores da mutação R309W, e noutros casos previamente identificados (131,132).

Um dos fatores que pode explicar esta variabilidade encontrada nos fenótipos femininos, é o mosaicismo celular para a mutação (35–37). Outros fatores podem ainda não serem conhecidos, considerando as características próprias da proteína MeCP2. Esta apresenta-se como uma proteína multifuncional, que interage com uma grande variedade de outras proteínas, e por isso, apresenta uma função complexa e dependente do ambiente em que se encontra (20,47,54). É importante realçar a falibilidade dos métodos de análise da XCI. Isto porque, o resultado de uma XCI enviesada é geralmente baseado em linfócitos obtidos em amostras de sangue, o que não inviabiliza a possibilidade de uma XCI enviesada em determinados conjuntos de células, como as células nervosas do cérebro. Esta falibilidade dos métodos pode explicar o motivo para se encontrar quadros clínicos totalmente distintos entre fenótipos femininos com uma XCI aleatória e com a mesma mutação no gene *MECP2* (131,133).

Para que o presente trabalho analise a mutação R309W e os seus respetivos fenótipos segundo os critérios de classificação dos métodos A e B, foi considerado para o fenótipo masculino associado à mutação, um quadro clínico com sintomas significativos e proeminentes associados à RTT, como evidencia o caso masculino descrito na *RettBase* e o caso referido na literatura científica (28,35,62,114). Por outro lado, foi também considerado para o fenótipo feminino associado à mutação R309W, um quadro clínico com sintomas significativos e proeminentes associados à RTT. Foi considerado este fenótipo, uma vez que a grande parte dos fenótipos femininos identificados com a mutação em estudo apresentam estas características,

excetuando o caso assintomático e o caso feminino com apenas um quadro de atraso mental (129–131). Outro motivo pelo qual se adotou este quadro clínico para o fenótipo feminino, foi o facto de se ter identificado este fenótipo num dos casos onde se verificou uma XCI aleatória, o que permite aumentar a probabilidade de neste caso não existirem fatores modeladores da severidade dos fenótipos, nomeadamente uma XCI enviesada (35,36,131).

Ao considerar os fenótipos referidos anteriormente, conclui-se que a severidade dos quadros clínicos em ambos os sexos são semelhantes. Isto significa que tanto o método B como o método A são ineficazes na classificação da mutação R309W e dos seus fenótipos, respetivamente (35). O Quadro 3.60 ilustra os motivos pelo qual o método A é ineficaz na classificação dos fenótipos associados à mutação R309W em ambos os sexos.

Quadro 3.60 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R309W através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	<p>O método A é ineficaz na categorização dos fenótipos, uma vez que os fenótipos de ambos os sexos apresentam uma severidade semelhante (35). Em ambos os sexos verifica-se um quadro com sintomas significativos e proeminentes associados à RTT (28,114,129–131).</p> <p>É possível verificar desvios significativos ao quadro clínico referido anteriormente no sexo feminino, devido a uma XCI enviesada e devido à probabilidade de existência de outros fatores modeladores da severidade dos fenótipos, como é o caso do mosaicismo celular para a mutação (131). No entanto, foi considerado este quadro clínico para o fenótipo feminino, uma vez que corresponde à grande parte dos fenótipos femininos identificados, inclusive um caso com uma aparente XCI aleatória (129–131).</p>

3.4.7.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.61 ilustra os motivos pelo qual o método B é ineficaz na classificação da mutação R309W.

Quadro 3.61 - Classificação da mutação p.R309W, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	<p>O método B é ineficaz na categorização da mutação, uma vez que em ambos os sexos os fenótipos apresentam uma severidade semelhante (35). Em ambos os sexos verifica-se um quadro com sintomas significativos e proeminentes associados à RTT (28,114,129–131).</p> <p>É possível verificar desvios significativos ao quadro clínico referido anteriormente no sexo feminino, devido a uma XCI enviesada e devido à probabilidade de existência de outros fatores modeladores da severidade dos fenótipos, como é o caso do mosaicismo celular para a mutação (131). No entanto, foi considerado este quadro clínico para o fenótipo feminino, uma vez que corresponde à grande parte dos fenótipos femininos identificados, inclusive um caso com uma aparente XCI aleatória (129–131).</p>

3.5 Mutações no domínio CTD

3.5.1 p.P322S (c.964 C ->T)

A base de dados *RettBase* identifica a mutação P322S num caso masculino de seis anos de idade, com um quadro de atraso mental e com diversos sintomas associados à RTT (62,134). Ao analisar a história clínica deste rapaz, verifica-se que este teve um nascimento sem complicações, mas nos primeiros anos de vida revelou atrasos motores e linguísticos. Aos quatro anos de idade desenvolveu episódios convulsivos e espasmos musculares nos membros superiores e inferiores. Aos seis anos de idade, as convulsões apresentavam uma recorrência diária. Identificaram-se problemas na interação social uma vez que a comunicação verbal era escassa e uma vez que a capacidade de compreensão verbal era muito fraca (134).

O rapaz apresentava também dismorfismo facial (posição irregular dos dentes, implantação baixa das orelhas, protuberância frontal), um atraso mental moderado, sintomas associados à perturbação do espectro do autismo, hipotonia, fraqueza nos membros inferiores,

ataxia, tremores e dismetria. A análise ao cariótipo deste caso masculino revelou um cariótipo normal 46, XY (134).

Por sua vez, verificou-se que a mãe deste caso masculino é portadora heterozigota da mutação P322S. O estudo que identifica esta mutação descreve que a mãe apresenta sintomas pouco severos, nomeadamente, uma locomoção desequilibrada, tremores ligeiros, diminuição dos reflexos tendinosos e alguns sintomas sugestivos de ansiedade depressiva e de um quociente de inteligência abaixo da média. As análises realizadas evidenciaram uma XCI aleatória (134).

A literatura científica não identifica nenhum outro caso portador da mutação P322S (62,134). No entanto, estão identificados diversos casos patogénicos portadores da mutação P322A e da mutação P322L, no gene *MECP2*, no sexo feminino. Estes casos apresentam quadros clínicos com sintomatologia associada a quadros de RTT, e permitem evidenciar o potencial patogénico da mutação P322S, uma vez que ocorrem no mesmo aminoácido da proteína MeCP2 (62,134).

Assim, ao analisar os dois fenótipos portadores da mutação P322S com recurso aos critérios de classificação do método A, conclui-se que estes podem ser classificados segundo a categoria A3 do método A. Esta classificação tem em conta o quadro de atraso mental com anomalias motoras no sexo masculino e os sintomas pouco significativos no sexo feminino (35,134). O Quadro 3.62 ilustra a classificação realizada pelo método A aos dois fenótipos identificados com a mutação P322S.

Quadro 3.62 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P322S, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem os critérios da categoria A3 (35). No sexo masculino está presente um quadro de atraso mental com anomalias motoras. No sexo feminino os sintomas presentes são pouco severos e pouco significativos (134).

3.5.1.1 Classificação e avaliação do método B

Ao analisar os dois fenótipos portadores da mutação P322S com recurso aos critérios de classificação do método B, conclui-se que a mutação pode ser classificada segundo a categoria B3 do método B. Esta classificação tem em conta o quadro clínico com diversos sintomas

típicos de quadros de RTT no sexo masculino e os sintomas poucos severos e pouco significativos no sexo feminino (35,134). O Quadro 3.63 ilustra a classificação realizada pelo método B à mutação P322S.

Quadro 3.63 - Classificação da mutação p.P322S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B3	Eficaz (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B3 (35). No sexo masculino existe um quadro clínico com diversos sintomas relevantes, típicos de quadros de RTT. Por sua vez, no sexo feminino existe um quadro clínico com sintomas pouco severos e pouco significativos, típicos da RTT (134).

3.5.2 p.K331R (c.992 A ->G)

A mutação K331R está referenciada na *RetBase* através de um estudo que identificou a mutação no seio de uma família, nomeadamente, numa rapariga de 14 anos de idade com um quadro clínico com sintomatologia associada à RTT. O estudo identificou também a mutação no pai da rapariga que, por sua vez, se apresentava assintomático. A literatura científica não refere mais nenhum caso portador da mutação K331R, para além destes dois casos familiares referenciados na *RetBase* (62,135).

O caso feminino, apresenta um quadro clínico caracterizado pela presença de: atraso mental, sintomas associados à perturbação do espectro de autismo, disfunção motora generalizada, perda de comunicação verbal, movimentos estereotipados nas mãos, dispraxia, bruxismo, distúrbios vasomotores periféricos, hiperventilação, episódios apneicos, intensa comunicação com os olhos, resposta diminuída ao estímulo da dor e risos/gargalhadas/gritos/berros inapropriados (135).

Por sua vez, o pai do caso feminino, que também apresenta a mutação K331R, apresenta-se assintomático. Por esta razão, o estudo que identifica estes dois casos familiares

concluiu que a mutação K331R não é patogénica, tratando-se, por isso, de um polimorfismo genético raro do gene *MECP2* (135). Para corroborar esta hipótese, foi avaliada a capacidade patogénica da mutação através do programa bioinformático *PolyPhen-2*. Este programa classifica a mutação K331R como “benigna”, com um *score* de 0,396.

Deste modo, ao considerar o caso masculino assintomático e a avaliação realizada pelo programa *PolyPhen-2*, o presente trabalho considerou a mutação K331R como não patogénica (35,135). Esta classificação está de acordo com as duas premissas presentes no ponto 2.5 do presente trabalho, que estabelecem as condições para concluir que uma mutação no gene *MECP2* é benigna. O Quadro 3.64 ilustra a classificação realizada pelo método A aos fenótipos portadores da mutação K331R, considerando a mutação como um polimorfismo genético.

Quadro 3.64 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K331R, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as mutações benignas.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.2.1 Classificação e avaliação do método B

Ao considerar o caso masculino assintomático, a avaliação realizada pelo programa *PolyPhen-2*, e as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, procedeu-se à classificação da mutação K331R através do método B, considerando a mutação como um polimorfismo genético raro (Quadro 3.65).

Quadro 3.65 - Classificação da mutação p.K331R, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1. O estudo que identifica a mutação comprovou a não patogenicidade da mesma, e o programa <i>PolyPhen-2</i> classifica-a como uma mutação benigna (135).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.3 p.R344W (c.1030 C ->T)

Ao analisar a mutação R344W no sexo masculino, com recurso à base de dados *RettBase*, verifica-se que esta mutação é referenciada num estudo que identifica um rapaz com um quadro clínico associado a sintomas de RTT. Este estudo, de Laccone *et al* (2002), não refere informações adicionais relativas ao quadro clínico deste caso masculino. Apenas acrescenta que a mutação R344W presente no rapaz foi herdada pela mãe (62,116).

Por sua vez, ao analisar a frequência da mutação R344W no sexo feminino, com recurso à *RettBase*, verifica-se a existência de dois artigos científicos, sendo o primeiro referente à mãe do rapaz anteriormente referido, que se apresentava como portadora assintomática da mutação. O segundo artigo é referente a um estudo que, apesar de identificar a mutação R344W num indivíduo, e apesar de estar referenciada na secção dos casos femininos da *RettBase*, não especifica o sexo desse mesmo indivíduo no artigo (116,136). Por este motivo, o presente trabalho não considerou este último caso nas respetivas conclusões derivadas da análise da mutação R344W.

Ao utilizar a literatura científica para analisar a frequência da mutação R344W, é possível identificar um estudo, que refere uma rapariga de 11 anos de idade, com um quadro convulsivo muito precoce e um conjunto de sintomas típicos de RTT, portadora da mutação R344W, herdada através da mãe saudável (137). Este estudo não se encontra referenciado na *RetBase* (62). O quadro convulsivo neste caso feminino teve início aos oito meses de idade. Foram posteriormente identificados outros sintomas típicos da RTT, nomeadamente, hiperventilação, microcefalia, hipotonia, incapacidade de comunicar verbalmente, incapacidade motora nas mãos e contrações bruscas e irregulares nas mãos. Adicionalmente à mutação R344W no gene *MECP2*, o estudo que identificou este caso feminino, identificou simultaneamente outra mutação (V424M) no gene *SCN2A* (137).

Mutações no gene *SCN2A* estão associadas a fenótipos diversificados. Os sintomas principais e característicos destas mutações são os de quadros epiléticos e convulsivos, que surgem geralmente numa fase muito precoce, nos primeiros meses de vida da criança. Os fenótipos criados por mutações no gene *SCN2A* apresentam muitas vezes outros sintomas associados, nomeadamente, atraso mental, perturbações do espectro de autismo, disfunções motoras generalizadas e incapacidade de comunicar verbalmente. Foram, no entanto, identificados também quadros de atraso mental e de autismo em indivíduos com mutações no gene *SCN2A*, sem qualquer outro tipo de sintomatologia associada e sem a presença de episódios epiléticos e/ou convulsivos (138). Deste modo, tal como sucede com fenótipos criados por mutações no gene *MECP2*, os quadros clínicos presentes em indivíduos com mutações no gene *SCN2A* são muito diversificados em termos de severidade e de sintomatologia. Adicionalmente, é possível verificar que o conjunto de sintomas associados a mutações no gene *SCN2A* são, em grande parte, sobreponíveis ao conjunto de sintomas associados a mutações no gene *MECP2* (7,138,139). Este facto torna difícil estabelecer uma correlação entre as duas mutações identificadas neste caso feminino, no estudo de Liang *et al* (2017), e os seus respetivos sintomas (137). Ao utilizar o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica das duas mutações, o programa bioinformático classifica a mutação R344W no gene *MECP2* como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,997, e a mutação V424M no gene *SCN2A* como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 1.

O presente trabalho, ao analisar os fenótipos identificados portadores da mutação R344W, classificou os mesmos segundo a categoria A3 do método A. Isto porque, ao associar ao fenótipo masculino um quadro clínico com sintomas associados à RTT, como Laccione *et al* (2002) descreve, é possível considerar um fenótipo com anomalias motoras e/ou com atraso

mental para o sexo masculino, como descreve a categoria A3 (7,35,116). Esta mesma categoria do método A descreve, para o sexo feminino, quadros assintomáticos. O mesmo se verifica, ao analisara o fenótipo assintomático da mãe do caso masculino identificado, e a mãe assintomática da rapariga portadora da mutação no gene *SCN2A* (35,116,137).

O outro caso feminino, portador da mutação R344W, apresenta um quadro com sintomas significativos e proeminentes associados à RTT, ao invés do quadro assintomático, descrito pela categoria A3 (7,35,137). No entanto, este último caso feminino apresenta outra mutação, nomeadamente, a mutação V424M no gene *SCN2A*, ao qual é atribuída capacidade patogénica e capacidade para originar o fenótipo identificado neste caso feminino. Por esta razão, não é considerada como válida esta discrepância do quadro clínico identificado neste caso feminino comparativamente aos critérios de classificação descritos pela categoria A3 do método A (35,137). Assim, tendo em conta os factos expostos anteriormente, é possível verificar a eficácia do método A na classificação dos fenótipos portadores da mutação R344W (35). O Quadro 3.66 ilustra a classificação realizada pelo método de classificação A aos fenótipos identificados como portadores da mutação R344W.

Ao analisar a referência da mutação R344W em documentos disponíveis *online*, o presente trabalho identificou uma referência à mutação em estudo num documento referente à *European Human Genetics Conference 2006*. Neste documento é referido um pequeno relatório que refere a identificação da mutação R344W num caso masculino assintomático (140). O presente trabalho, ao realizar a análise da mutação em estudo, não considerou este caso masculino, uma vez que não se identificou nenhum artigo ou estudo publicado que refira este mesmo caso masculino assintomático. No entanto, ao considerar este caso masculino, verifica-se uma ineficácia do método A, uma vez que este fenótipo assintomático no sexo masculino não se enquadra nos critérios de classificação da categoria A3 do método A (35,140).

Quadro 3.66 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R344W, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3*	Os fenótipos cumprem os critérios da categoria A3 (35). No sexo masculino está presente um fenótipo com anomalias motoras e/ou com atraso mental (116). Por sua vez, no sexo feminino, está presente um fenótipo assintomático (116,137).

*Não foi considerado o caso mencionado no documento disponível *online*, relativo à *Human Genetics Conference 2006* (140)

3.5.3.1 Classificação e avaliação do método B

O presente trabalho, ao analisar o fenótipo masculino portador da mutação R344W com recurso aos critérios de classificação do método B, classificou a mutação com a categoria intermédia B2-B3. Isto porque, o artigo de Laccone *et al* (2002) refere apenas que o caso masculino identificado apresenta um fenótipo com sintomas associados à RTT, sem especificar a sua severidade. Deste modo, o presente trabalho classificou com uma severidade intermédia esta mutação, nomeadamente, entre a categoria B2, que estabelece, no sexo masculino, um quadro clínico com sintomas pouco severos ou pouco significativos de RTT, e entre a categoria B3, que estabelece um quadro clínico com sintomas proeminentes de RTT (7,35,116). Com base na classificação realizada anteriormente, é possível extrapolar um fenótipo feminino associado à mutação R344W. Assim, os quadros clínicos para o sexo feminino, associados à categoria intermédia B2-B3 do método B, são de quadros assintomáticos e/ou de quadros clínicos com sintomas pouco severos ou pouco significativos de RTT. Ao analisar os fenótipos femininos identificados, portadores da mutação R344W, verifica-se fenótipos assintomáticos, nomeadamente, a mãe do caso masculino, descrito por Laccone *et al* (2002), e a mãe da rapariga portadora da mutação V424M no gene *SCN2A* (35,116,137).

Não é aqui considerado o outro caso feminino, também portador da mutação R344W, que apresenta um quadro com sintomas proeminentes de RTT, uma vez que este apresenta simultaneamente a mutação V424M no gene *SCN2A*, ao qual é atribuída a capacidade patogénica e a capacidade para originar o quadro clínico identificado neste caso feminino. Este caso feminino não está englobado pelos critérios de classificação da categoria intermédia B2-B3 e, por isso, não é considerado no processo de classificação da mutação R344W. Considerando o exposto anteriormente, é possível confirmar a eficácia da classificação da mutação R344W com recurso ao método B (35,137).

O presente trabalho não considerou o caso masculino assintomático descrito no documento disponibilizado *online*, referente à *European Human Genetics Conference 2006*, uma vez que não se identificou nenhum artigo ou estudo publicado que refira este caso masculino assintomático. No entanto, ao considerar este caso, é possível verificar uma ineficácia do método B, uma vez que este fenótipo assintomático no sexo masculino não se esquadra nos critérios de classificação da categoria intermédia B2-B3 do método B (35,140).

Quadro 3.67 - Classificação da mutação p.R344W, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B2-B3	EFICAZ* (+1)	A categoria intermédia B2-B3 é a categoria que melhor descreve os fenótipos da mutação (35). O fenótipo masculino apresenta um fenótipo com sintomatologia associada a quadros de RTT, com uma severidade compreendida entre a categoria B2, que estabelece, no sexo masculino, um quadro clínico com sintomas pouco severos ou pouco significativos de RTT, e entre a categoria B3, que estabelece um quadro clínico com sintomas proeminentes de RTT (7,35,116). Por outro lado, no sexo feminino, estão identificados na literatura quadros assintomáticos, que correspondem aos critérios de classificação descritos pela categoria B2, que está englobada na categoria B2-B3 (35,116,137).

*Não foi considerado o caso mencionado no documento disponível *online*, relativo à *Human Genetics Conference 2006* (140)

3.5.4 p.A358T (c.1072 G ->A)

Ao utilizar a *Rettbase* para analisar a frequência da mutação A358T no sexo masculino é possível identificar dois estudos (122,136). O primeiro estudo menciona um rapaz com um quadro de encefalopatia epiléptica (122). O segundo estudo é referente a um caso masculino saudável (136). Por sua vez, ao analisar a frequência da mutação A358T no sexo feminino, foram identificadas quatro raparigas portadoras da mutação (136,141,142). Dos quatro casos femininos, dois apresentam sintomatologia associada, nomeadamente, de XLMR e de RTT (136,141). Os restantes dois casos femininos são referentes a casos assintomáticos (141,142). O estudo de Chen *et al* (2020), que permitiu identificar dois casos portadores da mutação A358T, nomeadamente um caso masculino com um quadro de esquizofrenia, e um caso feminino assintomático, não se encontra mencionado na base de dados *RettBase* (142).

O estudo de Zvereff *et al* (2012), que identificou o caso masculino assintomático, permitiu concluir que esta mutação não apresenta capacidade patogénica (116,136). Ao utilizar

o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação A358T, o mesmo classifica-a como “benigna”, com um *score* de 0. No entanto, não está excluída a hipótese de mosaicismo celular no caso masculino assintomático identificado. A presença de mosaicismo celular poderia explicar o quadro assintomático identificado (35,136).

Considerando as conclusões do estudo de Zvereff *et al* (2012), e a avaliação do programa bioinformático, que permite corroborar a conclusão que afirma que a mutação A358T é benigna, o presente trabalho, em conformidade com o estabelecido no ponto 2.5, classificou a mutação A358T como uma mutação sem capacidade patogénica (116,136).

Ao analisar a mutação em estudo com recurso ao método A, verifica-se que os critérios de classificação deste método não englobam mutações não patogénicas, uma vez que apenas classifica fenótipos com sintomatologia associada (35,136). O Quadro 3.68 ilustra a não abrangência do método A na classificação dos fenótipos identificados com a mutação A358T.

Quadro 3.68 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A358T, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Apesar dos diversos fenótipos identificados portadores da mutação A358T, não se deve realizar uma correlação entre os quadros sintomatológicos identificados e a mutação em estudo (122,136,141,142). Isto porque, foi demonstrado, tanto no estudo de Zvereff <i>et al</i> (2012) (136), como através do <i>programa PolyPhen-2</i>, que a mutação é não patogénica, não apresentando por isso a capacidade para originar qualquer quadro sintomatológico. Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.4.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.A358T segundo o método de classificação B (Quadro 3.69), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.69 - Classificação da mutação p.A358T, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O estudo de Zvereff <i>et al</i> (2012) (136) e o programa <i>PolyPhen-2</i> comprovam a não patogenicidade da mutação em estudo.</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.5 p.S359P (c.1075 T ->C)

A mutação S359P foi identificada em dois casos masculinos, através de um estudo que se encontra referido na *RettBase*. Um é referente a um rapaz com um quadro de atraso mental e um conjunto de diversos sintomas típicos de quadros de RTT, nomeadamente: atraso no desenvolvimento psicomotor, ataxia, movimentos estereotipados nas mãos, incapacidade de comunicar verbalmente, hiperventilação, bruxismo, dismorfismo facial, convulsões, distúrbios vasomotores periféricos, obstipação e risos/gargalhadas/comportamentos inapropriados. Por sua vez, o primo em primeiro grau do rapaz referido anteriormente, apresenta-se também como portador da mutação S359P, mas com um quadro assintomático (62,143).

Ao analisar a frequência da mutação S359P no sexo feminino, verifica-se a existência de quatro casos femininos com um quadro assintomático, todos pertencentes à família identificada por Moncla *et al* (2002). Existe adicionalmente outro caso feminino, também portador da mutação em estudo, com um quadro de RTT (119,143).

No entanto, a identificação de um caso masculino assintomático portador da mutação S359P, permitiu concluir que esta mutação não apresenta capacidade patogénica, tratando-se, por isso, de um polimorfismo genético (116,143). Ao utilizar o programa bioinformático *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação S359P, o mesmo classifica a

mutação como “benigna”, com um *score* de 0. Deste modo, e em concordância com as premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, considerou-se a mutação S359P como benigna, sem capacidade patogénica. O Quadro 3.70 ilustra a não abrangência do método A relativamente à classificação de fenótipos assintomáticos associados a mutações benignas.

Quadro 3.70 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S359P, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Apesar dos diversos fenótipos identificados portadores da mutação S359P, não se deve realizar uma correlação entre os quadros sintomatológicos identificados e a mutação em estudo (119,143). Isto porque, foi demonstrado, tanto no estudo de Moncla <i>et al</i> (2002) (143), como através do <i>programa PolyPhen-2</i>, que a mutação é não patogénica, não apresentando, por isso, a capacidade para originar qualquer quadro sintomatológico. Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.5.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.S359P segundo o método de classificação B (Quadro 3.71), sendo que esta mutação classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.71 - Classificação da mutação p.S359P, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O estudo de Moncla <i>et al</i> (2002) (143), e o programa <i>PolyPhen-2</i> comprovam a não patogenicidade da mutação.</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.6 p.P376S (c.1126 C ->T)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação P376S, verifica-se a existência de três estudos que identificam três casos masculinos portadores da mutação (62,115,116,126). Um dos casos é referente a um rapaz com uma perturbação do espectro de autismo e com um quadro de atraso mental (115). Os restantes dois casos masculinos são referentes a casos assintomáticos (116,126). Existem adicionalmente dois estudos publicados que identificam mais três casos masculinos portadores da mutação P376S. Destes últimos três casos, dois apresentam quadros clínicos com sintomatologia associada, e outro é referente a um caso assintomático (117,144).

A presença da mutação P376S em casos masculinos saudáveis permitiu concluir que a mesma não apresenta capacidade patogénica (116,117,126). Para corroborar esta conclusão utilizou-se o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação. Este programa bioinformático classifica a mutação P376S como “benigna”, com um *score* de 0.

Apesar dos dados expostos anteriormente evidenciarem a mutação P376S como um polimorfismo, a possibilidade de a mutação ter capacidade patogénica não fica totalmente excluída. Isto porque, existe a possibilidade de existir um mosaicismo celular para a mutação nos casos masculinos assintomáticos identificados. Isto permitiria ocultar qualquer

sintomatologia associada à mutação P376S (35,116,117,126). Realça-se também que existem estudos sobre o impacto da mutação e o seu efeito fisiológico que permitem concluir que existe uma significativa probabilidade de a mutação P376S apresentar capacidade para originar quadros sintomatológicos (144).

Deste modo, em concordância com as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, considerou-se a mutação P376S como um polimorfismo genético sem capacidade patogénica. O Quadro 3.72 ilustra a não abrangência do método de classificação A na classificação de mutações benignas.

Quadro 3.72 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P376S, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Apesar de existirem fenótipos portadores da mutação P376S associados a quadros sintomatológicos, não se deve realizar uma correlação entre esses quadros e a mutação (115–117,126,144). Isto porque, foi demonstrado, tanto através de casos masculinos assintomáticos, como através do programa <i>PolyPhen-2</i>, que a mutação é não patogénica, não apresentando, por isso, a capacidade para originar quadros sintomatológicos (116,117,126). Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.6.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P376S segundo o método de classificação B (Quadro 3.73), sendo que esta é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.73 - Classificação da mutação p.P376S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). A análise clínica dos casos masculinos assintomáticos portadores da mutação, e o programa <i>PolyPhen-2</i>, comprovam a não patogenicidade da mutação em estudo (116,117,126).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.7 p.A378V (c.1133 C ->T)

A base de dados *RettBase* identifica a mutação A378V num caso masculino assintomático. Este caso corresponde a um pai de uma rapariga, que se apresenta, também, como portadora da mutação A378V. No entanto, este último caso feminino apresenta, ao contrário do pai, um quadro sintomatológico de RTT (62,65).

O estudo que identificou o caso masculino assintomático mencionado anteriormente conclui que a mutação A378V é um polimorfismo genético raro, sem capacidade patogénica (65). Ao utilizar o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação, o mesmo classifica a mutação A378V como “possivelmente patogénica”, com um *score* de 0,895.

Assim, ao considerar simultaneamente o caso masculino assintomático portador da mutação em estudo, e a classificação de “possivelmente patogénica” por parte do programa bioinformático *PolyPhen-2*, o presente trabalho considerou a mutação A378V como benigna, sem capacidade patogénica (65,116). Esta consideração teve em conta as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, que estipula que na presença de casos masculinos assintomáticos portadores da mutação em estudo, apenas se deve considerar essa mutação com capacidade patogénica, se se verificar uma classificação de “provavelmente patogénica” por

parte do programa *PolyPhen-2*. As premissas estipuladas no ponto 2.5 pretendem salvaguardar a possibilidade de classificar erroneamente mutações benignas como patogénicas, e vice-versa. Neste caso em concreto, e em concordância com as premissas estabelecidas no ponto 2.5, o presente trabalho optou por adotar a mesma conclusão de Fukuda *et al* (2005), nomeadamente, que a mutação A378V se trata de uma mutação sem capacidade patogénica. Esta conclusão privilegia os dados clínicos evidenciados pelo caso masculino assintomático, ao invés dos dados probabilísticos demonstrados pelo programa *PolyPhen-2* (65,116). Não fica, no entanto, excluída a hipótese de existir um mosaicismo celular para a mutação no caso masculino assintomático. O mosaicismo permitiria ocultar qualquer sintomatologia associada à mutação P378V. O Quadro 3.74 ilustra a não abrangência do método A na classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas.

Quadro 3.74 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A378V, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.7.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.A378V segundo o método de classificação B (Quadro 3.75), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.75 - Classificação da mutação p.A378V, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação permite comprovar a não patogenicidade da mutação (65).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B poder considerar mutações como benignas.</p>

3.5.8 p.P381A (c.1141 C ->G)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação P381A, é mencionado um estudo que identifica a mutação no seio de uma família. Este estudo identifica a mutação P381A numa rapariga com um quadro de RTT e no seu pai assintomático. A identificação da mutação num caso masculino saudável permitiu concluir que a mutação P381A não apresenta capacidade patogénica, sendo, por isso, um polimorfismo genético benigno (62,145).

De forma a confirmar esta consideração, utilizou-se o programa *PolyPhen-2* para analisar a capacidade patogénica da mutação. Este programa bioinformático classifica a mutação P381A como “benigna”, com *score* de 0,003. Assim, considerando a classificação do programa *PolyPhen-2* e a conclusão do estudo de Pan *et al* (2002) (145), que identificou o caso masculino assintomático, o presente trabalho também classificou a mutação P381A como um polimorfismo benigno sem capacidade patogénica. Esta classificação está em concordância com as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho. Não fica, no entanto, excluída a hipótese de existir um mosaïcismo celular para a mutação no caso masculino assintomático. O mosaïcismo permitiria ocultar qualquer sintomatologia associada à mutação P381A (35,145).

O Quadro 3.76 ilustra a não abrangência do método A na classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas.

Quadro 3.76 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P381A, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.8.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P381A segundo o método de classificação B (Quadro 3.77), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.77 - Classificação da mutação p.P381A, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogenicidade da mutação (145).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.9 p.P387L (c.1160 C ->T)

A base de dados *RetBase* menciona a mutação P387L através de um estudo que identifica um rapaz com uma mutação que origina uma substituição na base nitrogenada citosina pela base nitrogenada timina na posição 1160 do gene *MECP2* (61,62). Este rapaz apresenta um quadro de atraso mental e o estudo que o identifica descartou, através de análises moleculares, a presença da síndrome de X frágil, uma causa bem conhecida e comum de atraso mental (61).

Esta mesma mutação foi identificada noutra estudo (146) que não se encontra mencionado na base de dados *RetBase*. Por sua vez, este estudo identifica a mutação P387L numa rapariga de 30 meses de idade e no seu pai assintomático. A rapariga portadora da mutação apresenta um período de regressão, com a perda da capacidade de comunicar verbalmente e um quadro sintomatológico caracterizado pela presença de movimentos estereotipados nas mãos e pela presença de incontinência fecal (146).

O facto de se ter identificado a mutação P387L num caso masculino assintomático revela uma alta probabilidade de esta mutação não apresentar capacidade patogénica (116,146). Deste modo, utilizou-se o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação P387L. Este programa classifica a mesma como “benigna”, com um *score* de 0,421. O programa *PolyPhen-2* corrobora a alta probabilidade de a mutação não apresentar capacidade patogénica. Utilizou-se o *site* da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para confirmar se a substituição da base nitrogenada citosina pela base nitrogenada timina, na posição 1160 do gene *MECP2*, origina de facto uma substituição do aminoácido prolina pelo aminoácido leucina. O NCBI, para além de confirmar a existência da substituição dos aminoácidos e a existência do polimorfismo P387L, descreve esta mutação com uma alta probabilidade de ser um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (147).

Assim, considerando as duas premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, o caso masculino assintomático portador da mutação em estudo, e a classificação realizada pelo programa *PolyPhen-2*, o presente trabalho considerou a mutação P387L como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (146). O Quadro 3.78 ilustra a tentativa de classificar os fenótipos portadores da mutação P387L através de critérios de classificação do método A, tendo em conta que este método não abrange fenótipos portadores de polimorfismos benignos no gene *MECP2*.

Quadro 3.78 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P387L, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Apesar de existirem fenótipos portadores da mutação P387L associados a quadros sintomatológicos, não se deve realizar uma correlação entre esses quadros e a mutação. Isto porque, foi demonstrado, tanto através do caso masculino assintomático, como através do programa <i>PolyPhen-2</i>, que a mutação não apresenta capacidade patogénica, nem capacidade para originar qualquer quadro sintomatológico (61,146). Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.9.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P387L segundo o método de classificação B (Quadro 3.79), sendo esta mutação classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.79 - Classificação da mutação p.P387L, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogénica da mutação (146).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.10 p.E394K (c.1180 G ->A)

Ao analisar a frequência da mutação E394K no sexo masculino através da base de dados *RettBase*, são referenciados dois estudos que identificam, no total, três casos masculinos portadores da mutação (62,64,148). O primeiro estudo, de Yntema *et al* (2002) (64), identificou a mutação E394K num rapaz com um quadro de atraso mental. Ao analisar os familiares deste rapaz, o estudo identificou também a mutação na mãe e no avô materno. Por se detetar a mutação E394K num caso masculino assintomático, Yntema *et al* (2002), concluíram que a mutação não apresenta capacidade patogénica, tratando-se, por isso, de um polimorfismo genético benigno (64).

O segundo estudo referenciado na *Rettbase* identificou a mutação numa rapariga com RTT e no seu pai assintomático (148). Este segundo estudo corrobora as conclusões de Yntema *et al* (2002), pois a identificação de mais um caso masculino assintomático portador da mutação permite confirmar a inexistência de patogenicidade na mutação E394K (64,148). Existe, no entanto, outro estudo publicado, que não se encontra referenciado na *RettBase*, e que identifica um rapaz portador da mutação E394K com uma perturbação do espectro de autismo e com um quadro de atraso mental (149).

Foi utilizado o programa bioinformático *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação em estudo. Este classifica a mutação E394K como “benigna”, com um *score* de 0. Assim, o programa bioinformático corrobora as conclusões dos artigos expostos anteriormente (64,148). Considerando a classificação do programa *PolyPhen-2* e os casos masculinos assintomáticos portadores da mutação identificados (64,116,148), o presente trabalho classificou a mutação E394K como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica. Esta classificação está de acordo com as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho. O Quadro 3.80 ilustra a não abrangência do método A na classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas.

Quadro 3.80 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.E394K, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.10.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.E394K segundo o método de classificação B (Quadro 3.81), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.81 - Classificação da mutação p.E394K, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). Os casos masculinos assintomáticos portadores da mutação em estudo e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogénicidade da mutação (64,148).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.11 p.E397K (c.1189 G ->A)

Ao utilizar a *RetBase* para analisar a frequência da mutação E397K no sexo masculino, são evidenciados cinco estudos que identificam, no total, cinco casos masculinos (26,62,64,67,120,143). Destes casos, quatro são referentes a casos de atraso mental ou de autismo (64,67,120,143). No entanto, o último caso masculino, portador da mutação E397K, identificado no estudo de Wan *et al* (1999) (26), é de um rapaz assintomático. Deste modo, Wan *et al* (1999), concluíram que a mutação E397K não apresenta capacidade patogénica, tratando-se, por isso, de um polimorfismo genético benigno (26). No entanto, não fica excluída a hipótese de existir um mosaicismo celular para a mutação em estudo no caso masculino assintomático. O mosaicismo permitiria ocultar qualquer sintomatologia associada à mutação E397K (26,35).

Para corroborar as conclusões do estudo de Wan *et al* (1999), utilizou-se o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação em estudo. O programa bioinformático classifica a mutação E397K como “benigna”, com um score de 0, o que permite corroborar a inexistência de patogenicidade associada à mutação E397K (26). Considerando a classificação do programa *PolyPhen-2* e o caso masculino assintomático portador da mutação (26), o presente trabalho classificou também a mutação E397K como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica. Esta classificação está de acordo com as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho. O Quadro 3.82 ilustra a não abrangência do método A na classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas.

Quadro 3.82 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.E397K, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.11.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.E397K segundo o método de classificação B (Quadro 3.83), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.83 - Classificação da mutação p.E397K, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogenicidade da mutação (26).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.12 p.P399L (c.1196 C ->T)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação P399L, são evidenciados dois estudos que identificam, no total, dois casos masculinos portadores da mutação em estudo (61,62,116). O estudo de Couvert *et al* (2001) (61), foi o primeiro a identificar a mutação P399L, nomeadamente, num rapaz com um quadro de atraso mental. Estabeleceu, por isso, uma correlação entre a mutação P399L e o quadro sintomatológico identificado (61). Pouco tempo depois, foi publicado outro estudo que permitiu identificar novamente a mutação P399L. Neste último estudo, de Laccone *et al* (2002), foi possível comprovar a inexistência de patogenicidade associada à mutação P399L, uma vez que foi identificado um caso masculino assintomático portador da mutação (116). No entanto, não fica excluída a hipótese de existência de mosaïcismo celular para a mutação no caso masculino

assintomático identificado. A presença de mosaicismo permitiria ocultar qualquer sintomatologia associada à mutação (35,116).

De forma a corroborar as conclusões do estudo de Laccone *et al* (2002), utilizou-se o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação. Este programa classifica a mutação P399L como “benigna”, com um *score* de 0,089. Esta classificação permite corroborar a inexistência de patogenicidade associada à mutação. Assim, considerando a classificação do programa *PolyPhen-2* e o caso masculino assintomático portador da mutação, o presente trabalho classificou a mutação P399L como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (116). O Quadro 3.84 ilustra a não abrangência do método A na classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas.

Quadro 3.84 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P399L, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Deste modo, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.12.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P399L segundo o método de classificação B (Quadro 3.85), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.85 - Classificação da mutação p.P399L, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIÇÃO MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogenicidade da mutação (116).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.13 p.S401N (c.1202 G ->A)

A mutação S401N é referenciada na base de dados *RettBase* num estudo que permitiu identificar uma rapariga, portadora da mutação em estudo, com uma perturbação do espectro de autismo e com um quadro de atraso mental (62,77). Este mesmo estudo identificou que o pai da rapariga era portador assintomático da mutação S401N. Este caso masculino permitiu evidenciar a inexistência de patogenicidade associada à mutação S401N (77). No entanto, não fica excluída a hipótese de existência de mosaïcismo celular para a mutação neste caso masculino assintomático, uma vez que o mosaïcismo celular permitiria ocultar qualquer sintomatologia (35,77).

Foi utilizado o programa bioinformático *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação. Este programa classifica a mutação S401N como “benigna”, com um score de 0,244. Esta classificação permite corroborar a inexistência de patogenicidade associada à mutação. Deste modo, considerando a classificação do programa *PolyPhen-2* e o caso masculino assintomático, o presente trabalho classificou também a mutação S401N como um polimorfismo genético, sem capacidade patogénica (77,116). Esta classificação está de acordo com as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho. O Quadro 3.86 ilustra a não

abrangência do método A na classificação de fenótipos portadores de mutações não patogênicas.

Quadro 3.86 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.S401N através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogênicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Assim, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.13.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.S401N segundo o método de classificação B (Quadro 3.87), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.87 - Classificação da mutação p.S401N, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogenicidade da mutação (77).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.14 p.P402L (c.1207 C ->T)

Utilizou-se a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação P402L. Esta é referenciada apenas num estudo que permitiu identificar a mutação no seio de uma família (62,115). Neste estudo, de Beyer *et al* (2002) (115), a mutação foi primeiramente identificada numa rapariga com uma perturbação do espectro de autismo. Posteriormente, verificou-se que a irmã e o primo em primeiro grau da rapariga referida anteriormente são também portadores da mutação P402L. O primo apresenta um quadro sintomatológico de autismo e a irmã apresenta-se como portadora assintomática. No entanto, o pai da rapariga com o quadro de autismo apresenta-se também como portador da mutação, mas sem qualquer sintomatologia associada. A identificação deste caso masculino assintomático permitiu inferir a inexistência de patogenicidade associada à mutação P402L (115). Contudo, não fica descartada a hipótese de existência de mosaicismo celular para a mutação no caso masculino assintomático. O mosaicismo permitiria ocultar qualquer sintomatologia associada à mutação (35,115).

Usou-se o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação. Este programa bioinformático classifica a mutação P402L como “benigna”, com um *score* de 0. Esta classificação corrobora a inexistência de patogenicidade. Deste modo, considerando a classificação realizada pelo programa *PolyPhen-2* e os dados disponíveis no estudo de Beyer *et al* (2002), que demonstram a inexistência de patogenicidade associada à mutação, o presente trabalho classifica a mutação P402L como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (35,115,116). O Quadro 3.88 ilustra a não abrangência do método A na classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas.

Quadro 3.88 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P402L, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Assim, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.14.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P402L segundo o método de classificação B (Quadro 3.89), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.89 - Classificação da mutação p.P402L, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogenicidade da mutação (115).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.15 p.P405L (c.1214 C ->T)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação P405L, identificou-se dois estudos que, no total, identificam dois rapazes portadores da mutação. Ambos os casos masculinos apresentam um quadro de atraso mental associado a outros sintomas típicos de RTT, nomeadamente, movimentos estereotipados nas mãos, autismo, episódios epiléticos e/ou convulsivos, incapacidade de comunicar verbalmente, perda da capacidade motora nas mãos, dismorfismo facial e macrocefalia (62,121,150). Um dos estudos permitiu identificar a mutação P405L na mãe e na irmã de um dos rapazes. Ambas apresentavam um quociente de inteligência abaixo da média e um quadro epilético (121). Não se identificou, na literatura científica, mais nenhum caso identificado com a mutação P405L.

A mutação P405L ocorre num aminoácido altamente conservado da proteína MeCP2 e numa região crítica para a função da proteína, uma vez que esta região é responsável por realizar

interações entre a proteína MeCP2 e o ADN (121,151,152). Assim, a mutação P405L pode afetar a função da proteína MeCP2, existindo, por isso, a probabilidade de ter capacidade patogénica (121).

Para avaliar a capacidade patogénica da mutação, utilizou-se o programa *PolyPhen-2*. Este programa bioinformático classifica a mutação como “provavelmente patogénica” com um *score* de 1. Esta classificação corrobora a existência de patogenicidade associada à mutação P405L (121). O estudo de Campos *et al* (2009) menciona que outros programas bioinformáticos, para além do *PolyPhen-2*, como o programa *SIFT* e *Align-GVGD* (http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php), preveem que esta mutação apresente capacidade patogénica. Estes programas, à semelhança do *PolyPhen-2*, permitem prever se uma determinada mutação apresenta capacidade patogénica com base no seu impacto na estrutura e estabilidade das proteínas (150).

Ao analisar os dois casos masculinos identificados, pode-se concluir que os fenótipos masculinos portadores da mutação P405L são caracterizados por quadros clínicos com sintomas típicos de RTT (121,150). Por sua vez, os dois casos femininos portadores da mutação P405L são caracterizados por um quadro sintomatológico pouco severo ou pouco significativo, nomeadamente, um quadro com um quociente de inteligência abaixo da média e um quadro epilético (121). Deste modo, pode-se verificar que os quadros sintomatológicos associados aos casos femininos portadores da mutação em estudo são menos severos comparativamente aos quadros sintomatológicos dos casos masculinos. Esta é a premissa basilar para a classificação através dos métodos A e B e ocorre porque o gene *MECP2* mutado é diluído pelo gene *MECP2* não mutado no sexo feminino, devido a existência da XCI. Este fenómeno permite inativar uma parte dos cromossomas X mutados, ocultando o potencial patogénico associado à mutação P405L nos dois fenótipos femininos identificados (35,36,121,150).

Considerando os quadros sintomatológicos identificados portadores da mutação em estudo, a região da mutação, que é conservada e crítica para a função da proteína MeCP2, e as diversas classificações realizadas pelos programas bioinformáticos, como o programa *PolyPhen-2*, o presente trabalho classificou a mutação P405L como uma mutação com capacidade patogénica (35,121,150). O Quadro 3.90 ilustra a classificação realizada pelo método A aos fenótipos identificados com a mutação P405L e os motivos que sustentam essa mesma classificação.

Quadro 3.90 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P405L, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos identificados cumprem os critérios de classificação da categoria A3 (35). Os fenótipos identificados no sexo masculino são caracterizados por um quadro de atraso mental com anomalias motoras. Por sua vez, o fenótipo feminino é caracterizado por um quadro sintomatológico pouco severo (quociente de inteligência abaixo da média e quadro epilético) (121,150).

3.5.15.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P405L segundo o método de classificação B. O Quadro 3.91 ilustra esta classificação, sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B3.

Quadro 3.91 - Classificação da mutação p.P405L, através do método B. O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	B3	EFICAZ (+1)	Os fenótipos cumprem os critérios da categoria B3 (35). Isto porque existe no sexo masculino um fenótipo com sintomas típicos de quadros de RTT. Por sua vez, no sexo feminino existe um fenótipo caracterizado por quadros sintomatológicos pouco significativos e/ou pouco severos (epilepsia e quociente de inteligência abaixo da média) (121,150).

3.5.16 p.K417M (c.1250 A ->T)

Ao utilizar a base de dados *RetBase* para analisar a frequência da mutação K417M no sexo masculino, o mesmo é referenciado apenas num único estudo publicado de Kankirawatana *et al* (2006) (62,105). Este mesmo estudo descreve um rapaz com um quadro sintomatológico neonatal bastante severo. Este quadro sintomatológico provocou a morte prematura deste rapaz aos 14 meses de idade devido à sua severidade e era caracterizado pela presença de microcefalia, desaceleração do crescimento cefálico, EEG anormal, espasmos bruscos e repentinos e insuficiência respiratória. A mutação K417M foi transmitida ao caso masculino descrito anteriormente através da mãe. O estudo de Kankirawatana *et al* (2006) permitiu identificar a mutação em estudo na mãe assintomática deste rapaz, que apresenta uma XCI aleatória (105).

Não se identificou na literatura científica nenhum outro caso com a mutação K417M. Deste modo, e em concordância com o ponto 2.5 do presente trabalho, procedeu-se à análise dos fenótipos identificados segundo os critérios de classificação do método A. Ao analisar os fenótipos concluiu-se que o método A é ineficaz (35,62,105). O Quadro 3.92 ilustra esta ineficácia, evidenciando os motivos pelo qual o método A é ineficaz na classificação dos fenótipos identificados como portadores da mutação K417M.

Quadro 3.92 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.K417M através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	<p>O método A é ineficaz na categorização dos fenótipos identificados, uma vez que que o fenótipo masculino e feminino obedecem a diferentes categorias do método A (35).</p> <p>O fenótipo masculino portador da mutação K417M é caracterizado por um quadro clínico severo, com problemas respiratórios graves numa fase muito precoce. Por este motivo, o caso masculino apresentou uma morte prematura com poucos anos de vida. Este quadro sintomatológico é caracterizado pelos critérios da categoria A1 do método A. No entanto, ao analisar o fenótipo feminino portador da mutação K417M, o mesmo é caracterizado por um quadro assintomático, o que corresponde aos critérios de classificação da categoria A3 do método A (35,105).</p>

3.5.16.1 Classificação e avaliação do método B

Em concordância com o ponto 2.5 do presente trabalho, procedeu-se à análise dos fenótipos identificados segundo os critérios de classificação do método B. Ao analisar o fenótipo masculino e feminino, ambos portadores da mutação K417M, através dos critérios de classificação do método B, concluiu-se que o método é ineficaz (35,105). O Quadro 3.93 ilustra esta ineficácia, evidenciando os motivos pelo qual o método B é ineficaz na classificação da mutação K417M.

Quadro 3.93 - Classificação da mutação p.K417M, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	<p>O método B é ineficaz na categorização desta mutação, uma vez que o fenótipo masculino e feminino obedecem a distintas categorias do método B (35).</p> <p>O fenótipo masculino portador da mutação em estudo é caracterizado por um quadro clínico com sintomas de RTT bastante severos e incapacitantes. Os sintomas identificados demonstram-se incompatíveis com a vida devido à sua severidade, originando uma morte prematura, com apenas 14 meses de idade. Este quadro clínico identificado no caso masculino é abrangido pela categoria B4 do método B. Por sua vez, o fenótipo feminino portador da mutação K417M é caracterizado por um quadro assintomático, que é abrangido pelas categorias B2 e/ou B1 do método B (35,105).</p>

Não é claro se a mutação K417M, que ocorre num aminoácido extremamente conservado na proteína MeCP2, apresenta capacidade patogénica. Ao analisar a capacidade patogénica da mutação através do programa bioinformático *PolyPhen-2*, o mesmo classifica a mutação K417M como “benigna”, com um *score* de 0,007. Esta classificação indica uma probabilidade reduzida de a mutação apresentar capacidade patogénica. Assim, caso a mutação em estudo não for a causa para o quadro sintomatológico severo, este fator poderia explicar a ineficácia dos métodos A e B (35,105).

Há que ter em conta que a XCI aleatória evidenciada pelos linfócitos de uma amostra de sangue não exclui a possibilidade de existir uma XCI enviesada no cérebro do caso feminino identificado. Considerando que a aparente XCI aleatória, identificada no caso feminino do estudo de Kankirawatana *et al* (2006), foi obtida através da análise aos linfócitos de uma amostra de sangue, este fator poderia também explicar a ineficácia dos métodos A e B, uma vez que existe a possibilidade de ocultação de sintomatologia associada à mutação K417M no caso feminino (105).

3.5.17 p.G428S (c.1282 G ->A)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação G428S no sexo masculino, são referenciados dois estudos que identificam no total três casos masculinos (62,116,149,153). O primeiro estudo, de Imessaoudene *et al* (2001) (153), identifica um rapaz de três anos de idade com uma encefalopatia neonatal. Este foi fruto de uma gravidez e de um parto sem complicações e apresentou um quadro de hipotonia e de hipermobilidade articular nos primeiros meses de vida. Este estudo refere ainda um atraso motor severo neste caso masculino e que aos três anos de idade apresentava distúrbios motores, atrofia muscular, incapacidade de comunicar verbalmente, e descoordenação motora. Por fim, os autores referem que este caso nunca perdeu a capacidade motora nas mãos e que não perdeu qualquer capacidade adquirida, sendo que, aos três anos de idade, apresentava a capacidade de caminhar sem apoio (153).

O caso masculino descrito por Imessaoudene *et al* (2001) apresenta um cariótipo normal 46, XY e herdou a mutação G428S através da sua mãe assintomática. Para além da mãe, portadora assintomática da mutação, o estudo permitiu identificar a mutação em duas tias maternas, também assintomáticas. Imessaoudene *et al* (2001) concluíram que a mutação G428S é patogénica (153).

O segundo estudo referenciado na *RettBase*, que permitiu identificar a mutação G428S no sexo masculino, descreve um rapaz com uma encefalopatia severa fatal (62,116). Este estudo, de Laccone *et al* (2002), descreve um rapaz, fruto de uma gravidez e parto sem complicações, com um quadro convulsivo severo e intratável e com um quadro de atrofia

muscular. Este rapaz, que nunca chegou a adquirir a capacidade motora nas mãos, sofreu uma morte prematura aos 18 meses de idade, devido à gravidade do seu quadro clínico (116).

O estudo de Laccone et al (2002) permitiu ainda identificar a mutação G428S na mãe e no avô materno do rapaz, sendo ambos portadores assintomáticos da mutação. Deste modo, Laccone *et al* (2002) concluíram que a mutação é um polimorfismo genético benigno, devido ao caso masculino assintomático e devido ao facto de a mesma mutação (G428S) originar quadros sintomatológicos de severidade totalmente distintas (116).

Existe outro estudo publicado, que não se encontra referenciado na base de dados *RettBase*, e que identifica a mutação G428S noutro caso masculino (62,149). Este estudo, de Wang *et al* (2018), descreve um caso masculino com um quadro de autismo, atraso mental severo, distúrbios no sono, distúrbios de humor, perturbação de hiperatividade/défice de atenção e incapacidade de comunicar verbalmente (149).

Ao analisar o conjunto dos quatro fenótipos masculinos portadores da mutação em estudo, verifica-se quadros clínicos totalmente distintos. Existe um quadro assintomático e três quadros sintomatológicos que apresentam severidades distintas entre si (116,149,153). Assim, de modo a verificar a patogenicidade da mutação, utilizou-se o programa bioinformático *PolyPhen-2*. Este programa classifica a mutação G428S como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,957. O programa *PolyPhen-2*, ao contrário do que o estudo de Laccone *et al* (2002) conclui, evidência uma alta probabilidade de a mutação em estudo apresentar capacidade patogénica e evidência uma alta probabilidade de a mutação apresentar capacidade para originar os quadros sintomatológicos identificados (116).

Considerando a classificação realizada pelo programa *PolyPhen-2*, e em concordância com o estipulado no ponto 2.5 do presente trabalho, procedeu-se à análise dos fenótipos portadores da mutação G428S, através dos critérios de classificação do método A (116,149,153). O Quadro 3.94 ilustra a ineficácia, por parte do método A, ao classificar os fenótipos portadores da mutação G428S e os motivos que sustentam a ineficácia do método.

Quadro 3.94 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.G428S através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	O método A é ineficaz na categorização dos fenótipos, uma vez que os fenótipos masculinos com a mutação apresentam severidades totalmente distintas, obedecendo, por isso, a diferentes categorias do método A. Como confirma o estudo de Laccone <i>et al</i> (2002), existe um quadro assintomático, que corresponde à categoria A1, e existem quadros sintomatológicos com severidades totalmente distintas entre si, que correspondem à categoria A3. Assim, torna-se ineficaz a classificação dos fenótipos masculinos identificados com recurso aos critérios de classificação do método A (35,116,149,153).

3.5.17.1 Classificação e avaliação do método B

Considerando a classificação do programa *PolyPhen-2*, e em concordância com o ponto 2.5 do presente trabalho, procedeu-se à análise dos fenótipos portadores da mutação G428S através dos critérios de classificação do método B (116,149,153). O Quadro 3.95 ilustra a ineficácia do método B em classificar a mutação G428S, e os motivos que sustentam essa ineficácia.

Quadro 3.95 - Classificação da mutação p.G428S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	<p>O método B é ineficaz na categorização desta mutação, uma vez que os fenótipos masculinos com a mutação apresentam severidades totalmente distintas, obedecendo, por isso, a diferentes categorias do método B (35,116,149,153).</p> <p>Como confirma o estudo de Laccone <i>et al</i> (2002), os fenótipos masculinos com a mutação são incongruentes entre si. Existe um fenótipo assintomático, que corresponde à categoria B1 do método B, e fenótipos com quadros sintomatológicos de severidade distintas. Estes últimos quadros sintomatológicos correspondem às categorias B3 e B4 do método B, considerando o quadro clínico com sintomas de RTT e o quadro clínico severo que provocou uma morte prematura, respetivamente. Assim, considerando as dispersas categorias do método B que englobam os fenótipos masculinos, verifica-se uma incongruência que se traduz na ineficácia do método B em classificar a mutação em estudo (35,116,149,153).</p>

3.5.18 p.P430S (c.1288 C ->T)

A mutação P430S no gene *MECP2* é referenciada na base de dados *RettBase* através de um estudo que descreve um rapaz de 9 anos de idade, cego à nascença, e com um quadro severo de atraso mental e sintomas característicos de RTT (62,154). Este rapaz, fruto de uma gravidez e parto sem complicações, desenvolveu-se normalmente nos seus primeiros meses de vida, mas aos 3 anos de idade surgiu um período de regressão no seu desenvolvimento. Este perdeu a capacidade de comunicar verbalmente e o seu quadro sintomatológico era caracterizado por movimentos estereotipados nas mãos, distúrbios respiratórios, bruxismo, distúrbios no sono, risos/gargalhadas/comportamentos inapropriados e obstipação (154).

O estudo identificou um cariótipo normal 46, XY no rapaz e verificou que a mutação P430S foi herdada através da mãe, que se apresentava como portadora assintomática da mutação. O estudo permitiu ainda identificar a mutação no avô materno e em duas tias maternas do rapaz, sendo todos estes casos assintomáticos. Por se ter identificado um caso masculino portador da mutação P430S com um quadro assintomático, o estudo que identificou esta mutação não realiza uma correlação direta entre o quadro sintomatológico identificado no rapaz de 9 anos de idade e a mutação (154).

Utilizou-se o programa bioinformático *PolyPhen-2* para analisar a capacidade patogénica da mutação. Este programa classifica a mutação P430S como “benigna”, com um *score* de 0,008. Assim, considerando a classificação do programa *PolyPhen-2* e a identificação do caso masculino assintomático portador da mutação, o presente trabalho, em concordância com as premissas estabelecidas no ponto 2.5, classificou a mutação P430S como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (154). O Quadro 3.96 ilustra a ineficácia do método de classificação A, ao tentar classificar os fenótipos identificados como portadores da mutação P430S, e os motivos que sustentam a classificação ineficaz.

Quadro 3.96 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P430S através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Assim, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.18.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.P430S segundo o método de classificação B (Quadro 3.97), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.97 - Classificação da mutação p.P430S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogenicidade da mutação (154).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.19 p.A443T (c.1327 G ->A)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a frequência da mutação A443T, verifica-se que esta é referida no estudo de Zvereff *et al* (2012) (62,136). Este estudo descreve um rapaz de quatro anos de idade portador da mutação com um quadro de atraso mental e alguns sintomas típicos da RTT. Os sintomas de RTT presentes neste caso masculino são movimentos estereotipados nas mãos e o atraso no desenvolvimento da linguagem verbal. O estudo permitiu ainda identificar a mutação A443T na mãe do rapaz. A mãe, por sua vez, apresenta um quadro assintomático (136).

Zvereff *et al* (2012) considerou a mutação em estudo como uma variante com patogenicidade desconhecida (136). Ao utilizar o programa bioinformático *PolyPhen-2* para analisar a patogenicidade da mutação, este programa classifica a mutação A443T como “benigna”, com um *score* de 0,002. No entanto, considerando que não se identificou na literatura científica mais nenhum caso portador da mutação A443T, e considerando as duas premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, prosseguiu-se com a análise dos fenótipos portadores da mutação A443T através dos critérios de classificação do método A (35,62,136). O Quadro 3.98 ilustra a classificação realizada pelo método de classificação A aos fenótipos portadores da mutação A443T.

Quadro 3.98 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A443T, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem os critérios da categoria A3 (35). No sexo masculino está presente um fenótipo com anomalias motoras e/ou com atraso mental. Por sua vez, no sexo feminino, está presente um fenótipo assintomático (136).

3.5.19.1 Classificação e avaliação do método B

Considerando que não se identificou na literatura científica mais nenhum caso portador da mutação A443T, e considerando as duas premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, prosseguiu-se com a análise dos fenótipos portadores da mutação A443T com recurso aos critérios do método B. O presente trabalho ao analisar os fenótipos identificados, classificou a mutação A443T com a categoria intermédia B2-B3 (35,62,136). O Quadro 3.99 ilustra esta classificação realizada pelo método B e os motivos que a sustentam.

Quadro 3.99 - Classificação da mutação p.A443T, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B2-B3	EFICAZ (+1)	<p>A categoria intermédia B2-B3 é a categoria que melhor descreve os fenótipos da mutação. Isto porque tanto o fenótipo masculino como o fenótipo feminino são abrangidos pelos critérios da categoria intermédia B2-B3 (35,136).</p> <p>A categoria B2-B3 compreende no sexo masculino um quadro clínico com sintomas de RTT e/ou um quadro clínico com sintomas pouco significativos de RTT e/ou um quadro clínico com severidade intermédia entre os dois quadros clínicos referidos anteriormente. O fenótipo masculino portador da mutação A443T, ao apresentar um quadro sintomatológico com sintomas típicos de RTT, está englobado nesta categoria intermédia (35,136).</p> <p>Por sua vez, a categoria intermédia B2-B3 compreende, no sexo feminino, um quadro clínico assintomático e/ou um quadro clínico com sintomas de RTT pouco significativos/severos e/ou com um quadro clínico com uma severidade intermédia entre os dois quadros clínicos referidos anteriormente. Deste modo, ao considerar o fenótipo feminino assintomático portador da mutação A443T, este caso está também abrangido pela categoria intermédia B2-B3 (35,136).</p>

3.5.20 p.A444T (c.1330 G ->A)

A mutação A444T é referida na base de dados *RettBase* através de dois estudos que identificam casos masculinos portadores da mutação (62,67,124). O primeiro estudo permitiu identificar um caso masculino assintomático portador da mutação. Este caso masculino, que transmitiu a mutação à filha, foi descrito como sendo o pai de uma rapariga com um quadro

sintomatológico típico da RTT (124). Por outro lado, o segundo estudo mencionado na *RetBase* identifica um rapaz portador da mutação A444T com uma perturbação do espectro de autismo (67).

Os dois estudos referidos anteriormente classificam a mutação A444T como um polimorfismo genético benigno devido ao caso masculino assintomático identificado com a mutação (67,124). Ao utilizar o programa bioinformático *PolyPhen-2* para analisar a capacidade patogénica, este programa classifica a mutação A444T como “benigna”, com um *score* de 0,005.

A base de dados *RetBase* menciona ainda outros casos femininos portadores da mutação com quadros sintomatológicos diversos e típicos de RTT (62). No entanto, ao considerar as duas premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, o caso masculino assintomático portador da mutação, e a classificação do programa *PolyPhen-2*, o presente trabalho também classificou a mutação A444T como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (116,124). O Quadro 3.100 ilustra a não abrangência do método A na classificação dos fenótipos portadores da mutação A444T e os motivos a sustentam.

Quadro 3.100 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.A444T, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Assim, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.20.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.A444T segundo o método de classificação B (Quadro 3.101), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B1.

Quadro 3.101 - Classificação da mutação p.A444T, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogenicidade da mutação (124).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.21 p.R453Q (c.1358 G ->A)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a mutação R453Q, verifica-se que esta mutação é referida apenas num único estudo que descreve um rapaz portador da mutação com um quadro de atraso mental. O estudo permitiu excluir, através de análises moleculares, a presença da síndrome de X frágil, uma causa bastante comum e conhecida de quadros de atraso mental (61,62).

Não se identificou na literatura científica mais nenhum caso com a mutação R453Q. Esta mutação ocorre num aminoácido altamente conservado ao longo da evolução. O estudo que permitiu identificar o caso masculino portador da mutação em estudo não estabeleceu uma correlação direta entre a mutação R453Q e o quadro de atraso mental identificado, uma vez que se não se conhece ainda os efeitos da mutação sobre a função e estabilidade da proteína MeCP2 (61).

Deste modo, utilizou-se o programa bioinformático *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação. Este programa classifica a mutação R453Q como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,997, revelando assim uma alta probabilidade de a mutação R453Q apresentar capacidade patogénica.

Ao considerar-se as duas premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho e a classificação do programa *PolyPhen-2*, prosseguiu-se, de seguida, com a análise do fenótipo portador da mutação R453Q com recurso aos critérios de classificação do método A (35,61). O Quadro 3.102 ilustra a classificação realizada pelo método A ao fenótipo portador da mutação em estudo e os motivos que a sustentam.

Quadro 3.102 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R453Q, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	A3	Os fenótipos cumprem os critérios da categoria A3 (35). O fenótipo masculino é caracterizado por um quadro de atraso mental (61). Por outro lado, pode-se considerar o fenótipo feminino como um quadro assintomático, considerando que não se identificaram casos femininos portadores da mutação em estudo (61,62).

3.5.21.1 Classificação e avaliação do método B

Procedeu-se de seguida à classificação da mutação p.R453Q segundo o método de classificação B (Quadro 3.103), sendo que esta mutação é classificada como pertencendo à categoria B2.

Quadro 3.103 - Classificação da mutação p.R453Q, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B2	Eficaz (+1)	Os fenótipos cumprem todos os critérios para a categoria B2 (35). No sexo masculino existe um fenótipo de XLMR. No sexo feminino, por outro lado, não se identificaram casos (61,62).

3.5.22 p.R458H (c.1373 G ->A)

Ao utilizar a base de dados *RetBase* para analisar a mutação R458H no sexo masculino, verifica-se que a mutação é mencionada num estudo que identifica um caso masculino assintomático portador da mutação (62,155). Este caso masculino é pai de quatro raparigas, sendo que duas destas apresentam-se também como portadoras da mutação R458H. Concluiu-se, por isso, que o pai assintomático transmitiu a mutação em estudo a duas filhas suas. Por sua vez, as duas raparigas portadoras da mutação apresentam um quadro clínico com sintomas típicos de RTT. As restantes duas filhas do caso masculino assintomático apresentam-se saudáveis e não são portadoras da mutação R458H. Assim, ao utilizar as informações disponibilizadas pelo estudo, conclui-se que foram identificados como portadores da mutação R458H um caso masculino assintomático e dois casos femininos com quadros sintomatológicos típicos de RTT (155).

Os quadros clínicos das duas raparigas portadoras da mutação são caracterizados pela presença de hipotonia, desaceleração do crescimento cefálico, incapacidade de comunicar verbalmente, episódios convulsivos (num dos casos), e movimentos estereotipados nas mãos (num dos casos). O estudo que identificou estes dois casos femininos permitiu identificar em cada um destes casos deleções no gene *MECP2*. Assim, os dois casos femininos identificados, para além da mutação R458H, apresentam, simultaneamente, uma deleção no gene *MECP2*. Torna-se, por este motivo, difícil estabelecer uma correlação entre os quadros clínicos com sintomas típicos de RTT e a mutação R458H (155).

Ao utilizar o programa bioinformático *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação R458H, este programa classifica a mesma como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 0,996. Deste modo, o programa *PolyPhen-2* indica uma elevada probabilidade de a mutação em estudo apresentar capacidade patogénica. Considerando esta classificação e as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, prosseguiu-se com a análise dos fenótipos portadores da mutação através dos critérios de classificação do método A. Mas a presença simultânea de duas mutações no gene *MECP2* nos casos femininos impossibilita concluir sobre o fenótipo feminino criado pela mutação R458H. Assim, revela-se inconclusiva qualquer tentativa de classificação da mutação em estudo e os seus respetivos fenótipos através dos métodos de classificação A e B (35,155). O Quadro 3.104 ilustra os motivos pelo qual o presente trabalho considera inconclusiva qualquer tentativa de classificação dos fenótipos com recurso aos critérios de classificação do método A.

Quadro 3.104 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R458H, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Inconclusivo	Considerou-se como inconclusiva qualquer tentativa de classificação dos fenótipos identificados com a mutação, uma vez que os únicos casos femininos portadores da mutação em estudo apresentam, simultaneamente, duas mutações no gene <i>MECP2</i> , impossibilitando, por isso, concluir sobre o fenótipo feminino criado pela mutação em estudo (35,155). Um motivo adicional que revela que é inconclusiva qualquer tentativa de classificação baseia-se no facto de os dados clínicos provenientes do único fenótipo masculino identificado com a mutação em estudo serem contraditórios quando confrontados com os dados provenientes do programa <i>PolyPhen-2</i> (35,155).

3.5.22.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.105 ilustra os motivos pelo qual o presente trabalho considera inconclusiva qualquer tentativa de classificação da mutação R458H com recurso aos critérios de classificação do método B.

Quadro 3.105 - Classificação da mutação p.R458H, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	Inconclusivo	N/A	Considerou-se como inconclusiva qualquer tentativa de classificação dos fenótipos identificados com a mutação, uma vez que os únicos casos femininos portadores da mutação em estudo apresentam, simultaneamente, duas mutações no gene <i>MECP2</i> , impossibilitando, por isso, concluir sobre o fenótipo feminino criado pela mutação em estudo (35,155). Um motivo adicional que revela que é inconclusiva qualquer tentativa de classificação baseia-se no facto de os dados clínicos provenientes do único fenótipo masculino identificado com a mutação em estudo serem contraditórios quando confrontados com os dados provenientes do programa <i>PolyPhen-2</i> (35,155).

N/A – Não aplicável

3.5.23 p.T479M (c.1436 C ->T)

A mutação T479M é referida na base de dados *RettBase* através de um estudo que identifica um caso masculino assintomático portador da mutação. Este caso masculino transmitiu a mutação à sua filha, que apresenta, por sua vez, um quadro clínico de RTT. Deste modo, existem identificados na literatura científica como casos portadores da mutação T479M um caso masculino e um caso feminino (62,65).

O estudo que permitiu identificar estes casos concluiu que a mutação T479M se apresenta como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica, uma vez que foi identificado num caso masculino assintomático (65). De forma a corroborar esta hipótese, utilizou-se o programa *PolyPhen-2* para analisar a capacidade patogénica da mutação. Este programa classifica a mutação T479M como “provavelmente patogénica”, com um *score* de 1, revelando, assim, uma alta probabilidade de apresentar capacidade patogénica.

Considerando a classificação do programa *PolyPhen-2* e as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, prosseguiu-se à análise dos fenótipos portadores da mutação em estudo através dos critérios de classificação do método A (35). Para que seja possível classificar a mutação T479M e os seus respetivos fenótipos através dos critérios de classificação dos métodos A e B, é necessário que o quadro sintomatológico presente no sexo masculino seja mais severo e incapacitante, quando comparado com o quadro sintomatológico presente no sexo feminino (35). Neste caso, esta premissa não se verifica. Ao comparar a severidade dos dois fenótipos identificados com a mutação em estudo, verifica-se que o fenótipo feminino é caracterizado por ser incapacitante, com sintomas típicos de quadros de RTT, enquanto o fenótipo masculino é caracterizado por um quadro assintomático. Deste modo, pode-se concluir que os métodos de classificação B e A são ineficazes, respetivamente, na classificação da mutação T479M e dos seus fenótipos (35,65). O Quadro 3.106 ilustra a ineficácia na classificação dos fenótipos identificados com a mutação T479M, através dos critérios de classificação do método A.

Quadro 3.106- Classificação dos fenótipos com a mutação p.T479M, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	Ineficaz	O método A é ineficaz na categorização desta mutação. O fenótipo que surge no sexo feminino apresenta um quadro clínico mais incapacitante quando comparado com o quadro clínico assintomático que surge no sexo masculino (35,65).

3.5.23.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.107 ilustra os motivos pelo qual o método B é ineficaz na classificação da mutação T479M.

Quadro 3.107 - Classificação da mutação p.T479M, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AVALIAÇÃO MÉTODO	
B	Ineficaz	Ineficaz (+0)	O método B é ineficaz na categorização desta mutação. O fenótipo que surge no sexo feminino apresenta um quadro clínico mais incapacitante quando comparado com o quadro clínico assintomático que surge no sexo masculino (35,65).

É importante realçar que a presença de mosaïcismo celular para a mutação no fenótipo masculino poderia explicar a ineficácia dos métodos A e B. Isto porque a presença de mosaïcismo celular permitiria ocultar qualquer sintomatologia associada à mutação T479M no caso masculino identificado como portador da mutação em estudo (35,65). Outro fator que poderia explicar a ineficácia dos métodos A e B tem por base não considerar a mutação T479M como a causa para o quadro sintomatológico de RTT identificado no caso feminino portador da mutação, uma vez que existem outros genes, como o gene *FOXG1* e o gene *CDKL5*, com capacidade para originar quadros clínicos com sintomas típicos de RTT (7,48,65,125).

3.5.24 p.P480S (c.1438 C ->T)

A mutação P480S é mencionada na base de dados *RetBase* através do estudo de Yntema *et al* (2002) (64). Este estudo identificou a mutação num rapaz com um quadro de atraso mental. Foi descartada neste caso masculino, através de análises moleculares, a presença da síndrome de X frágil, uma causa bem conhecida e comum de atraso mental (64).

O estudo de Yntema *et al* (2002) permitiu ainda identificar a mutação P480S na mãe e no irmão do rapaz referido anteriormente. Tanto a mãe como o irmão, ambos portadores da mutação, apresentavam-se saudáveis sem qualquer sintomatologia associada. Por se ter identificado a mutação no irmão, sendo este um caso masculino assintomático, Yntema *et al* (2002) concluíram que a mutação P480S é um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (64).

De forma a corroborar esta afirmação, utilizou-se o programa bioinformático *PolyPhen-2* para analisar a capacidade patogénica da mutação. Este programa classifica a mutação P480S como “benigna”, com um score de 0,267. Deste modo, o programa *PolyPhen-2* corrobora a conclusão de Yntema *et al* (2002), uma vez que indica uma alta probabilidade de a mutação P480S ser benigna (64).

Ao considerar as duas premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, a classificação realizada pelo programa *PolyPhen-2* e o caso masculino assintomático portador da mutação, o presente trabalho também considerou a mutação P480S como um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica (64,116). O Quadro 3.108 ilustra a não abrangência do método A relativamente a fenótipos portadores de mutações benignas.

Quadro 3.108 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.P480S, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Assim, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35,64).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.24.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.109 ilustra como o método B classifica a mutação P480S, um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica.

Quadro 3.109 - Classificação da mutação p.P480S, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo e o programa <i>PolyPhen-2</i> permitem comprovar a não patogénica da mutação (64).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

3.5.25 p.R484T (c.1451 G ->C)

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar a mutação R484T, verifica-se que esta é referida no estudo de Yaron *et al* (2002) ao identificar uma rapariga portadora da mutação com um quadro clínico com sintomas típicos de RTT (62,156). Este mesmo estudo permitiu identificar a mutação no pai assintomático da rapariga referida anteriormente, permitindo, deste modo, identificar um caso masculino assintomático portador da mutação R484T (156).

Devido a este caso masculino saudável, o estudo concluiu que a mutação R484T não apresenta capacidade patogénica (156). De forma a corroborar esta conclusão utilizou-se o programa *PolyPhen-2* para avaliar a capacidade patogénica da mutação. Este programa classifica a mutação R484T como “possivelmente patogénica”, com um *score* de 0,895. É importante realçar que existe a possibilidade de existir um mosaicismo celular para a mutação no caso masculino assintomático. A presença de mosaicismo permitiria ocultar qualquer sintomatologia associada à possível patogénica da mutação R484T (35,156).

No entanto, ao considerar simultaneamente o caso masculino assintomático portador da mutação, e a classificação de “possivelmente patogénica” por parte do programa bioinformático *PolyPhen-2*, o presente trabalho considerou a mutação em estudo como benigna, sem capacidade patogénica (65,116). Esta consideração teve em conta as premissas estipuladas no ponto 2.5 do presente trabalho, que estipula que na presença de casos masculinos assintomáticos portadores da mutação em estudo, apenas se deve considerar essa mutação com capacidade patogénica, se se verificar uma classificação de “provavelmente patogénica” por parte do programa *PolyPhen-2*. As premissas estipuladas no ponto 2.5 pretendem salvaguardar a possibilidade de classificar erroneamente mutações benignas como patogénicas e vice-versa. Neste caso em concreto, e em concordância com as premissas estabelecidas no ponto 2.5, o presente trabalho optou por adotar a mesma conclusão de Yaron *et al* (2002), nomeadamente, que a mutação R484T se trata de uma mutação sem capacidade patogénica. Esta conclusão privilegia os dados clínicos evidenciados pelo caso masculino assintomático, ao invés dos dados probabilísticos demonstrados pelo programa *PolyPhen-2* (116,156). O Quadro 3.110 ilustra a não abrangência do método A ao classificar os fenótipos portadores da mutação R484T.

Quadro 3.110 - Classificação dos fenótipos com a mutação p.R484T, através do método A

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO		OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	
A	N/A	<p>O método A não contempla a classificação de fenótipos portadores de mutações não patogénicas. Este método só tem em conta fenótipos com sintomatologia associada. Assim, mutações que originam quadros assintomáticos não se enquadram neste método (35,156).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho.</p>

N/A – Não aplicável

3.5.25.1 Classificação e avaliação do método B

O Quadro 3.111 ilustra como o método B classifica a mutação R484T, um polimorfismo genético benigno, sem capacidade patogénica.

Quadro 3.111 - Classificação da mutação p.R484T, através do método B – O método B pretende classificar as mutações no gene *MECP2* segundo os fenótipos apresentados nos dois sexos. A avaliação do método tem em conta a capacidade do mesmo para prever e contextualizar os fenótipos apresentados pela mutação em estudo.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO			OBSERVAÇÕES
MÉTODO	CATEGORIA	AValiação MÉTODO	
B	B1	Eficaz (+1)	<p>O método B classifica a mutação com a categoria B1 (35). O caso masculino assintomático portador da mutação em estudo permite corroborar a não patogenicidade da mutação (156).</p> <p>Esta classificação é realizada em concordância com as duas premissas estabelecidas no ponto 2.5 do presente trabalho, que contemplam as condições necessárias para o método B considerar mutações como benignas.</p>

4 Discussão

4.1 Avaliação do método de classificação B

Após a análise do conjunto de mutações *missense* no gene *MECP2* identificadas no sexo masculino e referidas na base de dados *RetBase*, prosseguiu-se com a avaliação do método B, tendo em conta a sua capacidade para prever e contextualizar os fenótipos associados às mutações em estudo. A amostra de mutações analisadas no presente trabalho engloba as mutações referidas no ponto 2.3 e exclui as mutações que apresentem pelo menos um critério de exclusão referido no ponto 2.3.1. O Quadro 4.1 ilustra as mutações excluídas da amostra em estudo e os motivos que sustentam a exclusão.

Quadro 4.1 – Listagem das mutações excluídas da amostra em estudo - Enumeração dos motivos pelo qual se excluíram da amostra em estudo mutações identificadas no sexo masculino ou referidas na base de dados *RetBase*

MUTAÇÃO EXCLUÍDA	MOTIVO DE EXCLUSÃO
K12N	O artigo científico que menciona a mutação não descreve informações clínicas sobre o indivíduo portador da mutação K12N, o que torna impossível analisar o quadro sintomatológico e a sua severidade. Estas informações são necessárias para a classificação das mutações e dos seus respetivos fenótipos através dos métodos A e B.
G329S e A447T	Não se identificou qualquer menção das mutações nos respetivos artigos científicos mencionados na base de dados <i>RetBase</i> .
A439T	Não foi possível identificar o sexo do indivíduo portador da mutação A439T através do artigo científico que menciona esta mutação na base de dados <i>RetBase</i> . Considerando os critérios de classificação dos métodos A e B, é necessário identificar o sexo do fenótipo identificado com uma mutação no gene <i>MECP2</i> para a realização das classificações.
OUTRAS MUTAÇÕES NÃO ANALISADAS	As restantes mutações excluídas identificadas no sexo masculino e referidas na base de dados <i>RetBase</i> não estão analisadas no presente trabalho, uma vez que não apresentam nenhum artigo científico associado.

De modo a avaliar a capacidade do método B para realizar uma correlação genótipo/fenótipo, utilizou-se a metodologia descrita no ponto 2.6 do presente trabalho. Considerando que se analisou no total 54 mutações no gene *MECP2*, apurou-se o número de vezes que o método B foi eficaz no estabelecimento de uma correlação genótipo/fenótipo.

Mas antes de realizar este apuramento é importante referir que o método B foi inconclusivo na classificação de quatro mutações. São três as razões pelo qual se considerou que o método B foi inconclusivo. A primeira baseia-se na falta de um prognóstico clínico, devido aos poucos meses de vida do único fenótipo identificado com a mutação em questão, nomeadamente a mutação F157I. A segunda razão baseia-se no facto de os fenótipos decisivos para o estabelecimento de uma correlação genótipo/fenótipo, nomeadamente na classificação das mutações P251L e R458H, apresentarem simultaneamente duas mutações no gene *MECP2*. Por último, não se considerou como ineficaz a classificação realizada pelo método B para a mutação D147E, uma vez que o método B antevê, nos seus critérios de classificação, a necessidade de inexistência de fatores modeladores de severidade dos fenótipos (XCI enviesada, mosaicismo celular para a mutação e SK).

Considerando o exposto anteriormente, e segundo a metodologia descrita no ponto 2.6, o presente trabalho não considerou para os cálculos da percentagem (%) de eficácia do método B as classificações consideradas como inconclusivas, de forma a não prejudicar a avaliação do método B. Assim, ao considerar o conjunto de 54 mutações analisadas, e as quatro classificações inconclusivas, utilizou-se para o cálculo da percentagem de eficácia do método B uma amostra de 50 mutações.

Deste conjunto de 50 mutações analisadas, verificou-se que o método B foi eficaz em classificar 41 mutações e foi ineficaz em classificar 9 mutações. Conclui-se, por isso, que o método B apresenta uma percentagem de eficácia de 82%. Isto significa que da amostra de 50 mutações no gene *MECP2* identificadas no sexo masculino, o método B foi eficaz em 82% dos casos para realizar uma correlação genótipo/fenótipo. Esta percentagem de eficácia engloba a classificação das mutações consideradas como benignas no presente trabalho, considerando as premissas estipuladas no ponto 2.5.

4.1.1 Comparação do método A com o método B

Para analisar a capacidade do método A para prever e contextualizar os fenótipos associados às mutações, prosseguiu-se com o cálculo de eficácia do método A em classificar a amostra de mutações em estudo. Verificou-se que o método A foi eficaz em classificar 17 mutações e ineficaz em classificar 11 mutações. No entanto, foi inconclusivo em classificar 3 mutações e não abrangeu a classificação de 23 mutações não patogénicas.

As três classificações consideradas inconclusivas por parte do método A, provenientes da análise das mutações F157I, P251L e R458H não foram consideradas para o cálculo da percentagem de eficácia do método A, pelas mesmas razões expostas no ponto 4.1. Por outro lado, também não se considerou as tentativas de classificação do método A sobre as mutações consideradas benignas, uma vez que o método A antevê, nos seus critérios de classificação, apenas a classificação de mutações patogénicas, com capacidade para originar quadros clínicos com sintomatologia associada.

Assim, ao considerar o exposto anteriormente, o conjunto de mutações devidamente analisadas pelo método A foi de 28 mutações (das 54 mutações analisadas retiraram-se as 3 classificações inconclusivas e as 23 mutações consideradas benignas), tendo o método classificado eficazmente 17 mutações e ineficazmente 11 mutações. Isto traduz-se numa percentagem de eficácia de 60,7%.

É importante realçar que a percentagem de 82% de eficácia do método B engloba a classificação das mutações consideradas como benignas no presente trabalho. Foram consideradas como benignas todas as mutações que obedecessem às premissas estipuladas no ponto 2.5 e classificadas eficazmente com a categoria B1 do método B. Apesar de para todas estas mutações existirem fenótipos com quadros clínicos com sintomatologia associada, o presente trabalho considerou inválida qualquer associação entre estes quadros clínicos identificados e as mutações consideradas como benignas, uma vez que as duas premissas estipuladas no ponto 2.5 evidenciam a inexistência de patogenicidade associada a estas mesmas mutações.

Tendo em conta que o método de classificação A não têm em consideração a classificação de mutações benignas, apenas mutações patogénicas, é importante comparar a percentagem de eficácia do método A com a percentagem de eficácia do método B em classificar apenas mutações patogénicas no gene *MECP2*.

Ao considerar as 54 mutações no gene *MECP2* analisadas, das quais 23 são consideradas benignas no presente trabalho, e ao considerar as quatro classificações inconclusivas por parte do método B, verifica-se uma percentagem de 66,7% de eficácia do método B em classificar o conjunto de mutações patogénicas da amostra em estudo. Verifica-se que ao considerar-se apenas a classificação das mutações patogénicas, a percentagem de eficácia do método B é menor (ver Quadro 4.2).

No entanto, esta percentagem de 66,7% é maior quando comparada à percentagem de eficácia de 60,7% do método A (ver Quadro 4.2). Isto deve-se sobretudo a duas razões. A primeira deriva do facto de o método A não prever fenótipos com uma severidade intermédia entre as suas categorias. Um exemplo disso é o caso da classificação dos quadros clínicos portadores da mutação R133C, onde os fenótipos identificados apresentam uma severidade intermédia entre as categorias A1 e A3. Por outro lado, o método B prevê estes fenótipos com severidades intermédias, pelo que na classificação da mutação R133C e dos seus respetivos fenótipos, verificou-se uma eficácia por parte do método B e uma ineficácia do método A.

A segunda razão pela qual o método B apresenta uma percentagem de eficácia maior em classificar as mutações patogénicas, advém do facto de o método A ser ineficaz na classificação da mutação T160S, uma vez que não tem englobado, nos seus critérios de classificação, fenótipos masculinos com quadros clínicos menos severos, como o quadro de autismo. O quadro masculino menos severo englobado pelo método A é de atraso mental, sendo que um quadro de autismo é menos severo e distinto de um quadro de atraso mental. Por outro lado, o método B prevê melhor uma diversidade de fenótipos criados pelas mutações no gene *MECP2*, sendo, por este motivo, o método B eficaz na classificação da mutação T160S.

Ambas as mutações T160S e R133C ocorrem no domínio funcional MBD. Por essa razão, a percentagem de eficácia do método B em classificar as mutações identificadas neste domínio funcional é superior quando comparada à percentagem de eficácia do método A em classificar as mutações identificadas neste domínio. Por outro lado, verifica-se que as percentagens de eficácia dos métodos A e B em classificar os conjuntos de mutações analisadas, de forma individual, em cada domínio funcional da proteína MeCP2 são semelhantes. Isto porque o método B apenas tem vantagem sobre o método A em classificar estas duas mutações, pelas razões expostas anteriormente (ver Quadro 4.2).

No entanto, existiu um caso em que o método A teve uma melhor capacidade para prever e contextualizar os fenótipos comparativamente ao método B. Este caso é referente à mutação

D147E e seus respectivos fenótipos. Neste caso, o método A, por prever nos seus critérios de classificação fatores modeladores da severidade de quadros clínicos (mosaicismo celular para a mutação, SK e XCI enviesada), consegue, através da categoria A2, classificar fenótipos criados por mutações no gene *MECP2* na presença destes fatores modeladores. Por outro lado, o método B antevê, nos seus critérios de classificação, a necessidade da inexistência destes fatores modeladores de severidade dos fenótipos. Por este motivo, no caso referente à mutação D147E, o método B não é ineficaz na classificação, mas apenas inconclusivo. É por esta razão que o número da amostra de mutações patogénicas analisadas no domínio MBD é diferente entre os métodos A e B. Ao comparar os dois métodos, conclui-se que o método A tem vantagem em classificar mutações e seus respectivos fenótipos na presença de fatores modeladores de severidade de quadros clínicos (mosaicismo celular para a mutação, SK e XCI enviesada).

4.1.2 Eficácia do método B nos domínios funcionais da proteína MeCP2

O presente trabalho avaliou também a capacidade do método B para prever e contextualizar os fenótipos associados às mutações em estudo em cada domínio funcional da proteína MeCP2. Realizou-se a mesma avaliação sobre a capacidade do método A, de forma a poder realizar uma comparação entre os dois métodos. Com esta análise, que incide nos domínios funcionais da proteína MeCP2 de forma individualizada, pretende-se avaliar se mutações *missense* no gene *MECP2*, em determinado domínio funcional, origina fenótipos que não cumprem as premissas basilares dos métodos A e B. Com estas premissas basilares depreende-se a existência de fenótipos com severidades diferentes entre o sexo masculino e o sexo feminino para cada mutação analisada, sendo que, para cada uma dessas mutações, deve existir um fenótipo mais severo e incapacitante no sexo masculino quando comparado com o fenótipo feminino.

4.1.2.1 Eficácia do método B no domínio MBD

Ao analisar o conjunto de 11 mutações analisadas no domínio MBD da proteína MeCP2, o método B classificou eficazmente nove mutações e ineficazmente duas mutações. Isto traduz-se numa percentagem de eficácia de 81,8% na classificação. Esta percentagem tem em conta a classificação eficaz das mutações consideradas benignas.

Ao considerar a capacidade do método B para classificar apenas as mutações patogénicas identificadas no domínio MBD da proteína MeCP2, verifica-se que o método B apresenta uma percentagem de eficácia de 80%. Por outro lado, o método A apresenta uma percentagem de eficácia de 63,6% ao classificar o conjunto de mutações patogénicas identificadas no domínio MBD

4.1.2.2 Eficácia do método B no domínio ID

Ao analisar o conjunto total de nove mutações analisadas no domínio ID da proteína MeCP2, o método B classificou eficazmente oito mutações e ineficazmente uma mutação. Isto traduz-se numa percentagem de eficácia de 88,9% na classificação destas mutações. Esta percentagem tem em conta a classificação eficaz das mutações consideradas benignas.

Ao considerar a capacidade do método B para classificar apenas as mutações patogénicas identificadas no domínio ID da proteína MeCP2, verifica-se que o método B apresenta uma percentagem de eficácia de 80%. Por outro lado, o método A apresenta também uma percentagem de eficácia de 80% ao classificar o conjunto de mutações patogénicas identificadas no domínio ID.

4.1.2.3 Eficácia do método B no domínio TRD

Ao analisar o conjunto total de seis mutações analisadas no domínio TRD da proteína MeCP2, o método B classificou eficazmente três mutações e ineficazmente três mutações. Isto traduz-se numa percentagem de eficácia de 50%. Esta percentagem tem em conta a classificação eficaz das mutações consideradas benignas pelo presente trabalho.

Ao considerar a capacidade do método B para classificar apenas as mutações patogénicas identificadas no domínio TRD da proteína MeCP2, verifica-se que o método B

apresenta uma percentagem de eficácia de 25%. Por outro lado, o método A apresenta também uma percentagem de eficácia de 25% ao classificar o conjunto de mutações patogénicas identificadas no domínio TRD.

4.1.2.4 Eficácia do método B no domínio CTD

Ao analisar o conjunto total de 24 mutações analisadas no domínio CTD da proteína MeCP2, o método B classificou eficazmente 21 mutações e ineficazmente três mutações. Isto traduz-se numa percentagem de eficácia de 87,5% na classificação. Esta percentagem tem em conta a classificação eficaz das mutações consideradas benignas pelo presente trabalho.

Ao considerar a capacidade do método B para classificar apenas as mutações patogénicas identificadas no domínio CTD da proteína MeCP2, verifica-se que o método B apresenta uma percentagem de eficácia de 62,5%. Por outro lado, o método A apresenta também uma percentagem de eficácia de 62,5% ao classificar o conjunto de mutações patogénicas identificadas no domínio CTD.

4.1.2.5 Análise da eficácia do método B nos domínios da proteína MeCP2

O Quadro 4.2 resume as percentagens de eficácia dos métodos A e B em classificar as mutações em estudo. Este quadro ilustra a percentagem de eficácia do método B em classificar o conjunto de mutações patogénicas e benignas. Ilustra também a percentagem de eficácia do método B em classificar apenas o conjunto de mutações patogénicas, de forma a poder-se comparar com a percentagem de eficácia do método A, que classifica apenas mutações patogénicas. Por fim, permite ainda analisar individualmente a percentagem de eficácia dos respetivos métodos de classificação A e B sobre os conjuntos de mutações analisadas em cada domínio da proteína MeCP2.

Quadro 4.2 – Eficácia dos métodos A e B na classificação das mutações em estudo e respetivos fenótipos – Resumo das percentagens de eficácia dos métodos A e B sobre as mutações *missense* identificadas na proteína MeCP2 e nos seus respetivos domínios funcionais. Os valores entre parênteses, abaixo dos valores de percentagem, indicam o número de mutações utilizadas para o respetivo cálculo das percentagens de eficácia.

MUTAÇÕES PATOGENICAS E BENIGNAS					
MÉTODO B	% de eficácia na proteína MeCP2	% de eficácia para cada domínio funcional da proteína MeCP2			
		MBD	ID	TRD	CTD
	82% (50)	81,8% (11)	88,9% (9)	50% (6)	87,5% (24)
MUTAÇÕES PATOGENICAS					
MÉTODO B	% de eficácia na proteína MeCP2	% de eficácia para cada domínio funcional da proteína MeCP2			
		MBD	ID	TRD	CTD
	66,7% (27)	80% (10)	80% (5)	25% (4)	62,5% (8)
MÉTODO A	% de eficácia na proteína MeCP2	% de eficácia para cada domínio funcional da proteína MeCP2			
		MBD	ID	TRD	CTD
	60,7% (28)	63,6% (11)	80% (5)	25% (4)	62,5% (8)

Ao analisar o Quadro 4.2 é possível tirar algumas conclusões. O primeiro dado observável a partir do Quadro 4.2 baseia-se no facto de a percentagem de eficácia do método B ser menor a classificar o conjunto de mutações patogénicas comparativamente à percentagem de eficácia de classificação de mutações patogénicas e benignas. Esta conclusão aplica-se não só ao conjunto de mutações identificadas ao longo da proteína MeCP2, mas também se aplica às percentagens de eficácia em classificar as mutações identificadas em cada domínio funcional da proteína MeCP2.

Isto pode ser explicado pelo facto de o método B ser sempre eficaz em classificar, através da categoria B1, as mutações benígnas. Assim, por se remover da amostra de mutações analisadas o conjunto de mutações benígnas, que o método B classifica sempre eficazmente com a categoria B1, o número da amostra de mutações analisadas diminui, o que origina um decréscimo da percentagem de eficácia do método B tanto em classificar as mutações patogénicas identificadas ao longo da proteína MeCP2, como em classificar os conjuntos de mutações patogénicas identificadas em cada domínio funcional da proteína MeCP2.

Ao analisar as percentagens de eficácia dos métodos A e B, verifica-se que ambos os métodos obtêm percentagens razoavelmente boas. No entanto, o mesmo não se verifica ao analisar as percentagens de eficácia de ambos os métodos em classificar as mutações identificadas no domínio TRD da proteína MeCP2 (ver Quadro 4.2). São dois os motivos em que se baseia esta baixa percentagem de eficácia. O primeiro deriva do facto de duas mutações patogénicas (P225L e R309W) identificadas no domínio TRD originarem quadros clínicos no sexo masculino e feminino com severidades semelhantes. Esta situação contraria a premissa basilar dos métodos A e B, que afirma que, na ausência de fatores modeladores da severidade dos quadros clínicos (XCI enviesada, SK e mosaicismo celular para a mutação), o fenótipo criado por uma mutação patogénica no gene *MECP2* é sempre mais severo e incapacitante no sexo masculino quando comparado com o fenótipo feminino. O segundo motivo que explica a baixa percentagem de eficácia ao classificar o conjunto de mutações patogénicas no domínio TRD, advém do facto de a mutação P272L originar quadros clínicos díspares no sexo masculino e no sexo feminino. Isto resulta numa ineficácia por parte dos métodos A e B em prever e contextualizar os quadros clínicos associados à mutação.

Por sua vez, os motivos pelo qual os métodos A e B obtêm uma percentagem de eficácia menor no domínio CTD, comparativamente aos domínios MBD e ID, são semelhantes aos expostos anteriormente, nomeadamente, a criação de quadros clínicos díspares (mutação G428S) e a criação de quadros clínicos mais severos e incapacitantes no sexo feminino (mutação T479M). Por fim, a mutação K417M, também localizada no domínio CTD, origina quadros clínicos nos dois sexos impossíveis de contextualizar e categorizar segundo os critérios de classificação dos métodos A e B. A Figura 4.1 ilustra a distribuição ao longo da proteína MeCP2 das mutações classificadas de forma ineficaz através dos critérios de classificação do método B.

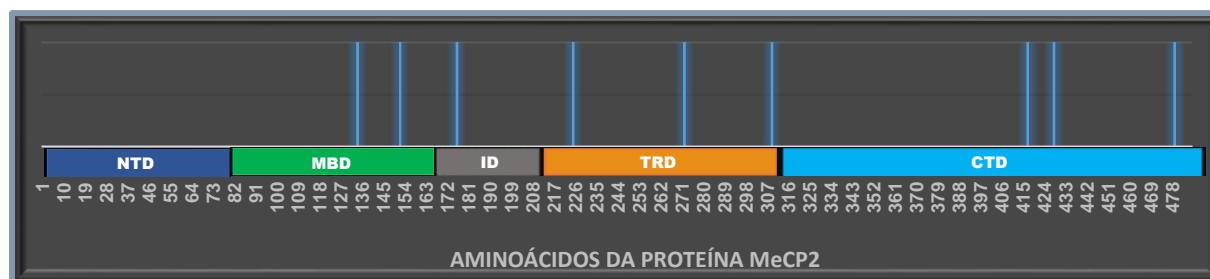


Figura 4.1 – Distribuição das mutações classificadas ineficazmente através do método B – Ilustração da localização na proteína MeCP2 das nove mutações classificadas ineficazmente através dos critérios de classificação do método B. Na região inferior estão enumerados os diversos aminoácidos da proteína MeCP2 e ilustrados, através de retângulos coloridos, os diferentes domínios funcionais da proteína MeCP2. Diferentes cores indicam diferentes domínios funcionais: azul-escuro, *N-Terminal Domain* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); azul-claro, *C-Terminal Domain* (CTD). Foram classificadas de forma ineficaz através do método B duas mutações no domínio MBD, uma mutação no domínio ID, três mutações no domínio TRD e três mutações no domínio CTD. Não foram identificadas mutações no domínio NTD.

Da análise da Figura 4.1 e das nove mutações classificadas ineficazmente pelo método B, verifica-se que estas mutações não se condensam em nenhum local específico na proteína MeCP2. Pode-se concluir que não existe nenhum domínio funcional ou local na proteína que contenha mutações que origine fenótipos que não obedeçam aos critérios dos métodos A e B.

Em última análise, verifica-se através do Quadro 4.2 que o método B obtém praticamente valores de percentagem de eficácia semelhantes ao método A, excetuando na classificação do conjunto de mutações patogénicas identificadas no domínio MBD, pelas razões expostas no ponto 4.1.1. A razão pela qual os valores de percentagem de eficácia entre os dois métodos serem praticamente semelhantes advém do facto do método B se basear no método A. Os critérios de classificação do método B baseiam-se nos critérios de classificação do método A, sendo que ambos os métodos partilham da mesma premissa basilar. Esta premissa basilar afirma que para a mesma mutação patogénica no gene *MECP2*, e na ausência de fatores modeladores de severidade de fenótipos (XCI enviesada, SK e mosaicismo celular para a mutação), o fenótipo masculino é sempre mais severo e incapacitante quando comparado com o fenótipo feminino.

Deste modo, através da percentagem de eficácia do método B, pode-se concluir que 66,7% das mutações patogénicas identificadas no gene *MECP2* originam quadros clínicos mais severos e incapacitantes no sexo masculino quando comparados com os quadros clínicos no

sexo feminino. Para a elaboração desta conclusão utilizou-se a percentagem de eficácia do método B, ao invés da percentagem de eficácia do método A, uma vez que no valor de percentagem de eficácia do método B não estão contempladas situações em que estão presentes fatores modeladores de severidade de fenótipos (XCI enviesada, SK e mosaicismo celular), que podem condicionar esta conclusão. É importante referir que o valor de 66,7% não engloba a classificação da mutação K417M e os seus respetivos fenótipos, onde os métodos A e B são ineficazes, mas o fenótipo masculino identificado é mais severo e incapacitante quando comparado com o fenótipo feminino.

4.2 Distribuição e frequência das mutações no gene *MECP2*

O presente trabalho analisou uma larga amostra de casos masculinos identificados com mutações *missense* no gene *MECP2*. No total somam-se 144 casos masculinos analisados. A Figura 4.2 ilustra a distribuição destes casos e a sua frequência. Ao analisar os resultados apresentados na Figura 4.2 e na Figura 1.14, verifica-se que as mutações *missense* mais recorrentes no gene *MECP2* no sexo feminino (R106W, R133C, T158M e R306C) não são as mutações *missense* mais recorrentes no sexo masculino no gene *MECP2* (20). Apesar de a mutação T158M, à semelhança do que se sucede no sexo feminino, ser uma das mutações que mais se identificou no sexo masculino, as mutações R133C e R106W não são das mutações mais frequentes no sexo masculino. Por outro lado, a mutação R306C, uma das mutações mais frequentes no sexo feminino, não foi identificada em nenhum caso masculino, segundo a base de dados *RettBase* (20).

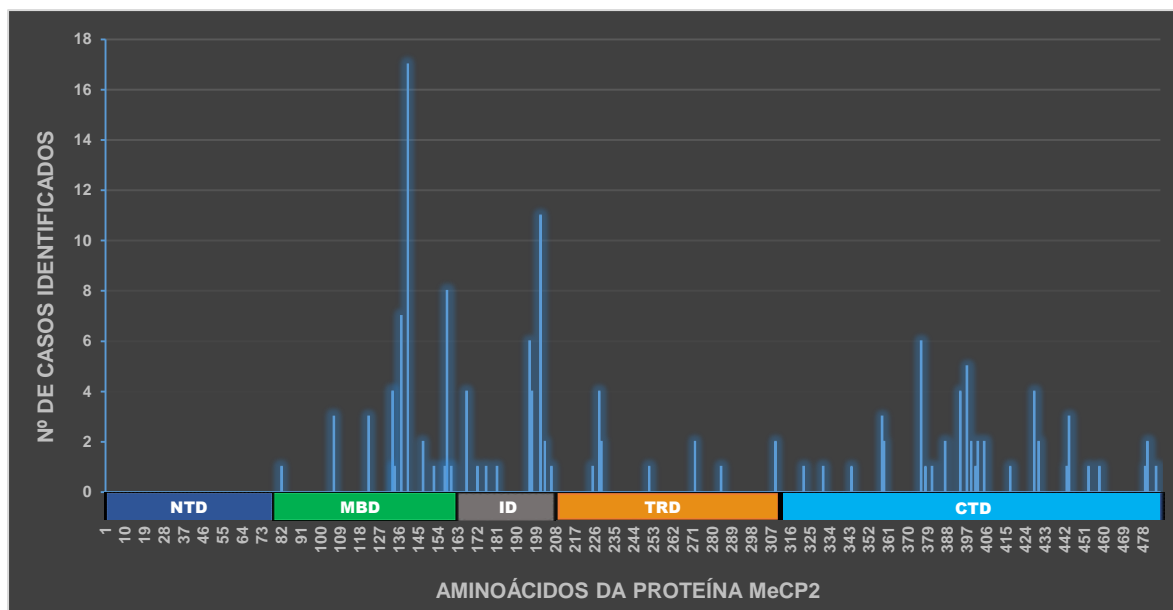


Figura 4.2 – Distribuição e frequência dos casos masculinos analisados – Ilustração da distribuição dos 144 casos masculinos analisados com mutações *missense* no gene *MECP2*. No eixo das ordenadas estão indicados os números de casos masculinos identificados com uma mutação *missense* no gene *MECP2* num determinado aminoácido da proteína. No eixo das abscissas estão enumerados os diversos aminoácidos da proteína MeCP2 e ilustrados, através de retângulos coloridos, os diferentes domínios funcionais da proteína MeCP2. Diferentes cores indicam diferentes domínios funcionais: azul-escuro, *N-Terminal Domain* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); azul-claro, *C-Terminal Domain* (CTD). Foram analisados 0 casos masculinos no domínio NTD, 49 casos masculinos no domínio MBD, 31 casos masculinos no domínio ID, 13 casos masculinos no domínio TRD e 51 casos masculinos no domínio CTD.

4.3 Severidade dos fenótipos analisados ao longo da proteína MeCP2

Após a classificação das mutações *missense* identificadas no gene *MECP2* no sexo masculino segundo os critérios de classificação do método B, é possível analisar a severidade dos fenótipos criados pelas diversas mutações analisadas ao longo da proteína MeCP2. Uma das principais vantagens do método B é permitir avaliar as mutações analisadas de uma forma quantitativa segundo o grau de severidade dos fenótipos criados por essas mesmas mutações. Deste modo, o presente trabalho usou esta vantagem e, através das categorias do método B, analisou a distribuição dos graus de severidade dos fenótipos associados às mutações analisadas ao longo da proteína MeCP2 (Figura 4.3).

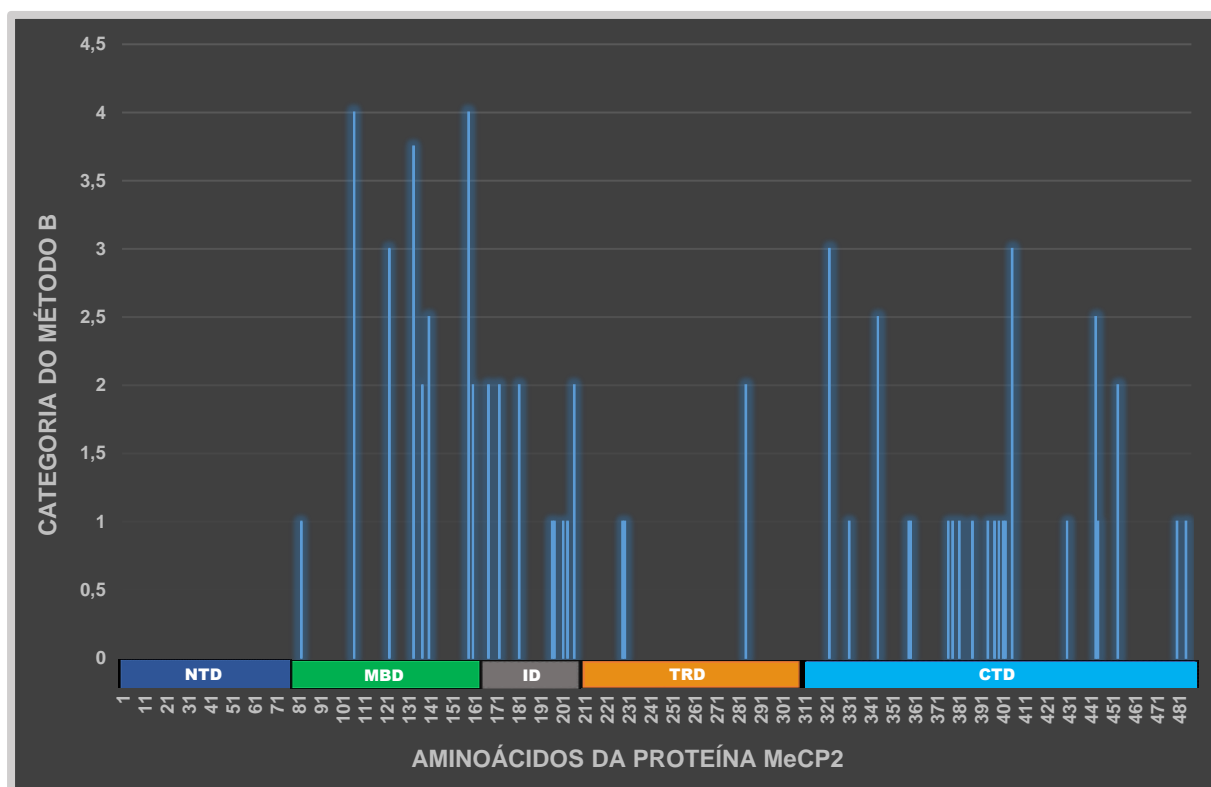


Figura 4.3 – Distribuição do grau de severidade dos fenótipos analisados ao longo da proteína MeCP2 – Distribuição das 41 mutações classificadas eficazmente segundo os critérios de classificação do método B, tendo em conta o aminoácido afetado na proteína MeCP2 e tendo em conta a severidade dos fenótipos. No eixo das ordenadas estão indicadas as categorias do método de classificação B. No eixo das abcissas estão enumerados os diversos aminoácidos da proteína MeCP2 e ilustrados, através de retângulos coloridos, os diferentes domínios funcionais: azul-escuro, *N-Terminal Domain* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); azul-claro, *C-Terminal Domain* (CTD). Às categorias intermédias do método B, foi alocado como valor numérico no eixo das ordenadas, a média dos dois valores correspondentes às duas categorias da respetiva categoria intermédia. No aminoácido 133 da proteína MeCP2, onde foram identificadas duas mutações distintas, foi alocado, como valor numérico no eixo das ordenadas, a média das duas classificações realizadas pelo método B às duas mutações.

De seguida, analisou-se a distribuição dos graus de severidade dos fenótipos associados apenas a mutações patogénicas ao longo da proteína MeCP2, focando, deste modo, apenas nas mutações classificadas eficazmente com um valor numérico superior a 1 com recurso às categorias do método B. A Figura 4.4 ilustra esta distribuição.

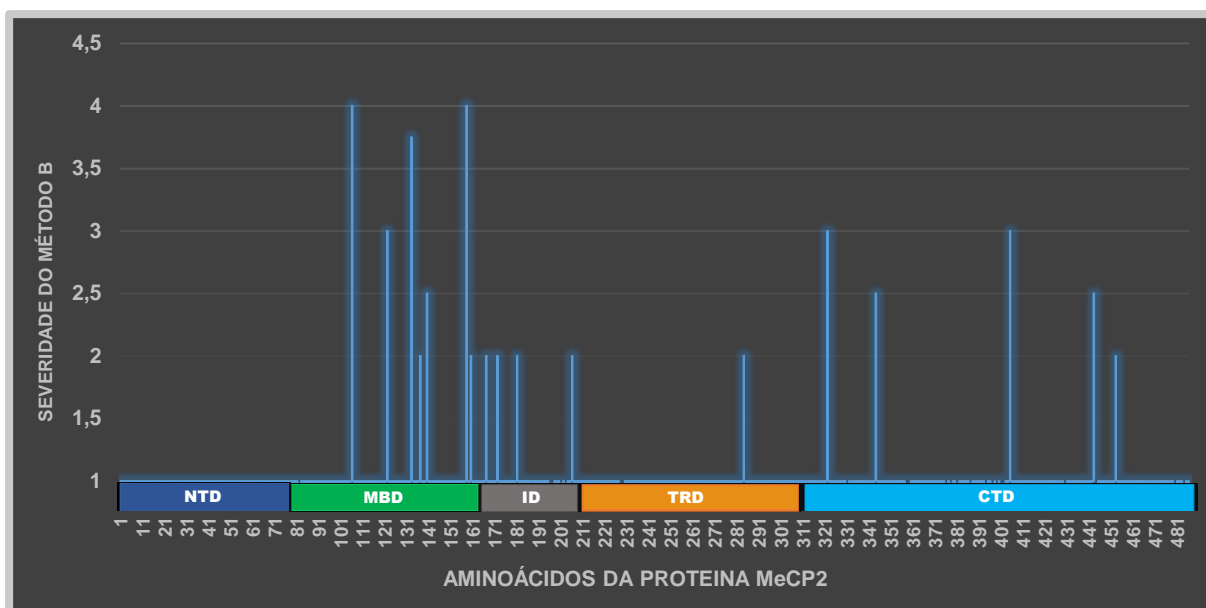


Figura 4.4 - Distribuição do grau de severidade dos fenótipos analisados com mutações patogênicas ao longo da proteína MeCP2 – Distribuição das 18 mutações patogênicas classificadas eficazmente segundo os critérios de classificação do método B, tendo em conta o aminoácido afetado na proteína MeCP2 e tendo em conta a severidade dos fenótipos. No eixo das ordenadas estão indicadas as categorias do método de classificação B. No eixo das abcissas estão enumerados os diversos aminoácidos da proteína MeCP2 e ilustrados, através de retângulos coloridos, os diferentes domínios funcionais: azul-escuro, *N-Terminal Domain* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); azul claro, *C-Terminal Domain* (CTD). Às categorias intermédias do método B, foi alocado como valor numérico no eixo das ordenadas, a média dos dois valores correspondentes às duas categorias da respetiva categoria intermédia. No aminoácido 133 da proteína MeCP2, onde foram identificadas duas mutações distintas, foi alocado, como valor numérico no eixo das ordenadas, a média das duas classificações realizadas pelo método B às duas mutações.

Uma vez que o método B permite avaliar as mutações analisadas de uma forma quantitativa segundo o grau de severidade dos fenótipos, o presente trabalho analisou o grau de severidade dos fenótipos associados às mutações analisadas em cada domínio funcional da proteína MeCP2. Esta análise pretende avaliar se existe algum domínio funcional onde se verifique mutações associadas a quadros clínicos mais severos e incapacitantes no sexo masculino. De forma a realizar esta análise calculou-se, para cada domínio funcional da proteína, a média dos valores numéricos associados às categorias de classificação do método B. Após este cálculo obteve-se para o domínio MBD a média de 2,89; domínio ID a média de 1,5; domínio TRD a média de 1,33; domínio CTD a média de 1,38 (Figura 4.5).

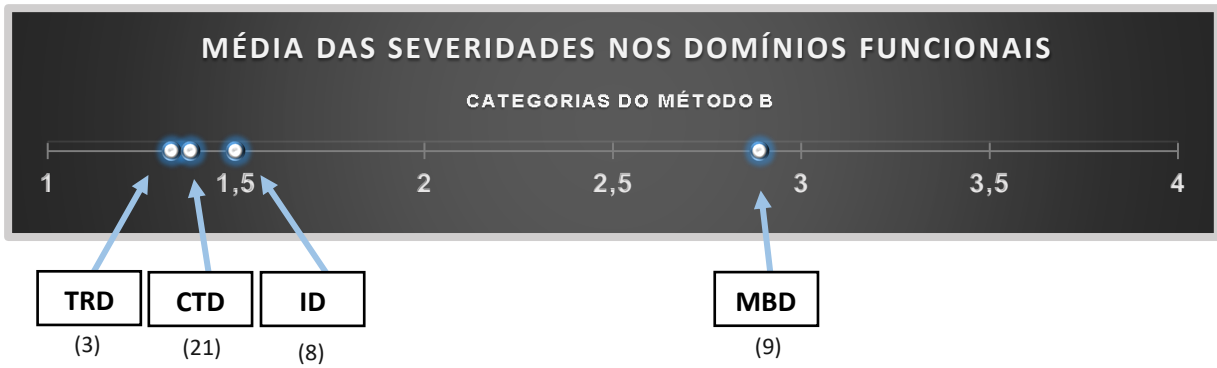


Figura 4.5 – Graus de severidade associados aos domínios funcionais da proteína MeCP2 - Ilustração numa escala de 1 a 4 (intervalo de valores numéricos para as categorias do método B) dos valores numéricos correspondentes às médias das categorias do método B que classificam os fenótipos associados às mutações analisadas em cada domínio funcional da proteína MeCP2: MBD:2,89; ID:1,5; TRD:1,33; CTD:1,38. Não foram identificadas mutações no domínio NTD. Os valores numéricos entre parênteses indicam o número de classificações utilizadas para o cálculo da média.

Por fim, através do conjunto das 41 mutações classificadas eficazmente através do método B, avaliou-se, ao longo da proteína MeCP2, a distribuição das 23 mutações consideradas benignas e a distribuição das 18 mutações consideradas patogénicas, tendo em conta o aminoácido afetado na proteína MeCP2. A Figura 4.6 ilustra a análise referente às mutações patogénicas e a Figura 4.7 ilustra a análise referente às mutações benignas.

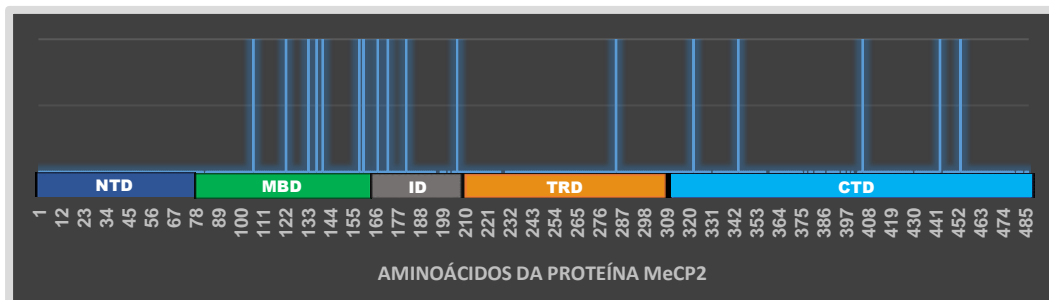


Figura 4.6 – Distribuição das mutações patogénicas ao longo da proteína MeCP2 – Distribuição das 18 mutações patogénicas classificadas eficazmente segundo os critérios de classificação do método B, tendo em conta o aminoácido afetado na proteína MeCP2. Na região inferior estão enumerados os diversos aminoácidos da proteína MeCP2 e ilustrados, através de retângulos coloridos, os diferentes domínios funcionais: azul-escuro, *N-Terminal Domain* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); azul-claro, *C-Terminal Domain* (CTD). Destas 18 mutações, oito mutações foram identificadas no domínio MBD, quatro mutações no domínio ID, uma mutação no domínio TRD e cinco mutações no domínio CTD. Não foram identificadas mutações no domínio NTD. Nesta figura não estão ilustradas as mutações patogénicas classificadas ineficazmente pelo método B ou as mutações patogénicas no qual a sua classificação se verificou inconclusiva segundo os critérios do método B

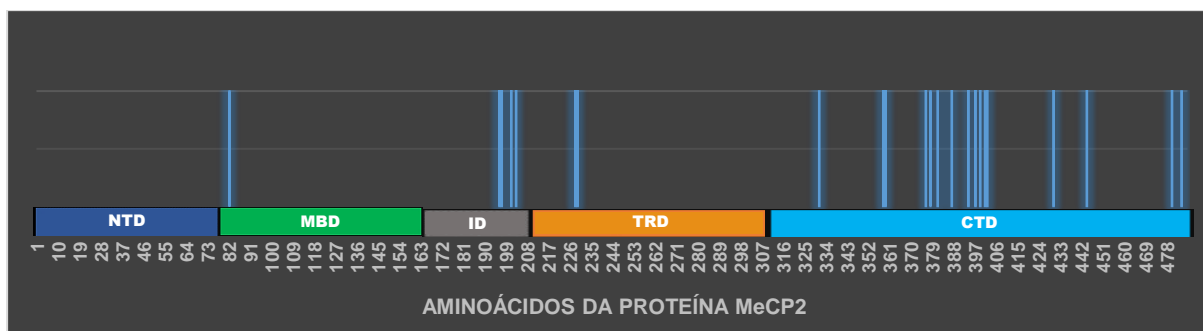


Figura 4.7 – Distribuição das mutações benignas ao longo da proteína MeCP2 – Ilustração da distribuição das 23 mutações consideradas benignas, através dos critérios estabelecidos no ponto 2.5, tendo em conta o aminoácido afetado da proteína MeCP2. Na região inferior estão enumerados os diversos aminoácidos da proteína MeCP2 e ilustrados, através de retângulos coloridos, os diferentes domínios funcionais: azul-escuro, *N-Terminal Domain* (NTD); verde, *Methyl-Binding Domain* (MBD); cinzento, *Inter-Domain* (ID); laranja, *Transcriptional Repression Domain* (TRD); azul-claro, *C-Terminal Domain* (CTD). Destas 23 mutações consideradas benignas, uma mutação foi identificada no domínio MBD, quatro mutações no domínio ID, duas mutações no domínio TRD e 16 mutações no domínio CTD. Não foram identificadas mutações no domínio NTD

A Figura 4.8 ilustra a proporção entre o conjunto de mutações patogénicas e o conjunto de mutações benignas tendo em conta a amostra de 41 mutações eficazmente classificadas pelo método B. Através desta figura é possível constatar que uma grande porção das mutações analisadas no presente trabalho são mutações consideradas benignas.

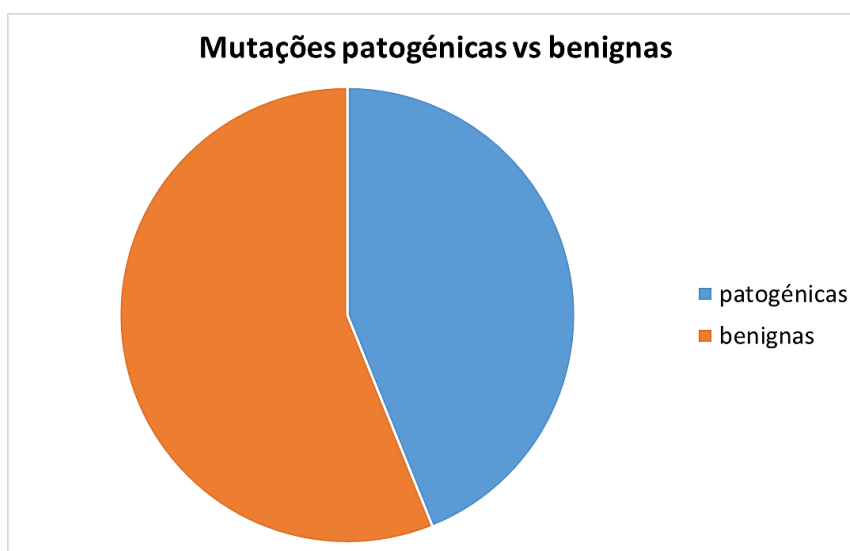


Figura 4.8 – Proporção entre mutações patogénicas e mutações benignas – Ilustração da proporção entre o conjunto de mutações patogénicas no gene *MECP2* classificadas eficazmente pelo método B (18 mutações patogénicas), e o conjunto de mutações no gene *MECP2* consideradas benignas, tendo em contas as premissas estabelecidas no ponto 2.5 (23 mutações benignas).

Da análise da Figura 4.4 e da Figura 4.5 é possível observar que o domínio MBD é o domínio funcional no qual estão presentes as mutações que originam os quadros clínicos mais severos e incapacitantes no sexo masculino. Os resultados evidenciados na Figura 4.5 corroboram de forma clara esta afirmação. Nesta última figura, onde estão ilustradas as médias das categorias do método B que classificam os fenótipos associados às mutações analisadas em cada domínio funcional, verifica-se que o valor numérico correspondente à média do domínio MBD distancia-se dos outros três domínios funcionais (ID, TRD e CTD).

Este dado pode ser indicativo de que o domínio MBD tem uma alta relevância para a função da proteína MeCP2. Este é o domínio de ligação ao ADN, uma ação necessária para que esta proteína possa exercer uma das suas principais funções fisiológicas, nomeadamente, a repressão da transcrição genética. Qualquer disrupção neste domínio poderá afetar significativamente a sua capacidade de se ligar ao ADN. Esta relevância do domínio MBD para a função da proteína MeCP2 pode explicar a razão pela qual estão associados a este domínio os quadros clínicos mais severos e incapacitantes analisados no sexo masculino (157,158).

Esta relevância do domínio MBD para a função fisiológica da proteína MeCP2 parece ser corroborada pela análise conjunta dos resultados evidenciados na Figura 4.2 e na Figura 4.7. Isto porque, apesar dos inúmeros casos masculinos analisados com mutações no gene *MECP2* no domínio MBD (ver Figura 4.2), apenas se identificou uma mutação benigna neste domínio (ver Figura 4.7), sendo as restantes mutações patogénicas. Este dado pode ser também indicativo de que qualquer disrupção neste domínio pode afetar significativamente a função da proteína. Existem estudos na literatura científica que evidenciam a mesma conclusão, nomeadamente, que ao domínio MBD estão associadas as mutações no gene *MECP2* que originam os quadros clínicos mais severos e incapacitantes (94).

Ao analisar as mutações e respetivos fenótipos identificados no domínio funcional TRD, verifica-se que se identificaram poucas mutações presentes no sexo masculino neste domínio. Os resultados evidenciados na Figura 4.2 e na Figura 4.3 ilustram este facto, mostrando os poucos casos identificados (13 casos) e, conseqüentemente, as poucas mutações analisadas neste domínio (seis mutações analisadas através do método B). Destas seis mutações identificadas no domínio TRD, apenas três foram eficazmente classificadas pelo método B (ver Quadro 4.2), sendo que destas três, duas mutações foram consideradas polimorfismos genéticos benignos. Deste modo, apenas três mutações foram usadas para tecer conclusões sobre o grau de severidade criado por mutações no domínio TRD.

O presente trabalho considera que o número de mutações identificadas no domínio TRD é bastante reduzido para poder realizar qualquer conclusão relativa à severidade associada aos fenótipos masculinos associados a mutações neste domínio. Por este motivo, uma das conclusões, passíveis de identificar através deste trabalho, é o facto de existir, no sexo masculino, um número bastante reduzido de mutações *missense* identificadas no gene *MECP2*. A Figura 4.2 e a Figura 4.3 ilustram esta conclusão.

Por outro lado, verifica-se que a conclusão referida anteriormente não se aplica ao sexo feminino. Ao analisar, através da base de dados *RetBase* as mutações *missense* identificadas no gene *MECP2* no sexo feminino, verifica-se a menção a 363 casos femininos com mutações no domínio TRD. Ao realizar a mesma pesquisa para os restantes domínios funcionais da proteína MeCP2, verifica-se que a *RetBase* faz referência a 980 casos no domínio MBD, 188 casos no domínio CTD e 68 casos no domínio ID (62). Assim, observa-se que, à semelhança do que se sucede no sexo masculino, as mutações *missense* no gene *MECP2* condensam-se no domínio MBD no sexo feminino (ver Figura 4.2). Por outro lado, no sexo feminino, o segundo domínio funcional com mais casos identificados com mutações *missense* no gene *MECP2* foi o domínio TRD. De forma contrária, como é possível constatar na Figura 4.2 e na Figura 4.3, no sexo masculino, o domínio funcional com menos casos identificados com mutações *missense* no gene *MECP2* é o domínio TRD. Não é claro o motivo pelo qual se identificou um número bastante reduzido de mutações *missense* no domínio TRD no sexo masculino, tendo em conta a importância deste domínio para a função da proteína MeCP2. O domínio TRD é responsável pela repressão da transcrição genética através do recrutamento de outras proteínas como o co-repressor Sin3A e as HDAC. Também o domínio NID, que está contido no domínio TRD, permite a interação da proteína MeCP2 com o complexo co-repressor NCoR/SMRT, que por sua vez, permite a repressão da transcrição genética (6,20,21).

Uma hipótese que poderia explicar o motivo pelo qual existem poucas mutações *missense* no domínio TRD baseia-se no facto de estas mutações originarem quadros clínicos letais e incompatíveis com a vida, provocando, deste modo, abortos espontâneos e mortes prematuras no sexo masculino. No entanto, existem dados na literatura científica que indicam que no sexo feminino os quadros clínicos criados por mutações *missense* no domínio TRD são menos severos quando comparados com os quadros clínicos criados por mutações *missense* no domínio MBD (126). Deste modo, ao considerar os diversos quadros clínicos de rapazes analisados com mutações *missense* no domínio MBD no presente trabalho, parece pouco

provável que a hipótese exposta anteriormente explique o número reduzido de mutações *missense* identificadas no domínio TRD no sexo masculino.

Por sua vez, ao analisar os fenótipos criados pelas mutações presentes no domínio ID, é possível retirar duas conclusões. A primeira conclusão deriva da análise da Figura 4.4, pois os fenótipos criados por mutações patogénicas presentes no domínio ID são de severidade reduzida, quando comparados com os outros domínios com mutações patogénicas (MBD e CTD). A segunda conclusão deriva da análise conjunta dos resultados evidenciados na Figura 4.6 e na Figura 4.7, e é relativa à identificação de um segmento no domínio ID, onde existem apenas mutações benignas. Os aminoácidos 196 e 203 da proteína MeCP2 delimitam uma zona na proteína, onde estão identificadas quatro mutações benignas (T203M, A201V, T197M, T196S). Estas quatro mutações benignas ao se encontrarem de forma condensada numa zona do gene onde não estão identificadas mutações patogénicas, podem defenir um segmento no domínio ID, correspondente a uma zona na proteína MeCP2, que em termos funcionais apresenta menos relevância para a função fisiológica da proteína.

Ao analisar a Figura 4.6 e a Figura 4.7 verifica-se que, à semelhança do exposto anteriormente, é possível identificar outro segmento no gene que codifica a proteína MeCP2, onde existem, de forma condensada, apenas mutações benignas. Este último segmento está localizado no domínio CTD e compreende os aminoácidos 376 e 402. Os aminoácidos 376 e 402 da proteína MeCP2 delimitam este segmento, sendo que dentro deste estão identificadas nove mutações benignas (P376S, A378V, P381A, P387L, E394K, E397K, P399L, S401N, P402L). Estas nove mutações benignas identificadas no domínio CTD, por se encontrarem de forma condensada numa zona onde não existem mutações patogénicas identificadas, podem ser indicativas de outra zona na proteína que em termos funcionais pode apresentar menos relevância para a função fisiológica da proteína MeCP2.

Ao utilizar a base de dados *RettBase* para analisar as mutações *missense* identificadas no sexo feminino presentes nestes dois segmentos da proteína MeCP2, verifica-se que a base de dados não identifica nenhuma mutação classificada como patogénica. Deste modo, o conjunto de mutações *missense* no gene *MECP2* referidas na *RettBase* e identificadas no sexo feminino, compreendidas entre os aminoácidos 196 a 203 e entre os aminoácidos 376 a 402, são classificadas como mutações benignas ou como tendo um significado patogénico desconhecido (62). Estes dados possibilitam também corroborar a hipótese de estes dois

segmentos da proteína MeCP2 apresentarem uma menor relevância para a função fisiológica da proteína (62).

4.4 Limitações do estudo

Após realizar-se a classificação da amostra de mutações e após a análise dos resultados obtidos torna-se importante refletir sobre as limitações do presente trabalho. As limitações, inerentes a qualquer estudo, podem interferir com os resultados obtidos e respectivas conclusões, sendo, por isso, importante analisar o impacto das limitações identificadas no presente trabalho.

Uma das principais limitações do presente estudo é referente à possibilidade de se estabelecer de forma errónea uma correlação entre determinada mutação e determinado quadro sintomatológico. O presente estudo, ao identificar num indivíduo masculino uma mutação no gene *MECP2*, estabelece de forma direta uma correlação entre essa mesma mutação e o quadro sintomatológico identificado no indivíduo. De forma a minimizar o efeito desta limitação, o presente trabalho estabeleceu no ponto 2.5 um conjunto de premissas que salvaguardam a possibilidade de a mutação analisada não ser a causa para o quadro sintomatológico identificado. No entanto, apesar da existência das duas premissas estabelecidas no ponto 2.5, existe a possibilidade de o presente trabalho estabelecer um correlacionamento erróneo entre uma mutação benigna e um quadro patogénico, tendo em conta que o programa *PolyPhen-2* é um programa bioinformático preditivo relativamente à patogenicidade das mutações, podendo apresentar resultados com um grau de confiança variável (66). Esta possibilidade pode criar um enviesamento nos resultados obtidos, nomeadamente no estabelecimento de um grau de severidade associado às mutações analisadas e, em último caso, afetar favoravelmente ou desfavoravelmente a eficácia da classificação realizada pelos métodos A e B.

Também o inverso do exposto anteriormente pode suceder, ou seja, considerar-se como benigna uma mutação patogénica. Isto deve-se à existência concomitante de outras limitações. Dessas limitações enumera-se o facto de que para algumas mutações existem poucos casos identificados ou, por vezes, apenas um caso masculino portador, sendo que existe a possibilidade de qualquer patogenicidade associada à mutação em estudo estar ocultada no(s) único(s) caso(s) masculino(s) identificado(s) como portadores da mutação (86). Esta ocultação de patogenicidade pode estar correlacionada com outra limitação do presente estudo, nomeadamente, a possibilidade de os artigos científicos, que descrevem as mutações analisadas,

não realizarem os devidos estudos moleculares para identificar a presença de fatores modeladores de severidade de fenótipos nos casos portadores de mutações (mosaicismo celular e SK).

Um fator que também pode originar uma correlação errônea entre determinada mutação e determinado quadro sintomatológico tem por base os próprios métodos moleculares que cada estudo adota para identificar as mutações no gene *MECP2*. Cada estudo utiliza determinado método molecular para poder identificar mutações no gene *MECP2*. Mas os próprios métodos moleculares são falíveis, pois apresentam as suas próprias limitações, existindo a hipótese de não serem identificadas mutações patogênicas no gene *MECP2* através desses métodos (128). Isto cria a possibilidade de se estabelecer uma correlação errônea entre determinada mutação benigna e um determinado quadro sintomatológico. O mesmo ocorre nos métodos de identificação do rácio da XCI, uma vez que pode existir distintos rácios de XCI em diferentes tecidos. A título de exemplo, um resultado que revela uma XCI aleatória numa amostra de sangue, não significa obrigatoriamente que haja uma XCI aleatória no cérebro (97). Todas estas limitações apresentam capacidade para criar enviesamentos nos resultados obtidos e enviesamentos nas conclusões relativas aos graus de severidade associados às mutações analisadas. Em última análise, estas limitações apresentam também capacidade para influenciar a percentagem de eficácia de classificação dos métodos A e B.

Uma limitação própria do método de classificação B reside na extrapolação que o método B realiza quando não existem casos femininos identificados com determinada mutação. Quando o método B não identifica casos femininos com uma mutação, extrapola que a mutação cria um fenótipo assintomático no sexo feminino (ver quadro 1.5). No entanto, existe a possibilidade de esta extrapolação ser incorreta em determinadas situações, tendo em conta que existem polimorfismos raros no gene *MECP2* que podem apresentar capacidade patogénica. Outro fator que pode contribuir para a extrapolação anterior estar incorreta, é relativo à grande diversidade e variabilidade sintomatológica e de fenótipos associados às mutações no gene *MECP2*. Isto pode gerar entropia na decisão de realizar um diagnóstico molecular a nível do gene *MECP2*, o que se traduz numa pouca frequência na realização da identificação de mutações eventualmente patogénicas no gene *MECP2*.

A existência de terapias farmacológicas e/ou não farmacológicas podem ser um aspeto que aumenta a variabilidade sintomatológica nos quadros clínicos identificados. A existência destes tratamentos, com o objetivo de controlar os quadros sintomatológicos nos casos

analisados, tem capacidade para afetar os graus de severidade associados às mutações analisadas, afetando, conseqüentemente, os resultados do presente trabalho. As informações relativas aos tratamentos farmacológicos e/ou não farmacológicos nem sempre estão contemplados nos artigos científicos e na maior parte dos casos é impossível prever o impacto destes tratamentos nos quadros clínicos. Este fator pode ser considerado como uma limitação no que se refere ao estabelecimento de uma correlação entre as mutações analisadas e as respectivas severidades dos quadros sintomatológicos. Em última análise, as terapias subjacentes aos casos identificados apresentam capacidade para provocar enviesamentos nos resultados obtidos no presente trabalho.

Por sua vez, pode-se considerar como limitação o facto de o presente estudo estar dependente apenas das informações clínicas descritas nos artigos científicos que mencionam as mutações analisadas. Para uma correta classificação das mutações através dos critérios dos métodos A e B, é necessário estabelecer um grau de severidade associado aos fenótipos identificados nos artigos científicos. Os artigos científicos que identificam as mutações descrevem de forma distinta os quadros clínicos, sendo que cada artigo descreve de forma mais ou menos detalhada, segundo o seu entender, os quadros sintomatológicos. Este fator pode ser motivo para a criação de disparidades e enviesamentos no estabelecimento de uma correlação entre determinada mutação e determinados graus de severidade de quadros clínicos.

Também é uma limitação o facto de muitos estudos não referirem se houve uma análise para verificar a existência de fatores modeladores de severidade de fenótipos (moisacismo celular para a mutação, XCI enviesada e SK) nos casos portadores de mutações no gene *MECP2*. Estes fatores podem ocultar a sintomatologia associada a mutações patogénicas. Por outro lado, também uma XCI enviesada pode agravar e aumentar o grau de severidade de quadros sintomatológicos associados a mutações patogénicas no gene *MECP2*. Assim, a inexistência de estudos que avaliem a presença destes fatores modeladores de severidade são uma das principais lacunas que impossibilitam tirar conclusões através dos estudos que identificam as mutações. Esta lacuna torna inviável concluir sobre a patogenicidade das mutações analisadas e impossibilitam estabelecer com segurança uma correlação entre determinada mutação e um determinado quadro sintomatológico.

Outra lacuna existente nos estudos que identificam as mutações no gene *MECP2* é a inexistência de estudos moleculares nos familiares dos casos analisados, com o objetivo de identificar essas mesmas mutações. Este é um fator determinante para estabelecer de forma

precisa e prudente uma correlação entre determinada mutação no gene *MECP2* e determinado quadro patogénico. O presente estudo permitiu demonstrar diversas vezes que foi possível verificar, apenas através de estudos moleculares a familiares dos casos estudados, que determinadas mutações não apresentam capacidade patogénica. Diversas vezes verificou-se que casos portadores de mutações no gene *MECP2* com quadros patológicos apresentam familiares do sexo masculino com quadros assintomáticos e com a mesma mutação. A identificação destes familiares portadores da mesma mutação permitiu concluir que determinadas mutações não são patogénicas e são classificadas como mutações benignas. A inexistência destes testes moleculares nos familiares dos casos estudados com mutações no gene *MECP2* podem promover a classificação errónea de mutações segundo a sua capacidade patogénica.

Por outro lado, ao refletir sobre o termo “severidade do quadro clínico”, o mesmo pode ser considerado subjetivo. Ao considerar a análise de um grande e diverso conjunto de quadros clínicos no presente trabalho, definir quantitativamente, através dos critérios de classificação do método B, um grau de severidade para os quadros clínicos pode ser subjetivo. Esta subjetividade inerente à análise crítica da severidade de um conjunto de sintomas presentes num determinado quadro clínico pode estar contemplada na análise realizada por este trabalho aos quadros clínicos, mas também na análise realizada pelos inúmeros e diversos autores dos artigos científicos utilizados pelo presente trabalho. Isto pode originar enviesamentos no estabelecimento de uma correlação entre as mutações analisadas e um grau de severidade sintomatológico, e por consequência, originar enviesamentos na classificação das mutações através do método B. Deste modo, a subjetividade associada à análise da severidade sintomatológica dos quadros clínicos pode ser considerada uma limitação do presente estudo.

5 Conclusão

A literatura científica evidencia diversas metodologias que procuram realizar uma correlação genótipo/fenótipo, tendo em conta as mutações identificadas no gene *MECP2* e os seus respetivos quadros clínicos associados (49). O presente trabalho propôs-se a testar um novo método, baseado na metodologia descrita por Villard (2007) (35), que permite realizar uma correlação genótipo/fenótipo tendo em conta as mutações no gene *MECP2* identificadas no sexo masculino. O método de Villard (2007) (35), designado pelo presente trabalho por método A, descreve três categorias para os fenótipos masculinos portadores de mutações patogénicas *missense* no gene *MECP2*. Assim, o presente trabalho desenvolveu, com base no método A, um novo método de classificação, designado por método B, que permite categorizar as mutações *missense* no gene *MECP2* e estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo. Ambos os métodos baseiam-se na premissa de que uma mutação patogénica no gene *MECP2* origina, na ausência de fatores modeladores de severidade de fenótipos (SK, XCI enviesada e mosaicismo celular para a mutação), um quadro clínico mais severo e incapacitante no sexo masculino comparativamente ao quadro clínico identificado no sexo feminino (35).

Ao testar a eficácia do método B em realizar uma correlação genótipo/fenótipo através do conjunto de mutações *missense* descritas na base de dados *RettBase* (62) e identificadas no sexo masculino, verificou-se que do conjunto de 50 mutações analisadas, obteve-se uma percentagem de eficácia de 82% na classificação. Esta classificação engloba a classificação de mutações benignas. Como o método A não tem em conta a classificação de mutações benignas, comparou-se as percentagens de eficácia dos dois métodos em classificar apenas as mutações patogénicas (35). Deste modo, obteve-se uma percentagem de eficácia de 60,7% para o método A e uma percentagem de eficácia de 66,7% para o método B, tendo em conta apenas a classificação das mutações patogénicas.

O método B revelou vantagens comparativamente ao método A. A primeira vantagem reside na capacidade do método B em classificar mutações benignas. No entanto, a principal vantagem do método B, que lhe confere uma percentagem de eficácia (66,7%) superior à do método A (60,7%), é relativa à sua capacidade para prever e contextualizar fenótipos com graus de severidade intermédia, tendo em conta a grande diversidade fenotípica e sintomatológica existente para as mutações patogénicas no gene *MECP2*. O método B consegue prever fenótipos que não estão englobados nos critérios de classificação do método A, uma vez que existem quadros patológicos menos severos do que aqueles que estão contemplados nos critérios do

método A e considerando que existem quadros patológicos com graus de severidade intermédios e compreendidos entre as categorias do método A (75,112).

No entanto, o método A apresenta uma vantagem comparativamente ao método B, nomeadamente, a sua capacidade para prever e contextualizar fenótipos que apresentem fatores modeladores de severidade dos quadros clínicos (SK, XCI enviesada e mosaicismo para a mutação). O método B, na presença destes fatores, revela-se inconclusivo.

Através do método B foi possível concluir que 66,7% das mutações *missense* patogénicas identificadas no gene *MECP2* originam fenótipos mais severos e incapacitantes no sexo masculino comparativamente aos fenótipos identificados no sexo feminino. Este método apresenta uma percentagem de eficácia (66,7%) que apesar de não ser elevada é razoavelmente justificável para poder utilizar o método para realizar correlações genótipo/fenótipo. Assim, através do estabelecimento de uma correlação entre determinada mutação patogénica no gene *MECP2* e determinado fenótipo, o método B permite extrapolar quadros sintomatológicos para casos portadores de mutações no gene *MECP2*. Esta aplicabilidade do método B pode ser útil tanto para as mutações já identificadas na literatura científica como para mutações que possam vir a ser futuramente identificadas no gene *MECP2*.

Verificou-se, através da análise do grau de severidade dos casos clínicos identificados, que as mutações *missense* identificadas no sexo masculino no domínio MBD estão associadas a quadros sintomatológicos mais severos e incapacitantes. Este dado pode ser indicativo da relevância do domínio MBD para a função fisiológica da proteína MeCP2. Por outro lado, verificou-se que existem poucas mutações *missense* no domínio TRD (sete mutações) identificadas no sexo masculino. Ao contrário do que sucede no sexo feminino, onde o domínio TRD é o segundo domínio funcional com mais casos identificados como portadores de mutações *missense*, no sexo masculino o domínio TRD é o domínio funcional com menos casos identificados como portadores de mutações *missense*. Ao analisar as mutações *missense* mais recorrentes no gene *MECP2* identificadas no sexo masculino, verifica-se que estas não correspondem às mutações *missense* mais recorrentes no sexo feminino (R106W, R133C, T158M e R306C) (20). O presente estudo identificou ainda no gene que codifica a proteína MeCP2 dois segmentos onde se encontram de forma condensada um conjunto de mutações benignas e onde não existem mutações patogénicas. Estes dois locais podem corresponder a zonas na proteína MeCP2 com menor relevância para a sua função fisiológica.

Por fim, tendo em conta a metodologia levada a cabo no presente trabalho, pode-se afirmar que este estudo se diferencia dos restantes pela quantidade de casos analisados. Neste trabalho analisou-se 144 casos masculinos portadores de mutações *missense* no gene *MECP2* e utilizou-se, para estipular a amostra em estudo, a *RettBase*, a base de dados de referência para as mutações no gene *MECP2*, uma vez que contem a grande maioria das mutações identificadas neste gene. Deste modo, obteve-se uma amostra bastante abrangente e alargada. Estes dados permitem sustentar e dar solidez às conclusões obtidas no presente trabalho.

6 Bibliografia

1. Haas RH. The history and challenge of Rett syndrome. *J Child Neurol*. 1988;3(Suppl):S3–5.
2. Ronen GM, Rosenbaum PL. Rett Syndrome Turns 50: Themes From a Chronicle: Medical Perspectives and the Human Face of Rett Syndrome. *Pediatr Neurol*. 2016;61:3–10.
3. Percy AK. Progress in Rett Syndrome: from discovery to clinical trials. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2016;166:325–32.
4. Lotan M, Ben-Zeev B. Rett syndrome. A review with emphasis on clinical characteristics and intervention. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:1517–41.
5. International Rett Syndrome Foundation. About Us. Disponível em: <https://www.rettysyndrome.org/about-us/>. Acedido em 10 de abril de 2022
6. Amir RE, Van Den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl- CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999;23(2):185–8.
7. Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, et al. Rett syndrome: Revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol*. 2010;68(6):944–50.
8. Amir RE, Van Den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, et al. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol*. 2000;47(5):670–9.
9. Verhoeven W, Egger J, Feenstr I. Autism and Genetic Syndromes. *Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment*;31-48.
10. Schanen C. A severely affected male born into a Rett syndrome kindred supports X- linked inheritance and allows extension of the exclusion map. Vol. 63, *American Journal of Human Genetics*. 1998. p. 267–269.
11. Schanen NC, Kurczynski TW, Brunelle D, Woodcock MM, Dure IV LS, Percy AK. Neonatal encephalopathy in two boys in families with recurrent Rett syndrome. *J Child Neurol*. 1998;13(5):229–31.
12. 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(4):471–9.
13. Coleman M. Is classical Rett syndrome ever present in males? *Brain Dev*. 1990;12(1):31–2.
14. Ishii T, Makita Y, Ogawa A, Amamiya S, Yamamoto M, Miyamoto A, et al. The role of different X-inactivation pattern on the variable clinical phenotype with Rett syndrome. *Brain Dev*. 2001;23(SUPPL. 1):161–4.
15. Philippe C, Amsallem D, Francannet C, Lambert L, Saunier A, Verneau F, et al. Phenotypic variability in Rett syndrome associated with FOXP1 mutations in females. *J Med Genet*. 2010;47(1):59–65.
16. Banerjee A, Miller MT, Li K, Sur M, Kaufmann WE. Towards a better diagnosis and treatment of Rett syndrome: A model synaptic disorder. *Brain*. 2019;142(2):239–48.
17. Trevathan E, Naidu S. The clinical recognition and differential diagnosis of Rett syndrome. *J Child Neurol*. 1988;3(SUPPL.):6–16.
18. Smeets EEJ, Pelc K, Dan B. Rett syndrome. *Mol Syndromol*. 2012;2(3–5):113–27.

19. Knight VM, Horn PS, Gilbert DL, Standridge SM. The Clinical Predictors That Facilitate a Clinician's Decision to Order Genetic Testing for Rett Syndrome. *Pediatr Neurol.* 2016;63:66–70.
20. Kyle SM, Vashi N, Justice MJ. Rett syndrome: A neurological disorder with metabolic components. *Open Biol.* 2018;8(2).
21. Neul JL, Chang Q. Rett syndrome and MECP2-related disorders. *Neurodevelopmental Disorders.* Elsevier Inc.; 2020. 269–284
22. Gold WA, Krishnaraj R, Ellaway C, Christodoulou J. Rett Syndrome: A Genetic Update and Clinical Review Focusing on Comorbidities. *ACS Chem Neurosci.* 2018;9(2):167–76.
23. Einspieler C, Kerr AM, Prechtl HFR. Abnormal general movements in girls with Rett disorder: The first four months of life. *Brain Dev.* 2005;27(SUPPL. 1):8–13.
24. Hagberg B, Witt-Engerstram I. Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *American Journal of Medical Genetics.* 1986. 24: 47-59
25. Hagberg B. Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(2):61–5.
26. Wan M, Lee SSJ, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, et al. Rett syndrome and beyond: Recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet.* 1999;65(6):1520–9.
27. Jülich K, Horn D, Burfeind P, Erler T, Auber B. A Novel MECP2 Mutation in a Boy with Neonatal Encephalopathy and Facial Dysmorphism. *J Pediatr.* 2009;155(1):140–3.
28. Neul JL, Benke TA, Marsh ED, Skinner SA, Merritt J, Lieberman DN, 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.* 2019;180(1):55–67.
29. Partington MW. Rett syndrome in monozygotic twins. *Am J Med Genet.* 1988;29(3):633–7.
30. Eeg-Olofsson O, Al-Zuhair AG, Teebi AS, Zaki M, Daoud AS. A boy with the Rett syndrome? *Brain Dev.* 1990;12(5):529–32.
31. Schanen C. Rethinking the fate of males with mutations in the gene that causes Rett syndrome. *Brain Dev.* 2001;23(SUPPL. 1):144–6.
32. Bmria BZ, Yuval Y, N. Carolyn S, Haika W, Nalhahi B, Nathan G, et al. Rett Syndrome: Clinical Manifestations in Males With MECP2 Mutations. *J Child Neurol.* 2002;17:20–4.
33. Moog U, Smeets EEJ, Van Roozendaal KEP, Schoenmakers S, Herbergs J, Schoonbrood-Lenssen AMJ, et al. Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP 2). *Eur J Paediatr Neurol.* 2003;7(1):5–12.
34. Esch H Van, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, et al. Duplication of the. 2005;442–53.
35. Villard L. MECP2 mutations in males. *J Med Genet.* 2007;44(7):417–23.
36. Knudsen GPS, Neilson TCS, Pedersen J, Kerr A, Schwartz M, Hulten M, et al. Increased skewing of X chromosome inactivation in Rett syndrome patients and their mothers. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(11):1189–94.
37. Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(8):565–75.

38. Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Distèche CM. Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet.* 2011;130(2):237–45.
39. Pescatore A, Spinosa E, Casale C, Lioi MB, Ursini MV, Fusco F. Human Genetic Diseases Linked to the Absence of NEMO: An Obligatory Somatic Mosaic Disorder in Male. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
40. Gajecka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Mol Genet Genomics.* 2016;291(2):513–30.
41. Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, et al. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet.* 2001;68(5):1093–101.
42. Girard M, Couvert P, Carrié A, Tardieu M, Chelly J, Beldjord C, et al. Parental origin of de novo MECP2 mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(3):231–6.
43. Lee SS, Wan M, Francke U. Spectrum of MECP2 mutations in Rett syndrome. *Brain Dev.* 2001;23(Suppl. 1):S138–43.
44. Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Macmillan Mag.* 2000;1:40–7.
45. Thomas GH. High male:female ratio of germ-line mutations: An alternative explanation for postulated gestational lethality in males in X-linked dominant disorders. *Am J Hum Genet.* 1996;58(6):1364–8.
46. Clark M, Choi J, Douglas M. *Biology 2e.* 2nd ed. OpenStax. Rice, University; 2018. 1237–1238 p.
47. Vashi N, Justice MJ. Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies. *Mamm Genome.* 2019;30(5–6):90–110.
48. Guerrini R, Parrini E. Epilepsy in Rett syndrome, and CDKL5- and FOXP1-gene-related encephalopathies. *Epilepsia.* 2012;53(12):2067–78.
49. Pascual-Alonso A, Martínez-Monseny AF, Xiol C, Armstrong J. MECP2-related disorders in males. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):1–16.
50. Vuu YM, Roberts CT, Rastegar M. MeCP2 Is an Epigenetic Factor That Links DNA Methylation with Brain Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4).
51. Das. R, Thakur. K, Shrivastava. A, Puri. A, Mutsuddi. M. Identifying Epigenetic Endpoints of Pesticide Exposure Can Curtail Risk To Develop Cancer: a Review. *Int J Adv Res.* 2017;5(1):1093–107.
52. Kinde B, Wu DY, Greenberg ME, Gabel HW. DNA methylation in the gene body influences MeCP2-mediated gene repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(52):15114–9.
53. Bedogni F, Rossi RL, Galli F, Cobolli Gigli C, Gandaglia A, Kilstrup-Nielsen C, et al. Rett syndrome and the urge of novel approaches to study MeCP2 functions and mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;46(P2):187–201.
54. Ortega-Alarcon D, Claveria-Gimeno R, Vega S, Jorge-Torres OC, Esteller M, Abian O, et al. Stabilization effect of intrinsically disordered regions on multidomain proteins: The case of the methyl-cpg protein 2, mecp2. *Biomolecules.* 2021;11(8).

55. Sandweiss AJ, Brandt VL, Zoghbi HY. Advances in understanding of Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome: prospects for future therapies. *Lancet Neurol.* 2020;19(8):689–98.
56. Clemens AW, Wu DY, Moore JR, Christian DL, Zhao G, Gabel HW. MeCP2 Represses Enhancers through Chromosome Topology-Associated DNA Methylation. *Mol Cell.* 2020;77(2):279-293.e8.
57. Kinde B, Gabel HW, Gilbert CS, Griffith EC, Greenberg ME. Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(22):6800–6.
58. Ku CS, Naidoo N, Wu M, Soong R. Studying the epigenome using next generation sequencing. *J Med Genet.* 2011;
59. Antequera F. Cp G Islands and DNA Methylation . *eLS.* 2007;1–7.
60. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25(10):1010–22.
61. Couvert P, Bienvenu T, Aquaviva C, Poirier K, Moraine C, Gendrot C, et al. MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet.* 2001;10(9):941–6.
62. Krishnaraj R, Ho G, Christodoulou J. RettBASE: Rett syndrome database update. *Hum Mutat.* 2017.
63. Good K V., Vincent JB, Ausió J. MeCP2: The Genetic Driver of Rett Syndrome Epigenetics. *Front Genet.* 2021;12(January):1–21.
64. Yntema HG, Kleefstra T, Oudakker AR, Romein T, de Vries BBA, Nillesen W, et al. Low frequency of MECP2 mutations in mentally retarded males. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(8):487–90.
65. Fukuda T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Miyamoto K, Jin JJ, Ohmori I, et al. Methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) variations in Japanese patients with Rett syndrome: Pathological mutations and polymorphisms. *Brain Dev.* 2005;27(3 SPEC. ISS.):211–7.
66. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248–9.
67. Coutinho AM, Oliveira G, Katz C, Feng J, Yan J, Yang C, et al. MECP2 coding sequence and 3'UTR variation in 172 unrelated autistic patients. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144(4):475–83.
68. Gonzales ML, Adams S, Dunaway KW, LaSalle JM. Phosphorylation of Distinct Sites in MeCP2 Modifies Cofactor Associations and the Dynamics of Transcriptional Regulation. *Mol Cell Biol.* 2012;32:2894–903.
69. Ausió J, Georgel PT. MeCP2 and CTCF: Enhancing the cross-talk of silencers. 1999;1–76.
70. Bellini E, Pavesi G, Barbiero I, Bergo A, Chandola C, Nawaz MS, et al. MeCP2 post-translational modifications: A mechanism to control its involvement in synaptic plasticity and homeostasis? *Front Cell Neurosci.* 2014;8.
71. Shioda T, Takahashi S, Kaname T, Yamauchi T, Fukuoka T. MECP2 mutation in a boy with severe apnea and sick sinus syndrome. *Brain Dev.* 2018;40(8):714–8.
72. Psoni S, Sofocleous C, Traeger-Synodinos J, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Fryssira-Kanioura H. Phenotypic and genotypic variability in four males with MECP2 gene sequence aberrations including a novel deletion. *Pediatr Res.* 2010;67(5):551–6.

73. McWilliam C, Cooke A, Lobo D, Warner J, Taylor M, Tolmie JL. Semi-dominant X-chromosome linked learning disability with progressive ataxia, spasticity and dystonia associated with the novel MECP2 variant p.V122A: Akin to the new MECP2 duplication syndrome? *Eur J Paediatr Neurol*. 2010;14(3):267–9.
74. Zhang Q, Zhao Y, Bao X, Luo J, Zhang X, Li J, et al. Familial cases and male cases with MECP2 mutations. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2017;174(4):451–7.
75. Masuyama T, Matsuo M, Jing JJ, Tabara Y, Kitsuki K, Yamagata H, et al. Classic Rett syndrome in a boy with R133C mutation of MECP2. *Brain Dev*. 2005;27(6):439–42.
76. Rauchman M, Hoffman WH, Hanna JD, Kulharya AS, Figueroa RE, Yang J, et al. Preserved speech variants of the Rett syndrome: Molecular and clinical analysis. *Am J Med Genet*. 2001;104(1):14–22.
77. Zappella M, Meloni I, Longo I, Canitano R, Hayek G, Rosaia L, et al. Study of MECP2 gene in Rett syndrome variants and autistic girls. *Am J Med Genet*. 2003;119B(1):102–7.
78. Zahorakova D, Lejkova P, Gregor V, Magner M, Zeman J, Martasek P. MECP2 mutations in Czech patients with Rett syndrome and Rett-like phenotypes: Novel mutations, genotype-phenotype correlations and validation of high-resolution melting analysis for mutation scanning. *J Hum Genet*. 2016;61(7):617–25.
79. The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group. Diagnostic criteria for Rett syndrome. The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group. *Ann Neurol*. 1988;23(4):425–8.
80. Armstrong J, Poo P, Pineda M, Aibar E, Gean E, Catalaand V, et al. Classic rett syndrome in a boy as a result of somatic mosaicism for a MECP2 mutation. *Ann Neurol*. 2001;50(5):692.
81. Monrós E, Armstrong J, Aibar E, Poo P, Canós I, Pineda M. Rett syndrome in Spain: mutation analysis and clinical correlations. *Brain Dev*. 2001;23(SUPPL. 1):251–3.
82. Bienvenu T, Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: When DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet*. 2006;7(6):415–26.
83. Hoffbuhr K, Devaney JM, LaFleur B, Sirianni N, Scacheri C, Giron J, et al. MeCP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome. *Neurology*. 2001;56(11):1486–95.
84. Philippe C, Villard L, De Roux N, Raynaud M, Bonnefond JP, Pasquier L, et al. Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: A molecular update. *Eur J Med Genet*. 2006;49(1):9–18.
85. Yoon JA, Yoo Y, Lee JS, Kim YM, Shin YB. An early seizure variant type of a male Rett syndrome patient with a MECP2 p.Arg133His missense mutation. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(3):1–6.
86. Budden SS, Dorsey HC, Steiner RD. Clinical profile of a male with Rett syndrome. *Brain Dev*. 2005;27(SUPPL. 1):69–71.
87. Huppke P, Laccone F, Krämer N, Engel W, Hanefeld F. Rett syndrome: Analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Hum Mol Genet*. 2000;9(9):1369–75.
88. Obata K, Matsuishi T, Yamashita Y, Fukuda T, Kuwajima K, Horiuchi I, et al. Mutation analysis of the methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) in patients with Rett syndrome. *J Med Genet*. 2000;37(8):608–10.
89. Vacca M, Filippini F, Budillon A, Rossi V, Mercadante G, Manzati E, et al. Mutation analysis of the MECP2 gene in British and Italian Rett syndrome females. *J Mol Med*. 2000;78(11):648–55.

90. Cheadle JP, Gill H, Fleming N, Maynard J, Kerr A, Leonard H, et al. 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(7):1119–29.
91. Yamashita Y, Kondo I, Fukuda T, Morishima R, Kusaga A, Iwanaga R, et al. Mutation analysis of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MECP2) in Rett patients with preserved speech. *Brain Dev.* 2001;23(SUPPL. 1):157–60.
92. Giunti L, Pelagatti S, Lazzerini V, Guarducci S, Lapi E, Coviello S, et al. Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 64 Italian Rett syndrome girls: Tentative genotype/phenotype correlation. *Brain Dev.* 2001;23(SUPPL. 1):242–5.
93. Gendrot C, Ronce N, Raynaud M, Ayrault AD, Dourlens J, Castelnaud P, et al. X-linked nonspecific mental retardation (MRX16) mapping to distal Xq28: Linkage study and neuropsychological data in a large family. *Am J Med Genet.* 1999;83(5):411–8.
94. K Ravn, J B Nielsen, P Uldall, F J Hansen MS. No correlation between phenotype and genotype in boys with a truncating. 2003;1–5.
95. Meloni I, Bruttini M, Longo I, Mari F, Rizzolio F, D'adamo P, et al. A mutation in the Rett syndrome gene, MECP2, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet.* 2000;67(4):982–5.
96. Miltenberger-Miltenyi G, Laccone F. Mutations and polymorphisms in the human methyl CpG-binding protein MECP2. *Hum Mutat.* 2003;22(2):107–15.
97. Orrico A, Lam CW, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF, et al. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett.* 2000;481(3):285–8.
98. Klauck SM, Lindsay S, Beyer KS, Splitt M, Burn J, Poustka A. A mutation hot spot for nonspecific X-linked mental retardation in the MECP2 gene causes the PPM-X syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002;70(4):1034–7.
99. Winnepeninckx B, Errijgers V, Hayez-Delatte F, Reyniers E, Kooy RF. Identification of a family with nonspecific mental retardation (MRX79) with the A140V mutation in the MECP2 gene: Is there a need for routine screening? *Hum Mutat.* 2002;20(4):249–52.
100. Cohen D, Lazar G, Couvert P, Desportes V, Lippe D, Mazet P, et al. MECP2 Mutation in a Boy With Language Disorder and Schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2002;159:1:148–9.
101. Lindsay S, Splitt M, Edney S, Berney TP, Knight SJL, Davies KE, et al. PPM-X: A new X-linked mental retardation syndrome with psychosis, pyramidal signs, and macroorchidism maps to Xq28. *Am J Hum Genet.* 1996;58(6):1120–6.
102. Parmeggiani A, Tedde MR, Arbizzani A, Posar A, Scaduto MC, Santucci M, et al. Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) gene mutations in an Italian sample of patients with pervasive developmental disorder and mental retardation. *J Child Neurol.* 2009;24(6):772–4.
103. Venkateswaran S, Mcmillan HJ, Doja A, Humphreys P. Adolescent onset cognitive regression and neuropsychiatric symptoms associated with the A140V MECP2 mutation. *Dev Med Child Neurol.* 2014;56(1):91–4.
104. Adegbola AA, Gonzales ML, Chess A, LaSalle JM, Cox GF. A novel hypomorphic MECP2 point mutation is associated with a neuropsychiatric phenotype. *Hum Genet.* 2009;124(6):615–23.
105. Kankirawatana P, Leonard H, Ellaway C, Scurlock J, Mansour A, Makris CM, et al. Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations. *Neurology.* 2006;67(1):164–6.
106. 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(8):1188–93.

107. Leonard H, Silberstein J, Falk R, Houwink-Manville I, Ellaway C, Raffaele LS, et al. Occurrence of Rett syndrome in boys. *J Child Neurol.* 2001;16(5):333–8.
108. Kleefstra T, Yntema HG, Nillesen WM, Oudakker AR, Mullaart RA, Geerdink N, et al. MECP2 analysis in mentally retarded patients: Implications for routine DNA diagnostics. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(1):24–8.
109. Lundvall M, Samuelsson L, Kyllerman M. Male Rett phenotypes in T158M and R294X MeCP2-mutations. *Neuropediatrics.* 2006;37(5):296–301.
110. Lynch SA, Whatley SD, Ramesh V, Sinha S, Ravine D. Sporadic case of fatal encephalopathy with neonatal onset associated with a T158M missense mutation in MECP2. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88(3):250–2.
111. Sheikh TI, Ausió J, Faghfoury H, Silver J, Lane JB, Eubanks JH, et al. From Function to Phenotype: Impaired DNA Binding and Clustering Correlates with Clinical Severity in Males with Missense Mutations in MECP2. *Sci Rep.* 2016;6(December):1–13.
112. Campos M, Pestana CP, dos Santos AV, Ponchel F, Churchman S, Abdalla-Carvalho CB, et al. A MECP2 missense mutation within the MBD domain in a Brazilian male with autistic disorder. *Brain Dev.* 2011;33(10):807–9.
113. Kapp SK, Steward R, Crane L, Elliott D, Elphick C, Pellicano E, et al. ‘People should be allowed to do what they like’: Autistic adults’ views and experiences of stimming. *Autism.* 2019;23(7):1782–92.
114. Campos M, Abdalla CB, Santos-Rebouças CB, dos Santos AV, Pestana CP, Domingues ML, et al. Low significance of MECP2 mutations as a cause of mental retardation in Brazilian males. *Brain Dev.* 2007;29(5):293–7.
115. Beyer KS, Blasi F, Bacchelli E, Klauck SM, Maestrini E, Poustka A. Mutation analysis of the coding sequence of the MECP2 gene in infantile autism. *Hum Genet.* 2002;111(4–5):305–9.
116. Laccone F, Zoll B, Huppke P, Hanefeld F, Pepinski W, Trappe R. MECP2 gene nucleotide changes and their pathogenicity in males: Proceed with caution. *J Med Genet.* 2002;39(8):586–8.
117. Bourdon V, Philippe C, Martin D, Verloès A, Grandemenge A, Jonveaux P. MECP2 Mutations or Polymorphisms in Mentally Retarded Boys: Diagnostic Implications. *Mol Diagnosis.* 2002;7(1):3–7.
118. Psoni S, Sofocleous C, Traeger-Synodinos J, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Fryssira-Kanioura H. MECP2 mutations and clinical correlations in Greek children with Rett syndrome and associated neurodevelopmental disorders. *Brain Dev.* 2012;34(6):487–95.
119. Bienvenu T, Villard L, Roux N de, Bourdon V, Fontes M, Beldjord C, et al. Spectrum of MECP2 mutations in Rett syndrome. *Genet Test.* 2002;6.
120. Ylisaukko-Oja T, Rehnström K, Vanhala R, Kempas E, Von Koskull H, Tengström C, et al. MECP2 mutation analysis in patients with mental retardation. *Am J Med Genet.* 2005;132A(2):121–4.
121. Moog U, Roozendaal K Van, Smeets E, Tserpelis D, Devriendt K, Buggenhout G Van, et al. MECP2 mutations are an infrequent cause of mental retardation associated with neurological problems in male patients. *Brain Dev.* 2006;28(5):305–10.
122. Wong VCN, Li SYH. Rett syndrome: Prevalence among Chinese and a comparison of MECP2 mutations of classic Rett syndrome with other neurodevelopmental disorders. *J Child Neurol.* 2007;22(12):1397–400.

123. San-mei W, Ming L, Yan-ling Y, Hong P, Jing L, Kai-feng P. Mutational analysis of the methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) gene in male autism patients. 2013;45.
124. Buyse IM, Fang P, Hoon KT, Amir RE, Zoghbi HY, Roa BB. 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.* 2000;67(6):1428–36.
125. Hadzsiev K, Polgar N, Bene J, Komlosi K, Karteszi J, Hollody K, et al. Analysis of Hungarian patients with Rett syndrome phenotype for MECP2, CDKL5 and FOXP1 gene mutations. *J Hum Genet.* 2011;56(3):183–7.
126. Amano K, Nomura Y, Segawa M, Yamakawa K. Mutational analysis of the MECP2 gene in Japanese patients with Rett syndrome. *J Hum Genet.* 2000;45(4):231–6.
127. Fabio RA, Colombo B, Russo S, Cogliati F, Masciadri M, Foglia S, et al. Recent insights into genotype-phenotype relationships in patients with Rett syndrome using a fine grain scale. *Res Dev Disabil.* 2014;35(11):2976–86.
128. Zahorakova D, Rosipal R, Hadac J, Zumrova A, Bzduch V, Misovicova N, et al. Mutation analysis of the MECP2 gene in patients of Slavic origin with Rett syndrome: Novel mutations and polymorphisms. *J Hum Genet.* 2007;52(4):342–8.
129. Piton A, Gauthier J, Hamdan F, Lafrenière R, Yang Y. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2011;1–7.
130. Maortua H, Martínez-Bouzas C, García-Ribes A, Martínez MJ, Guillen E, Domingo MR, et al. MECP2 gene study in a large cohort: Testing of 240 female patients and 861 healthy controls (519 females and 342 males). *J Mol Diagnostics.* 2013;15(5):723–9.
131. Schönewolf-Greulich B, Tejada MI, Stephens K, Hadzsiev K, Gauthier J, Brøndum-Nielsen K, 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(6):733–8.
132. Nielsen JB, Henriksen KF, Hansen C, Silahatoglu A, Schwartz M, Tommerup N. MECP2 mutations in Danish patients with Rett syndrome: High frequency of mutations but no consistent correlations with clinical severity or with the X chromosome inactivation pattern. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(3):178–84.
133. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature.* 2005;434: 400-404
134. Ventura P, Galluzzi R, Bacca SM, Giorda R, Massagli A. A novel familial MECP2 mutation in a young boy : Clinical and molecular findings. 2006;2:867–9.
135. Rajaei S, Erlandson A, Kyllerman M, Albage M, Lundstrom I, Karrstedt EL, et al. Early infantile onset “congenital” rett syndrome variants: Swedish experience through four decades and mutation analysis. *J Child Neurol.* 2011;26(1):65–71.
136. Zvereff V, Carpenter L, Patton D, Cabral H, Rita D, Wilson A, et al. Molecular diagnostic dilemmas in Rett syndrome. *Brain Dev.* 2012;34(9):750–5.
137. Liang JS, Lin LJ, Yang MT, Wang JS, Lu JF. The therapeutic implication of a novel SCN2A mutation associated early-onset epileptic encephalopathy with Rett-like features. *Brain Dev.* 2017;39(10):877–81.
138. Reynolds C, King MD, Gorman KM. The phenotypic spectrum of SCN2A-related epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2020;

139. Wolff M, Johannesen KM, Hedrich UBS, Masnada S, Rubboli G, Gardella E, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. *Brain*. 2017;140(5):1316–36.
140. European Society of Human Genetics. Human Genetics Conference May 2006 - Final Programme and Abstracts. 2006;154.
141. Li MR, Pan H, Bao XH, Zhang YZ, Wu XR. MECP2 and CDKL5 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. *J Hum Genet*. 2007;52(1):38–47.
142. Chen CH, Cheng MC, Huang A, Hu TM, Ping LY, Chang YS. Detection of Rare Methyl-CpG Binding Protein 2 Gene Missense Mutations in Patients With Schizophrenia. *Front Genet*. 2020;11(May):1–9.
143. Moncla A, Kpebe A, Missirian C, Mancini J, Villard L. Polymorphisms in the C-terminal domain of MECP2 in mentally handicapped boys: Implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(1):86–9.
144. Wen Z, Cheng TL, Li GZ, Sun SB, Yu SY, Zhang Y, et al. Identification of autism-related MECP2 mutations by whole-exome sequencing and functional validation. *Mol Autism*. 2017;8(1):1–10.
145. Pan H, Wang YP, Bao XH, Meng H Di, Zhang Y, Wu XR, et al. MECP2 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(8):484–6.
146. Bhanushali AA, Mandsaurwala A, Das BR. Homozygous c.1160C>T (P38L) in the MECP2 gene in a female Rett syndrome patient. *J Clin Neurosci*. 2016;25:127–9.
147. National Center for Biotechnology Information. dbSNP Short Genetic Variations. rs63390262. 2022. Acedido em 12 maio de 2023. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs63390262#clinical_significance
148. Chapleau CA, Lane J, Kirwin SM, Schanen C. Detection of Rarely Identified Multiple Mutations in MECP2 Gene Do Not Contribute to Enhanced Severity in Rett Syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;
149. Wang YM, Zheng YF, Yang SY, Yang ZM, Zhang LN, He YQ, et al. MicroRNA-197 controls ADAM10 expression to mediate MeCP2's role in the differentiation of neuronal progenitors. *Cell Death Differ*. 2018;26(10):1863–79.
150. Campos M, Abdalla CB, Santos AV dos, Pestana CP, Santos JM dos, Santos-Rebouças CB, et al. A MECP2 mutation in a highly conserved aminoacid causing mental retardation in a male. *Brain Dev*. 2009;31(2):176–8.
151. Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, Wolffe AP. The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry*. 1999;38(22):7008–18.
152. Buschdorf JP, Strätling WH. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: Impact on Rett syndrome. *J Mol Med*. 2004;82(2):135–43.
153. Imessaoudene B, Bonnefont J, Royer G, Cormier-daire V, Lyonnet S, Lyon G, et al. MECP2 mutation in non-fatal, non-progressive encephalopathy in a male. *J Med Genet*. 2001;38:171–4.
154. Khajuria R, Gupta N, Sapra S, Gulati S, Ghosh M, Kalra V, et al. A novel MECP2 change in an Indian boy with variant rett phenotype and congenital blindness: Implications for genetic counseling and prenatal diagnosis. *J Child Neurol*. 2011;26(2):209–13.

155. Rosser LG, McKee S, Millar DS, Archer H, Hughes J, Butler R, et al. Two sisters with Rett syndrome and non-identical paternally-derived microdeletions in the MECP2 gene. *Genomic Med.* 2008;2(3–4):77–81.
156. Yaron Y, Ben Zeev B, Shomrat R, Bercovich D, Naiman T, Orr-Urtreger A. MECP2 mutations in Israel: Implications for molecular analysis, genetic counseling, and prenatal diagnosis in Rett syndrome. *Hum Mutat.* 2002;
157. Tillotson R, Selfridge J, Koerner M V., Gadalla KKE, Guy J, De Sousa D, et al. Radically truncated MeCP2 rescues Rett syndrome-like neurological defects. *Nature.* 2017;550(7676):398–401.
158. Lyst MJ, Bird A. Rett syndrome: A complex disorder with simple roots. *Nat Rev Genet.* 2015;16(5):261–74.