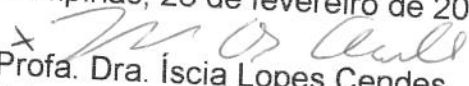


DANIELA FACCHIN

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Genética Médica da aluna **Daniela Facchin**.

Campinas, 26 de fevereiro de 2002.


Prof. Dra. Íscia Lopes Cendes
Orientadora

ESTUDOS MOLECULARES NA SÍNDROME DE RETT

CAMPINAS

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DANIELA FACCHIN

ESTUDOS MOLECULARES NA SÍNDROME DE RETT

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Médicas, área de
Genética Médica.*

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. ISCIA T. LOPES-CENDES

CAMPINAS

2002

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
F118e
V EX
TOMBO BCI 50499
PROC 46-837102
C DA
PREÇO R\$ 11,00
DATA 21/08/02
Nº CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00172431-0

BIB ID 252359

F118e Facchin, Daniela
Estudos moleculares na Síndrome de Rett / Daniela Facchin.
Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Iscia Teresinha Lopes Cendes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biologia Molecular. 2. Neurogenética. 3. Genética Humana. I.
Ischia Teresinha Lopes Cendes. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Íscia Lopes Cendes

Membros:

1. Profa. Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith

2. Profa. Dra. Christine Hackel

3. Profa. Dra. Íscia Lopes Cendes

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26.02..2002

200232616

DEDICATÓRIA

*A Deus, a eterna gratidão por me abençoar tanto,
e a meus pais, por toda minha vida.*

À Profª Drª Iscia T. Lopes Cendes, pela oportunidade de realização do desenvolvimento profissional que sempre desejei.

Aos doutores Sérgio Antonio Antoniuk e Isac Bruck da Universidade Federal do Paraná (UFPR), à Profª Drª Laura Jardim e ao Prof. Dr. Roberto Giugliani da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e às Profªs Drªs Antonia Paula Marques de Faria, Denise Yvone Janovitz Norato, Drª Daniela Faroro Giovannetti e Prof. Carlos Eduardo Steiner do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo carinho, atenção e respeito dedicados a mim, possibilitando a avaliação de várias famílias e sem os quais esse trabalho não seria possível.

Aos grandes amigos que fiz em Campinas em todos esses anos, agradeço muito toda a cumplicidade, a amizade, os momentos de mau e de bom humor, as contribuições e os ensinamentos em todos os pontos de vista. Vocês são os principais responsáveis por tornar minha estadia aqui muito mais agradável.

Aos familiares das pacientes, pelo carinho, atenção, compreensão, colaboração, e, principalmente, pela existência desse trabalho.

A todas as instituições que contribuíram direta ou indiretamente nesse projeto, meus sinceros agradecimentos e cumprimentos por toda a dedicação e empenho.

Aos membros da banca pela disponibilidade, engrandecendo minha experiência profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

	PÁG
RESUMO	<i>xiii</i>
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Caracterização clínica.....	17
1.2. Prevalência e padrão de herança.....	20
1.3. Estudos moleculares.....	21
1.3.1. Pesquisa do gene candidato.....	21
1.3.2. Estudo de Ligação.....	23
1.3.3. O gene MECP2.....	24
2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	30
3. METODOLOGIA	32
3.1. Pacientes e estratégias para o cumprimento das etapas do projeto.....	33
3.2. Análise molecular	37
3.2.1. Extração do DNA genômico das amostras colhidas.....	37
3.2.2. Seleção dos marcadores de DNA no cromossomo X.....	38
3.2.3. Polimerase (PCR) para os marcadores e genotipagem.....	40
3.3. Estratégia para interpretação dos resultados.....	41
3.3.1. Caracterização das pacientes.....	41
3.3.2. Métodos de cálculo do “lod score” pelo programa LINKAGE.....	42
3.3.3. Análise dos haplótipos.....	44

4. RESULTADOS.....	45
4.1. Avaliação clínica.....	46
Identificação resumida das pacientes.....	47
4.2. Resultados LINKAGE.....	53
4.3. Segregação dos haplótipos nas famílias.....	61
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	68
7. SUMMARY	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9. ANEXOS.....	78
ANEXO I: Formulário de avaliação clínica.....	79
ANEXO II: Formulários de consentimento livre e esclarecido e carta de aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da FCM-UNICAMP...	86
ANEXO III: Soluções utilizadas.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

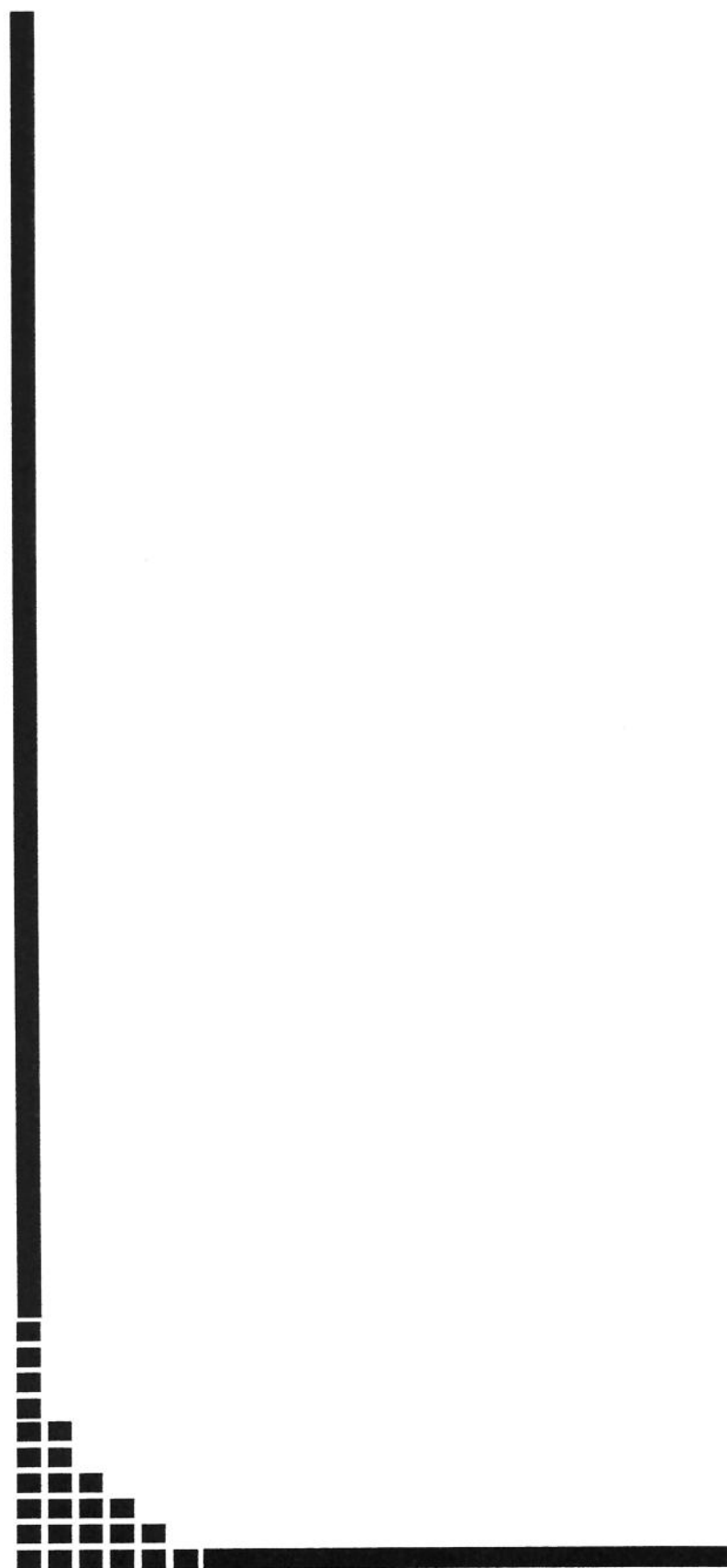
μg	micrograma	
μl	microlitro	
μM	micromolar	
cr	cromossomo	
DNA	Ácido desoxirribonucléico	
dATP[P³³]	dinucleotídeo A marcado com fósforo radioativo (P ³³).	
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato	
EDTA	Ácido tetraaceticodiaminoetileno	
kb	quilobases	
MBD	domínio do gene MECP2 com influência na ligação com as ilhas CpG (“metil binding domain”)	
MECP2	“methyl CpG binding protein 2”	
MgCl₂	Cloreto de magnésio	
ml	Mililitro	
mM	Milimolar	
Mutações	de sentido trocado	“missense”
	sem sentido	“nonsense”
	mudança na matriz de leitura “frameshift”	

PCR	Reação em cadeia da polimerase	“Polymerase chain reaction”
“Primers”	Oligonucleotídeos iniciadores	
RPM	Rotações por minuto	
RSB	Tampão à base de cloreto de magnésio e cloreto de potássio	
SDS	Lauril sulfato de sódio	
Taq®	DNA polimerase <i>Termus aquaticus</i>	
TRD	domínio do gene MECP2 com influência na repressão da transcrição (“transcription repression domain”)	
V	Volts	
W	Watts	

	PÁG
Tabela 1: Descrição dos marcadores utilizados para análise comparativa em relação à localização no cromossomo X.....	44
Tabela 2: Resultados do DMS-IV.....	50
Tabela 3: Resultados dos critérios necessários do Grupo de Trabalho da Síndrome De Rett.....	51
Tabela 4: Resultados dos critérios de suporte do Grupo de Trabalho da Síndrome De Rett.....	52
Tabela 5: Resultados referentes ao marcador DXS 1073.....	54
Tabela 6: Resultados referentes ao marcador DXS 8103.....	55
Tabela 7: Resultados referentes ao marcador DXS 8091.....	56
Tabela 8: Resultados referentes ao marcador DXS 8043.....	57
Tabela 9: Resultados referentes ao marcador DXS 1227.....	58
Tabela 10: Resultados referentes ao marcador DXS 1192.....	59

	PÁG
Figura 1: Representação esquemática do gene MECP2.....	26
Figura 2: Representação de um filme radiográfico após a revelação.....	41
Figura 3: Representação esquemática de um arquivo com extensão pre.....	42
Figura 4: Representação esquemática da análise dos haplótipos.....	44
Figura 5: Heredograma das famílias analisadas.....	46
Figura 6: Representação esquemática dos resultados obtidos.....	60
Figura 7: Representação esquemática da análise de segregação dos haplótipos.....	64

	PÁG
Quadro 1: Critérios diagnósticos da Síndrome de Rett.....	17
Quadro 2: Estágios clínicos da Síndrome de Rett.....	19
Quadro 3: Pesquisa de genes candidatos realizadas em RS.....	22
Quadro 4: Resumo das principais mutações detectadas em pacientes com RS.....	27
Quadro 5: Marcadores microssatélites utilizados no projeto.....	39
Quadro 6: Representação esquemática de um arquivo com extensão ped.....	43



RESUMO

A síndrome de Rett (RS) é considerada um transtorno invasivo do desenvolvimento, primeiramente descrita em 1966 pelo austríaco Andreas Rett. Clinicamente é caracterizada por desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal entre os seis e 18 meses de idade. Após este período o desenvolvimento fica estagnado, atinge um platô e posteriormente ocorre regressão motora progressiva. A prevalência da RS é ao redor de 1:10 000 a 1:22 000, no sexo feminino.

Até outubro de 1999, o diagnóstico era feito somente através da aplicação de critérios clínicos, pois não havia um marcador bioquímico, citogenético ou molecular conhecido, associado à patologia. Diferentes modelos de herança foram propostos para RS a saber: mutações no DNA mitocondrial, dissomia uniparental, inativação preferencial do cromossomo X, mutações dinâmicas (repetição de tripletos) e aumento na frequência de sítios frágeis. Recentemente, mutações no gene *MECP2*, localizado na região Xq28, foram identificadas em 33% a 80% de pacientes com quadro clínico clássico da RS e em pacientes outros fenótipos.

O objetivo principal deste projeto foi investigar a presença de ligação genética entre marcadores de DNA localizados no cr X, incluindo a região Xq28.

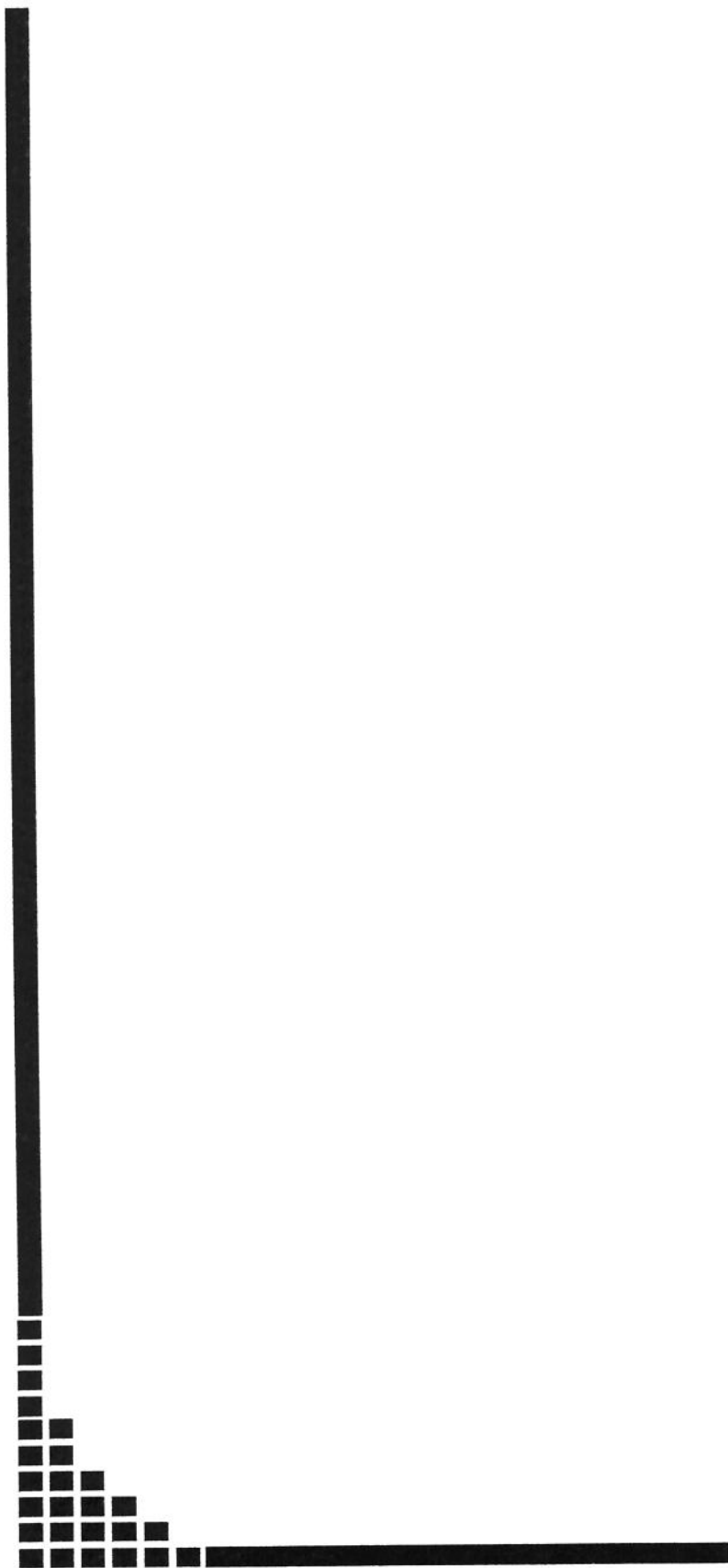
Para o cumprimento dos objetivos acima, contou-se com um total de 86 amostras, pertencentes a 23 famílias, das quais 25 pacientes com quadro clínico clássico de RS. Os estudos de ligação foram realizados através da genotipagem de marcadores anônimos de DNA do tipo microssatélite e a análise estatística da probabilidade de ligação calculada por métodos paramétricos, “lod score”, através da utilização do programa de computador LINKAGE. Além disso, analisou-se, cuidadosamente, a segregação dos marcadores genotipados em em todas as famílias nas quais era possível estabelecer haplótipos.

Obteve-se “lod scores” negativos significativos para todos os marcadores analisados, quando as famílias eram avaliadas em conjunto, sendo que extensas porções do cromossomo X foram excluídas a saber: DXS 1073 exclusão de 12 cM (compreendendo a região onde localiza-se o gene *MECP2*), DXS 8103 exclusão de 2 cM, DXS 8091 exclusão de 4 cM, DXS 8043 exclusão de 22 cM, DXS 1227 exclusão de 4 cM, e DXS 1192

exclusão de 10 cM. No entanto, observou-se que menos da metade das famílias contribuiu para os “lod scores” obtidos. Nenhuma família sozinha foi suficiente para gerar “lod score” significativo. Porém a análise dos haplótipos da família número 6, mostrou que em uma as duas irmãs com RS herdaram porções distintas do cromossomo X materno (Xq26-qter), concluindo-se que, nesse caso, o gene responsável pela RS não se encontra na região distal do braço longo do cromossomo X. As demais famílias não forneceram resultados conclusivos.

Em conclusão, esses resultados indicam fortes evidências da presença de heterogeneidade genética na RS.

Estudos subseqüentes, como a análise das mutações no gene *MECP2* e o estudo da sua expressão, associados aos estudos de inativação do cromossomo X complementarizam esse trabalho e auxiliar na elucidação do papel do cromossomo X na etiologia da RS.



1. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

A síndrome de Rett (RS) foi primeiramente descrita por Andreas Rett em 1966 (RETT,1966) por meio do relato de 31 meninas que desenvolveram importante regressão mental nos primeiros anos de vida, associada a movimentos estereotipados de mãos em linha média e alterações no comportamento.

Nos últimos trinta anos, vários relatos de pacientes com quadro semelhante surgiram na literatura, ajudando a estabelecer a RS como entidade clinicamente distinta. É importante salientar que, até outubro de 1999, o diagnóstico da RS era exclusivamente clínico, não havendo nenhum marcador biológico descrito para a doença.

A RS clássica subdivide-se em quatro estágios: O primeiro estágio, de estagnação precoce, ocorre entre seis e 18 meses e é caracterizado por atraso progressivo de desenvolvimento neuropsicomotor, embora o padrão de desenvolvimento ainda não seja característico. O segundo estágio inicia-se entre o primeiro e o quarto ano de idade, com rápida regressão no desenvolvimento, acompanhada por perda das habilidades adquiridas. O terceiro estágio caracteriza-se por um período pseudoestacionário, havendo a reaquisição de algumas habilidades com regressão neuromotora discreta. O quarto estágio é o de deterioração motora tardia, com dependência completa de cadeira de rodas; associado a estado de consumpção e contraturas distais, podendo se prolongar por décadas (vide quadros 1 e 2). (HAGBERG & WITT-ENGERSTRÖM, 1986; adaptado por HAGBERG, 1989; WITT-ENGERSTRÖM, 1990).

Quadro 1: Critérios diagnósticos da Síndrome de Rett. Baseado no proposto por HAGBERG B., GOUTIÈRES F., HANEFELD F., & RETT A em 1985 e atualizado pelo Grupo de trabalho em Síndrome Rett (TREVATHAN & MOSER, 1988).

CRITÉRIOS NECESSÁRIOS

- a) Período pré e perinatal aparentemente normal;
- b) Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até cinco ou seis meses de idade;
- c) Perímetro cefálico normal ao nascimento;
- d) Desaceleração na velocidade de crescimento do perímetro cefálico (dos três meses aos três anos);
- e) Perda das habilidades adquiridas:
 - e1) habilidades manuais propositadas;
 - e2) balbúcio e palavras faladas;
 - e3) habilidades de comunicação;

- f) Deficiência mental óbvia;
- g) Movimentos estereotipados de mãos, intensos e sucessivos;
 - g1) movimentos de torcer, retorcer e apertar;
 - g2) movimentos de “lavar as mãos”, fricção;
 - g3) movimentos de levar a mão à boca e protusão lingual;
- h) Anormalidades na marcha entre as meninas que deambulam;
- i) Apraxia/dispraxia na marcha;
- j) Ataxia de tronco/dispraxia corporal;
- k) Tentativa de diagnóstico entre dois e cinco anos de idade;

CRITÉRIOS DE SUPORTE

- a) Disfunção do ritmo respiratório;
 - a1) apnéia periódica durante a vigília;
 - a2) hiperventilação intermitente;
 - a3) crises de perda do fôlego;
 - a4) expulsão forçada de ar ou saliva;
- B) Aerofagia;
- c) Anormalidades eletroencefalográficas:
 - c1) ritmo de base anormal com ondas lentas constantes ou intermitentes (3-5Hz)
 - c2) descargas epileptiformes, com ou sem convulsões;
- d) Epilepsia com várias formas de crises;
- e) Sinais de espasticidade, fraqueza muscular tardia, e/ou distonia;
- f) Distúrbios vasomotores periféricos;
- g) Escoliose de origem neurológica;
- h) Hipotrofia discreta e pés frios;
- i) Atraso no crescimento.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- a) Organomegalias ou sinais sugestivos de doença de depósito;
- b) Retinopatia ou atropia óptica;
- c) Microcefalia ao nascimento;
- d) Existência de doença metabólica ou heredodegenerativa identificada;
- e) Doença neurológica adquirida, resultantes de quadros infecciosos severos ou traumatismos crânio encefálicos;
- f) Evidência de retardo de crescimento intra-uterino;
- g) Evidência de dano cerebral perinatal adquirido;

Quadro 2: Estágios clínicos da Síndrome de Rett (HAGBERG & WITT-ENGERSTRÖM 1986).

1.º Estágio: ESTAGNAÇÃO PRECOCE

Início entre 6 e 18 meses de idade

Características clínicas:

- a) Atraso progressivo de desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM);
- b) Padrão de desenvolvimento ainda não é significativamente anormal;
- c) Desaceleração na velocidade de crescimento do perímetro cefálico;

2.º Estágio: REGRESSÃO RÁPIDA

Início de 1 a 4 anos de idade

Características clínicas:

- a) Regressão no DNPM;
- b) Mudanças da comunicabilidade e contato ocular;
- c) Diminuição do interesse por jogos ou brincadeiras;
- d) Perda do uso propositado das mãos;
- e) Estereotípias manuais;
- f) Marcha atáxica, (desajeitada e incoordenada);
- g) Respiração irregular: hiperventilação, aerofagia, apnéia durante a vigília;
- h) Bruxismo;
- i) Crises convulsivas;
- j) Auto-agressividade.

3.º Estágio: PSEUDO-ESTACIONÁRIO

Início de 2 a 10 anos de idade

Duração de meses a anos

Características clínicas:

- a) Estabilização clínica;
- b) Comprometimento intelectual;
- c) Humor estável;
- d) Persiste ataxia de marcha e, às vezes, ataxia de tronco;
- e) Controle melhor das crises convulsivas;
- f) Perda de peso associado a excelente apetite;
- g) Reaquisição de algumas habilidades.

4.º Estágio: DETERIORAÇÃO MOTORA

Início aos 10 anos de idade

Duração de anos

Características clínicas:

- a) Paciente com deambulação e mobilidade restrita (leito ou cadeira de rodas);
- b) Escoliose acentuada;
- c) Distúrbios tróficos e vasomotores em pés;
- d) Melhoria no contato social e emocional;
- e) Crises epiléticas controladas;
- f) Déficit pênico-estatural, constipação intestinal crônica;
- g) Puberdade.

1.2. PREVALÊNCIA E PADRÃO DE HERANÇA

A prevalência da RS é estimada em 1:10 000 na Suécia (HAGBERG 1985), 1:20 000 em Dakota (USA), 1:22 800 no Texas (USA) (KOZINETZ *et al.*, 1993), e 1:24 588 na Suíça (BOLTSHAUSER & KUNZ, 1987). BURD, MARTSOLF & RANDAL (1990) sugeriram a possibilidade de que 3% das mulheres institucionalizadas por retardamento mental seriam portadoras da RS e TREVATHAN & ADAMS (1988) sugerem que RS possa ser a maior causa de retardamento mental no sexo feminino.

No Brasil, mesmo com a presença da Associação Brasileira de Síndrome de Rett (ABRE-TE), nenhum estudo relativo a prevalência dessa patologia foi realizado.

A maioria dos casos é isolado; no entanto, quando ocorre recorrência familiar, a doença segrega com um padrão de herança dominante ligado ao cromossomo (cr) X (HAGBERG, 1993.), com provável letalidade intra-útero para o sexo masculino (HAGBERG, 1993). As principais observações que levam a essa hipótese são:

- a) nenhum caso de RS no sexo masculino foi relatado (HAGBERG, 1993);
- b) existe uma alta frequência de abortamentos espontâneos em famílias de indivíduos com RS (HAGBERG, 1993);

- c) foram descritas duas translocações, envolvendo o braço curto do cromossomo X em pacientes com RS (HAGBERG, 1993);
- d) algumas famílias de pacientes com RS apresentam defeito metabólico, ligado ao cromossomo X, observado na enzima ornitina transcarbamilase (OTC) (THOMAS *et al.*, 1987, 1990; CLARKE *et al.*, 1990).

1.3. ESTUDOS MOLECULARES

Duas estratégias podem ser aplicadas na tentativa de se descobrir a localização de um gene ou região cromossômica responsável por determinada patologia: a pesquisa do gene candidato ou o estudo de ligação. Quando o mecanismo fisiopatológico da doença é conhecido, por meio do conhecimento do mecanismo de ação de vários genes, a pesquisa do gene candidato é a mais indicada. Se o mecanismo fisiopatológico não estiver bem elucidado, o estudo de ligação é a melhor alternativa.

Na síndrome de Rett, muito embora a fisiopatologia não esteja bem estabelecida, as duas estratégias foram utilizadas e, mesmo tendo vários resultados negativos, a pesquisa do gene candidato teve papel fundamental na descoberta do gene responsável.

1.3.1. Pesquisa do gene candidato

Uma variedade de genes candidatos foram considerados na RS. Na maior parte desses estudos, foram incluídos genes que atuam no sistema nervoso central, codificando neurotransmissores ou receptores, fatores de crescimento ou seus receptores e proteínas neuronais (PERCY *et al.*, 1998). Esses genes candidatos foram sistematicamente excluídos por meio de análise mutacional. Além da análise molecular do DNA genômico nuclear, alguns estudos investigaram possíveis associações entre a RS e mutações presentes no DNA mitocondrial: posição 2835; na região que codifica a subunidade 16S do rRNA do mtDNA entre os nucleotídeos 2650-3000; e na posição 10463 (TANG *et al.*, 1997 e CARDAIOLI *et al.*, 1999).

Quadro 3: Pesquisa de genes candidatos realizada em RS. Modificado de PERCY *et al.*, 1998; TANG *et al.*, 1997, CARDAIOLI *et al.*, 1999, AMIR *et al.*, 1999 e WAN *et al.*, 1999.

Gene	Locus	Referências
Receptor tirosinoquinase A	1q21-22	NARAYANAN <i>et al.</i> , 1998
Receptor tirosinoquinase B	9q22.1	NARAYANAN <i>et al.</i> , 1998
Receptor de dopamina D ₄	11p15.5	ANVRET, ZHANG, HAGBERG, 1994
Tirosina hidroxilase	11p15.5	ANVRET <i>et al.</i> , 1994
Fator de crescimento "insulina-like"	11p15.5	ANVRET <i>et al.</i> , 1994
Fator neurotrófico derivado do cérebro	11p13	ANVRET <i>et al.</i> , 1994
Receptor tirosinoquinase C	15q24-q25	NARAYANAN <i>et al.</i> , 1998
Bcl-2	18q21.3	ANVRET <i>et al.</i> , 1994
Synapsin I	Xp11.23	DE GENNARO <i>et al.</i> , 1987; ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Synaptophysin	Xp11.23-p11.22	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Monoaminoxidase A	Xp11.23	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Monoaminoxidase B	Xp11.23	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Subunidade A ₂ do receptor de glicina	Xp21-p22	SCHANEN <i>et al.</i> , 1997
Ornitina transcarbamilase	Xp21.1	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Receptor peptídico liberador de gastrina	Xp22.2	ANVRET <i>et al.</i> , 1994; HEIDARY <i>et al.</i>
Subunidade E α da piruvato desidrogenase	Xp22.1	SCHANEN <i>et al.</i> , 1997
M6b	Xp22.2	NARAYANAN <i>et al.</i> , 1998
Receptor de andrógeno	Xq11-q12	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
EPH (related tyrosine kinase ligand)	Xq12	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Proteína de junção de Gap (Connexin 32)	Xq13	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Canal aniônico dependente de voltagem	Xq13-q21	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Fator de transcrição 4	Xq21.1	ELISSON <i>et al.</i> , 1992
Proteína proteolipídica	Xq22	SCHANEN <i>et al.</i> , 1997
"Marcadores anônimos de DNA"	Xq28	SIRIANNI <i>et al.</i> , 1998
Subunidade 16S do rRNA do DNA mitocondrial	nucleotídeo 2835	TANG <i>et al.</i> , 1997
Subunidade 16S do rRNA do DNA mitocondrial	nucleotídeos 2650-3000	TANG <i>et al.</i> , 1997
	nucleotídeo 10463	TANG <i>et al.</i> , 1997 e CARDAIOLI <i>et al.</i> , 1999
MECP2	Xq28	AMIR <i>et al.</i> , 1999 e WAN <i>et al.</i> , 1999

1.3.2. Estudo de Ligação

Para a melhor compreensão da aplicação dessa metodologia, introduzir-se-á alguns conceitos que serão utilizados (OTT, 1991, LATHROP, 1984).

a) marcadores microssatélites: são seqüências conhecidas repetidas de DNA, altamente polimórficas na população geral, formadas por repetições de dois ou três nucleotídeos (por exemplo GCGCGC...). No estudo de ligação, esses marcadores são utilizados para que se possa fazer uma correlação entre a região do marcador que está sendo utilizado na análise e a possível localização do gene responsável pela doença. Em geral, os marcadores foram selecionados levando-se em consideração: o PIC ("polymorphism information content"), preferencialmente com valor superior a 75%; e o intervalo entre dois marcadores não superior a 10 centiMorgans. O PIC é um indicador resultante da análise desse polimorfismo feita na população geral. Quanto maior sua heterozigotidade na população geral, maior a chance de obtermos informação significativa, tanto de ligação como de exclusão, na amostra analisada. Pequenos intervalos entre marcadores microssatélites permitem uma chance maior de se obter resultados significativos em grandes regiões cromossômicas.

b) Distância física e genética: Em genética molecular trabalha-se com dois tipos de distâncias: a física, medida em pares de base, e a genética medida em centiMorgans. No início do século passado, Morgan observou que a possibilidade de recombinação entre dois genes no mesmo cromossomo era diretamente proporcional à distância física entre eles. Então a distância genética é calculada por meio da relação entre recombinantes e não recombinantes entre dois *loci*. Por exemplo, se em 100 meioses analisadas, encontram-se cinco recombinações diz-se que a distância entre os dois *loci* é de cinco centiMorgans (cM). A relação entre a distância física e a genética é relativa, variando conforme a região cromossômica analisada, tendo em vista que, nas regiões teloméricas, a possibilidade de recombinação é maior em relação às regiões centroméricas. Em geral, um cM equivale a um milhão de bases aminadas.

c) **Análise dos resultados:** Para calcular a probabilidade de dois genes estarem ligados, utiliza-se um cálculo em escala logarítmica, o “lod score”, o qual leva em consideração a probabilidade de ligação e a probabilidade de não ligação entre dois *loci* avaliados. Por exemplo, se essa relação for de 100:1, o “lod score” será +2,00. Por outro lado, se a relação for de 1:100, o “lod score” será -2,00. Os “lod scores” podem ser somados para famílias. Consideram-se como resultados significativos (quando o padrão de herança é ligado ao cromossomo X): “lod score” $\geq + 2,00$ confirmando ligação (OTT, 1991) e “lod score” $< - 2,00$ excluindo ligação. Valores entre - 2,00 e + 2,00 não são significativos, ou seja, são inconclusivos.

1.3.3. O gene *MECP2*

MECP2 é um gene de 76 000 Kb (quilobases) formado por 4 exons. Codifica 486 aminoácidos e tem dois domínios principais: o de inibição da metilação (MBD: “metil binding domain”) e o de inibição da transcrição (TRD: “transcription repression domain”).

A primeira descrição do gene *MECP2* foi feita em 1992, quando LEWIS *et al.* identificaram e clonaram o *MECP2* em camundongos. O produto do gene estaria concentrado na heterocromatina pericentromérica e, tal como o *MECP1*, estaria apto a ligar um simples par de metil CpG.

A confirmação da ligação entre a metilação das ilhas CpG e o gene *MECP2* iniciou-se em 1993, quando NAN, MEEHAN, BIRD clonaram o gene em ratos e identificaram o domínio de ligação metil CpG (MBD). Em 1994, QUADERI *et al.* localizaram o gene em camundongos. Ele estaria ligado ao cromossomo X, aproximadamente 40 quilobases (kb) entre os genes *LICAM* e *RSVP*. Esta região é homóloga a região Xq28 em humanos. Em 1995 ADLER *et al.* estudaram a expressão do gene *MECP2* no cromossomo X inativo, usando um sistema de translocação entre cromossomo X e autossomo, concluindo que este gene, em camundongos, estaria sujeito à inativação. NAN *et al.* em 1996 demonstraram que, *in vivo*, a proteína *MECP2* parecia ser a maior mediadora da reação em cascata na metilação do DNA.

Também em 1996, TATE, SKARNES & BIRD, usando camundongos machos com o gene *MECP2* mutado, notaram que a linhagem celular mutada se multiplicava e diferenciava como a linhagem normal, mas influía no desenvolvimento embrionário prejudicando-o. Concluíram que o papel deste gene era dispensável nas células do tronco embrionário, mas fundamental no desenvolvimento embrionário.

D'ESPÓSITO *et al.*, em 1996, na expectativa que o gene *MECP2* estivesse localizado entre os genes *LICAM* e *RCP/GCP* (*loci* da visão a cores), hibridizaram, com sondas de *MECP2* de ratos, um filtro contendo todos os YACs entre estes dois pontos. Três YACs foram hibridizados para o *MECP2*, o qual estaria localizado, aproximadamente, 70kb mais centromérico que o “cluster” para visão colorida *RCP/GCP*. Ainda em 1996, Vilain *et al.* confirmaram a localização do gene *MECP2* na região Xq28.

Entre os anos de 1997 e 1998, Nan *et al.* identificaram o domínio de repressão da transcrição (TRD) do gene *MECP2*. Esse interagiria com histona desacetilase (componente essencial para repressão). Com isso, sugeriram que dois mecanismos globais da regulação gênica (o da metilação do DNA e da deacetilação das histonas) estariam ligados ao *MECP2*.

JONES *et al.*, em 1998, descobriram que o mecanismo de silenciamento conferido pelo *MECP2* e o DNA metilado pode ser causado pela inibição da histona desacetilase, facilitando o remodelamento da cromatina e ativação da transcrição. Estes resultados estabeleceram uma relação causal direta entre o silenciamento da transcrição dependente da metilação do DNA e a modificação da cromatina.

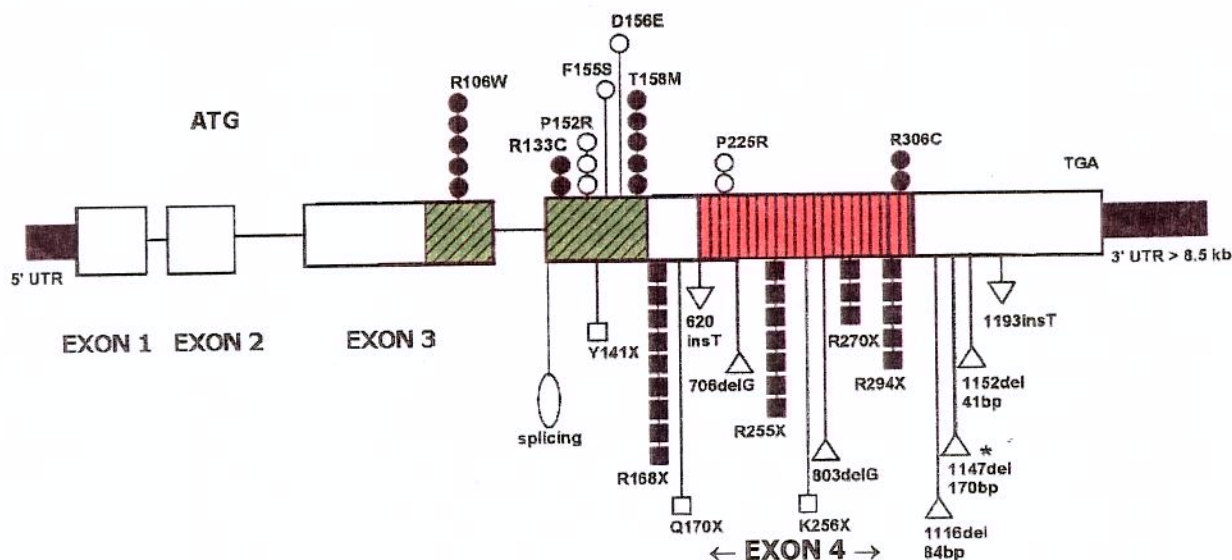


Figura 1: Representação esquemática do gene *MECP2*, mostrando a localização das principais mutações relatadas na síndrome de Rett. Em verde, o domínio da metilação (MBD: “metil binding domain”), em vermelho o domínio de repressão da transcrição (TRD: “transcriptional repression domain”). Observa-se que a grande maioria das mutações estão localizadas no exon 4. As principais mutações descritas são de sentido trocado e com mudança na matriz de leitura. Inserções e deleções também são descritas.

Em outubro de 1999, foram descritas as primeiras mutações no gene *MECP2* na RS por AMIR *et al.* Utilizando método de triagem, foram detectadas mutações como causa de alguns casos de RS clássica. Em cinco dos 21 pacientes esporádicos foram encontradas três mutações “de novo” “missense” na região codificadora e altamente conservada de MBD, como também duas mutações “de novo” uma “frameshift” e outra “nonsense” ambas prejudicando TRD. Em duas meio-irmãs pelo lado materno, AMIR *et al.* encontraram segregação de uma mutação “missense” não detectada em sua mãe. Este achado poderia sugerir a presença de mosaicismo germinativo na mãe destas meio-irmãs. Segundo os autores, este estudo relatou a primeira doença de regulação epigenética anormal como mecanismo básico de sua patogênese.

Também em 1999, WILLARD & HENDRICH relacionaram as características clínicas na presença de mutação no *MECP2* em pacientes com RS clássica, com as características descritas em camundongos por TATE *et al.* em 1996 (vide acima), indicando que estes animais poderiam ser considerados modelos animais para síndrome de Rett. As pacientes do sexo feminino com RS representariam um mosaico de expressão e deficiência do gene *MECP2*, em razão da inativação randômica do cromossomo X. Também relatam que RS é uma das patologias que envolvem alterações estruturais e remodelamento da cromatina com conseqüentes efeitos epigenéticos na expressão de um ou mais genes que não estariam mutados.

Desde então vários foram os trabalhos publicados (WAN *et al.*, 1999; CHEADLE *et al.*, 2000; AMIR *et al.*, 2000; HUPPKE *et al.*, 2000; BIENVENU *et al.* 2000; entre outros) correlacionando as mutações encontradas. Em resumo, presença de mutações no gene foram detectadas em 33 a 80% dos casos esporádicos de RS clássica e em menos de 30% dos casos familiares. Até então, os estudos só analisaram a região codificadora do gene. Isso poderia explicar a falta de identificação de mutações em alguns pacientes.

Quadro 4: Resumo das principais mutações detectadas em pacientes com RS. DRAGICH, HOUWINK-MANVILLE, SCHANEN (2000).

Nucleotídeo trocado	Aminoácido trocado	Dominio	Frequência	Referências
258-259delCA	fs	M	0.42	HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
291CA	D97E	M	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
301CA	P101T	M	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
302CA	P101H	M	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
302CT	P101L	M	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
316CT	R106W	M	7.50	AMIR <i>et al.</i> (1999); XIANG <i>et al.</i> (2000); WAN <i>et al.</i> (1999); AMIR <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
317GA	R106Q	M	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
378-2ag splice site	fs	M	0.83	AMIR <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
397CT	R133C	M	3.75	AMIR <i>et al.</i> (1999); XIANG <i>et al.</i> (2000); WAN <i>et al.</i> (1999); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000)

398GA	R133H	M	0.42	mas
401CG	S134C	M	0.83	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
407del507+ins	fs	M	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
GCTTTTAG				
411delG	L138X	M	0.42	WAN <i>et al.</i> (1999)
NPb	Y141X	M	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
455CG	P152R	M	3.33	AMIR <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000);msa
463TA	F155I	M	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
464TC	F155S	M	0.42	AMIR <i>et al.</i> (1999)
NPb	D156E	M	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
473CT	T158M	M	10.42	XIANG <i>et al.</i> (2000); AMIR <i>et al.</i> (2000); BIENVENU <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000); mas; msc
502CT	R168X	I	15.42	XIANG <i>et al.</i> (2000); AMIR <i>et al.</i> (2000); BIENVENU <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000); mas; msc
NPb	Q170X	I	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
592AT	R198X	I	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
611CT	S204X	I	0.42	msa
620insT	fs	I	0.42	AMIR <i>et al.</i> (1999)
654delGAAG	fs	T	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
674CG	P225R	T	1.25	AMIR <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
677insA	fs	T	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
706delG	fs	T	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
710insT	fs	T	0.42	msa
730CT	Q244X	T	0.42	msa
747insC	fs	T	0.42	msa
763CT	R225X	T	10.42	XIANG <i>et al.</i> (2000); WAN <i>et al.</i> (1999); AMIR <i>et al.</i> (2000); BIENVENU <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000); mas; msc
NPb	K256X	T	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
803delG	fs	T	2.08	WAN <i>et al.</i> (1999); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); msc
808CT	R270X	T	7.92	AMIR <i>et al.</i> (2000); BIENVENU <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000); mas
855del4	fs	T	0.42	msa
880CT	R294X	T	5.42	AMIR <i>et al.</i> (2000); BIENVENU <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000); mas

904CG	P302A	T	0.42	HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
905CG	P302R	T	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
905CT	P302L	T	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
914AG	K305R	T	0.42	msa
916CT	R306C	T	5.00	XIANG <i>et al.</i> (2000); WAN <i>et al.</i> (1999) ; AMIR <i>et al.</i> (2000); BIENVENU <i>et al.</i> (2000); CHEADLE <i>et al.</i> (2000); HUPPKE <i>et al.</i> (2000) mas; msc
917GA	R306H	T	0.83	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
965CT	P322L	C	0.83	HUPPKE <i>et al.</i> (2000); msa
965CG	P322A	C	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
1098del70	fs	C	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
1011del191	fs	C	0.42	msa
1038del82	fs	C	0.42	msa
1053ins10	fs	C	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
1096del101	fs	C	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
1116del84	fs	C	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
1120del69	fs	C	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
1141del55	fs	C	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
1147del170ins3	fs	C	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
1154del32	fs	C	0.42	msa
1156del17	fs	C	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
1156del44	fs	C	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
1157del41	fs	C	0.42	CHEADLE <i>et al.</i> (2000)
1157del43	fs	C	0.42	HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
1158del110	fs	C	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
1159del43	fs	C	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
1160del26	fs	C	0.83	msa
1163del26	fs	C	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
1163del34	fs	C	0.42	HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
1163del43	fs	C	0.42	msa
1165del26	fs	C	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
1182del7	fs	C	0.42	XIANG <i>et al.</i> (2000)
1193insT	fs	C	0.42	AMIR <i>et al.</i> (2000)
1194insT	fs	C	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)
1364–1365insC	fs	C	0.42	HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
1451del4	fs	C	0.42	HUPPKE <i>et al.</i> (2000)
1461AC	X487C	Terminus	0.42	BIENVENU <i>et al.</i> (2000)

Legenda:

Abreviatura dos domínios: **M**, MBD; **I**, região intermediária; **T**, TRD; **C**, região C-terminal.

msa K. Hoffbuhr *et al.*, manuscrito em preparação.

NP^b Troca de nucleotídeo não descrita.

msc I. Houwink-Manville *et al.*, manuscrito em preparação.

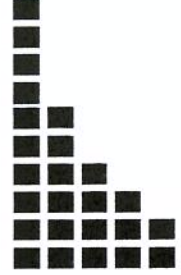
fs: mutação *frameshift*.



2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Investigar a presença de ligação genética entre marcadores de DNA localizados no cromossomo X, incluindo a região Xq28, onde está localizado o gene *MECP2*.

Esse trabalho teve início em 1999 e, como até aquele momento várias evidências apontavam para genes localizados na região Xq28, embora nenhuma mutação tivesse sido descrita, optou-se por investigar tal região candidata, em pacientes com quadro clínico clássico de RS. A principal evidência da ligação do gene responsável pela RS e a região Xq28 foi descrita por SIRIANNI *et al.*, em 1998. Eles relataram um estudo de ligação, realizado em uma família brasileira em que três meninas, de uma irmandade de nove, tinham hipótese diagnóstica de RS. Os resultados apontaram a região Xq28 como candidata a conter o gene para RS.



3. METODOLOGIA

3.1. PACIENTES E ESTRATÉGIAS PARA O CUMPRIMENTO DAS ETAPAS DO PROJETO

A identificação das famílias de pacientes com hipótese diagnóstica de RS foi realizada por meio da aplicação dos critérios diagnósticos (Quadro 1, Anexo 1: formulário clínico). Esta foi possível por meio da colaboração de várias instituições nacionais, que atendem esses pacientes a saber: os Drs. Sérgio Antonio Antoniuk e Isac Bruck da Universidade Federal do Paraná (UFPR), a Profa. D^{ma}. Laura Jardim da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e as Prof^{as}. Dr^{as}. Antonia Paula Marques de Faria e Denise Yvone Janovitz Norato do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Com o objetivo de obter informações a respeito da história familiar foi realizada a revisão de todos os prontuários e, posteriormente, por meio da anamnese completa e detalhada com construção dos heredogramas. Os critérios diagnósticos foram aplicados as pacientes para a confirmação diagnóstica. Nessa etapa os responsáveis foram devidamente informados e convidados a participar do estudo por meio da doação de uma amostra de sangue. Também foi solicitada a assinatura do formulário de consentimento livre e esclarecido (veja Anexo II).

Resumo dos critérios clínicos utilizados (DMS-IV e Grupo de síndrome de Rett)

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE RETT (DMS-IV)

A. Todos os seguintes:

- (1) DNPM aparentemente normal nos períodos pré e perinatal; S ☐ N ☐ ? ☐
- (2) Desenvolvimento aparentemente normal nos primeiros cinco meses de vida;
S ☐ N ☐ ? ☐
- (3) Perímetro cefálico normal ao nascimento; S ☐ N ☐ ? ☐

B. Todos os seguintes, com início após desenvolvimento normal:

- (1) Desaceleração da velocidade de crescimento do perímetro cefálico entre cinco e 48 meses;
S ☐ N ☐ ? ☐
- (2) Perda do uso propositado das habilidades manuais entre cinco e 30 meses, com subsequente desenvolvimento de movimentos estereotipados das mãos;
S ☐ N ☐ ? ☐
- (3) Perda precoce do relacionamento social no curso do distúrbio,
(apesar da interação social poder se desenvolver mais tarde); S ☐ N ☐ ? ☐
- (4) Aparecimento de coordenação pobre de movimentos de tronco e marcha;
S ☐ N ☐ ? ☐
- (5) Comprometimento grave no desenvolvimento da linguagem expressiva e receptiva com grave retardamento psicomotor . S ☐ N ☐ ? ☐

Fonte: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - **Manual de diagnóstico e estatística de distúrbios mentais**, 4ª edição, Washington 1994.

Legenda: S = sim, N = não, ? = duvidoso.

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO GRUPO DE TRABALHO DA SÍNDROME RETT

1) Critérios necessários:

- a) Período pré e perinatal aparentemente normal; S ☐ N ☐ ? ☐
- b) DNPM aparentemente normal até cinco ou seis meses de idade; S ☐ N ☐ ? ☐
- c) Perímetro cefálico normal ao nascimento; S ☐ N ☐ ? ☐
- c) Desaceleração na velocidade de crescimento do perímetro cefálico
(dos três meses aos três anos de idade); S ☐ N ☐ ? ☐
- e) Perdas das habilidades adquiridas:
- e1) Habilidades manuais propositadas; S ☐ N ☐ ? ☐
(Se sim idade de início e/ou término)
- e2) Balbucio e palavras faladas; S ☐ N ☐ ? ☐
(Se sim idade de início e/ou término)
- e3) Habilidades de comunicação; S ☐ N ☐ ? ☐
(Se sim idade de início e/ou término)
- f) Deficiência mental óbvia; S ☐ N ☐
(Se sim idade de início e/ou término)
- g) Movimentos estereotipados de mãos intensos e sucessivos;
- g1) Torcer e apertar; S ☐ N ☐
- g2) “Lavar as mãos”, e fricção; S ☐ N ☐
- g3) Levar as mãos à boca e protrusão lingual; S ☐ N ☐
- h) Anormalidades na marcha em pacientes que deambulam;
- h1) Apraxia / dispraxia na marcha S ☐ N ☐
- h2) Ataxia de tronco / dispraxia corporal; S ☐ N ☐
- h3) outros:

2) Critérios de suporte:

a) Disfunção do ritmo respiratório:

a1) Apnéia periódica durante a vigília; S ☐ N ☐

a2) Hiperventilação intermitente; S ☐ N ☐

a3) Crises de perda de fôlego; S ☐ N ☐

a4) Expulsão de ar ou saliva; S ☐ N ☐

b) Aerofagia; S ☐ N ☐

c) Anormalidades eletroencefalográficas:

c1) Ritmo de base anormal com ondas lentas constantes ou intermitentes (3-5Hz);

S ☐ N ☐

c2) Descargas epileptiformes com ou sem convulsões; S ☐ N ☐

d) Epilepsia com várias formas de crises; S ☐ N ☐

e) Sinais de espasticidade, fraqueza muscular tardia, e/ou distonia; S ☐ N ☐

f) Distúrbios vasomotores periféricos; S ☐ N ☐

g) Escoliose de origem neurológica; S ☐ N ☐

h) Hipotrofia discreta e pés frios; S ☐ N ☐

i) Atraso no crescimento. S ☐ N ☐

3) Critérios de exclusão: Nenhum estava presente nas pacientes.

a) Organomegalias ou sinais sugestivos de doença de depósito;

b) Retinopatia ou atrofia óptica;

c) Microcefalia ao nascimento;

d) Existência de doença metabólica ou hereditária degenerativa identificada;

e) Doença neurológica adquirida resultante de quadro infeccioso grave ou traumatismo crânio encefálico;

f) Evidência de atraso de crescimento intrauterino;

g) Evidência de dano cerebral perinatal adquirido;

Atualizado do original Viena (Hagberg *et al.*, 1985) e dos Critérios Diagnósticos do Grupo de trabalho da Síndrome Rett (Trevathan & Moser, 1988)

Conclusão: ☐ forma típica de Síndrome de Rett ☐ forma possível de síndrome de Rett

☐ forma atípica de Síndrome de Rett ☐ outros: _____

3.2. ANÁLISE MOLECULAR

3.2.1. Extração do DNA genômico das amostras colhidas

Utilizaram-se protocolos manuais de extração de DNA com fenol e clorofórmio (MANIATIS T., FRITSCH & SAMBROOK, 1989). Vinte a 30 ml de sangue venoso foram colhidos do propósito e dos familiares imediatos (ambos os pais e irmãos). As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde estão localizados os leucócitos, foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1X (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet®. A solução foi então centrifugada à 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS para sangue, 500µl de RSB 1X e 60µl de proteinase K (100 mg/ ml) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação foram acrescentados 3 ml de fenol, misturado por dez minutos, seguido de centrifugação à 2500 rpm por outros dez minutos e descarte da parte orgânica da solução (sobrenadante). Esse processo foi repetido com 1,5ml de fenol e 1,5ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado com 6ml de etanol absoluto. Esse método propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700 µg a partir de 20 ml de sangue venoso).

3.2.2. Seleção dos marcadores de DNA no cromossomo X

Esses marcadores foram selecionados utilizando mapas genéticos detalhados de microssatélites localizados no cromossomo X (GENETHON®, 1998). Os marcadores foram selecionados levando-se em consideração: o PIC (“polymorphism information content”), sendo selecionados apenas os com valor superior a 75% (exceção feita para o marcador DXS 1227); e com intervalo não superior a 10 centiMorgans entre dois marcadores (o que não foi possível entre os marcadores DXS 8043 e DXS 1227).

Quadro 5: Marcadores microsatélites utilizados nesse projeto, detalhando o número de alelos descritos na população mundial, a heterozigotidade, os “primers”, o tamanho médio dos fragmentos e a distância em relação ao telômero Xp.

Nome	Número	Nº de alelos	Heterozigotidade	Primer 1 (CA)	Primer 2 (GT)	(a)	(b)
AFM 196 xa1	DXS 1192	9	82	gtt gcc aac tgc tgg aac g	tgt ggt gca ggg aag cc	121 a 137	155,76
AFM 317 ye9	DXS 1227	6	73	aga ggt ccg agt ctt cca c	ata agg gtt tac tcc ccc aa	174 a 186	164,69
AFM b 018 wd9	DXS 8043	11	80	agt tct cag aaa cat tfg gtt agg c	aat tat tgg caa aga gta cag gca g	167 a 189	176,67
AFM 345 wg9	DXS 8091	9	78	cac att cag gtt cca cag g	caa gat cca ggc aaa agt c	89 a 111	186,36
AFM a 065wd9	DXS 8103	8	79	cgt tgc tfg gga tgg a	agc cct ggg gta cac a	234 a 248	192,5
AFM 276 xh9	DXS 1073	13	80	ggc tga ctc cag agg c	ccg agt tat tac aaa gaa gca c	217 a 243	196,44

(a) Tamanho do produto de PCR (em pares de base)

(b) Distância em centiMorgans no sentido Xp22.3 a Xq28

3.2.3. Polimerase (PCR) para os marcadores e genotipagem

Os “primers” específicos para a amplificação da região repetitiva de cada microssatélite foram sintetizados e as condições ideais de PCR foram estabelecidas para cada par. O volume total do PCR foi de 12,5 µl com 40-80 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada “primer” (“sense” e “antisense”), 1,25 mM MgCl₂, 200 µM de dCTP, dTTP e dGTP; 25 µM de dATP; 1,5µCi [P³³]dATP; 0.5 unidades de *Taq* DNA polimerase e 2µl de tampão 10X . A eletroforese foi feita em um gel desnaturante de poliacrilamida a 6%. Em cada canaleta aplicamos o produto da reação em cadeia da polimerase previamente misturado a 8 µl de “stock solution” (tampão de formamida, azul de bromofenol e xilenocianol) e desnaturado a 95°C por dois minutos. A eletroforese é feita a 1500 volts, 45 miliamperes e 60 watts. O tempo de corrida depende do tamanho do fragmento. Posteriormente o gel foi transferido para um papel de grande porosidade, seco na secadora a uma temperatura de 80 °C por uma hora e exposto em um filme radiográfico na câmara escura. O tempo de exposição depende da relação entre a meia-vida o isótopo e o tempo em que ele já está em uso (em média 72 horas).

O gel, de poliacrilamida a 6%, é composto por:

- ☞ Uréia – 25,2 gramas
- ☞ Água – 28,5 ml
- ☞ TBE 20X – 03 ml
- ☞ Poliacrilamida 40% - 09 ml
- ☞ Persulfato de amônio a 25% - 110 microlitros
- ☞ TEMED – 40 microlitros

Após a revelação do filme radiográfico, teremos a seguinte apresentação:

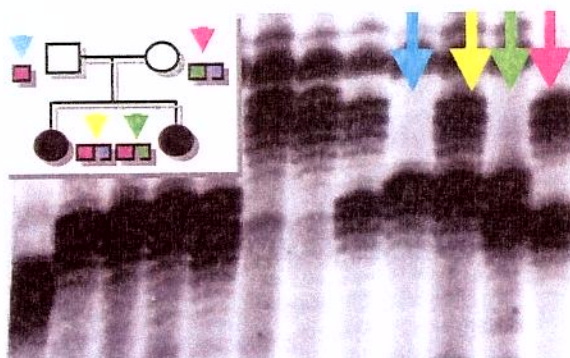


Figura 2: Representação de um filme radiográfico após a revelação

O produto de PCR migra do polo negativo para o positivo. Sob ação da fonte de energia, fragmentos menores migram mais rápido. Pelo fato do gel ser desnaturante as fitas de DNA mantêm-se separadas. Indivíduos do sexo masculino (hemizigotos) assim como as homozigotas do sexo feminino apresentam apenas uma banda pelo fato de estarmos analisando marcadores do cromossomo X. Alelos diferentes são designados por indicadores diferentes para diferenciá-los.

3.3. ESTRATÉGIA PARA INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

3.3.1. Caracterização das pacientes

Utilizando os critérios clínicos para RS já descritos e o DMS IV, incluímos nesse projeto apenas meninas com quadro clínico clássico de RS.

3.3.2. Métodos de cálculo do “lod score” pelo programa LINKAGE

Análise dos dados por métodos paramétricos de análise de ligação.

Iniciamos o programa LINKAGE inserindo os dados da genealogia (arquivo de extensão pre – figura 3). Depois esse arquivo é transformado para linguagem de computador (arquivo de extensão ped – figura 4). A seguir são colocados os dados da doença como freqüência do gene (1:12500), padrão de herança (dominante ligado ao X), penetrância (0% em homozigotas ou hemizigotos normais; 100% em homozigotas ou hemizigotos mutantes e 99,5% em heterozigotas, tendo em vista o risco empírico de recorrência de 0,05%, calculado em relação aos casos familiares cadastrados); e a freqüência encontrada de cada um dos alelos para cada marcador (arquivo de extensão dat). Por fim correlacionam-se os dados da doença com as genealogias (arquivos de extensão ped e dat) para se obter o resultado final. Esse programa foi utilizado para análise de dois pontos.

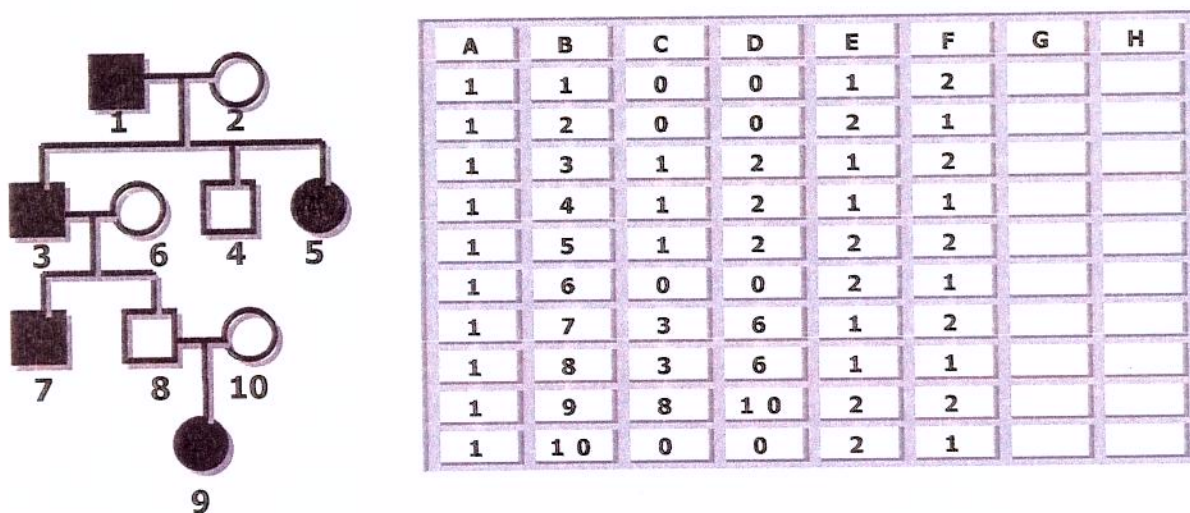


Figura 3: Representação esquemática de um arquivo com extensão pré. Na coluna A indicamos a família, na B o número do indivíduo (para diferenciá-los), na C o número do pai, na D o número da mãe, na E o sexo (1 para masculino e dois para feminino), na F a condição de afetado (2) ou não (1), e nas seguintes a identificação dos alelos. O zero indica não avaliado ou indicação não relevante para a análise.

Quadro 6. Representação esquemática de um arquivo com extensão ped após interpretação das informações colocadas da família anterior, na linguagem de computador.

1	1	0	0	3	0	0	1	1	2	0	1	0	1	1	Ped:1	Per: 1
1	2	0	0	3	0	0	2	0	1	1	1	0	1	1	Ped:1	Per: 2
1	3	1	2	7	4	4	1	0	2	1	1	0	0	1	Ped:1	Per: 3
1	4	1	2	0	5	5	1	0	1	0	1	0	1	1	Ped:1	Per: 4
1	5	1	2	0	0	0	2	0	2	1	1	0	0	1	Ped:1	Per: 5
1	6	0	0	7	0	0	2	0	1	1	0	1	1	1	Ped:1	Per: 6
1	7	3	6	0	8	8	1	0	2	1	0	1	0	1	Ped:1	Per: 7
1	8	3	6	9	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	Ped:1	Per: 8
1	9	8	10	0	0	0	2	0	2	1	0	0	1	1	Ped:1	Per: 9
1	10	0	0	9	0	0	2	0	1	1	1	0	1	1	Ped:1	Per: 10

3.3.3. Análise dos haplótipos

A análise é feita por meio da comparação entre os alelos herdados pelos pais e comparação com os dos irmãos.

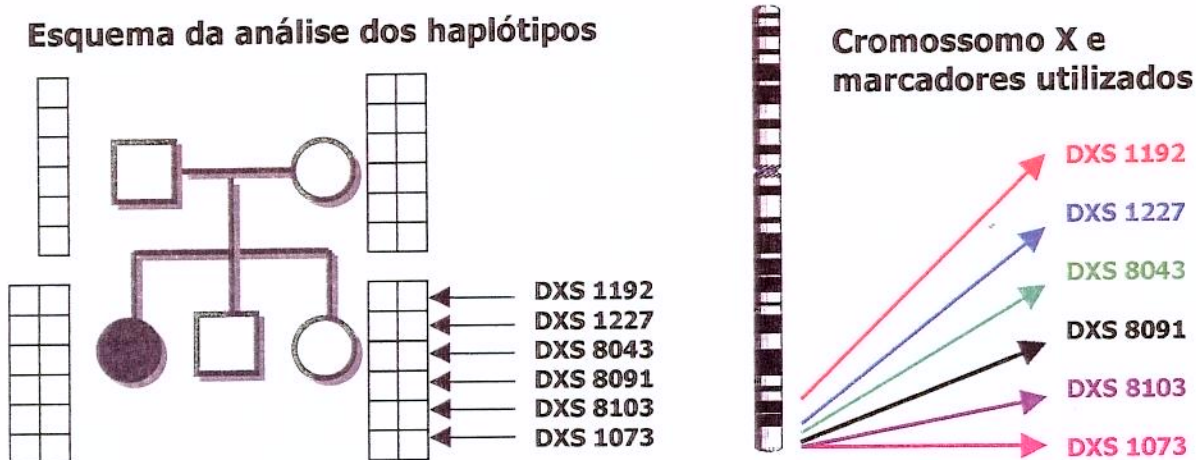


Figura 4: Representação esquemática do esquema de análise dos haplótipos ao lado dos heredogramas, localização do marcadores utilizados. Quadrados dos haplótipos em branco indicam que não foi realizada a análise por falta de amostra de DNA.

Tabela 1: Descrição dos marcadores utilizados para análise comparativa em relação à localização no cromossomo X (acima do lado direito).

marcador	heteroziguidade	nº de alelos descritos / encontrados nesse trabalho	região cromossômica	distância em cM do telômero Xp
DXS 1192	82%	09/06	Xq25	155,76
DXS 1227	73%	06/05	Xq26	164,69
DXS 8043	80%	11/06	Xq27	176,67
DXS 8091	78%	09/07	Xq27	186,36
DXS 8103	79%	08/07	Xq28	192,5
DXS 1073	80%	13/09	Xq28	196,44
Telômero Xq dista 1,62 cM do marcador DXS 1073				



4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

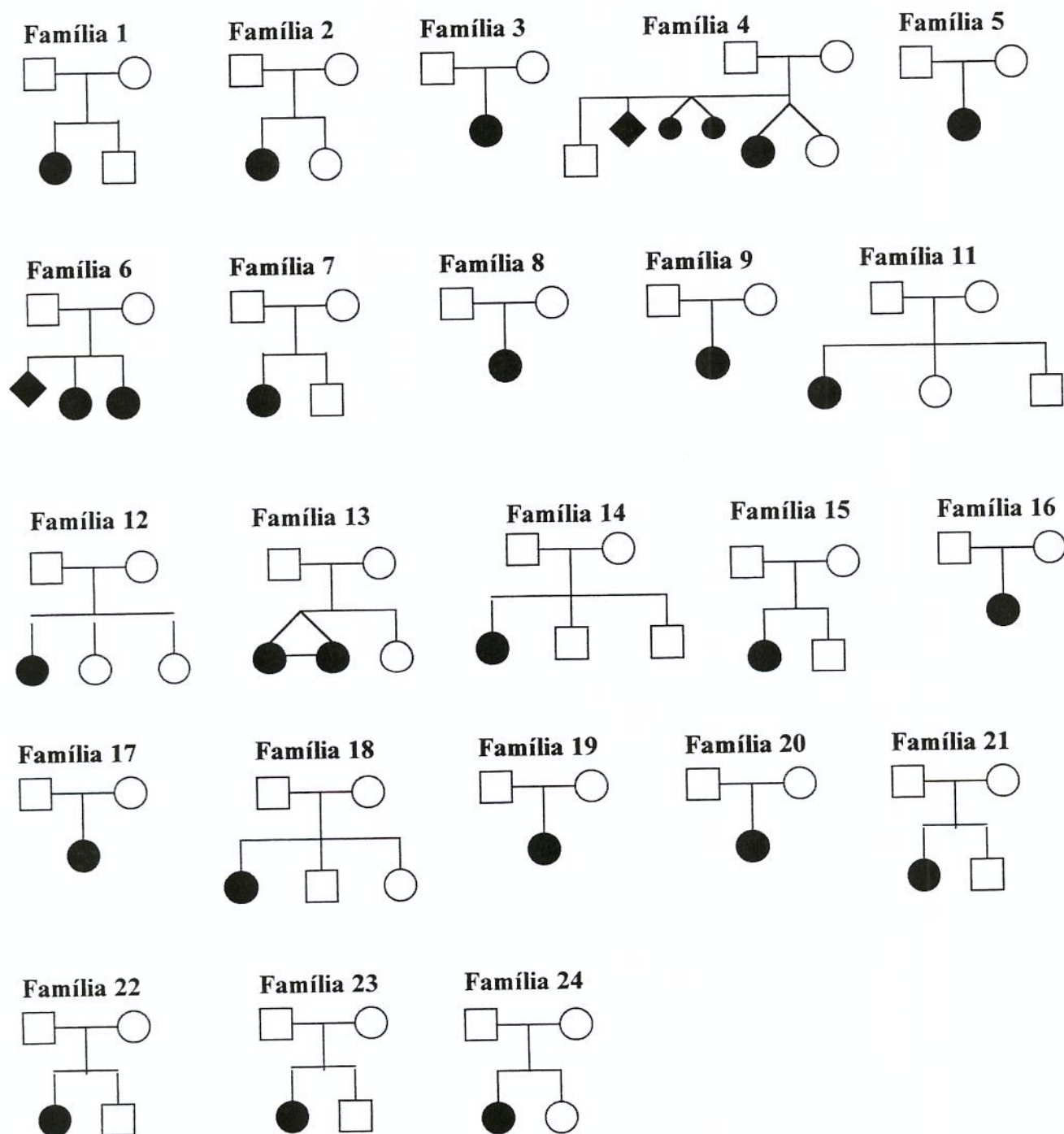


Figura 5: Heredograma das famílias analisadas

Resumo das pacientes

Família 1: F.B.S. Nascimento em 24/11/1990 (11 anos de idade). Estágio III. Diminuição da velocidade do DNPM aos 7 meses, regressão ao redor de sete meses de idade. Avaliação feita em maio de 1999.

Família 2: A.L. Nascimento em 01/09/1973 (28 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até 1 ano de idade. Avaliação feita em maio de 1999.

Família 3: L.L.P. Nascimento em 09/12/1990 (11 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até nove meses de idade. Avaliação feita em maio de 1999.

Família 4: M.L.D.A. Nascimento em 11/06/1990 (11 anos e meio de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano de idade. Avaliação feita em maio de 1999. A mãe teve três abortos espontâneos. O primeiro com dois meses de gestação e o segundo com 24 semanas de gestação (vide heredograma).

Família 5: G.B.M. Nascimento em 02/10/1989 (12 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano e dois meses de idade. Avaliação feita em maio de 1999.

Família 6A: T.B.A. Nascimento em 17/12/1992 (9 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até quatro meses de idade. Avaliação feita em maio de 1999.

Família 6B: N.B.A. Nascimento em 23/01/1996 (4 anos e 11 meses de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até cinco meses de idade. Avaliação feita em maio de 1999.

Família 7: M.D.S. Nascimento em 17/02/1995 (5 anos e 10 meses de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano de idade. Avaliação feita em agosto de 1999.

Família 8: B.C.R.L. Nascimento em 13/11/1996 (5 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até oito meses de idade. Avaliação feita em outubro de 1999.

Família 9: M.C.I. Nascimento em 04/04/1980 (21 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano e meio de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 11: A.C. Nascimento em 15/05/1984 (17 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano e meio de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 12: T.R.B. Nascimento em 28/06/1983 (18 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 13: F.A.M. Gêmeas monozigóticas nascidas em 13/04/1985 (16 anos de idade). Estágio IV. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano e três meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 13: G.A.M. Gêmeas monozigóticas nascidas em 13/04/1985 (16 anos de idade). Estágio IV. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até três meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 14: W.Y.L.S. Nascimento em 27/12/1989 (12 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até oito meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 15: R.G. Nascimento em 07/02/1987 (14 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano e meio de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 16: D.S. Nascimento em 16/09/1987 (14 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até dois anos de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 17: L.F.P. Nascimento em 14/10/1983 (18 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano e meio de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 18: L.A.F. Nascimento em 18/09/1973 (28 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até um ano de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 19: A.W. Nascimento em 25/09/1985 (16 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até nove meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 20: S.S.B.R. Nascimento em 18/07/1985 (16 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até nove meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 21: K.P.M. Nascimento em 12/10/1992 (09 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até quatro meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 22: R.A. Nascimento em 31/05/1976 (25 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até sete meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 23: L.M. Nascimento em 11/09/1985 (16 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até sete meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Família 24: A.P.M. Nascimento em 11/12/1988 (13 anos de idade). Estágio III. Desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente normal até oito meses de idade. Avaliação feita em janeiro de 1999.

Tabela 2: Resultados do DMS-IV

Critérios Diagnósticos para Síndrome de Rett (DMS-IV)								
Paciente/critério	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4	B5
1	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	?	?	N	S	S	S
3	S	S	?	S	N	S	S	S
4	S	S	S	?	N	S	S	S
5	S	N	S	N	S	S	S	S
6A	S	N	S	S	S	S	S	S
6B	S	N	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	?	S	S	S	S
9	S	S	S	?	S	S	S	S
11	S	S	?	?	S	S	S	S
12	S	S	S	N	S	S	S	S
13a	S	S	S	?	S	S	S	S
13b	S	S	S	?	S	S	S	S
14	S	S	S	?	S	S	S	S
15	S	S	S	N	S	S	S	S
16	S	S	?	?	S	S	S	S
17	S	S	?	?	S	S	S	S
18	S	S	N	N	S	S	S	S
19	S	S	S	?	S	S	S	S
20	S	S	S	?	S	S	S	S
21	S	N	?	?	S	S	S	S
22	S	S	?	?	S	S	S	S
23	S	S	S	S	S	S	S	S
24	S	S	S	N	S	S	S	S

Tabela 3: Resultados dos Critérios Necessários do Grupo de Trabalho da Síndrome De Rett.

Critérios Diagnósticos do Grupo de Trabalho da Síndrome De Rett													
Paciente/ critério	Critérios Necessários												
	1a	1b	1c	1d	1e1	1e2	1e3	1f	1g1	1g2	1g3	1h1	1h2
1	S	S	S	S	S	N	N	S	S	N	S	S	S
2	S	S	?	?	S	S	S	S	S	N	N	S	S
3	S	S	?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	?	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	N	S	N	S	S	S	S	S	S	N	N	N
6A	S	N	S	S	S	N	N	S	S	N	S	N	N
6B	S	N	S	S	S	N	S	S	S	N	S	N	N
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	N	S	S
8	S	S	S	?	S	S	S	S	S	N	S	N	N
9	S	S	S	?	S	S	S	S	S	S	?	S	?
11	S	S	?	?	S	S	S	S	S	N	N	S	S
12	S	S	S	N	S	N	S	S	S	S	N	S	S
13a	S	S	S	?	S	N	S	S	S	S	N	N	S
13b	S	S	S	?	S	N	S	S	S	S	N	N	S
14	S	S	S	?	S	S	S	S	S	N	S	S	S
15	S	S	S	N	S	S	S	S	N	S	S	S	S
16	S	S	?	?	S	S	S	S	N	S	S	N	N
17	S	S	?	?	S	S	S	S	N	S	S	N	S
18	S	S	N	N	S	S	S	S	N	N	N	S	S
19	S	S	S	?	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	?	S	S	S	S	S	N	S	N	N
21	S	N	?	?	S	N	S	S	S	S	N	N	N
22	S	S	?	?	S	N	S	S	S	S	S	S	S
23	S	S	S	S	S	N	S	S	N	S	S	N	N
24	S	S	S	N	S	S	S	S	N	S	N	S	S

Tabela 4: Resultados dos Critérios de Suporte do Grupo de Trabalho da Síndrome De Rett.

Critérios Diagnósticos do Grupo de Trabalho da Síndrome De Rett													
Paciente/ critério	Critérios de Suporte												
	2a1	2a2	2a3	2a4	2b	2c1	2c2	2d	2e	2f	2g	2h	2i
1	N	N	N	S	N	S	S	N	N	N	N	S	S
2	N	N	N	N	N	N	S	S	N	S	S	N	S
3	N	S	N	S	N	S	S	S	N	N	S	N	S
4	S	S	S	S	N	S	S	S	N	S	N	S	S
5	S	S	S	S	S	N	S	N	N	S	S	S	S
6A	S	N	N	S	S	N	S	N	S	N	S	S	S
6B	N	S	N	S	S	N	N	S	N	N	N	N	S
7	N	N	N	S	N	S	S	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S
9	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	N	N	S	N	S	S	N	S	S	S	S
12	S	S	N	N	S	S	S	S	N	S	S	S	S
13a	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13b	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	N	N	N	N	N	S	S	N	N	S	S	S	S
15	S	N	N	N	N	S	S	S	N	S	N	S	S
16	N	S	N	N	N	S	S	S	N	S	S	S	N
17	S	S	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S
18	N	N	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S
19	N	N	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	N	S	N	?	S	S	N	N	S	N	S
21	S	N	N	N	N	?	S	S	N	S	N	S	S
22	N	N	N	N	N	S	S	N	N	S	N	S	S
23	N	S	S	S	N	S	S	S	N	S	N	S	S
24	N	N	N	S	N	S	S	S	N	N	S	N	S

4.2. RESULTADOS LINKAGE

“Lod scores” de dois pontos para os marcadores analisados.

Obtiveram-se “lod scores” negativos significativos para todos os seis marcadores analisados. No entanto, os resultados só foram significativos quando se somaram todas as famílias em conjunto. Nenhuma família, isoladamente, foi suficiente para gerar um resultado conclusivo.

DXS 1073: Apenas as famílias 4, 6, 14, 18 e 23 contribuíram para o resultado final. Para esse marcador excluiu-se uma região de 6 cM (vide tabela 9).

DXS 8103: Apenas as famílias 4, 7, 22 e 23 contribuíram no resultado final. Para esse marcador excluiu-se uma região de 1 cM (vide tabela 10).

DXS 8091: Apenas as famílias 7 e 11 (de forma positiva) e 6, 12, 22, 23 e 24 (de forma negativa) contribuíram no resultado final. Para esse marcador excluiu-se uma região de 2 cM (vide tabela 11).

DXS 8043: As famílias 1 e 7 (de forma positiva) e 2, 4, 11, 13, 14, 22, 23 e 24 (de forma negativa) contribuíram no resultado final. Para esse marcador excluiu-se uma região de 11 cM (vide tabela 12).

DXS 1227: As famílias 7, 13, 18, 21 e 23 (de forma positiva) e 2, 6, 11, 14 e 24 (de forma negativa) contribuíram no resultado final. Para esse marcador excluiu-se uma região de 2 cM (vide tabela 13).

DXS 1192: Apenas as famílias 1, 6, 13, 21 e 23 (de forma positiva) e 2, 4, 12, 14, 15, 18 e 24 (de forma negativa) contribuíram no resultado final. Para esse marcador excluiu-se uma região de 5 cM (vide tabela 14).

Tabela 5: Resultados referentes ao marcador DXS 1073. Cada família individual está representada pela letra F.

DXS 1073	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
TOTAL	- 2.45	- 1.4	- 0.84	- 0.51	- 0.30	- 0.17	- 0.9	- 0.3	0.0
F1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F2	0.24	0.20	0.16	0.12	0.09	0.06	0.03	0.02	0.00
F3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F4	-0.57	-0.38	-0.25	-0.17	-0.11	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00
F5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F6	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F7	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F14	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F15	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F18	-0.46	-0.32	-0.22	-0.15	-0.1	-0.06	-0.03	-0.01	-0.00
F19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F23	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabela 6: Resultados referentes ao marcador DXS 8103.

DXS 8103	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
TOTAL	- 1.05	- 0.61	- 0.38	- 0.24	- 0.14	- 0.08	- 0.04	- 0.02	0.00
F1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F4	-0.57	-0.38	-0.25	-0.17	-0.11	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00
F5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F7	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F22	-0.01	-0.01	-0.01	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00
F23	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabela 7: Resultados referentes ao marcador DXS 8091.

DXS 8091	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
TOTAL	- 1.28	- 0.65	- 0,33	- 0.16	0.03	0.08	0.01	0.03	0.00
F1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F6	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F7	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F11	0.52	0.45	0.38	0.30	0.23	0.16	0.1	0.05	0.01
F12	-0.47	-0.32	-0.22	-0.15	-0.1	-0.06	-0.03	-0.01	-0.00
F13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F22	-0.01	-0.01	-0.01	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00
F23	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F24	-0.13	-0.1	-0.07	-0.05	-0.04	-0.02	-0.01	-0.01	-0.00

Tabela 8: Resultados referentes ao marcador DXS 8043.

DXS 8043	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
TOTAL	- 3.65	-2.21	- 1.4	- 0.91	- 0.56	- 0.33	- 0.17	- 0.08	- 0.02
F1	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F2	-0.57	-0.38	-0.25	-0.17	-0.11	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00
F3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F4	-0.57	-0.38	-0.25	-0.17	-0.11	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00
F5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F7	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F11	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F13	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F14	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F22	-0.01	-0.01	-0.01	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00
F23	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F24	-0.13	-0.1	-0.07	-0.05	-0.04	-0.02	-0.01	-0.01	-0.00

Tabela 9: Resultados referentes ao marcador DXS 1227.

DXS 1227	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
TOTAL	-1.06	- 0.27	0.06	0.20	0.23	0.20	0.14	0.07	0.01
F1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F2	-0.57	-0.38	-0.25	-0.17	-0.11	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00
F3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F6	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F7	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F11	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F13	0.52	0.45	0.38	0.30	0.23	0.16	0.1	0.05	0.01
F14	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F18	0.52	0.45	0.38	0.30	0.23	0.16	0.1	0.05	0.01
F19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F21	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F23	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F24	-0.13	-0.1	-0.07	-0.05	-0.04	-0.02	-0.01	-0.01	-0.00

Tabela 10: Resultados referentes ao marcador DXS 1192.

DXS 1192	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
TOTAL	- 2.10	- 1.06	- 0.53	- 0.24	- 0.09	- 0.02	0.02	0.01	0.00
F1	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F2	-0.57	-0.38	-0.25	-0.17	-0.11	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00
F3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F4	-0.57	-0.38	-0.25	-0.17	-0.11	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00
F5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F6	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F12	-0.47	-0.32	-0.22	-0.15	-0.1	-0.06	-0.03	-0.01	-0.00
F13	0.52	0.45	0.38	0.30	0.23	0.16	0.1	0.05	0.01
F14	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F15	-0.72	-0.44	-0.29	-0.19	-0.12	-0.08	-0.04	-0.02	-0.00
F16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F18	-0.46	-0.32	-0.22	-0.15	-0.1	-0.06	-0.03	-0.01	-0.00
F19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F21	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F22	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F23	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02	0.00
F24	-0.13	-0.1	-0.07	-0.05	-0.04	-0.02	-0.01	-0.01	-0.00

Não houve exclusão de toda a região cromossômica analisada, pelo fato das regiões de exclusão dos marcadores não estarem sobrepostas, mas a região onde se encontra o gene *MECP2* foi excluída (vide figura 6).

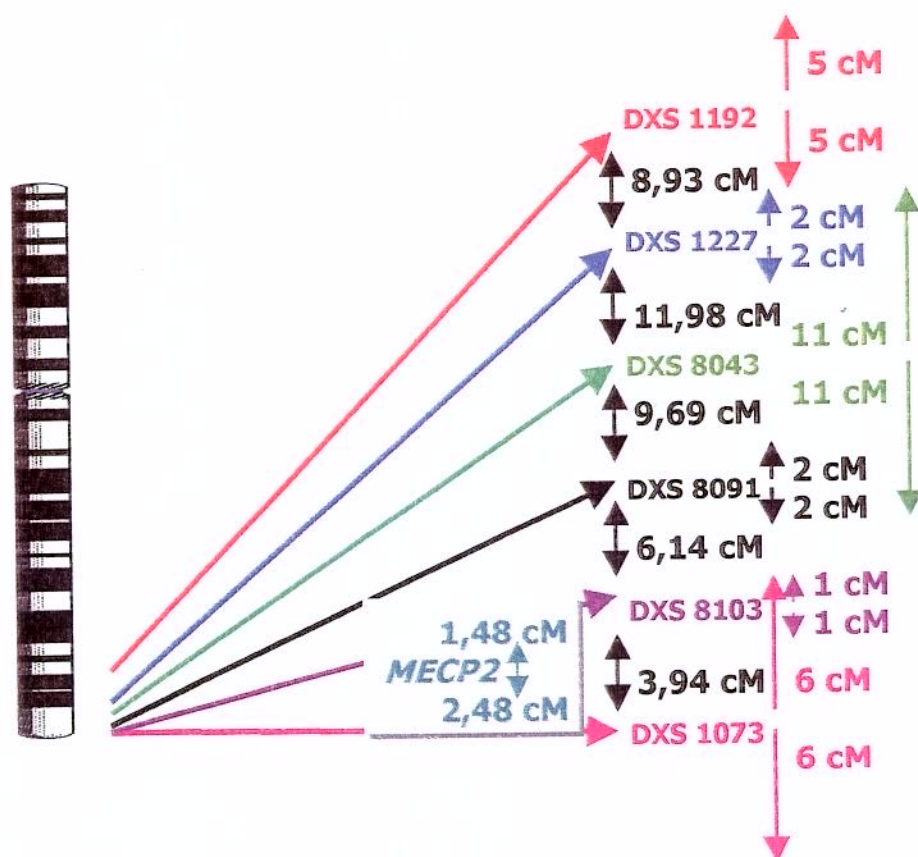


Figura 6: Representação esquemática dos resultados obtidos. Entre a descrição dos marcadores indica-se a distância entre eles (em preto). Na cor do marcador, as setas à direita indicam o tamanho da região de exclusão obtida. Em destaque, entre os marcadores DXS 1073 e DXS 8103, a localização do gene *MECP2*.

4.3. SEGREGAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS NAS FAMÍLIAS

A análise de haplótipos só pôde ser realizada em 15 famílias pois, em sete famílias, a irmandade era constituída por apenas uma criança com RS. A família 10 também não foi incluída pelo fato de estar disponível apenas a amostra da paciente. Identificaram-se dois casos familiares com RS: duas irmãs (família 6) e gêmeas monozigóticas concordantes para RS (família 13). No outro caso de gemelaridade, as gêmeas são dizigóticas e discordantes para RS (família 4). A seguir, a análise de segregação dos haplótipos para as famílias disponíveis. Essa análise pode ser observada na figura 7.

Família 1: pelo fato da mãe ser homozigota para os marcadores 1,2,3 e 5, só se pode dizer que os irmãos herdaram alelos distintos no marcador 4.

Família 2: a mãe é homozigota para os marcadores 2 e 3. As filhas herdaram alelos distintos no marcador 1 e iguais para os marcadores 4, 5 e 6, indicando ter recebido a mesma região cromossômica para os quatro marcadores mais centroméricos.

Família 4: a mãe é homozigota para os marcadores 3 e 5 e, mesmo as filhas sendo gêmeas dizigóticas discordantes, as meninas receberam a mesma porção cromossômica da mãe. Gostaria de enfatizar que não se pode descartar a possibilidade de uma mutação “de novo” na irmã com RS.

Família 6: a mãe é homozigota para os marcadores 2 e 4 e as irmãs aparentemente receberam regiões cromossômicas distintas da mãe até o marcador 6. Tendo em vista que as duas irmãs têm RS concluiu-se que, nesse caso, há uma forte evidência de que o gene responsável não está localizado nessa região (Xq26-qter).

Família 7: a mãe é homozigota para os marcadores 6 e os irmãos receberam alelos distintos.

Família 11: a mãe é homozigota para os marcadores 1, 2, 3 e 6. As irmãs têm a mesma região cromossômica nos alelos 4 e 5.

Família 12: a mãe é homozigota para os marcadores 1, 2, 4 e 5. No marcador 3 uma irmã recebeu o mesmo alelo e, no marcador 6, a outra irmã recebeu o mesmo alelo.

Família 13: a mãe é homozigota para os marcadores 1, 2 e 3 e as gêmeas têm alelos distintos da irmã em 4, 5 e 6.

Família 14: a mãe é homozigota para os marcadores 2 e 3. Um dos irmãos aparentemente recebeu a mesma região cromossômica e o outro difere nos marcadores 5 e 6.

Família 15: a mãe é homozigota para os marcadores 2, 3, 4 e 5. Os irmãos herdaram marcador 1 diferente e o 6 é igual.

Família 18: a mãe é homozigota para os marcadores 2, 3 e 4. Os marcadores 1 e 6 são iguais ao da irmã e o 5 é diferente.

Família 21: a mãe é homozigota para os marcadores 1, 2, 3 e 4. Os marcadores 5 e 6 são diferentes nos irmãos.

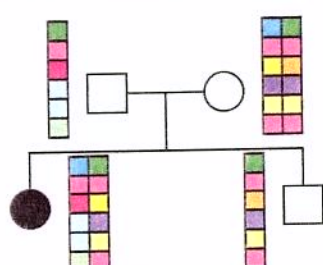
Família 22: a mãe é homozigota para os marcadores 1 e 5. Apenas o marcador 6 difere nos irmãos.

Família 23: Único caso em que a mãe é heterozigota em todos os marcadores utilizados. Apenas os marcadores 5 e 6 diferem nos irmãos indicando terem recebido a mesma região cromossômica que compreende os marcadores 1 a 4. Não se pode descartar a possibilidade de mutação “de novo”.

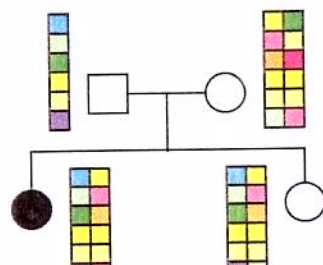
Família 24: a mãe é homozigota para os marcadores 1, 2 e 5. Os marcadores 3, 4 e 6 são os mesmos nas duas irmãs.

Legendas

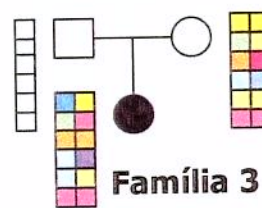
	DXS 1192	DXS 1227	DXS 8043	DXS 8091	DXS 8103	DXS 1073
alelo 1						
alelo 2						
alelo 3						
alelo 4						
alelo 5						
alelo 6						
alelo 7						
alelo 8						
alelo 9						



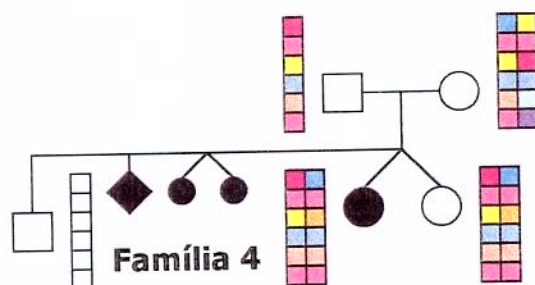
Família 1



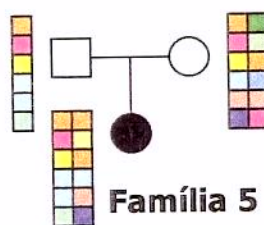
Família 2



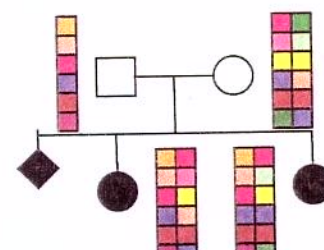
Família 3



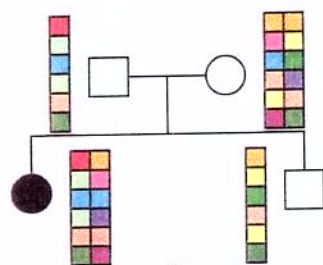
Família 4



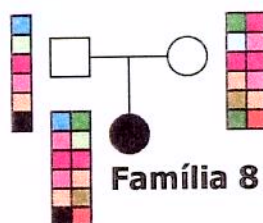
Família 5



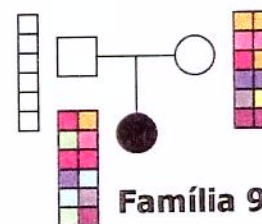
Família 6



Família 7



Família 8



Família 9

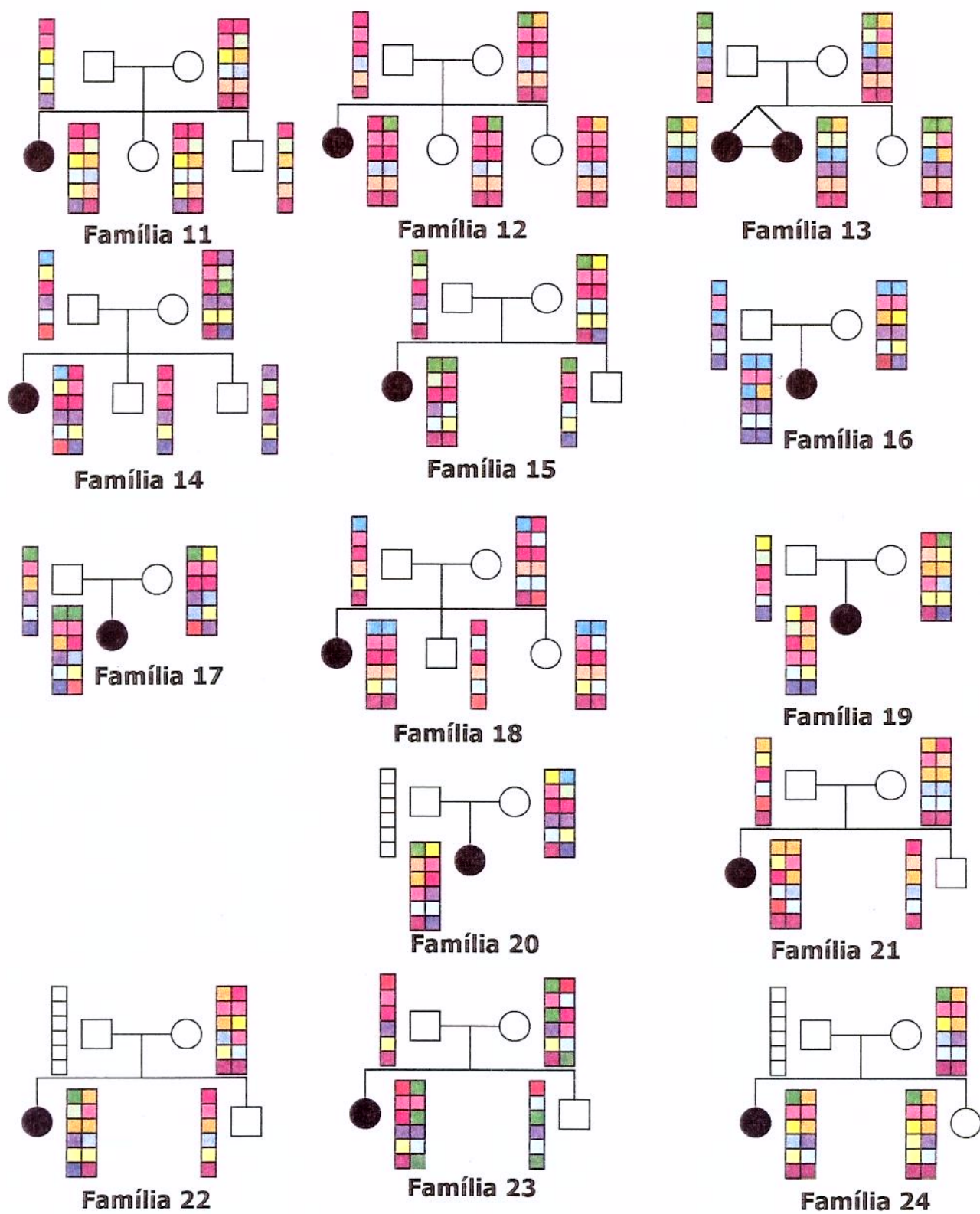
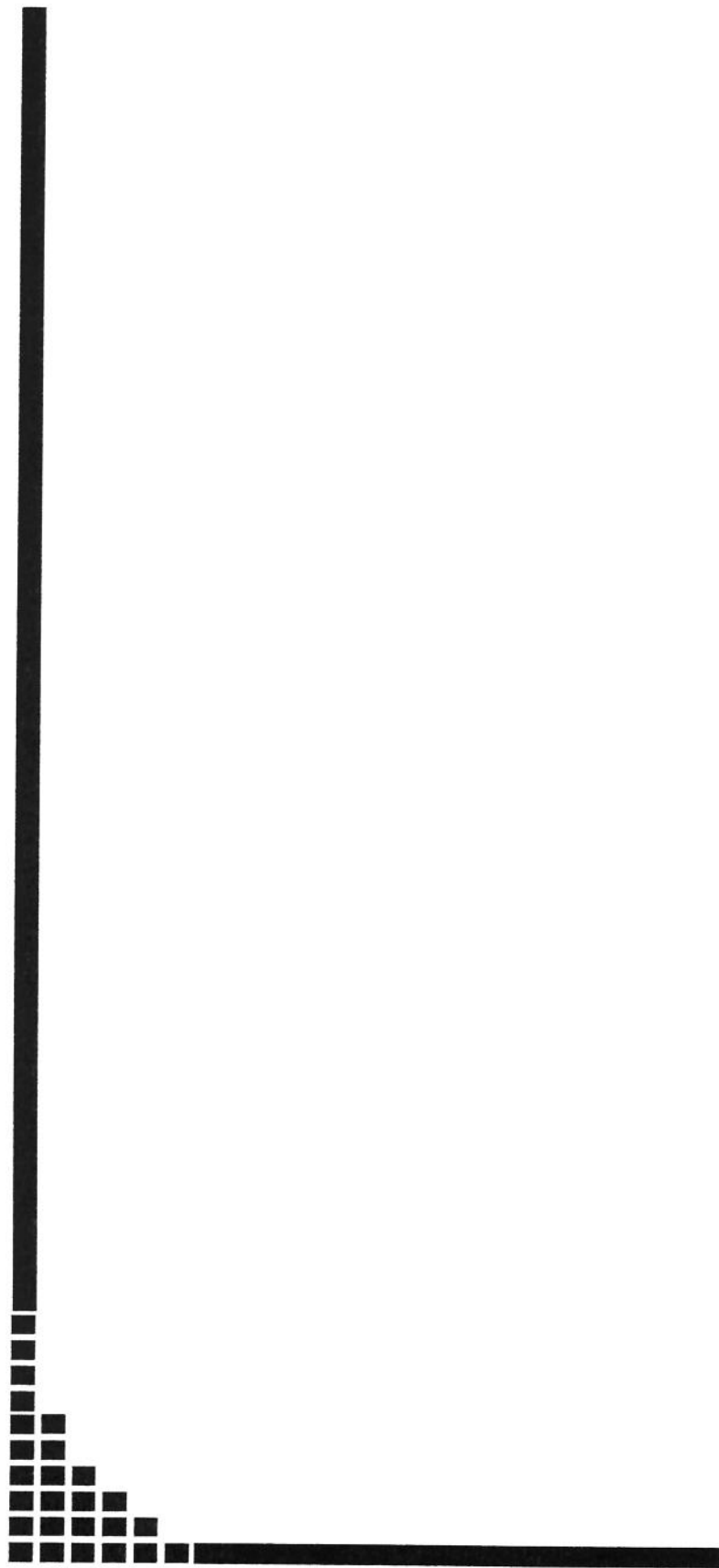


Figura 7: Representação esquemática da análise de segregação dos haplótipos.



5. DISCUSSÃO

Nesse projeto teve-se a oportunidade de avaliar 26 meninas portadoras da forma típica de RS utilizando dois critérios clínicos distintos: um mais abrangente, DMS IV (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994), utilizado em indivíduos com transtornos invasivos do desenvolvimento e outro mais específico para RS (HAGBERG *et al.*, 1985; TREVATHAN & MOSER, 1988). Tendo em vista o fato da RS ter uma evolução clínica bem particular, a utilização dos critérios clínicos específicos permitiu distinguir, clinicamente, as pacientes com quadro clínico clássico.

Para obtenção de resultados fidedignos, somente pacientes com quadro clínico clássico foram analisadas. Para isso há necessidade de ter a presença de, no mínimo: cinco critérios necessários, três de suporte e nenhum critério de exclusão deve estar presente (vide páginas 41 a 43).

Desde a descoberta do gene *MECP2*, poucos foram os estudos de ligação realizados, tendo em vista que a grande maioria dos pesquisadores acreditou que esse seria o gene responsável pela RS, muito embora ainda não tenham sido descobertas mutações em 100% dos casos. Tal fato poderia ser explicado, pois as mutações poderiam estar localizadas nas regiões não codificadoras do gene, as quais dificultariam a sua identificação.

No entanto, não se pode descartar a hipótese da RS apresentar heterogeneidade de *locus* ou mesmo ter uma herança mais complexa: poligênica ou multifatorial. O gene *MECP2* poderia ser apenas um gene modificador pelo fato de agir tanto na repressão da transcrição como também na ativação e inativação de outros genes.

VILLARD *et al.* (2001), tentando desvendar a ausência de mutações no gene *MECP2*, em grande parte dos casos familiares, relataram um estudo feito em cinco casos familiares de RS. Em apenas uma família encontrou mutações no gene *MECP2*. Nos outros quatro, observaram que todas as mães e em seis de oito filhas portadoras de RS havia inativação preferencial do cromossomo X e que o cromossomo ativo era de origem paterna. O estudo de ligação, utilizando 32 marcadores polimórficos, sugeriu um possível *locus* responsável por essa inativação preferencial localizado no braço curto do cromossomo X entre os marcadores DXS 1068 e DXS 1024. O “lod score” final foi de + 1,5. Os próprios

autores disseram que não é um valor significativo, mas propuseram que casos familiares de RS podem ser transmitidos por duas diferentes formas: ou pela inativação preferencial do cromossomo X na mãe, ou pela ação de outro *locus* ligado ao cromossomo X que escaparia à inativação. Os autores concluíram o estudo sugerindo duas hipóteses:

- a) Podem ter ocorrido falhas na análise do *MECP2*, tendo em vista que, até então, apenas a linhagem hematopoiética foi analisada, encobrendo um fenômeno desconhecido que possa afetar esse gene, e/ou
- b) Poder haver heterogeneidade genética em síndrome de Rett.

No estudo de ligação obteve-se resultados negativos significativos para todos os marcadores utilizados, quando se somaram os resultados obtidos de todas as famílias. Analisando as famílias de forma isolada, não se teve nenhum resultado significativo. A análise dessa metodologia sugere a ausência de ligação na região Xqter (compreendendo a localização do gene *MECP2*).

Na segregação dos haplótipos da família 6, nitidamente observa-se que as duas irmãs herdaram cromossomos X distintos da mãe, muito embora as duas sejam portadoras de RS. Mesmo sem a realização da pesquisa de mutações no gene *MECP2* dessa família, esse resultado corrobora os achados da literatura que descrevem poucos casos familiares com mutações no gene *MECP2*. As demais famílias não forneceram resultados conclusivos.

Mutações de ponto, nos casos isolados, não podem ser descartadas, embora haja fortes evidências de heterogeneidade genética.

Outros estudos nessa amostra, como a análise das mutações do gene *MECP2* e a pesquisa da sua expressão, associados a estudos de inativação do cromossomo X, auxiliariam na elucidação do papel do gene *MECP2* na etiologia da RS, complementando esse trabalho.



6. CONCLUSÃO

Por meio de estudo de ligação, com a utilização de marcadores microssatélites e a análise da segregação dos haplótipos, excluíram-se grandes regiões do cromossomo X como candidatas a serem portadoras do gene responsável pela RS, em pacientes com quadro clínico típico. Além disso, em pelo menos uma família, a análise dos haplótipos excluiu uma região mais ampla (Xq26-qter).

Esses resultados, em conjunto com a revisão da literatura, permitem concluir que haja heterogeneidade genética na RS.



7. SUMMARY

Rett syndrome (RS) is a pervasive development disorder first described by Andreas Rett in 1966. It is characterized by normal development during the first 6 to 18 months of age followed by developmental regression. Thereafter development successively stagnates, plateaus and regresses. The estimated prevalence is 1 in 10 000 to 22 000 females.

Before october 1999, the diagnosis was based only on clinical criteria, since there were no bioquimic, citogenetic or molecular marker for RS. Different models of inheritance had been proposed for RS including uniparental disomy, skewed X inactivation, mutations in the mitochondrial DNA, and triplet repeat expansions. Recently, mutations in the *MECP2* gene on chromosome Xq28 have been found in 33 to 80% of patients with classical RS and in patients with other phenotypes.

The aim of the present study was to performed linkage analysis in 86 samples from 23 families including 25 girls with classical RS using six microsatellites markers on X chromosome. Linkage studies were performed by genotyping marker using PCR and two point lod score calculation using the program MLINK of the LINKAGE package. Lod score added for all 23 families.

We have excluded a region of 12 cM around marker DXS 1073 (where the *MECP2* gene is located), 2 cM around marker DXS 8103, 4 cM around marker DXS 8091, 22 cM around marker DXS 8043, 4 cM around marker DXS 1227 and 10 cM around marker DXS 1192.

No isolated families gave significant lod score. However haplotype analysis of family 6 composed by two sisters with classical RS clearly show inherited of different haplotypes for five marker genotyped (Xq26 and Xqter).

In conclusion our results strengthens the evidence for genetic heterogeneity in RS, thus adding information which is likely to help the search for an alternative locus for RS.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER DA, QUADERI NA, BROWN SDM, CHAPMAN VM, MOORE J, TATE P, DISTECHE CM.
- The X-linked methylated DNA binding protein, Mecp2, is subject to X inactivation in the mouse. *Mammalian Genome*; 6:491-492, 1995.
- AMIR R.E., VAN DEN VEYVER, I.B., SCHULTZ, R, SCHULTZ R, MALICKI DM, TRAN CQ, DAHLE EJ, PHILIPPI A, TIMAR L, PERCY AK, MOTIL KJ, LICHTARGE O, SMITH EO, GLAZE DG, ZOGHBI HY. - Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol*; 47:670–679, 2000.
- 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. *Nature Genet*; 23:185–188, 1999.
- ANVRET M, ZHANG ZP, HAGBERG B. - Rett syndrome: the bcl-2 gene – a mediator of neurotrophic mechanisms? *Neuropediatrics*; 25:323-324, 1994.
- BIENVENU, T., CARRIE, A., DE ROUX, N, VINET MC, JONVEAUX P, COUVERT P, VILLARD L, ARZIMANOGLU A, BELDJORD C, FONTES M, TARDIEU M, CHELLY J. - *MECP2* mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*; 9:1377–1384, 2000.
- BOLTSHAUSER E, KUNZ C.- Prevalence of Rett syndrome in Switzerland. *Helv Paediatr Acta* 42:407-411, 1987.
- BURD L, MARTSOLF J T, RANDAL T. - A prevalence study of Rett syndrome in a institutional population. *Am J Med Genet*, 36:33-36, 1990.
- CARDAIOLI E, DOTTI MT, HAYEK G, ZAPPELLA M, FEDERICO A.- Studies on mitochondrial pathogenesis of Rett syndrome: ultrastructural data from skin and muscle biopsies and mutational analysis at mtDNA nucleotides 10463 and 2835. *J Submicrosc Cytol Pathol*; 31(2):301-304, 1999.
- CHEADLE J P, GILL H, FLEMING N, MAYNARD J, KERR A, LEONARD H, KRAWCZAK M, COOPER DN, LYNCH S, THOMAS N, HUGHES H, HULTEN M, RAVINE D, SAMPSON JR, CLARKE A. - Long-read sequence analysis of the *MECP2* gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet*; 9:1119–1129, 2000.

- CLARKE A, GARDNER-MEDWIN D, RICHARDSON J, MCGANN A, BONHAM JR, CARPENTER KH, BHATTACHARYA S, HAGGERTY D, FLEETWOOD JA, AYNLEYGREEN A. - Abnormalities of carbohydrate metabolism and of OTC gene function in the Rett syndrome. *Brain & development*; 12:119-124, 1990.
- DRAGICH J, HOUWINK-MANVILLE I & SCHANEN C. - Rett syndrome: a surprising result of mutation in *MECP2*. *Hum Mol Genet*; 9(16):2365-2375, 2000.
- ELISSON K A, FILL C P, TERWILLINGER J., DE GENNARO LJ, MARTIN-GALLARDO A, ANVRET M, PERCY AK, OTT J, ZOGHBY H. - Examination of X chromosome markers in Rett syndrome: exclusion mapping with a novel variation on multilocus linkage analysis. *Am J Hum Genet*; 50:278-287, 1992.
- D'ESPOSITO M, QUADERI NA, CICCODICOLA A, BRUNI P, ESPOSITO T, D'URSO M, BROWN SDM. - Isolation, physical mapping, and Northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, *MECP2*. *Mammalian Genome*; 7: 533-535, 1996.
- DE GENNARO LJ, MCCAFFERY CA, KIRCHGESSNER CU, YANG-FENG TL, FRANCKE U.- Molecular analysis of synapsin I, a candidate gene for Rett syndrome. *Brain Development* 9:469-474, 1987.
- HAGBERG B - *Genetic considerations and clues from molecular genetics*, in Anvret M, Wahlstrom J, Hans-Olof Akesson (eds): Rett syndrome - clinical and biological aspects, n° 127. Cambridge, England, Cambridge Mackeith Press, 1993, p 103.
- HAGBERG B. - Rett syndrome: clinical peculiarities and biological mysteries. *Acta Paediatrica*; 84:971-976, 1995.
- HAGBERG B - Rett syndrome: clinical peculiarities, diagnostic approach and possible cause. *Pediatric Neurology*; 5:75-83, 1989.
- HAGBERG B - Rett syndrome: Swedish approach to analysis of prevalence and cause. *Brain & Development*; 7:277-280, 1985.
- HAGBERG B., GOUTIÈRES F., HANEFELD F., RETT A., WILSON J. - Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain and Development*; 7:372-373, 1985.

- HAGBERG B & WITT-ENGERSTRÖM I - Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet*; 24(Suppl. 1):47-59, 1986.
- HUPPKE P, LACCONE F, KRAMER N, ENGEL W, HANEFELD F. - Rett syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Hum. Mol. Genet*; 9:1369-1375, 2000.
- JONES PL, VEENSTRA GJC, WADE PA, VERMAAK D, KASS SU, LANDSBERGER N, STROUBOULIS J, WOLFFE AP. - Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet*; 19:187-191, 1998.
- KOZINETZ CA, SKENDER M L, MACNAUGHTON M, SCHULTZ RJ, RN, MSN, CPNP, PERCY AK, GLAZE DG. - Epidemiology of Rett syndrome: a population based registry. *Pediatrics*; 91:445-450, 1993.
- LATHROP GM, LALOUEL JM, JULLIER C, *et al* . Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 81: 3443-3445, 1984.
- LEWIS JD, MEEHAN RR, HENZEL WJ, MAURER-FOGY I, JEPPESEN P, KLEIN F, BIRD A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*; 69: 905-914, 1992.
- MANIATIS T, FRITSCH EF, AND SAMBROOK J - *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, 2nd. Edition, 1989
- NAN X, CAMPOY FJ, BIRD A. - MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*; 88:471-481, 1997.
- NAN X, MEEHAN RR, BIRD A. - Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res*; 21:4886-4892, 1993.
- NAN X, NG, HH, JOHNSON CA, LAHERTY CD, TURNER BM, EISENMAN RN, BIRD A. - Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*; 393:386-389, 1998.

- NAN X, TATE P, LI E, BIRD A. - DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Molec Cell Biol*; **16**:414-421, 1996.
- NARAYANAN V, OLINSKY S, DAHLE E, NAIDU S, ZOGHBI HY. Mutation analysis of the M6b gene in patients with Rett syndrome. *Am J Med Genetics* **78**:165-168, 1998.
- OTT J (ed) - *Analysis of human genetic linkage*, rev ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1991, pp 55-81.
- PERCY AK, SCHANEN C, DURE LS. - The genetic basis of Rett syndrome: candidate gene considerations. *Mol Genet Metab.*; May; **64**(1):1-6, 1998.
- QUADERI NA, MEEHAN RR, TATE PH, CROSS SH, BIRD AP, CHATTERJEE A, HERMAN GE, BROWN SDM. - Genetic and physical mapping of a gene encoding a methyl CpG binding protein, Mecp2, to the mouse X chromosome. *Genomics*; **22**:648-651, 1994.
- RETT A. - *Über ein zerebral-atrophisches Syndrom bei Hyperammonämie*. Vienna, Brüder Hollinek, 1966.
- SCHANEN NC, DAHLE EJR, CAPOZZOLI F, HOLM VA, ZOGHBI HY, FRANCKE U. - A new Rett syndrome family consistent with X-linked inheritance expands the X chromosome exclusion map. *Am J Hum Genetics*; **61**:634-641, 1997.
- SIRIANNI N, NAIDU S, PEREIRA J, PILLOTTO RF, HOFFMAN EP. - Rett syndrome: Confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *Am J Hum Genetics*; **63**(5):1552-1558, 1998.
- TANG J, QI Y, BAO XIN-HUA, WU XI-RU. - Mutational Analysis of Mithochondrial DNA of Children With Rett Syndrome. *Pediatr Neurol*; **17**:327-330, 1997.
- TATE, P.; SKARNES, W.; BIRD, A. - The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nature Genet*; **12**:205, 1996.
- THOMAS S, OBERHOLZER V, WILSON J, HJELM M. - The urea cycle in the Rett syndrome. *Brain Dev*; **12**:93-96, 1990.

- THOMAS S, HJELM M, OBERHOLZER V, BRETT EM, WILSON J. - Rett's syndrome and ornithine carbamoyltransferase deficiency. *Lancet*; **2**:1330-1331, 1987.
- TREVATHAN E, MOSER H W, OPITZ JM, PERCY AK, NAIDU S, HOLM VA, BORING CC, JANSSEN RS, YEARGIN-ALLSOPP M, ADAMS MJ. Diagnostic criteria for Rett syndrome. *Annals of Neurology*; **23**:425-428, 1988.
- VILLARD L, LEVY N, XIANG F, KPEBE A, LABELLE V, CHEVILLARD C, ZHANG Z, SCHWARTZ CE, TARDIEU M, CHELLY J, ANVRET M, FONTÈS M. - Segregation of a totally skewed pattern of X chromosome inactivation in four familial cases of Rett syndrome without MECP2 mutation: implications for the disease. *J Med Genet*; **38**(7):435-42, 2001.
- WAN M, LEE SS, ZHANG X, HOUWINK-MANVILLE I, SONG HR, AMIR RE, BUDDEN S, NAIDU S, PEREIRA JL, LO IF, ZOGHBI HY, SCHANEN NC, FRANCKE U. - Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet*; **65**:1520-1529, 1999.
- WILLARD HF & HENDRICH BD. - Breaking the silence in Rett syndrome. *Nat Genet*; **23**(2):127-8, 1999.
- WITT-ENGERSTRÖM I - Rett syndrome in Sweden. Neurodevelopment - Disability - Pathophysiology. *Acta Paediatrica Scandinavica; Suppl 369*:1-60, 1990.
- XIANG F, BUERVENICH S, NICOLAO P, BAILEY ME, ZHANG Z, ANVRET M. - Mutation screening in Rett syndrome patients. *J Med Genet*; **37**:250-255, 2000.



9. ANEXOS

**FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM
HIPÓTESE DIAGNÓSTICA DE SÍNDROME DE RETT**

Código: _____

Data: ____/____/____

1. Nome: _____

2. Data de nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____

3. Data da coleta das amostras: ____/____/____ Data do FAX (se for o caso): ____/____/____

4. Instituição: _____

5. Registro na instituição: _____

6. Filiação: nome do pai: _____

origem dos ascendentes (étnica e geográfica) : _____

nome da mãe: _____

origem dos ascendentes (étnica e geográfica) : _____

7. Anamnese:• **HPMA:** I.G.: _____ Peso de nascimento: _____ (g) Estatura: _____ (cm)

Perímetro cefálico (ao nascimento): _____ (cm) outros: _____

Desenvolvimento Neuropsicomotor (DNPM)

idade	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>
sorriso															
firmou cabeça															
sentou (apoio)															
sentou sozinho															
palavras															
andou sozinho															
frases															

- Heredograma:

- Exame Físico Geral: idade: _____; peso: _____ (Kg); estatura: _____ (cm);
perímetro cefálico: _____ (cm); comprimento de: mãos _____
(cm), dedos médios _____ (cm), pés: _____ (cm); outros:

Achados Neurológicos:	Sim	Não	Idade de Aparecimento
Crises epilépticas:	☐	☐	_____

Alterações Cognitivas:	☐	☐	_____
------------------------	--------------------------	--------------------------	-------

Incoordenação:

Membros superiores	☐	☐	_____
Membros inferiores	☐	☐	_____
Marcha	☐	☐	_____
Movimentos involuntários	☐	☐	_____

Reflexos tendinosos: _____

MMSS: normais ☐ aumentados ☐ diminuídos ☐ ausentes ☐

MMII: normais ☐ aumentados ☐ diminuídos ☐ ausentes ☐

Força muscular: _____

Tônus: _____

• **Exames Subsidiários:**

Sim	Não	Idade de aparecimento
-----	-----	-----------------------

Avaliação oftalmológica:	☐	☐	_____
--------------------------	--------------------------	--------------------------	-------

Diminuição da acuidade auditiva:	☐	☐	_____
----------------------------------	--------------------------	--------------------------	-------

CT:

MRI:

ENMG:

EEG :

Biópsia muscular:

Autopsia:

Outros:

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE RETT (DMS-IV)
--

A. Todos os seguintes:

(1) DNPM aparentemente normal nos períodos pré e perinatal; S ☐ N ☐ ? ☐

(2) Desenvolvimento aparentemente normal nos primeiros cinco meses de vida;

S ☐ N ☐ ? ☐

(3) Perímetro cefálico normal ao nascimento; S ☐ N ☐ ? ☐

B.Todos os seguintes, com início após desenvolvimento normal:

(1) Desaceleração da velocidade de crescimento do perímetro cefálico entre cinco e 48 meses; S ☐ N ☐ ? ☐

(2) Perda do uso propositado das habilidades manuais entre cinco e 30 meses, com subsequente desenvolvimento de movimentos estereotipados das mãos;

S ☐ N ☐ ? ☐

(3) Perda precoce do relacionamento social no curso do distúrbio,

(apesar da interação social poder se desenvolver mais tarde); S ☐ N ☐ ? ☐

(4) Aparecimento de coordenação pobre de movimentos de tronco e marcha;

S ☐ N ☐ ? ☐

(5) Comprometimento grave no desenvolvimento da linguagem expressiva e receptiva com grave retardamento psicomotor .

S ☐ N ☐ ? ☐

Fonte: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - **Manual de diagnóstico e estatística de distúrbios mentais** , 4ª edição, Washington 1994.

e2) Balbucio e palavras faladas; S ☐ N ☐ ? ☐

(Se sim idade de início e/ou término ____)

e3) Habilidades de comunicação; S ☐ N ☐ ? ☐

(Se sim idade de início e/ou término ____)

f) Deficiência mental óbvia; S ☐ N ☐

(Se sim idade de início e/ou término ____)

g) Movimentos estereotipados de mãos intensos e sucessivos;

g1) Torcer e apertar; S ☐ N ☐

g2) “Lavar as mãos”, e fricção; S ☐ N ☐

g3) Levar as mãos à boca e protrusão lingual; S ☐ N ☐

h) Anormalidades na marcha em pacientes que deambulam; S ☐ N ☐

h1) Apraxia / dispraxia na marcha S ☐ N ☐

h2) Ataxia de tronco / dispraxia corporal; S ☐ N ☐

h3) outros:

Critérios de suporte:

a) Disfunção do ritmo respiratório:

a1) Apnéia periódica durante a vigília; S ☐ N ☐

a2) Hiperventilação intermitente; S ☐ N ☐

a3) Crises de perda de fôlego; S ☐ N ☐

a4) Expulsão de ar ou saliva; S ☐ N ☐

b) Aerofagia; S ☐ N ☐

c) Anormalidades eletroencefalográficas:

c1) Ritmo de base anormal com ondas lentas constantes ou intermitentes (3-5Hz);

S ☐ N ☐

c2) Descargas epileptiformes com ou sem convulsões; S ☐ N ☐

- | | | |
|--|----------------------------|----------------------------|
| d) Epilepsia com várias formas de crises; | S ☐ | N ☐ |
| e) Sinais de espasticidade, fraqueza muscular tardia, e/ou distonia; | S ☐ | N ☐ |
| f) Distúrbios vasomotores periféricos; | S ☐ | N ☐ |
| g) Escoliose de origem neurológica; | S ☐ | N ☐ |
| h) Hipotrofia discreta e pés frios; | S ☐ | N ☐ |
| i) Atraso no crescimento. | S ☐ | N ☐ |

2) Critérios de exclusão:

- a) Organomegalias ou sinais sugestivos de doença de depósito;
- b) Retinopatia ou atrofia óptica;
- c) Microcefalia ao nascimento;
- d) Existência de doença metabólica ou heredodegenerativa identificada;
- e) Doença neurológica adquirida resultante de quadro infeccioso grave ou traumatismo crânio encefálico;
- f) Evidência de atraso de crescimento intrauterino;
- g) Evidência de dano cerebral perinatal adquirido;

Atualizado do original Viena (Hagberg *et al.*, 1985) e dos Critérios Diagnósticos do Grupo de trabalho da Síndrome Rett (Trevathan & Moser, 1988)

Conclusão: ☐ forma típica de Síndrome de Rett ☐ forma possível de síndrome de Rett
 ☐ forma atípica de Síndrome de Rett ☐ outros: _____

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos na Síndrome de Rett

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com suspeita clínica de síndrome de Rett. O objetivo geral do estudo é o de isolar o (s) gene (s) responsável (is) por esta doença por meio de métodos de genética molecular. Esses estudos poderão levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado da síndrome de Rett de modo geral. Tanto as amostras de DNA, de linhas celulares e a informação médica que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores, podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa dessa síndrome. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos por meio da utilização de um de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. O propósito será submetido a um exame físico neurológico para confirmar a hipótese diagnóstica. Além disso, poderá ser submetido a exames subsidiários laboratoriais, e/ou de imagem (como tomografia computadorizada ou a uma ressonância magnética de crânio). Uma amostra de sangue será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, serão realizados dentro do primeiro ano após o consentimento em participar no estudo e, com exceção da coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com síndrome de Rett. Porém, a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderá ser feita durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do sangue do propósito serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 a 30 ml de sangue será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

Título do projeto: Estudos Genéticos na Síndrome de Rett

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo e que o diagnóstico e o tratamento provavelmente não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares que por ventura forem obtidos, estarão disponíveis por meio do acompanhamento no ambulatório de origem.

SIGILO:

Entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico do propósito e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Entendo que a participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro. Eu reconheço também que a Dra. Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos na Síndrome de Rett

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☐ Caixa Postal 611

13083-970 Campinas-S.P.

☎ 0 XX 19 7888936

fax 0 XX 19 7888925

✉ cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER: Nº 091/99

P. DE PESQUISA: MAPEAMENTO DO(S) LOCUS(I) PARA SÍNDROME DE RETT
ATRAVÉS DE ESTUDO DE LIGAÇÃO

PESQUISADOR: Daniela Facchin

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

Em 15/09/1999

Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

SOLUÇÕES UTILIZADAS**RSB 10X**

Tris HCl	1,0 molar	50ml
KCl	2,0 molar	25 ml
<u>MgCl₂</u>	<u>1,0 molar</u>	<u>50 ml</u>

Completar até 500 ml com água bidestilada

☞ Tris HCl 1,0 molar

Se o peso molecular for 121,1, colocar 60,55g de Trisma
HCl suficiente para obter pH entre 7,5 e 8,0
qsp (água) até completar 500 ml

observações: 01. Fazer na capela
02. autoclavar

☞ KCl 2,0 molar

cloreto de potássio 14,94g

Completar até 100 ml com água bidestilada

observação: autoclavar

☞ MgCl₂ 1,0 molar

MgCl₂ 203,31g

Completar até 1000 ml com água

observações: 01. Usar agitador e banho até 37°C
02. autoclavar

SDS PARA SANGUE

RSB 10X	50 ml
NaCl 5 molar	40 ml
SDS 20%	12,5 ml
<u>EDTA 0,5 molar</u>	<u>2,0 ml</u>

Completar até 500 ml com água bidestilada

☞ RSB 10x vide acima

☞ NaCl 5 molar

Se peso molecular = 58,44, colocar 292,20g de NaCl

Completar até 1000ml de água

observações: 01. Colocar o pó aos poucos usando o agitador e, se necessário, o banho até 37°C

02. autoclavar

☞ SDS 20%

SDS – 20g

Completar até 100ml de água

observação: não autoclavar

☞ EDTA 0,5 molar

EDTA 186,12 g

Completar até 1000ml de água

observação: autoclavar

PROTEINASE K (100 mg/ ml)

FENOL

Saturação do fenol

Tirar o fenol da geladeira, deixá-lo sob água corrente até atingir temperatura ambiente, colocá-lo em banho a 68°C até se liqüefazer. Adicionar um volume igual de tris/HCl 0,5 molar pH 8,0 e misturar, na capela, com agitador magnético por 15 minutos em temperatura ambiente. Após os 15 minutos deixar a solução em repouso até que se distingam duas fases. Desprezar o sobrenadante, e adicionar volume igual de tris/HCl 0,1 molar. Misturar por 30 minutos e deixar a solução em repouso novamente até que se distingam as duas fases. Desprezar o sobrenadante e medir o pH. Caso o pH não esteja próximo a 7,8, repetir a parte sublinhada até que se obtenha pH próximo a 7,8.

Quando esse pH for obtido, armazenar a solução em um frasco protegido da luz, adicionar quantidade de 10% do volume restante obtido de tris/HCl 0,1 molar e por fim adicionar 0,1 g de hidroxiquinoleína. Deixar em repouso e utilizar no dia seguinte.

SOLUÇÃO DE ÁLCOOL ISOAMÍLICO E CLOROFÓRMIO

24 ml de clorofórmio para cada ml de álcool isoamílico.

POLICRILAMIDA a 40%

acrilamida 19,33g

bisacrilamida 0,67g

Completar até 50 ml com água desionizada

- observações:** 01. Colocar o pó aos poucos usando o agitador e, se necessário, o banho até 37°C
02. proteger da luz (substância fotossensível).
03. não autoclavar.

STOCK SOLUTION

Formamida	9,5ml
EDTA 0,2M	0,49ml
Azul de bromofenol	0,005g
<u>Xilenocianol</u>	<u>0,005g</u>
Completar até 10 ml com água MILLIQ	