

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *MECP2* EN PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE RETT CLÁSICO Y ATÍPICO.**

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A

DRA. MARIANA HERNÁNDEZ GÓMEZ

TUTOR DE TESIS

DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL

México, D.F.

OCTUBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN ESTRUCTURADO.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
• EPIDEMIOLOGÍA.....	4
• CUADRO CLÍNICO Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS.....	4
• PATOGENIA.....	9
• HERENCIA.....	11
• ASPECTOS MOLECULARES.....	12
• ESPECTRO MUTACIONAL DEL <i>MECP2</i>	16
• DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SÍNDROME DE RETT.....	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
JUSTIFICACIÓN.....	20
OBJETIVOS.....	21
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
• POBLACIÓN ELEGIBLE.....	22
• CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	22
• CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	22
• TAMAÑO DE MUESTRA.....	22
• DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.....	22
• VARIABLES DEL ESTUDIO.....	27
• CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	30
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	47
ANEXOS.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	58

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *MECP2* EN PACIENTES CON SÍNDROME DE RETT CLÁSICO Y ATÍPICO

COAUTORES: Dra. Mariana Hernández Gómez (Médico residente), M.C. Rehotbevely Barrios Ríos (Departamento de Genética, Laboratorio de Biología Molecular), M.C. José Antonio Velázquez Aragón (Departamento de Genética, Laboratorio de Biología Molecular), Dra. Violeta Carolina Medina Crespo (Médico adscrito al Departamento de Neurología), Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza (Departamento de Genética, Laboratorio de Biología Molecular), Dra. Ariadna González del Ángel (Médico adscrito al Departamento de Genética y Jefe de Laboratorio de Biología Molecular).

RESUMEN ESTRUCTURADO

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO. El síndrome de Rett (SR) es un desorden severo del neurodesarrollo, que afecta de manera casi exclusiva al género femenino. Es la causa más importante de retraso mental y discapacidad en niñas y mujeres a nivel mundial. Clínicamente se caracteriza por pérdida progresiva de la capacidad intelectual, de las habilidades motoras, de comunicación y una marcada desaceleración de crecimiento del perímetro cefálico así como desarrollo de movimientos estereotipados de las manos, lo cual ocurre después de un periodo aparentemente normal. El diagnóstico se establece únicamente por criterios clínicos, pero las manifestaciones muestran una gran variabilidad, lo que ha conducido a establecer subgrupos de pacientes definiendo dos formas clínicas, la clásica y las formas atípicas. El 80 a 85% de los casos de SR clásico y 30 a 50% de los casos atípicos se deben a una mutación en el gen *MECP2* localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq28) y hasta el momento se han reportado más de 200 diferentes mutaciones; ocho mutaciones son las más comunes y sumadas representan aproximadamente el 70% de todas las mutaciones descritas.

JUSTIFICACIÓN. En México se desconoce el tipo de mutaciones en pacientes con síndrome de Rett clásico y atípico así como la frecuencia de las mismas. El realizar el análisis del gen *MECP2* permitirá identificar el tipo de mutaciones asociadas al SR, así como su frecuencia en nuestra población y un mayor entendimiento de la patología.

OBJETIVOS. Caracterizar las mutaciones en el gen *MECP2* en pacientes mexicanas con diagnóstico clínico de SR clásico y atípico y describir el grado de severidad.

MATERIAL Y MÉTODOS. En pacientes con diagnóstico de SR clásico y atípico, a partir de DNA genómico se caracterizaron por PCR restricción (RFLP) cuatro mutaciones (p.R168X, p.R270X, p.R306C y p.T158M) en el gen *MECP2*. Se correlacionó el tipo de mutación con el grado de severidad consignado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. Se captaron 21 pacientes con SR, todos casos esporádicos, 61.9% tuvieron SR clásico y 38% SR atípico. La tasa de detección de mutaciones fue 57.14%; de estos 83.3% tenían diagnóstico de SR clásico y 16.6% SR atípico. La mutación más frecuente fue la p.T158M, la cual se encontró en 33.3% de los pacientes, siendo que a nivel mundial es la tercera en frecuencia. Las mutaciones p.R270X y p.R306C se encontraron en 25% de los casos respectivamente, mientras que a nivel mundial la mutación p.R306C es la cuarta en frecuencia y finalmente la mutación p.R168X la cual se identificó en 16.6% de las pacientes, es la mutación más frecuente a nivel mundial y la menos frecuente en esta muestra. Las cuatro mutaciones se consideraron severas, sin embargo se encontró variabilidad fenotípica lo cual se podría explicar por modificaciones epigenéticas, descritas en la literatura como la inactivación del cromosoma X, o bien por la presencia de polimorfismos en genes blanco.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Rett (SR) es un desorden severo de las últimas etapas del neurodesarrollo, de inicio en la infancia y que afecta de manera casi exclusiva al género femenino. Representa la causa más importante de retraso mental y discapacidad en niñas y mujeres a nivel mundial. El diagnóstico es difícil, ya que comparte características con enfermedades psiquiátricas, neurológicas y degenerativas.

Clínicamente se caracteriza por pérdida progresiva de la capacidad intelectual, de las habilidades motoras finas y gruesas, de comunicación y una marcada desaceleración de crecimiento del perímetro cefálico así como desarrollo de movimientos estereotipados de las manos, lo cual ocurre después de un periodo aparentemente normal. Posteriormente pueden presentar crisis convulsivas, alteración en el patrón de respiración con hiperventilación y periodos de apnea, escoliosis, retraso en el crecimiento y marcha atáxica, lo que conlleva una gran discapacidad (1).

En la actualidad el diagnóstico se establece únicamente por criterios clínicos, pero las manifestaciones clínicas muestran una gran variabilidad, con un amplio espectro tanto en severidad como en evolución que han conducido a establecer subgrupos de pacientes definiendo dos formas clínicas, la clásica y las formas atípicas. Dentro de las formas atípicas se distinguen cinco categorías: forma congénita, epilepsia precoz, conservación del lenguaje, regresión tardía y forma frustra (2,3).

El 80 a 85% de los casos de SR clásico y 30 a 50% de los casos atípicos, se deben a una mutación en el gen *MECP2* localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq28) y se conoce que el 99% son mutaciones esporádicas. Se han descrito algunos casos de SR atípico con mutaciones en el gen *CDKL5*, particularmente en aquellos que tienen un inicio temprano y cursan con convulsiones (3).

Al parecer, mutaciones en *MECP2* generan una desventaja en el crecimiento neuronal y de fibroblastos que aunado a la inactivación azarosa del cromosoma X, confieren la variabilidad fenotípica observada. Originalmente se pensó que *MECP2* era un represor global de la transcripción; sin embargo hallazgos recientes sugieren que juega un papel determinante en la regulación de la expresión génica neuronal (5).

MARCO TEÓRICO

El SR fue descrito por primera vez en 1966 por el pediatra austriaco Andreas Rett, posteriormente en 1983, Hagberg y colaboradores ampliaron la descripción del padecimiento en una publicación inglesa, en la que describían 35 niñas con fenotipos similares, el cual consistía en autismo, pérdida del movimiento dirigido de las manos, ataxia y microcefalia postnatal, momento a partir del cual se reconoció con el nombre de Síndrome de Rett.

En 1988 se establecieron los primeros criterios diagnósticos, denominados necesarios y de apoyo basados en las características clínicas (1,2). Sin embargo no fue sino hasta 1999, año en el que el entendimiento clínico y neurobiológico de la enfermedad finalmente permitió una asociación entre SR y mutaciones en el gen *MECP2*. Hasta la fecha se han reconocido más de 200 mutaciones y sólo 15 - 20% de las pacientes parecen no tener mutaciones en este gen por lo que los criterios diagnósticos, revisados en el año 2001, siguen siendo clínicos (7).

Epidemiología

Actualmente el SR es reconocido como una entidad que afecta niñas en todo el mundo. La prevalencia estimada a nivel mundial es de 1 en 10,000 – 15,000 niñas nacidas vivas (1,7,8). Sin embargo, en la medida en la que se ha ido conociendo más el espectro clínico de esta entidad, la prevalencia parece mucho mayor (1,7).

En México se desconoce la frecuencia, sin embargo en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría, se identificó como la principal causa de demencia en un grupo de pacientes entre 1 mes y 18 años de edad (9).

Cuadro clínico y criterios diagnósticos

El inicio de las manifestaciones de este padecimiento único del neurodesarrollo es generalmente inespecífico. A pesar de que la hipotonía está usualmente presente en los primeros 6 meses de vida, se considera que las niñas con SR clásico nacen sin complicaciones. Después de este periodo aparentemente normal, durante los primeros 6 a 18 meses, las distintas características clínicas aparecen sucesivamente, con un inicio inespecífico que se vuelve muy característico con el transcurso de la enfermedad.

En el cuadro 1 se describen las 4 etapas clínicas distintivas de SR. La presentación es sucesiva y la transición de un estadio a otro es paulatina y en ocasiones se traslapa.

Cuadro 1. Etapas o Estadios del Síndrome de Rett

Etapa I. Inicio Temprano

Duración: semanas a meses.

Aparentemente normal hasta los 6 a 18 meses de vida.

Las características de esta etapa son muy inespecíficas, existe hipoactividad y disminución del interés por el juego y las personas. Comienza el retraso psicomotor, la desaceleración del crecimiento y del perímetro cefálico.

Etapa II. Regresión Rápida del Desarrollo

Duración: semanas a meses, posiblemente un año.

Inicia a partir de los 18 a 24 meses de edad.

Regresión rápida de las habilidades adquiridas del desarrollo (demencia), aparición de estereotipias manuales y desaceleración del perímetro cefálico. Alteración del comportamiento (conducta autista y psicótica), gritos y llanto inconsolable que alternan con hiperventilación. Pérdida del lenguaje y comunicación acompañado de insomnio. Inician con crisis epilépticas que pueden ser de difícil control.

Etapa III. Pseudoestacionaria.

Duración: años.

Inicio a partir de los 4 a 10 años (después de la etapa II)

Se detienen tanto la regresión de habilidades como los episodios de irritabilidad, mejora el sueño y el control de las crisis epilépticas. Si bien no se recuperan las habilidades motoras y el lenguaje expresivo, las pacientes logran de forma paulatina, mejor interacción con el medio ambiente. Desarrollan una comunicación a través del contacto visual.

Etapa IV. Deterioro Motor Tardío.

Duración: décadas.

Inicio 11 a 12 años.

Se caracteriza por una marcada hipotrofia muscular, tienden a desarrollar contracturas articulares y escoliosis, que incapacitan la marcha. En esta fase presentan complicaciones broncopulmonares secundarias al patrón restrictivo. Esta etapa se ha subdividido en dos subgrupos: IV(A) para pacientes que pierden la deambulación y IV(B) para las que nunca lograron la marcha.

Hagberg (1993), Witt-Engerström (1990).

La primera etapa, denominada inicial o temprana, es una etapa en la que los padres notan ciertos cambios relativamente repentinos en la interacción de la paciente con el medio, sin embargo siguen adquiriendo algunas habilidades aunque con cierto retraso. Las niñas se muestran irritables y con tendencia al llanto fácil. Debido a que son alteraciones tan sutiles y poco específicas es prácticamente imposible establecer el diagnóstico. En este periodo inicia la desaceleración del crecimiento cefálico (1,3,5).

La segunda etapa llamada regresión rápida del desarrollo es la más abrumadora, que lleva a los familiares a solicitar ayuda médica. Esta etapa con mucha frecuencia se confunde con autismo. Se caracteriza por una rápida pérdida de habilidades previamente adquiridas e inicia repentinamente con síntomas pseudotóxicos (fiebre, datos sugestivos de meningoencefalitis y llanto), sin datos bioquímicos o microbiológicos que le permitan al médico una explicación del cuadro clínico observado. Este episodio puede durar días o semanas, después las niñas se recuperan y presentan un cambio importante de personalidad, además de una pérdida sustancial de las habilidades motoras y de relación. Mantienen el contacto visual aunque es evidente el desinterés hacia las personas y el medio. En este lapso se presenta limitación progresiva para la manipulación de objetos hasta la apraxia, la cual sustituyen por movimientos repetitivos de ambas manos típicos de este síndrome. Inician con posturas distónicas y estereotipias manuales que incluyen movimientos diversos, ejemplos de ello: frotamiento, lavado, aplauso, etc. La deambulaci3n ocurre en 80% de las pacientes, con un patr3n de ataxia-apraxia. Presentan pies fr3os con o sin cambios vasculares, que modifican la coloraci3n distal. Las crisis convulsivas se presentan en 30 y hasta 80% de los casos durante esta etapa. El tipo de crisis convulsiva m3s comunmente observadas son parcial compleja y la t3nico-cl3nica generalizada, que en ocasiones puede ser de dif3cil control, que hay que diferenciar de paroxismos no epil3pticos como: bruxismo, alteraciones en la respiraci3n (aereofagia, meteorismo, eructos), hiperventilaci3n con o sin intervalos de apnea (1,3,5).

En la tercera etapa que se denomina pseudoestacionaria, periodo en el cual se autolimita la regresi3n, las niñas conservan la marcha o incluso empiezan a caminar. Las estereotipias de manos se hacen muy notorias y se consideran un dato diagn3stico importante. Mejora su capacidad de memoria e interacci3n social. Aunque no logran recuperar el lenguaje articulado, mejora el contacto social a trav3s de una mirada expresiva, la cual fijan en los objetos que desean acercar. Este comportamiento visual les permite establecer comunicaci3n con su entorno. En esta etapa inicia la hipotrofia de extremidades y la escoliosis que limita la capacidad de deambulaci3n en 25% de los casos. Se acentúan las alteraciones auton3micas que se pueden manifestar como: constipaci3n severa, disfunci3n orofar3ngea, anormalidades en la conducci3n cardiaca que incluyen intervalos Q-T largos, taquicardia y bradicardia sinusal (1,3,5).

En la cuarta etapa llamada de deterioro motor tard3o, hay p3rdida de la deambulaci3n y las niñas se vuelven dependientes de la silla de ruedas. Cabe seÑalar que 20% de las pacientes que presentan un cuadro severo nunca aprenden a caminar y pasan de la etapa II a la IV. Es una etapa en la que ocurre un franco deterioro neurol3gico, atrofia muscular y deformidad de extremidades. Los movimientos de manos se hacen menos constantes, la falta de movilidad incluso se manifiesta como cuadriplej3a esp3stica y pueden desarrollar parkinsonismo en etapas posteriores (1,3,5).

El diagnóstico es clínico, basado en los criterios internacionales (7), revisados en el 2001 (cuadro 2).

Cuadro 2. Criterios diagnósticos para SR.

Criterios Necesarios

1. Periodos pre y perinatal aparentemente normal
2. Desarrollo psicomotor normal en los primeros 6 meses o con retraso desde el nacimiento
3. Perímetro cefálico normal al nacimiento
4. Desaceleración postnatal del crecimiento cefálico en la mayoría de los casos
5. Pérdida del movimiento propositivo de las manos entre los 6 meses y 2 años y medio de edad, asociado a alteraciones en la comunicación y relación social
6. Movimientos estereotipados de manos como frotamiento, lavado, aplauso, etc.
7. Pérdida del contacto social, disfunción en la comunicación, pérdida de palabras previamente aprendidas y deterioro cognitivo
8. Dispraxia o pérdida de la locomoción

Criterios de apoyo

1. Alteraciones de la ventilación en vigilia (hiperventilación, expulsión forzada de aire o saliva y aerofagia)
2. Bruxismo
3. Patrón alterado del sueño desde la infancia temprana
4. Tono muscular anormal asociado a atrofia y distonia sucesiva
5. Alteraciones vasomotoras periféricas
6. Escoliosis / Xifosis progresiva durante la infancia
7. Retraso del crecimiento
8. Pies fríos e hipotróficos; manos pequeñas y delgadas

Criterios de exclusión.

1. Visceromegalia u otros datos de enfermedad de depósito
2. Retinopatía, atrofia óptica o catarata

3. Evidencia de daño perinatal o postnatal a sistema nervioso central
4. Existencia o identificación de un desorden metabólico o de un proceso neurológico progresivo
5. Daño neurológico adquirido secundario a trauma o infecciones

Hagberg et al., 2002

Para establecer el diagnóstico no se requieren todos los criterios necesarios, con 4 de ellos es suficiente.

De manera casi simultánea al establecimiento de los primeros criterios clínicos, se publicaron casos que aún cumpliendo con un gran número de ellos, diferían de los casos de SR clásico, ya sea por la edad de inicio, por los síntomas iniciales o por manifestaciones clínicas más atenuadas e incompletas a las que se han denominado SR atípico o variantes (2).

Estas variantes representan alrededor del 10% de todos los casos y hasta el momento se han establecido 5 fenotipos distintos considerados SR atípico.

1. SR forma frusta: término que se emplea para designar aquellos casos que pasan desapercibidos durante años, pero que, durante la pubertad desarrollan el cuadro clínico completo. Es la variante más frecuente y las niñas inician la regresión entre el año y los tres años de edad de forma poco llamativa, en algunas ocasiones conservan parcialmente el uso de las manos y pueden no presentar esterotipias manuales. Muestran una ligera desaceleración del crecimiento del perímetro cefálico, situándose éste excepcionalmente por debajo de 2 desviaciones estándar (2,3).
2. SR de inicio precoz con crisis convulsivas: son aquellos casos que se presentan con espasmos infantiles e hipsarritmias y que más tarde evolucionan como SR clásico. La edad media de comienzo de las crisis es de 9.5 meses (rango 1 – 15 meses). Los tipos de crisis son muy variables, pero se considera que existe un predominio de los espasmos infantiles y crisis generalizadas (2,3).
3. SR de regresión tardía: son aquellos casos que presentan, durante la infancia, retraso mental moderado, no específico, con un coeficiente intelectual entre 40 y 50 puntos. Seguido de la aparición tardía de los signos y síntomas que caracterizan al SR, a veces de forma tan lenta, que la regresión parece dudosa. Generalmente el diagnóstico se establece en la segunda década de la vida e incluso pasados los 20 años (2).

4. SR de habla conservada: ocurren las cuatro etapas de la evolución, pero con ligeras diferencias; estereotipias manuales más variadas y menos continuas y menor desaceleración del perímetro cefálico. Las niñas recuperan el habla que habían perdido, primero emitiendo palabras sueltas y posteriormente dicen frases con ecolalia (2,3).
5. SR congénito: son niñas que muestran una alteración en el desarrollo desde el nacimiento o en los primeros meses de vida, como hipotonia o retraso psicomotor evidente con instauración posterior de los criterios diagnósticos de SR (2,3).

Al igual que para el SR clásico, el diagnóstico es clínico basado en criterios clínicos específicos los cuales se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Criterios clínicos revisados para el diagnóstico de las Variantes del Síndrome de Rett.

Criterios de inclusión

1. Reunir al menos 3 a 6 criterios principales
2. Reunir al menos 5 a 11 criterios de soporte

Seis criterios principales

1. Ausencia o disminución de las habilidades manuales
2. Pérdida o disminución del lenguaje articulado o balbuceo
3. Patrón monótono de movimientos hasta estereotipias manuales
4. Pérdida o disminución de la comunicación
5. Desaceleración del crecimiento del perímetro cefálico desde el primer año de vida
6. Patrón de SR: etapa de regresión seguida de un periodo de mejoría en la interacción y comunicación social en contraste con una regresión motora lenta

Once criterios de apoyo

1. Patrón de respiración irregular
2. Aerofagia
3. Bruxismo
4. Alteración en las habilidades motoras
5. Escoliosis / Xifosis

6. Amiotrofia de extremidades inferiores
7. Pies fríos y cambios en la coloración, generalmente con detención del crecimiento
8. Alteraciones del sueño que incluyen "gritos nocturnos"
9. Moria
10. Respuesta disminuida al dolor
11. Contacto visual intenso

Hagberg, et al., 2002.

Otras variantes posibles.

- SR provisional o potencial. Se trata de niñas entre 1 y 3 años, con retraso psicomotor inexplicado y/o pérdida de las habilidades funcionales, particularmente logros adquiridos.
- Variante casos familiares atípicos. Existen familias con más de dos miembros con diagnóstico probable de SR que muestran marcadas diferencias en las manifestaciones clínicas entre ellos; uno puede presentar SR clásico y el otro retraso mental o patrones conductuales autistas.
- Variante de variabilidad en gemelos monocigotos. En aquellos casos publicados de gemelos monocigotos, la concordancia fenotípica parece más la excepción que la regla (2).
- Fenotipo en varones. A pesar de que inicialmente se consideraba que el SR afectaba de manera exclusiva a mujeres, se han descrito varones con SR clásico (10). Ya se habían identificado mutaciones en *MECP2* en varones, diferentes a las que causan SR, que se asocian a un rango amplio de manifestaciones neurológicas que abarcan desde retraso mental hasta encefalopatía severa. Las mutaciones que causan SR clásico en mujeres sólo se habían descrito en varones con cariotipo normal que cursaban con encefalopatía neonatal y morían en el primer año de vida o bien en varones que sí presentaban SR clásico, pero con cariotipo 47,XXY o con mosaico somático (3); sin embargo, recientemente se han descrito mutaciones presentes en mujeres con SR clásico en varones con cariotipo normal lo que sugiere la existencia de genes modificadores que permiten la sobrevivencia de estos pacientes (11,12,13,14).

Patogenia

Cambios neuropatológicos

A pesar del profundo daño neurológico el mayor cambio histopatológico detectado a nivel de sistema nervioso central es la disminución del tamaño cerebral y neuronal. Estudios anatomopatológicos muestran una reducción de 12-34% del peso y volumen cerebral de pacientes con SR, que compromete de forma predominante las regiones prefrontal, frontal posterior y temporal anterior (15). No hay evidencia de degeneración, atrofia, inflamación, gliosis o de defectos en la migración neuronal (16,17). Estas evidencias demostraron que SR es un desorden del neurodesarrollo postnatal más que un proceso degenerativo, es decir, involucra etapas correspondientes a la organización y sinápsis cerebral (18,19). Se observa un patrón dendrítico único a diferencia de otros desordenes que cursan con retraso mental (20). Otros territorios que presentan cambios son el tálamo, núcleos basales, amígdala e hipocampo en los que se han encontrado neuronas disminuidas de tamaño, aunque no atróficas (21).

Modelos murinos demuestran alteraciones en el número de sinapsis glutaminérgicas más que alteraciones pre o postsinápticas (22), además de cambios en acetilcolina, dopamina, serotonina y sustancia P; sin embargo, aún se desconoce el papel que muchas de estas sustancias tienen en la fisiopatología del SR.

Cambios Neurofisiológicos

Estudios neurofisiológicos aportan datos de disfunción tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso autónomo, los cuales contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad. No existe involucro visual ni auditivo demostrado mediante potenciales evocados. Los potenciales somatosensoriales y los patrones alterados electroencefalográficos sugieren un estado de excitabilidad cortical anómalo, sin embargo los trazos electroencefalográficos no son diagnósticos y pueden variar entre pacientes así como en las diferentes etapas de la enfermedad. El electrocardiograma muestra intervalos Q-T largos resultado de la disfunción autónoma (23).

Herencia

El SR es una enfermedad con herencia ligada al X. Debido a que el 99% de los casos son esporádicos, se considera que el riesgo de recurrencia es de 0.1% (1). La mayoría de las mutaciones son de origen germinal paterno (24,25). A consecuencia de la inactivación al azar del cromosoma X y dependiendo del porcentaje de cromosomas X mutados que se

encuentren activos o inactivos, puede existir gran variabilidad en la expresión, desde fenotipos severos, moderados o incluso mujeres asintomáticas las cuales se identifican al tener una hija afectada (1,3). Por lo que, en caso de identificar la mutación en una paciente, siempre es recomendable hacer la búsqueda de ésta en la madre. Por otro lado, el diagnóstico prenatal se puede ofrecer a padres con antecedente de una hija con SR, cuya mutación haya sido caracterizada, por la probabilidad de mosaico gonadal, aunque esta posibilidad es en realidad baja (1).

Aspectos moleculares del Síndrome de Rett: gen *MECP2*

Debido a que la mayoría de los casos son esporádicos, fue difícil identificar el locus mediante análisis de ligamiento; sin embargo, mediante el empleo de información de los pocos casos familiares que existen, se identificó una región candidata en Xq28 y en 1999 se logró determinar que el SR era el resultado de mutaciones en el gen *MECP2* en la mayoría de los casos (26).

MECP2 es uno de los genes localizados en el cromosoma X que sufre inactivación (27), es un gen altamente conservado ya que se han encontrado ortólogos de éste en rata, ratones, monos, *Xenopus* y pez cebra. Su transcrito más grande consta de 10.1 kb, aunque las regiones codificantes sólo representan 1500 pb, las cuales están distribuidas en 4 regiones exónicas de tamaño heterogéneo. Codifica para dos isoformas, originadas por splicing alternativo, que varían únicamente en su extremo N-terminal, una de 498 aminoácidos (MeCP_e1, codificado por *MECP2 α* o B, que incluye al exón 1 pero no al 2) y otra de 486 aminoácidos (MeCP_e2, codificado por *MECP2 β* o A, que incluye parte del exón 2, pero no al 1) (8, 28,29,30). Tiene una región 3' no traducible grande altamente conservada, región que contiene múltiples sitios de poliadenilación, que pueden generar de manera alterna cuatro isoformas (Figura 1).

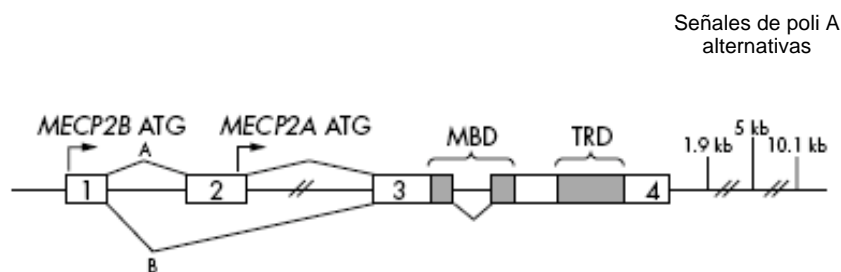


Figura 1. Estructura del gen *MECP2*.

Splicing alternativo de *MECP2*: Isoforma MeCP_e1 excluye el exón 2, mientras que la isoforma MeCP_e2 excluye el exón 1. Weaving, et al., 2007.

Estudios de expresión en ratones han mostrado que el transcrito e1 es el más abundante en cerebro, con su máxima expresión en el desarrollo embrionario, seguido de un descenso postnatal e incremento posterior en la vida adulta. Estos transcritos pudieran ser tejido específico y tener una regulación dependiente del estadio del desarrollo (3).

La proteína MeCP2 es un miembro de la familia de proteínas de unión a DNA (incluidas las proteínas MBD). Tiene dos señales de localización nuclear y tres dominios funcionales: 1) el dominio de unión a Metil CpG (MBD) que abarca de la posición 78 a la 174, la cual se une de forma selectiva a residuos de 5-metilcitosina en dinucleótidos CpG simétricamente posicionados. Recientemente se ha demostrado que secuencias ricas en Adenina y Timina adyacentes a dinucleótidos metil-CpG son esenciales para la alta afinidad entre MeCP2 y sus sitios blanco (31). 2) Una región de represión transcripcional (TRD) codificada desde la posición 219 a la 310, la cual es capaz de reclutar complejos co-represores (Sin3A) y desacetilasas de histonas, los cuales median la represión transcripcional mediante la compactación de DNA y 3) un dominio WW del residuo 337 al C-terminal el cual es capaz de unirse a la proteína de unión a RNA YB1 (Y box-binding protein 1) para la regulación de splicing de otros genes (32) (Figura 2). A pesar de no estar bien caracterizado el extremo C-terminal es clara su importancia funcional ya que muchas mutaciones responsables de SR involucran esta región y algunos modelos murinos se producen eliminando la región C-terminal lo que genera distintos fenotipos que simulan SR (33).

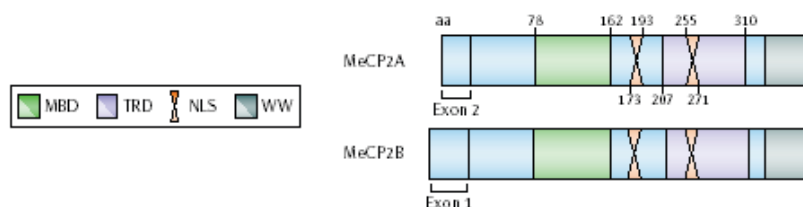


Figura 2. Isoformas de MeCP2. Sólo varían en su extremo N-terminal, ambas cuentan con tres dominios funcionales idénticos: 1) Dominio de unión a DNA (MBD); 2) Dominio de represión de la transcripción (TRD); 3) Dominio WW (WW), y dos señales de localización nuclear (NLS).

MeCp2 interactúa con un gran número de proteínas, entre las que se encuentran además de las previamente mencionadas, DNA-metiltransferasas (DMT1), metiltransferasas de histonas (Suv39H1), factores de transcripción (TFIID), correpresores (c-Ski y N-CoR) y helicasas, lo que hace evidente la gran cantidad de funciones que desempeña en la remodelación de la cromatina, en la regulación transcripcional y en el procesamiento de RNA (3).

A pesar de que la proteína MeCP2 se expresa en todo el organismo, es más abundante en cerebro, primordialmente en neuronas maduras postmigratorias (34). Los niveles de la proteína son bajos durante la embriogénesis e incrementan progresivamente durante el periodo postnatal de maduración neuronal (35,36,37,38,39). Reportes recientes sugieren que MeCP2 es translocada al núcleo independientemente de la diferenciación neuronal (40). Por lo que se infiere que MeCP2 dado que se expresa en neuronas maduras e incrementa su expresión en el periodo postnatal, puede desempeñar un papel en la modulación de la actividad y plasticidad neuronal y no parece intervenir en la proliferación o diferenciación de los precursores neuronales.

Se ha descubierto que la actividad neuronal induce la fosforilación de MeCP2 permitiendo su separación de las regiones promotoras y la disociación de los complejos correpresores así como la hiperacetilación de histonas que permiten el acceso a la maquinaria de transcripción (3).

Genes blanco de MECP2

Originalmente se pensó que *MECP2* era un represor global de la transcripción. Sin embargo, perfiles transcripcionales en modelos de ratones nulos para *MECP2* no mostraron mayores cambios en el patrón transcripcional, por lo que se considera que no es un represor global. Se piensa que la pérdida de *MECP2* debe implicar únicamente cambios sutiles en la expresión de genes blanco específicos (41). Por otro lado, si *MECP2* regula la expresión sólo de un cierto número de genes en una población neuronal específica, los patrones de expresión dependerán de la región cerebral analizada, lo que dificulta el estudio de este gen.

Se han propuesto varios genes blanco de *MECP2*, tanto en humanos como en ratones, de los cuales algunos se han confirmado y otros siguen bajo investigación. En la tabla 1 se muestran algunos de ellos.

Tabla 1. Genes Blanco de *MECP2*

Gen	Función	Referencia
<i>BDNF</i>	Desarrollo y supervivencia neuronal	Chen et al., Martinowich et al.
<i>xHairy2a</i>	Represor neuronal	Stacheva et al.
<i>DLX5/Dlx5</i>	Factor de transcripción neuronal	Horike et al.
<i>Sgk1</i>	Señalización hormonal	Nuber et al.
<i>Fkbp5</i>	Señalización hormonal	Nuber et al.
<i>Uqcrc1</i>	Cadena respiratoria mitocondrial	Kriaucionis et al.
<i>ID1-3/Id1-3</i>	Factor de transcripción neuronal	Peddada et al.
<i>FXJD1/Fxyd1</i>	Regulador de canal iónico	Deng et al.
<i>IGFBP3/igfbp3</i>	Señalización hormonal	Itoh et al.
<i>Crh</i>	Neuropeptido	McGill et al.
<i>UBE3A</i>	Ligasa de Ubiquitina	Samaco et al.
<i>GABRB3</i>	Receptor Gaba-adrenérgico	Samaco et al.

Zoghbi et al. 2007. (*DLX5* y *UBE3A* no se han podido reproducir en estudios independientes: Hogart et al., 2007; Jordan y Francke, 2006; Makedonski et al., 2005; Samaco et al., 2005; Schule et al., 2007).

Uno de los genes regulados por *MECP2* es el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (*BDNF*) (42,43). El control es dependiente de la actividad neuronal. Al despolarizarse la membrana se genera un flujo intracelular de calcio, que induce la desfosforilación de *MECP2* liberando al promotor y la disociación de los correpresores, permitiendo así que se lleve a cabo la transcripción. Existen estudios contradictorios, ya que en ratones nulos, no se observa un incremento en la expresión de *BDNF* como era de esperarse y la explicación de este evento es que al ser una regulación mediada por actividad neuronal, las neuronas carentes de la función de *MECP2* pueden tener una actividad disminuida e indirectamente generar una disminución en los niveles de *BDNF*. Por otro lado los ratones nulos, en los que se reestablece la actividad de *BDNF*, logran cierta mejoría del fenotipo (42). A pesar de estos hallazgos, se requieren más estudios que permitan establecer la función que desempeña *BDNF* en las diferentes etapas clínicas y en la patogénesis del SR.

MECP2 también se encuentra involucrado en la regulación de genes implicados en la respuesta al estrés. El estrés es claramente un estado fisiológico alterado que produce un cambio en la expresión de varios genes que controlan el eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal, así como los genes efectores necesarios para la actividad esteroidea y sus receptores. Estudios de expresión en ratones nulos han mostrado una sobreexpresión de genes reguladores de

glucocorticoides. Por otro lado los modelos murinos *Mecp2*^{308/Y}, portadores de una proteína trunca, que genera alelos hipomorfos que mantienen los 3 dominios funcionales de la proteína MeCP2 y sólo se elimina el extremo C-terminal, presentan niveles elevados de corticoesterona, una respuesta alterada al estrés y datos de ansiedad e hiperexcitabilidad que pudiera corresponder a los episodios de ansiedad observados en la niñas con SR (44,45). Por lo anterior, se comenzó a estudiar el gen *Crh*, el cual codifica para la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH), encargada de modular el comportamiento y la respuesta al estrés (46, 47). Mediante estudios de expresión con RT-PCR de hipotálamo y de amígdala central, regiones críticas para la respuesta al estrés, mostraron un incremento en la expresión de *Crh* en ratones *Mecp2*^{308/Y}. Se ha descubierto que *MECP2* se une al promotor de *Crh*, el cual es rico en regiones CpG metiladas y que al alterar la función de *MECP2* ocurre una sobreexpresión del gen blanco (44). *Crh* resulta uno de los genes candidatos a estudiar más atractivos, ya que podría ser un blanco terapéutico mediante el empleo de antagonistas del receptor Crh 1 (46).

Estos últimos datos permiten inferir que *MECP2* no es un silenciador de genes, si no que es un modulador de la expresión génica en estados fisiológicos específicos del organismo.

A pesar de todos estos avances, hasta el momento no se conoce una causa de la detención del desarrollo cerebral y como es que los genes blanco de *MECP2* pueden alterar la neurofisiología normal y condicionar el cuadro clínico de SR.

Espectro mutacional de *MECP2*.

Mutaciones en los exones 2 al 4 de *MECP2*, condicionan 80 a 85% de los casos de SR clásico y 30-50% de los casos atípicos, principalmente en aquellas con preservación del lenguaje (25,48,49).

La mayoría de las mutaciones son transiciones de citosina por timina en dinucleótidos CpG (4,24,25). El espectro de mutaciones incluye: sentido erróneo, sin sentido, aquellas que producen corrimiento del marco de lectura (50) y deleciones que abarcan todos los exones (51,52).

Las mutaciones de sentido erróneo se localizan de manera más frecuente en el dominio MBD y las mutaciones sin sentido en el dominio TRD (53).

Se han reportado más de 200 diferentes mutaciones, ocho mutaciones son las más comunes, con una frecuencia mayor a 3% del total de los casos reportados y sumadas representan aproximadamente 70% de todas las mutaciones descritas (Tabla 2) (48). La mayoría de éstas mutaciones son de sentido erróneo o sin sentido, mientras que las deleciones del extremo C-terminal representan sólo el 10% y los rearrreglos complejos constiuyen el 6% (3).

Tabla 2. Mutaciones más comunes del gen *MECP2* presentes en pacientes con síndrome de Rett clásico o atípico a nivel mundial.

	Frecuencia	Ubicación	Cambio de nucleótido
p.R168X	11.5%	Exón 4	502C>T
p.R270X	9.0%	Exón 4	808C>T
p.R255X	8.7%	Exón 4	763C>T
p.T158M	8.3%	Exón 4	473C>T
p.R306C	6.8%	Exón 4	916C>T
p.R294X	5.9%	Exón 4	880C>T
p.R133C	4.2%	Exón 4	397C>T
p.R106W	4.2%	Exón 3	316C>T

Bienvenu, et al., 2000; Cheadle, et al., 2000; Huppke, et al., 2000.

Sin embargo estas mutaciones tienen una distribución variable entre poblaciones que oscila desde 44% en población coreana (54) hasta 72% en población alemana (56), 69% en Reino Unido (55) y 59% en población francesa la cual es la cohorte más grande hasta ahora reportada. En este estudio se analizaron 424 pacientes, de las cuales 324 tuvieron mutaciones previamente descritas y se reportaron 121 mutaciones nuevas (48). A pesar de que en la mayoría de los reportes la mutación más común es p.R168X (24,26,30,55,56,57); en población alemana (58) la más común es p.R294X y en Estados Unidos (59), Inglaterra, Italia (60) y China (61) la mutación predominante es p.T158M.

Se considera que el SR tiene una penetrancia de 100%, sin embargo la variabilidad en la expresión es amplia y existen varios reportes en donde la misma mutación presenta un fenotipo variable, que incluso condiciona diferencias fenotípicas que se manifiestan como SR clásico o atípico (58,62,66).

Al no existir reportes sobre mutaciones en *MECP2* en poblaciones hispanas, latinoamericanas o mexicanas se desconoce la frecuencia de estas mutaciones en estos grupos, aunque es de esperarse que estas ocho mutaciones presenten una frecuencia similar a lo reportado a nivel mundial.

Correlación fenotipo-genotipo

Se han realizado diferentes estudios de correlación fenotipo-genotipo los cuales permiten establecer ciertas conclusiones. En general, las mutaciones que generan una proteína trunca tardía tienen una presentación menos típica que aquellas mutaciones de sentido erróneo o que generan una proteína trunca temprana, que presumiblemente reflejan la función residual de la proteína. De igual forma pacientes con mutaciones truncas prematuras tienen un fenotipo más severo que aquellas con mutaciones de sentido erróneo o mutaciones truncas tardías (3,63).

La severidad se ha establecido de acuerdo a escalas, que incluyen parámetros clínicos como: perímetro cefálico, pérdida de las habilidades manuales, movimientos manuales estereotipados, lenguaje, deambulacion, retraso mental, epilepsia y escoliosis, sin embargo estas escalas no son universales y se han modificado de acuerdo a los diferentes autores (49,55,56,63,64,65). En 2001 se establecieron las guías para reportar datos clínicos en los casos de pacientes con SR, que permiten estandarizar el grado de severidad. En este sistema, se consignan 20 aspectos, tales como, crecimiento, patrón de respiración, epilepsia, sueño, estado de ánimo, deformidades y habilidades motoras gruesas y cognitivas a las cuales se les asigna un valor en una escala de 0 a 2. El puntaje máximo es 40, un puntaje por arriba de 30 es muy severo, entre 25 y 30 severo, entre 10 y 25 moderado (53, 64) (ver anexo 1).

Las razones por la cuales se modifica o se emplean otras escalas de severidad, son en primer lugar por que las manifestaciones consideradas en está escala no son predominantes en los casos moderados y en segundo lugar por que muchas características son dependientes del tiempo en el que se evalúa a las pacientes. Sin embargo es la única escala que se ha realizado mediante un consenso y es una herramienta práctica para la evaluación de la severidad en pacientes con SR, ya que facilita la comparación entre estudios, a pesar de que puede estar sujeto a interpretaciones subjetivas (53).

Se ha logrado establecer una correlación del genotipo con el grado de severidad, en algunas mutaciones, como es el caso para las mutaciones p.R255X y p.R270X, localizadas entre el dominio de represión transcripcional y las regiones de señalización nuclear (TRD-NLS), se asocian a fenotipos severos y en las que generalmente, el diagnóstico se sospecha antes de los 2 años y se confirma rápidamente. Estas pacientes presentan muchas de las características de SR, pero pueden no presentarlas todas. La sobrevivida por arriba de los 30 años es rara, por lo que se considera que tiene una mortalidad incrementada. Ambas mutaciones presentan el puntaje más alto de severidad (32,53,63).

De igual forma, las pacientes con la mutación p.T158M localizada en el dominio MBD, se caracterizan por ser hiperactivas, tener cambios bruscos en el estado de ánimo, conservan relativamente la marcha y desarrollan escoliosis lentamente. Todas tienen de manera

predominante epilepsia en algún momento de la vida. El patrón en la infancia es relativamente atípico, principalmente en lo referente al comportamiento, pero se establece un patrón clásico en la adolescencia. Muchos casos se han diagnosticado en la infancia como una variante frustra.

En el caso de la mutación p.R133C, se ha asociado a un fenotipo moderado, generalmente considerada en la infancia como una variante frustra o bien se ha reportado asociada a la variante con presevación del lenguaje y movimientos propositivos de las manos (63,64,67,68). Sin embargo, presentan escoliosis grave la cual no es posible tratar mediante métodos quirúrgicos. Este grupo de pacientes ha obtenido el puntaje más bajo de severidad entre aquellas pacientes en las que el patrón de SR es reconocible (53).

A pesar de todos estos avances, existen inconsistencias entre los distintos estudios, por ejemplo, la mutación p.R306C se ha asociado a fenotipos moderados en algunos estudios, pero no en otros, reportando puntajes altos y bajos de severidad en este grupo de pacientes (55,56,63). De tal manera que se reportan pacientes con la misma mutación y fenotipo diferente, por lo que se ha sugerido que el contexto genético y/o la inactivación específica del cromosoma X en el cerebro influencia las consecuencias biológicas de las mutaciones en *MECP2*. Incluso, como ya se mencionó, se considera que la extrema inactivación específica del X portador del alelo mutado, puede explicar la existencia de casos poco frecuentes de portadoras con manifestaciones muy leves o incluso asintomáticas (62,69), por lo que la correlación fenotipo-genotipo ha sido difícil de establecer.

Diagnóstico molecular de Síndrome de Rett

La detección de mutaciones se ha basado en la amplificación de las regiones exónicas del gen por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y posteriormente su detección por técnicas de tamizaje como DGGE, dHPLC, SSCP y secuenciación de los fragmentos que mostraron patrones alterados (5,48,70) en algunos reportes simplemente realizan secuenciación directa de todas las regiones exónicas (26,55) o bien por PCR en tiempo real la cual detecta rearrreglos grandes del gen *MECP2* (71). Estos métodos son muy confiables, sin embargo son costosos, tardados y algunos son técnicamente difíciles.

Con menor frecuencia se ha utilizado la técnica de RFLP (Restriction fragment length polymorphisms o fragmentos largos de restricción polimórfica) para detectar alguna de las mutaciones ya descritas. Ésta técnica tiene la ventaja de ser relativamente barata, rápida y sencilla. La técnica de RFLP fue empleada para confirmar mutaciones en *MECP2* detectadas previamente por secuenciación directa por un grupo coreano; sin embargo, las mutaciones analizadas por esta metodología, la p.G161E y la p.T311M, no se encuentran dentro de las 8 más comunes (54), a pesar de que cuatro de ellas pueden ser analizadas por esta metodología, ya que su presencia crea o elimina sitios de restricción específicos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los tipos de mutaciones y su frecuencia en el gen *MECP2* en pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Rett clásico y atípico?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome de Rett se considera la principal causa de discapacidad en niñas y mujeres a nivel mundial, se sabe que 80 a 85% de los casos de SR clásico y 30 a 50% de las variantes atípicas son debidos a mutaciones en el gen *MECP2*. Hasta el momento se han reportado más de 200 mutaciones, sin embargo 8 de ellas representan aproximadamente el 70% de las mutaciones reportadas a nivel mundial. La frecuencia y distribución de estas mutaciones varían de acuerdo a la población de estudio. A pesar del avance en el abordaje molecular del SR, el diagnóstico sigue siendo esencialmente clínico, sin embargo el conocimiento de las bases moleculares, permitirá un mejor entendimiento de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

En México se desconoce tanto el tipo de mutaciones en pacientes con síndrome de Rett clásico y atípico así como la frecuencia de las mismas. El realizar el análisis del gen *MECP2* permitirá identificar el tipo de mutaciones asociadas al SR clásico y atípico, así como su frecuencia en nuestra población ya que al ser un grupo tan heterogéneo es posible que además de encontrar las mutaciones reportadas a nivel mundial, la frecuencia de estas pueda ser distinta e incluso identificar nuevos cambios.

Por otro lado el SR atípico implica un reto diagnóstico para el clínico, por lo que consideramos que el estudio molecular puede ser una herramienta de apoyo muy importante en la corroboración diagnóstica, lo cual nos ayudará a brindar un diagnóstico y asesoramiento certero.

A pesar de que el 99% de las mutaciones son esporádicas hay autores que sugieren estudiar a las madres aún cuando clínicamente no tienen manifestaciones, con el fin de descartar que sean portadoras, lo cual permite ofrecer un pronóstico reproductivo más certero. El estudio incluso, permite la posibilidad de ofrecer el diagnóstico prenatal en futuros embarazos a parejas con hijas afectadas, el cual también se sugiere, por la posible existencia de un mosaico gonadal.

Actualmente se sabe que el espectro clínico de mutaciones en el gen *MECP2* es muy amplio y no sólo corresponde a pacientes con un cuadro de SR clásico o atípico. Se han descrito pacientes femeninas con sólo retraso mental e incluso con un fenotipo que semeja síndrome de Angelman, así como varones con retraso mental, esquizofrenia, epilepsia, autismo,

encefalopatía neonatal e incluso varones con el espectro clínico de SR, antes considerado exclusivo de pacientes femeninas. De tal manera que hoy en día se considera un gen importante a estudiar en caso de pacientes con retraso mental de etiología no determinada, lo cual implica que el análisis de *MECP2* no sólo tiene un impacto en pacientes con SR, ya que en un futuro este estudio podrá hacerse extensivo a otro tipo de pacientes y así contribuir con el abordaje de pacientes con retraso mental y otras entidades.

OBJETIVOS

I. Objetivo General

1. Caracterizar las mutaciones en el gen *MECP2* en pacientes con diagnóstico clínico de SR clásico y atípico.

II. Objetivos Específicos

1.- Identificar tipo de mutaciones y frecuencia en el gen *MECP2* en pacientes con diagnóstico de SR clásico de acuerdo a los criterios clínicos internacionales revisados en 2002.

2.- Identificar tipo de mutaciones y frecuencia en el gen *MECP2* en pacientes con diagnóstico de SR atípico de acuerdo a los criterios clínicos internacionales revisados en 2002.

3.- Definir si existe diferencia en el tipo de mutación y frecuencia en el gen *MECP2* entre el grupo de pacientes con diagnóstico de SR clásico y atípico.

4.- Describir en las pacientes el grado de severidad, de acuerdo a la escala de severidad de las guías de 2001.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Es un estudio observacional, descriptivo, transversal, prospectivo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Población objetivo:

Pacientes de nacionalidad mexicana con diagnóstico clínico de SR clásico o atípico, de acuerdo a los criterios diagnósticos del consenso de 2002.

Población elegible:

Casos con diagnóstico clínico de SR clásico o atípico, establecido por Neurólogo Pediatra, que cuenten con expediente en el Instituto Nacional de Pediatría. El diagnóstico será establecido de acuerdo con los criterios internacionales para el diagnóstico de SR revisados en 2002, referidos en el marco teórico (cuadro 2 y 3).

Criterios de inclusión

- a) Pacientes con diagnóstico clínico de SR clásico y atípico.
- b) Cualquier edad.
- c) Firma de carta de consentimiento informado por padres o tutores.

Criterios de exclusión

- a) Pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses (se excluirán de manera temporal).

Tamaño de Muestra

Dada la frecuencia de la entidad, el tamaño de la muestra fue a conveniencia, en nuestro Instituto, el servicio de Neurología tiene un registro de casos en el que se refieren 16 pacientes con diagnóstico de SR clásico y 21 como SR atípico.

Descripción general del estudio

Las pacientes se captaron a través de la consulta del servicio de Neurología y del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, en quienes de acuerdo con los criterios internacionales de 2002 se estableció el diagnóstico de SR clásico y atípico.

Se realizó una historia clínica genética y árbol genealógico por los coautores genetistas clínicos del Departamento de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría. En cada caso se asentaron los datos clínicos para la escala de severidad así como el diagnóstico establecido de SR clásico o atípico en la Hoja de Captación de Datos (ver anexo 3).

Previa firma de carta de consentimiento informado por alguno de los progenitores (ver anexo 2), se obtuvo de cada paciente una muestra de sangre periférica (3ml) para obtener de DNA genómico.

a) Creación del banco de DNA:

Para el estudio molecular del gen *MECP2* se obtuvo el DNA genómico mediante la técnica de precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) a partir de leucocitos de sangre periférica con EDTA como anticoagulante (3-5 mL) del caso índice. El DNA genómico obtenido se cuantificó y se valoró su pureza e integridad mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de DNA se conservaron a 4° C. hasta su análisis.

b) Como estrategia inicial del protocolo, se realizó la búsqueda de las mutaciones p.R168X, p.R270X, p.R306C y p.T158M en el gen *MECP2*:

Las 4 mutaciones se identificaron mediante amplificación por PCR de 3 regiones del exón 4, ya que las mutaciones p.T158M y p.R168X se encuentran en la misma región, se empleó el mismo amplicón para su análisis. Posteriormente se sometieron a restricción con endonucleasas específicas para cada mutación

Los oligonucleótidos de cada secuencia, así como el tamaño del producto amplificado se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3.

Alelo	Primer F.	Primer R.	Tamaño del producto
R168X T158M	5'TTTGTCAGAGCG TTGTCACC 3'	5'CTTCCCAGGACTT TTCTCCA 3'	380 pb
R270X	5'AACCACCTAAGA AGCCCAA 3'	5'CTGCACAGATCG GATAGAAGAC 3'	380 pb
R306C	5'GGCAGGAAGCG AAAAGCTGAG 3'	5'TGAGTGGTGGTG ATGGTGGTGG 3'	366 pb

La amplificación por PCR se realizó mediante condiciones estándar de concentración de reactivos, utilizando Taq polimerasa Gold TM Applied Biosystems.

Las condiciones que se emplearon para la amplificación en el termociclador constaron de 35 ciclos bajo las siguientes condiciones (Tabla 4).

Tabla 4.

Mutación	Condiciones
p.R168X, p. T158M y p.R270X	95° C – 7 minutos
	95° C – 45 segundos
	58° C – 40 segundos
	72° C – 45 segundos
	72° C - 10minutos
	4° C - ∞
p.R306C	95° C – 7 minutos
	95° C – 45 segundos
	65° C – 40 segundos
	72° C – 45 segundos
	72° C – 10 minutos
	4° C - ∞

Posteriormente se sometió a los amplificadores resultantes a restricción con 5U de su respectiva endonucleasa a 37°C por 48 horas.

Las enzimas de restricción y los productos esperados se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 5.

Exón	Mutación	Enzima	Productos WT	Productos mutación	
Exón 4	T158M	NlaIII	380 pb	199 pb	
				181 pb	
Exón 4	R168X	HphI	351pb	227pb	
				21pb	124 pb
				8pb	21 pb
					8 pb
Exón 4	R270X	NlaIV	91 pb	177 pb	
				86 pb	80 pb
				80 pb	74 pb
				74 pb	49 pb
				49 pb	
Exón 4	R306C	HhaI	164 pb	308 pb	
				144 pb	47 pb
				47 pb	11 pb
				11 pb	

El proyecto de Tesis se concluyó hasta esta parte del protocolo; sin embargo, el trabajo de investigación continúa con las siguientes etapas.

c) Caracterización de mutaciones diversas en el gen *MECP2*.

Las pacientes que resulten negativas para las 4 mutaciones previamente descritas, serán sometidas al estudio de tamizaje de otras mutaciones mediante análisis conformacional de cadena sencilla o SSCP. Para ello se amplificarán mediante PCR los 4 exones del gen *MECP2*, con los oligonucleótidos específicos para cada exón.

Debido a los tamaños del exón 3 y 4 estos se dividirán en 2 y 5 regiones respectivamente. Los oligonucléotidos y las secuencias resultantes se enlistan en la tabla 6.

Tabla 6.

Región	Primers	Tamaño del producto
Promotor y exón 1	F: 5'-GGGTGCAATGAAACGCTTA-3' R:5'-TTTACCACAGCCCTCTCTCC-3'	250 pb
Exón 2	F: 5'-GTTATGTCTTTAGTCTTTGG-3' R:5'-TGTGTTTATCTTCAAATGT-3'	364 bp
Exón 3.1	F: 5'- CCTGCCTCTGCTCACTTGTT-3' R:5'-GGGGTCATCATACATGGGTC -3'	339 bp
Exón 3.2	F: 5'- AGCCCGTGCAGCCATCAGCC-3' R:5'-GTTCCCCCGACCCACCCT -3'	349bp
Exón 4.1	F: 5'-TTTGTGAGAGCGTTGTCACC -3' R:5'- CTTCCCAGGACTTTTCTCCA-3'	380bp
Exón 4.2	F: 5'-AACCACCTAAGAAGCCCAAA-3' R:5'-CTGCACAGATCGGATAGAAGAC-3'	380bp
Exón 4.3	F: 5'- GGCAGGAAGCGAAAAGCTGAG-3' R:5'-TGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGG -3'	366bp
Exón 4.4	F: 5'- TGGTGAAGCCCCTGCTGGT-3' R:5'-CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG -3'	414bp
Exón 4.5	F: 5'- GGAGAAGATGCCAGAGGAG-3' R:5'- CGGTAAGAAAACATCCCCAA-3'	411bp

Los amplicones resultantes de la PCR, previa mezcla con acarreador desnaturalizante con urea y tratamiento con choque térmico, se someterán a análisis electroforético en cámara vertical tipo secuenciación en geles de MDE de 0.4mm/32cm. El corrimiento electroforético será a 6-8W por 18-24 horas a temperatura ambiente. Los productos con corrimiento anómalo, serán sometidos a secuenciación automática fluorescente para determinar el tipo de cambio (mutación o polimorfismo) y con ello identificar mutaciones previamente

reportadas o mutaciones propias de la población mexicana aún no reportadas. Aquellos cambios de sentido erróneo o presentes en sitios de splicing, no descritos previamente en la literatura se analizarán *in silico* para predecir si tienen o no un efecto patogénico con el programa PMUT (72). Para confirmar que se traten de un polimorfismo o mutación se analizarán de manera dirigida en 100 individuos sanos. Se considerará un polimorfismo cuando la variante este presente en por lo menos el 1% de la población sana.

Variables del estudio

Se analizaron las siguientes variables:

Sexo	Cualitativa, categórica nominal dicotómica
Edad	Cuantitativa numérica discreta.
Perímetro cefálico	Circunferencia de la cabeza, pasando una cinta métrica flexible por la glabella, eurión, opistocráneo, eurión y glabella. Cualitativa, numérica discreta.
Síndrome de Rett	Cualitativa categórica, nominal, dicotómica. Diagnóstico establecido de acuerdo al consenso de 2002: 1) SR clásico 2) SR atípico
Mutación	Cualitativa , categórica, nominal. 1) p.T158M, 2) p.R168X, 3) p.R270X, 4) p.R360C

Las manifestaciones clínicas en los sistemas enunciados a continuación se analizaron como variables cualitativas, categóricas nominal dicotómicas 1) si = presente, 0) no = ausente:

Desarrollo psicomotor normal: adquisición de habilidades motoras y neurológicas que aparecen de manera sucesiva de acuerdo a la edad cronológica dada.

Retraso mental: trastorno caracterizado por una función intelectual general inferior a la media, con alteración en la capacidad de aprendizaje y adaptación social. (73).

Movimientos estereotipados de manos: movimientos de oscilación rítmica, caracterizados por actos repetitivos de manos como frotamiento, lavado, aplausos (74).

Pérdida del contacto social: pérdida de la capacidad para interactuar con el medio y las personas que rodean al individuo.

Comunicación disfuncional: comunicación resultante de percepciones inexactas, alteración de los filtros internos (interpretaciones personales de la información) y aislamiento social (73).

Afasia o disfasia: pérdida de la comprensión o producción del lenguaje hablado o escrito, o ambos (74).

Deterioro cognitivo: relativo al proceso que empeora y afecta el proceso mental de comprensión, juicio, memorización y razonamiento (73).

Dispraxia: incapacidad de cumplir de manera automática con ciertos movimientos habituales, adaptados a un fin determinado (75).

Alteraciones de la ventilación en vigilia: pérdida del patrón respiratorio normal, dentro de los que se consideran dos tipos, el toracoabdominal y el costal superior con la consecuente aparición de hiperventilación, expulsión forzada de aire o saliva y aerofagia (76).

Bruxismo: Rechinar los dientes de manera inconsciente, durante el sueño o vigilia (73).

Patrón alterado del sueño: alteración en la interrupción fisiológica de la vigilia, en la que ocurre una atenuación y suspensión de las funciones nerviosas, tiempo durante el cual desaparece la motilidad voluntaria y se sustituye por una motilidad automática. Predominio de las manifestaciones neurovegetativas y depresión de la actividad cortical y medular. Se considera que existen tres principales alteraciones del sueño, hipersomnia, insomnio y parasomnias (alteraciones de la conducta durante el sueño) (75).

Hipersomnia: es un trastorno intrínseco del sueño. Cursa con somnolencia excesiva; episodios prolongados de sueño nocturno y episodios de sueño diurno que se producen cada día durante al menos 1 mes con deterioro funcional significativo, en ausencia de insomnio y que no sea producto del efecto del uso de sustancias o fármacos.

Insomnio: es la dificultad para conciliar el sueño o permanecer dormido, o una alteración en el patrón del sueño que, al despertarse, lleva a la percepción de que el sueño ha sido insuficiente.

Parasomnia: es un trastorno de la conducta durante el sueño asociado con episodios breves o parciales de despertar, sin que se produzca una interrupción importante del sueño ni una alteración del nivel de vigilia diurno. El síntoma de presentación suele estar relacionado con la conducta en sí misma. Algunas de las alteraciones que se incluyen son, *jactatio capitis nocturna* (hábito de golpearse la cabeza durante el sueño), el hábito de hablar durante el sueño, las pesadillas y los calambres nocturnos de las piernas.

Tono muscular: estado de tensión del músculo en reposo, el cual es un fenómeno reflejo que se manifiesta como una resistencia pasiva al movimiento cuando el control voluntario está ausente. Contracción muscular sostenida de manera involuntaria.

Atrofia muscular: disminución del volumen y del número de fibras contráctiles de uno o varios músculos (75).

Distonía: perturbaciones del tono muscular en que alternan la hipotonía y la hipertonía. Depende de lesiones del sistema extrapiramidal (75).

Alteraciones vasomotoras periféricas: alteración en el control autonómico de vasoconstricción y vasodilatación en extremidades caracterizado por cambios en la coloración y temperatura de las mismas.

Escoliosis: incurvación lateral de la columna (76).

Epilepsia: grupo de procesos neurológicos caracterizados por episodios recurrentes de convulsiones, trastornos sensoriales, conducta anómala, pérdida de la conciencia o todo ello. Característica común a todas las epilepsias es la existencia de descargas eléctricas incontroladas de las células nerviosas de la corteza cerebral las cuales se evidencian mediante el electroencefalograma (73).

Cifosis: trastorno de la columna vertebral caracterizado por el aumento en la convexidad de la curvatura de la columna dorsal, vista lateralmente (73).

Retraso del crecimiento: ausencia de desarrollo físico normal como consecuencia de factores genéticos, nutritivos, patológicos o psicosociales (73).

Visceromegalia: aumento de tamaño de los órganos que se encuentran en el abdomen tales como hígado y bazo.

Retinopatía: enfermedad ocular no inflamatoria provocada por alteración en los vasos sanguíneos retinianos (73).

Atrofia óptica: degeneración del nervio óptico. Desgaste de la papila óptica como consecuencia de la degeneración de las fibras del nervio óptico y de la cintilla óptica (73).

Catarata: opacidad del cristalino, debido a una alteración en su microarquitectura. Trastorno del cristalino caracterizado por la pérdida de transparencia. Se observa una opacidad gris blanquecina en el cristalino por detrás de la pupila (73).

Aerofagia: deglución de aire, generalmente seguida de la necesidad de eructar, molestias gástricas y meteorismo (73).

Moria: risa inmotivada (75).

Respuesta disminuida al dolor: disminución de la respuesta al estímulo de los nociceptores que se manifiesta como disminución en la sensación espacial, desagradable, molesta e inquietante (75).

Consideraciones éticas

Se solicitó el consentimiento informado de los padres de las pacientes con el diagnóstico de SR (ver anexo 2). Debido a la patología a estudiar no fue posible contar con carta de asentimiento independientemente de la edad de las pacientes. En los casos en que se identifique una mutación, se solicitará carta de consentimiento informado en la madre biológica para determinar en ella si es portadora o no de la mutación, de acuerdo a ello brindarle asesoramiento genético con relación a pronóstico reproductivo así como posibilidad de realizarse diagnóstico prenatal en futuros embarazos.

La información personal, de identidad y del genotipo se manejarán en forma estrictamente confidencial, siguiendo las normas establecidas por la Declaración de Helsinki, La ley General de Salud y las Buenas prácticas Clínicas y de Armonización y del ELSI (del inglés "Ethical, Legal and Social Issues").

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando la base de datos generadas a partir de las hojas de captación de datos por medio de estadística descriptiva. Los resultados se presentan por promedio y la frecuencia de las mutaciones se reportan en porcentaje.

RESULTADOS

Se capturaron un total de 21 pacientes con diagnóstico de SR establecido por el Servicio de Neurología del Instituto Nacional de Pediatría. Todos los casos fueron esporádicos, sin embargo en 3 de ellos (pacientes 2, 3 y 14), se encontró que las madres tuvieron historia de abortos, en el caso 2 además tiene dos hijos varones sanos, en el caso 3 sólo un aborto previo y con relación a la paciente 14, se refiere que la madre tiene una hija y un hijo previos sanos (figura 3).

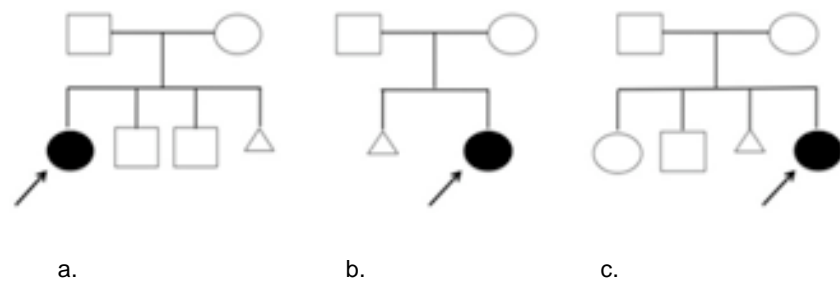
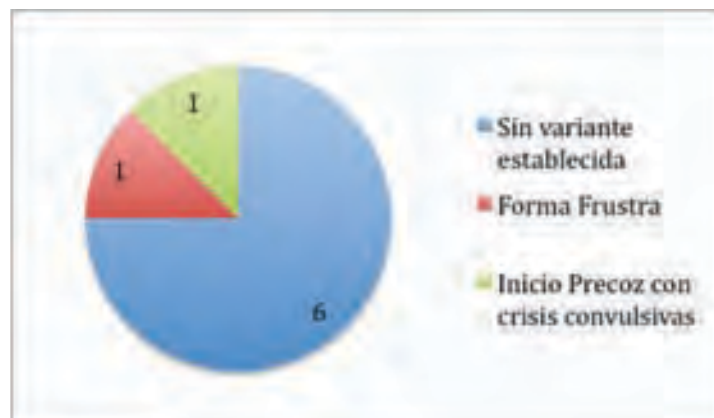


Figura 3. 3a árbol genealógico de la paciente 2. 3b árbol genealógico de la paciente 3. 3c árbol genealógico de la paciente 14.

El rango de edad de las pacientes al momento de la captación de datos fue de 3 a 20 años con una media de 11.1 años de edad. De las 21 pacientes, 13 tenían diagnóstico de SR clásico (61.9%) y 8 SR atípico (38%), estableciendo que el diagnóstico de SR clásico fue más frecuente.

De las 8 pacientes clasificadas como SR atípico, en 2 de los casos se especificó el tipo de variante que presentaban; una paciente con forma frustra y otra con presentación de inicio precoz con crisis convulsivas (gráfica 1).

Gráfica 1. Total de pacientes con SR Atípico.



De acuerdo con la escala de severidad 11 (52.3%) pacientes fueron clasificadas con una severidad moderada, 9 severos (42.8%) y 1 muy severo (4.76%) (ver anexo 4).

De los 13 casos de SR clásico 4 (30.7%) fueron casos moderados, 8 severos (61.5%) y sólo 1 muy severo (7.6%). Mientras que de los 8 casos con SR atípico, 7 (87.5%) fueron casos moderados, dentro de los cuales uno se encuentra clasificado como forma frustra; sólo 1 caso atípico (12.5%) se clasificó como severo el cual correspondió al caso de inicio precoz con crisis convulsivas y no se tuvo ningún caso con SR atípico clasificado como muy severo (Tabla 7).

Tabla 7. Número de pacientes con SR clásico y atípico con escala de severidad.

No. Paciente	Edad	Clasificación	Puntaje de severidad	Severidad
1	12	Clásico	24	Moderada
2	13	Atípico	21	Moderada
3	15	Clásico	28	Severa
4	9	Atípico forma frustra	14	Moderada
5	20	Clásico	25	Severa
6	12	Clásico	29	Severa
7	13	Clásico	28	Severa
8	8	Clásico	20	Moderada
9	9	Clásico	25	Severa
10	15	Clásico	32	Muy severo
11	11	Clásico	28	Severa
12	8	Atípico	15	Moderada
13	14	Atípico	12	Moderada
14	14	Clásico	27	Severa
15	7	Atípico con crisis convulsivas	26	Severa
16	10	Atípico	23	Moderada
17	19	Clásico	30	Severa
18	9	Clásico	14	Moderada
19	7	Clásico	22	Moderada
20	13	Atípico	23	Moderada
21	3	Atípico	18	Moderada

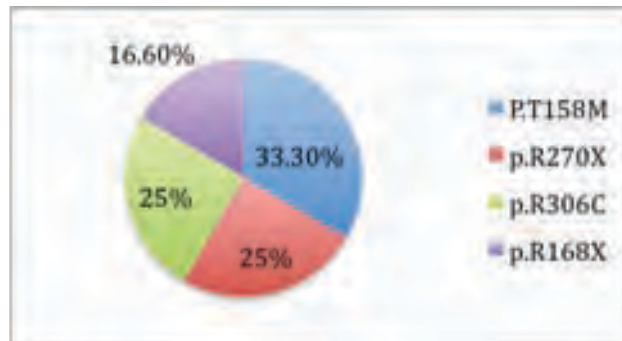
Se identificó una de las 4 mutaciones en 12 de las 21 (57.14%) pacientes. De las cuales 10 (83.3%) tenían diagnóstico SR clásico y 2 (16.6%) SR atípico. En 9 (42.85%) de los casos la mutación no se identificó por medio de la técnica molecular de PCR y restricción (Tabla 8).

Tabla 8. Mutaciones caracterizadas en pacientes con SR clásico y atípico.

No. Paciente	Edad Actual	Clasificación	Severidad	Mutación
1	12	Clásico	Moderada	p.R270X
2	13	Atípico	Moderada	p.R306C
3	15	Clásico	Severa	p.T158M
4	9	Atípico forma frustra	Moderada	Sin mutación caracterizada
5	20	Clásico	Severa	Sin mutación caracterizada
6	12	Clásico	Severa	p.R168X
7	13	Clásico	Severa	p.R270X
8	8	Clásico	Moderada	p.T158M
9	9	Clásico	Muy severa	Sin mutación caracterizada
10	15	Clásico	Muy severa	p.T158M
11	11	Clásico	Severa	p.R270X
12	8	Atípico	Moderada	Sin mutación caracterizada
13	14	Atípico	Moderada	Sin mutación caracterizada
14	14	Clásico	Severa	p.R360C
15	7	Atípico con crisis convulsivas	Severa	p.T158M
16	10	Atípico	Moderada	Sin mutación caracterizada
17	19	Clásico	Severa	p.R168X
18	9	Clásico	Moderada	Sin mutación caracterizada
19	7	Clásico	Moderada	p.R306C
20	13	Atípico	Moderada	Sin mutación caracterizada
21	3	Atípico	Moderada	Sin mutación caracterizada

La mutación más frecuente fue p.T158M, la cual se identificó en 4 de las 12 pacientes, lo cual representa el 33.3% del total de las mutaciones caracterizadas, seguida en orden de frecuencia por p.R270X y p.R306C, las cuales se identificaron en 3 de los casos respectivamente, que corresponde al 25% para cada mutación y finalmente la mutación p.R168X se identificó en 2 casos, que representa el 16.6% (gráfica 2).

Gráfica 2. Total de mutaciones caracterizadas.



De las 4 pacientes en las que se identificó la mutación p.T158M, 3 tenían diagnóstico de SR clásico, uno fue un caso moderado, otro severo y otro muy severo y finalmente el último, fue una paciente con diagnóstico de SR atípico variante de inicio precoz con crisis convulsivas (Imagen1).

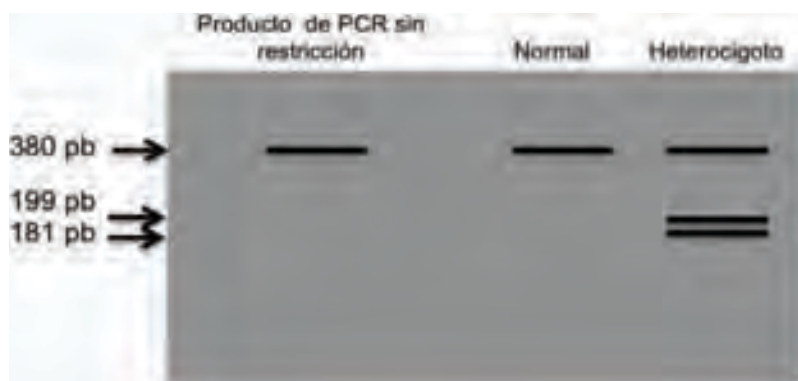


Imagen 1a.



Imagen 1b.

Imagen 1a. Esquema del producto de amplificación del exón 4 sin restricción y los patrones de restricción para el alelo normal y el alelo mutado. **Imagen 1b.** Gel de agarosa al 3%, con amplificación del exón 4 para la identificación de la mutación p.T158M, con un producto de PCR de 380 pb. Se muestran los productos de restricción con la enzima NlaIII. La mutación crea un sitio de restricción lo que genera dos productos; uno de 199 pb y otro de 181 pb (carriles 4,9,10 y 15) en los cuales se observan las bandas correspondientes a 380 pb del alelo normal y la de 199 y 181 pb correspondiente al alelo mutado, las cuales parecen una sola banda gruesa. En los alelos sin mutación el producto amplificado es de 380 pb (carriles 1,2,3,5,6,7,8,11,12,13,14,16,17 y 18). *MP: marcador de peso molecular.*

En la tabla 9 se enlistan las características encontradas en las cuatro pacientes.

Tabla 9. Características clínicas de las pacientes con la mutación p.T158M.

	Paciente no. 3	Paciente no. 8	Paciente no. 10	Paciente no. 15
Diagnóstico	SR clásico	SR clásico	SR clásico	SR atípico (crisis convulsivas)
Severidad	Severa	Moderada	Muy severa	Severa
Edad	15 años	8 años	15 años	7 años
Perímetro cefálico al nacimiento	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior
Desarrollo psicomotor temprano	Subóptimo	Normal	Subóptimo	Subóptimo
Perímetro cefálico actual	Debajo de pc 3	Debajo de pc 3	Debajo de pc 3	Debajo de pc 3
Tono muscular	Alteración severa	Alteración severa	Alteración severa	Alteración severa
Escoliosis	Severa	Sin desviación	Moderada	Moderada
Contracturas	Severas	Ninguna	Severas	Moderadas
Marcha	Sin marcha	Anormal	Sin marcha	Sin marcha

Movimientos estereotipados de manos	Moderados	Dominantes	Dominantes	Dominantes
Movimientos voluntarios de manos	Ninguno	Normales	Ninguno	Ninguno
Alteración en la deglución	Severa	Ninguna	Severa	Ninguna
Discapacidad intelectual	Profunda	Profunda	Profunda	Profunda
Lenguaje	Repentino sin significado	Repetitivo	Repentino sin significado	Repentino sin significado
Epilepsia	En control	No controlada	No controlada	En control
Alteración en el patrón de respiración	No	No	Severa	No
Circulación periférica	Pies fríos, con cambios atróficos	No	No	No
Alteración en el estado de ánimo	Severa	Severa	Agitación	Severa
Desordenes del sueño	No	No	Severos	Severos

En 3 de las afectadas se identificó la mutación p.R270X, todas clasificadas como SR clásico; 2 con severidad moderada y 1 severa (Imagen 2).

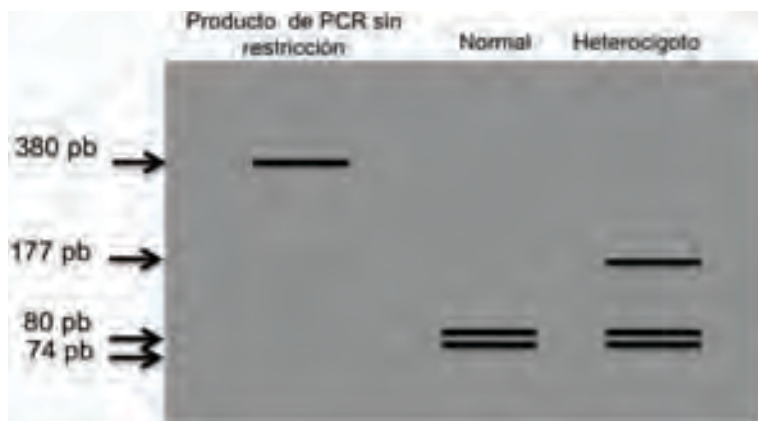


Imagen 2a.

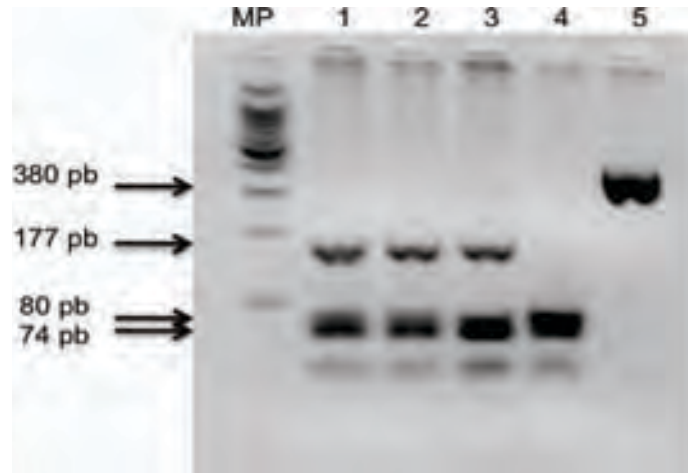


Imagen 2b.

Imagen 2a. Esquema del producto de PCR del exón 4 sin restricción y con restricción para la mutación p.R270X, ejemplificando el alelo normal y el alelo mutado. **Imagen 2b.** Gel de agarosa al 3 %, en el que se evidencian los productos de PCR del exon 4 para la cual se obtiene una banda de 380 pb. La restricción con la enzima NlaIV genera un producto de restricción para el alelo mutado de 177, 80, 74 y 49 pb, en el gel sólo se aprecian las bandas correspondientes a los pesos 177, 80, 74 pb, ya que el tamaño del fragmento de 49 pb, es muy pequeño, no es posible apreciarlo en un gel de este tipo (carriles 1,2 y 3). Para lo alelos normales se generan productos de 91, 86, 80, 74 y 49 pb, dado que la diferencia en tamaño entre los fragmento de 91, 86 y 80 es poca no se logran apreciar como bandas separadas y el producto de 49 pb es muy pequeño para identificarlo con la resolución de este gel (carril 4). En el último carril (carril 5), se encuentra la banda correspondiente al producto de PCR sin restricción de 380 pb. En los cuatro primeros carriles se observa al final una banda que corresponde a dímeros de primers. *MP: Marcador de peso molecular.*

A continuación de consignan las características de las pacientes en la tabla 10.

Tabla 10. Características clínicas de las pacientes con la mutación p.R270X.

	Paciente no. 1	Paciente no. 7	Paciente no. 11
Diagnóstico	SR clásico	SR clásico	SR clásico
Severidad	Moderada	Severa	Severa
Edad	12 años	13 años	11 años
Perímetro cefálico al nacimiento	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior
Desarrollo psicomotor temprano	Normal	Subóptimo	Subóptimo
Perímetro cefálico actual	Entre pc 3-10	Debajo de pc 3	Debajo de pc 3
Tono muscular	Alteración severa	Alteración severa	Alteración severa
Escoliosis	Moderada	Moderada	Moderada
Contracturas	Ninguna	Moderadas	Severas

Marcha	Anormal	Anormal	Anormal
Movimientos estereotipados de manos	Moderados	Dominantes	Dominantes
Movimientos voluntarios de manos	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Alteración en la deglución	Ninguna	Leve	Leve
Discapacidad intelectual	Profunda	Profunda	Profunda
Lenguaje	Repentino con algunas palabras comprensibles	Repentino sin significado	Repentino sin significado
Epilepsia	No controlada	No controlada	No controlada
Alteración en el patrón de respiración	Moderada	Moderada	Moderada
Circulación periférica	Pies fríos, con cambios atróficos	Pies fríos, con cambios de coloración no atróficos	Pies fríos, con cambios atróficos
Alteración en el estado de ánimo	Severa	Severa	Severa
Desordenes del sueño	Severos	No	Presente, pero no severos

Para la mutación p.R306C, de los 3 casos, dos eran SR clásico; uno de ellos era severo y otro moderado y la tercer paciente con SR atípico, sin variante definida con severidad moderada (Imagen 3).

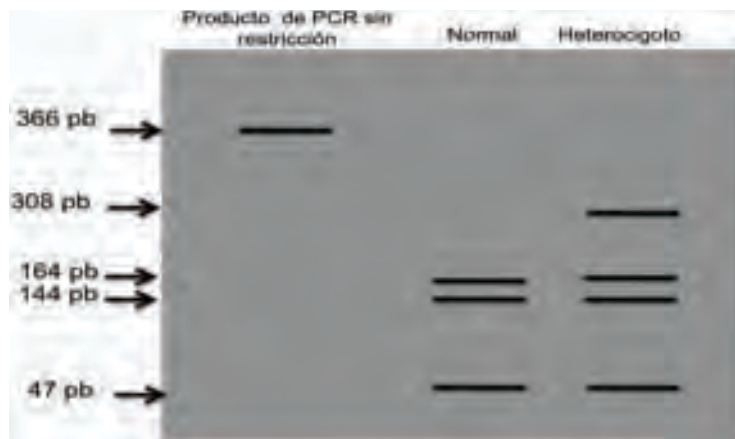


Imagen 3a.

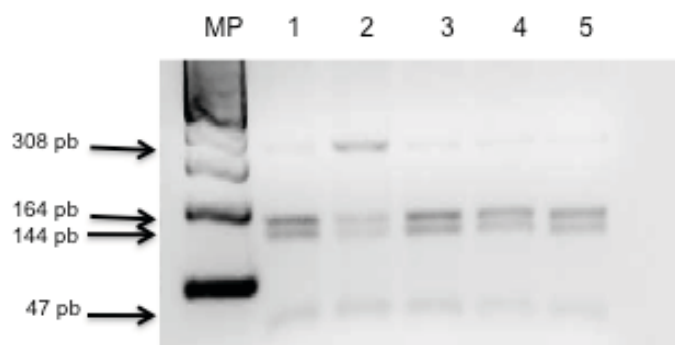


Imagen 3b.

Imagen 3a. Esquema del producto de PCR del exón 4 sin restricción y con restricción para la mutación p.R306C, ejemplificando el alelo normal y el alelo mutado. **Imagen 3b.** Gel de agarosa al 3 %, en el que se evidencian los productos de PCR y restricción con la enzima HhaI. Se genera un producto de restricción para el alelo mutado de 308, 47 y 11 pb, en una paciente con mutación en estado heterocigoto se observan 4 bandas correspondientes a un fragmento de 308 pb del alelo mutado y las bandas de 164 y 144pb que corresponden al alelo normal y una banda de 47 pb de ambos alelos (carril 2). Mientras que para los casos en los que no se observó la mutación, se obtuvo un producto de 164, 144, 47 y 11pb en los que se aprecian los fragmentos de 164,144 y 47 y no se observa el de 11 pb de bases por lo pequeño del tamaño (carriles 1,3,4 y 5). *MP: marcador de peso molecular.*

En la tabla 11, se enlistan las características de las pacientes con ésta mutación.

Tabla 11. Características clínicas de las pacientes con la mutación p.R306C.

	Paciente no. 2	Paciente no. 14	Paciente no. 19
Diagnóstico	SR atípico	SR clásico	SR clásico
Severidad	Moderada	Severa	Severa
Edad	13 años	14 años	7 años
Perímetro cefálico al nacimiento	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior
Desarrollo psicomotor temprano	Subóptimo	Subóptimo	Subóptimo
Perímetro cefálico actual	Debajo de pc 3	Entre pc 3-10	Debajo de pc 3
Tono muscular	Alteración severa	Alteración severa	Alteración severa

Escoliosis	Moderada	Moderada	Moderada
Contracturas	Moderadas	Severas	Ninguna
Marcha	Anormal	Anormal	Anormal
Movimientos estereotipados de manos	Moderados	Dominantes	Dominantes
Movimientos voluntarios de manos	Ninguno	Intermitentes	Ninguno
Alteración en la deglución	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Discapacidad intelectual	Moderada	Profunda	Profunda
Lenguaje	Repentino sin significado	Repentino sin significado	Repentino con algunas palabras comprensibles
Epilepsia	En control	No controlada	En control
Alteración en el patrón de respiración	No, ritmo normal	Severa	Moderada
Circulación periférica	Pies fríos, con cambios atróficos	Pies fríos, con cambios de coloración no atróficos	Pies fríos, con cambios de coloración no atróficos
Alteración en el estado de ánimo	Severa	No	Agitación
Desordenes del sueño	Patrón normal	Severo	Patrón normal

Por último la mutación p.R168X presente en 2 de los casos los cuales tenían diagnóstico de SR clásico severo (Imagen 4).

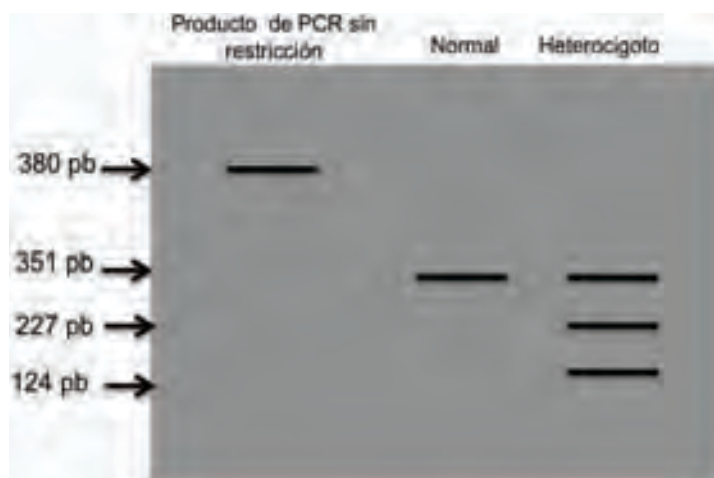


Imagen 4a.

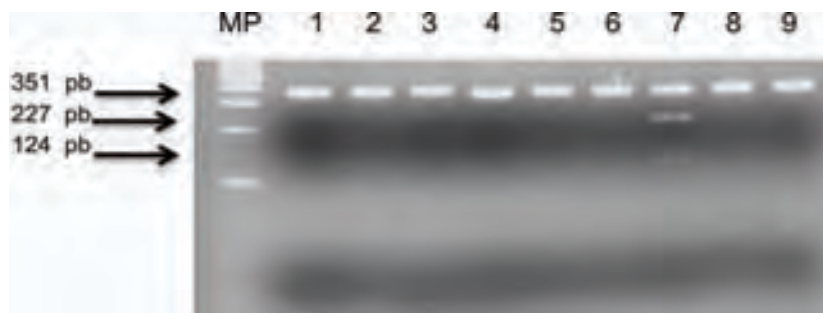


Imagen 4b.

Imagen 4a. Esquema del producto de PCR del exón 4 sin restricción y con restricción para la mutación p.R168X, ejemplificando el alelo normal y el alelo mutado. **Imagen 4b.** Gel de agarosa al 3 %, en el que se muestran los productos de PCR y restricción con la enzima HphI. Se genera un producto de restricción para el alelo mutado de 227,124, 21 y 8 pb, en donde se aprecia la banda de 351 pb del alelo normal y las bandas de 227 y 124 pb correspondientes al alelo mutado, las bandas de 21 y 8 pb son muy pequeñas para apreciarlas en este tipo de gel (carril 7). Mientras que para el alelo normal se obtiene un producto de 351, 21 y 8 pb (carriles 1,2,3,4,5,6,8 y 9), en los cuales sólo se aprecia la banda de 351 pb, mientras que los productos de 21 y 8 pb no se ven por el tamaño pequeño. *MP: marcador de peso molecular.*

Las características de las pacientes con esta mutación se describen a continuación en la tabla 12.

Tabla 12. Características clínicas de las pacientes con la mutación p.R168X.

	Paciente no. 6	Paciente no. 17
Diagnóstico	SR clásico	SR clásico
Severidad	Severa	Severa
Edad	12 años	19 años
Perímetro cefálico al nacimiento	Normal con desaceleración posterior	Normal con desaceleración posterior
Desarrollo psicomotor temprano	Subóptimo	Subóptimo
Perímetro cefálico actual	Debajo de pc 3	Por debajo de pc 3

Tono muscular	Alteración severa	Alteración severa
Escoliosis	Moderada	Severa
Contracturas	Severas	Moderadas
Marcha	Marcha anormal	Sin marcha
Movimientos estereotipados de manos	Moderados	Dominantes
Movimientos voluntarios de manos	Ninguno	Reducidos
Alteración en la deglución	Leve	Severa
Discapacidad intelectual	Profunda	Profunda
Lenguaje	Repentino sin significado	Repentino sin significado
Epilepsia	En control	No controlada
Alteración en el patrón de respiración	Moderada	Ritmo normal
Circulación periférica	Pies fríos, con cambios atróficos	Pies fríos, con cambios de coloración no atróficos
Alteración en el estado de ánimo	Severa	Agitación
Desordenes del sueño	Patrón normal	Presente pero no severo

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados encontrados y en congruencia con lo previamente reportado, todos los casos fueron esporádicos ya que en la historia clínica de las pacientes no hay datos que apoyen casos familiares. Las madres que tuvieron historia de un aborto, no cuentan con información suficiente que sustente la etiología de la pérdida gestacional y debido a que las causas son heterogéneas, no es posible establecer, si mutaciones en *MECP2* fueron causales de estas pérdidas; sin embargo, en un futuro se tiene contemplado estudiar a las mamás de las pacientes con mutación caracterizada para corroborar que son casos esporádicos o descartar la posibilidad de mosaico en alguna de las madres, ya que de identificarse esto último, podría explicar la causa de las pérdidas gestacionales.

Las edades de las pacientes, reflejan la variabilidad del inicio y establecimiento del diagnóstico, sin embargo la edad consignada es a la cual se capturaron los datos, lo que impide establecer una conclusión acerca de la instauración de los síntomas y correlacionarlo con la severidad y el tipo de mutación. El diagnóstico clínico certero, generalmente se establece, en promedio a los 12 años de edad, lo que se refleja en la muestra, en donde el

promedio de edad fue de 11.1 años. En el caso de la paciente más joven (3 años) no se logró identificar la mutación y se encuentra clasificada como SR atípico, aún sin una variante definida y la paciente de mayor edad fue un caso con SR clásico de 20 años de edad, en quien se identificó la mutación p.R168X y de acuerdo con la escala de severidad se clasificó como severa. En ningún caso se documentó alguna defunción ya que sólo incluimos pacientes con expediente activo en el Instituto, por lo que no podemos hablar de sobrevivencia.

El 61.9% de las pacientes tuvieron diagnóstico de SR clásico y 38% SR atípico y de estas últimas sólo en dos se especificaba el tipo de variante y sólo en dos se caracterizó la mutación responsable. El porcentaje de paciente con SR atípico es mayor en nuestra casuística a lo reportado, ya que se refiere en la literatura que representan sólo el 10% de los casos, sin embargo, como se mencionó previamente, seis casos aún no han sido clasificados y según otras publicaciones, algunas pacientes son reclasificadas como SR clásico al paso del tiempo, haciendo difícil el diagnóstico de SR atípico y al ser el presente un estudio transversal, en este momento no se puede conocer el curso posterior del padecimiento.

De acuerdo con la escala de severidad el 61% de los casos con SR clásico tiene una presentación severa mientras que el 87% de las pacientes con SR atípico tienen un fenotipo moderado, sin embargo se ha visto que la severidad incrementa con la edad en ambos casos (88). Esto puede afectar el grado de severidad atribuida a cada paciente y ser un factor de confusión en la correlación fenotipo-genotipo.

De las 21 pacientes captadas en 12 (57%) se identificó una de las cuatro mutaciones. Estas mutaciones son cuatro de las ocho mutaciones más frecuentes a nivel mundial, que representan el 70% de los casos, lo cual varía de acuerdo con el país teniendo un rango de entre 44 y 72%. Consideramos que la tasa de detección está relacionada en primer lugar al porcentaje de pacientes con SR atípico que se incluyeron, ya que en otros trabajos donde se reporta una tasa más alta de detección sólo se incluyen pacientes con SR clásico (54) y en segundo lugar porque hasta el momento sólo se han analizado cuatro mutaciones con una sola técnica molecular, por lo que se espera que el análisis por secuenciación eleve nuestro índice de detección de mutaciones.

De las 12 pacientes en las que se caracterizó la mutación, el 83.3% tenía diagnóstico de SR clásico y 16.6% atípico, dato que corresponde a lo previamente publicado, pues se ha encontrado que 80% de las pacientes con SR clásico tiene una mutación en *MECP2* y sólo de 30 a 50% de aquellas con variantes atípicas, lo cual se explica porque en estas últimas también se han reportado otros genes responsables del cuadro clínico como *CDLK5* y recientemente *FOXG1* y *Netrin G1* (84,85).

La mutación más frecuente fue p.T158M (33.3%), al igual que ocurre en países como Italia, Estados Unidos, Gran Bretaña y China, sin embargo a nivel mundial ocupa el tercer lugar en frecuencia. En segundo lugar se encuentran las mutaciones p.R270X y p.R306C (25%

respectivamente), que ocupan el segundo y cuarto lugar en frecuencia y la mutación menos frecuente fue p.R168X (16.6%), que es la mutación más frecuente a nivel mundial. Aún cuando la muestra es pequeña comparada con otras publicaciones y no es posible establecer frecuencias exactas, si se evidencia que existe variabilidad entre poblaciones y es importante conocer el comportamiento de la nuestra para establecer una búsqueda diagnóstica efectiva en nuestro país, de acuerdo con las mutaciones más frecuentes en la población mexicana.

La mutación p.T158M, es un cambio de sentido erróneo en el dominio MBD, y es considerada una mutación moderada en algunos trabajos y severa en otros (86). En estudios de correlación genotipo-fenotipo, se describen pacientes con un patrón atípico en la infancia que se vuelve clásico en la adolescencia, por lo que muchas pacientes son diagnosticadas como formas frustas y reclasificadas como SR clásico más tarde. Clínicamente se mencionan que conservan la deambulación relativamente a pesar de la hipotonía y tienen un lento desarrollo de la escoliosis, además son hiperactivas y con alteración del estado de ánimo. Todas tiene epilepsia en algún momento de la vida o irregularidades en el patrón de respiración. La escala de severidad aumenta con la edad, ya que pierden la marcha en la adultez (5,53,54).

De las cuatro pacientes en la que se encontró la mutación p.T158M en este trabajo (tabla 9), tres tenían diagnóstico de SR clásico (una con severidad moderada, otra severa, una muy severa) y la cuarta SR atípico, variante de crisis convulsivas. En los casos severos y en el caso muy severo el desarrollo psicomotor fue subóptimo desde el nacimiento. Todas las pacientes tuvieron una alteración severa en el tono muscular, lo cual se ha reportado en la literatura para esta mutación. La escoliosis se consignó en las pacientes con SR clásico severo y muy severo al igual que en la paciente con SR atípico, sin embargo no se observó en la paciente con SR clásico moderado (paciente 8), que cabe mencionar tiene menor edad que las otras dos pacientes con SR clásico, por lo que pudiera ser que la escoliosis sea una manifestación dependiente de la edad en pacientes con esta mutación. Tres de las pacientes no tenían marcha (casos 3, 10 y 15) y esto llama la atención ya que se refiere que la marcha se pierde hasta la edad adulta. Todas las pacientes cursan con epilepsia y sólo en dos se considera que están controladas (pacientes 3 y 15), lo cual es consistente con descripciones previas que correlacionana fenotipo-genotipo. Sólo la paciente número 10, la cual tiene el fenotipo más severo, tiene alteraciones en el patrón de respiración y finalmente como dato importante, debido a lo constante del síntoma, es que las cuatro pacientes presentaron alteraciones graves en el estado de ánimo, lo cual también ha sido descrito.

En la literatura, p.T158M se reporta como una mutación severa pero hay publicaciones que la consideran moderada e incluso asociado a una forma frustra. De acuerdo con nuestros datos, se podría considerar una mutación severa, ya que el único caso clasificado como muy severo se encuentra en este grupo de pacientes y la paciente con el fenotipo moderado tiene menor edad (tabla 9). En el caso de la paciente número 15 con SR atípico la variante es

precoz con crisis convulsivas y en la literatura son pocas las pacientes con ésta variante las que se relacionan con mutaciones en *MECP2*.

La mutación p.R270X, es un cambio sin sentido localizado en TRD y NLS y se ha asociado con el diagnóstico de Rett clásico con fenotipo muy severo. En estas pacientes generalmente se establece o se sospecha el diagnóstico después de los dos años de edad, siendo confirmado a medida que avanza la edad. Son pacientes que pueden no presentar todas las características descritas para SR y la supervivencia después de los 30 años es rara (53,54). También se describe esta mutación en pacientes con SR atípico con preservación del lenguaje (89). En este estudio, las tres pacientes con esta mutación tuvieron SR clásico: dos con fenotipos severos y una moderado (tabla 10). En todas las pacientes se consigno, escoliosis moderada, marcha anormal, ninguna mantenía movimientos voluntarios de manos, todas tenían epilepsia sin control, un patrón de respiración alterado, alteración de la circulación periférica y cambios severos del estado de ánimo. Sin embargo, sólo las dos pacientes con fenotipo severo (casos 7 y 11) tuvieron alteración en la deglución la cual era leve y el grado de contracturas fue variable. La paciente de presentación moderada (caso número 1), es la única en la que se refiere lenguaje repentino con algunas palabras comprensibles.

De acuerdo con los datos obtenidos en nuestras tres pacientes (tabla 10), se podría considerar a p.R270X una mutación severa, a diferencia de las descripciones encontradas en las que se reporta como muy severa, aunque el número de pacientes en este estudio con la mutación p.R270X es muy bajo, ninguna de las tres fue clasificada como muy severa, sin embargo las edades de las pacientes son muy parecidas (11 a 13 años) y como hemos mencionado la severidad puede aumentarse con la edad. En la literatura, se consignan tanto pacientes con SR clásico y SR atípico con preservación del lenguaje y se piensa que esta diferencia está dada por los patrones de inactivación del cromosoma X, por lo que se considera en realidad parte del mismo espectro por lo que no es de extrañar que nuestras tres pacientes tengan el diagnóstico de SR clásico y que la clasificada con severidad moderada, sea la que preserva parcialmente el lenguaje (paciente número 1) (89). De las manifestaciones clínicas a vigilar, de acuerdo a lo previamente descrito, en las pacientes con esta mutación son la epilepsia que es de difícil control, el patrón de respiración, los cambios vasculares periféricos así como los cambios en el estado de ánimo.

La mutación p.R306C, también considerada una de las mutaciones más comunes en SR, está localizada en el dominio TRD. El fenotipo de las pacientes se ha asociado a la variante forma frustra en la infancia y SR clásico en el adulto joven. Sin embargo no hay concordancia entre los diferentes reportes ya que en algunos se considera una mutación moderada y en otros severa, por lo que ha sido difícil establecer una correlación fenotípica. Las características descritas, son la progresión moderada de los síntomas neurológicos, espasticidad de miembros pélvicos (desarrollo de pie equinovaro), por lo que pierden la marcha y sí presentan epilepsia ésta es de fácil control. La escoliosis es leve y rara vez

requiere corrección quirúrgica además se menciona que tienen un temperamento tranquilo. Se ha reportado un caso severo por las alteraciones en el patrón de respiración y alteraciones autonómicas importantes (53). En otro estudio se menciona que las pacientes con esta mutación tienen menor probabilidad de caminar solas, preservar el lenguaje y de tener un uso propositivo de manos (86).

En este trabajo, en tres pacientes se encontró la mutación p.R306C, dos clasificadas como SR clásico severo y una SR atípico sin variante definida con severidad moderada (tabla 11). Todas las pacientes presentaron alteración importante del tono muscular, lo que concuerda con los síntomas neurológicos reportados, sin embargo no está definido si efectivamente tuvieron una progresión lenta, ya que incluso la paciente número 19 que es la más joven (7 años) la presenta. La escoliosis moderada se encontró en todas y la frecuencia de las contracturas fue variable. En todos los casos se reporta marcha anormal a pesar de que dos tienen contracturas (casos 2 y 14), distinto a lo que se describe en la literatura en la que se refiere pérdida de la marcha, sin embargo, esto puede depender del tiempo de evolución. La epilepsia en dos de las tres pacientes está controlada (casos 2 y 19), lo que parece concuerda con descripciones previas. El temperamento no fue un dato constante que nos permita establecer una conclusión. Otra característica constante y previamente descrita, es que ninguna paciente tenía movimientos propositivos de manos. Por último, en la paciente número 14, la de mayor edad en este grupo (14 años), se identificaron alteraciones severas del patrón respiratorio, circulación periférica y del patrón del sueño, características que pudieran formar parte de la evolución en pacientes con esta mutación lo que nos obligaría a vigilarlas estrechamente e implementar de manera oportuna medidas terapéuticas.

Por último la mutación p.R168X, también se localiza en el dominio MBD y se considera una mutación severa, que se ha asociado a la variante de preservación del lenguaje aunque se describen pacientes en las que la característica principal es la pérdida del habla y de la marcha (54, 86, 89). En este trabajo, fue la mutación menos frecuente, los dos casos en los que se encontró son SR clásico severo (tabla 12). Ambas a pesar de la diferencia de edad (12 y 19 años), presentaban alteración importante del tono muscular, en la paciente de mayor edad, se consigna que tenía escoliosis severa, sin embargo las contracturas eran de mayor severidad en la paciente de 12 años con la marcha anormal, ambas tenían alteración en la deglución que iba de leve a severa lo cual está acorde con la edad, en ningún caso el lenguaje es comprensible, la epilepsia fue de difícil control sólo en la paciente número 17. Ambas tienen cambios atróficos en pies. La paciente número 17 tenía alteración del estado de ánimo y del patrón de sueño pero no de manera importante. De acuerdo con lo observado en el presente trabajo y lo publicado previamente, podemos considerar a la mutación p.R168X como severa, la cual se incrementa con la edad, como se observó en la paciente número 17, que es la de mayor edad quien ya no conserva la marcha o el lenguaje, la epilepsia es de difícil control y la escoliosis es más grave.

En la mayoría de los casos existe una gran variabilidad fenotípica y no es posible una correlación fenotipo-genotipo exacta. Una de las explicaciones son las modificaciones epigenéticas como la inactivación del X, ya que se ha visto, que el alelo normal está preferencialmente inactivado en los casos severos a diferencia de los casos moderados, sin embargo los estudios de inactivación se llevan en linfocitos y los patrones podrían ser distintos a nivel neuronal (87). Otro factor actualmente en estudio son polimorfismos en genes blanco como *BDNF* (específicamente el polimorfismo p.V66M), que se considera actúa como modificador de la enfermedad y se ha correlacionado con el grado de severidad. Esto se estudió en 125 pacientes captadas a través de la base de datos Australiana (The Australian Rett Syndrome Database) y de una cohorte Israelí con mutaciones en *MECP2* confirmadas, en la que se hizo una correlación de la severidad y el polimorfismo, encontrando que las pacientes heterocigotas (Val/Met) tenían un fenotipo más severo (incremento de 2.1 puntos en la escala de severidad de Percy, $p= 0.09$) que las pacientes homocigotas (Val/Val). Este hallazgo fue especialmente importante en aquellas pacientes con la mutación p.R168X, ya que hubo un incremento de 6 puntos en la escala de severidad, asociándose a un inicio más temprano de crisis convulsivas. Sin embargo esta asociación no se encontró en pacientes con la mutación p.T158M (90). Estos hallazgos han sugerido que la actividad de *BDNF* es importante en la patogénesis de SR, papel que puede no ser específico y que en general puede estar implicado en la sobrevivencia y plasticidad neuronal o bien tener una vía común con *MECP2*. Además, estudios en animales han demostrado que el efecto de *BDNF* es específico de género ya que la deficiencia de este gen en machos produce hiperactividad pero no cambios depresivos, a diferencia de las hembras en quienes no se encontró ningún dato motor, pero si comportamiento depresivo. El efecto de *BDNF* condiciona que el entendimiento del SR sea más complejo.

Se requiere de un mayor número de pacientes para lograr establecer una relación entre las mutaciones y el cuadro clínico esperado así como el contar con la unificación de las escalas de severidad actualmente utilizadas y ajustar los resultados a la edad de las pacientes para poder comparar los trabajos realizados en distintos países, ya que existen mutaciones que se reportan con severidades distintas de acuerdo con la escala utilizada; un ejemplo de ello es el cuadro clínico reportado para las mutaciones p.T158M y p.R306C para las cuales la correlación genotipo fenotipo no ha sido consistente (5,53,54,86,87).

En la medida en que logremos un mayor entendimiento de la enfermedad y el efecto que causan cada una de las mutaciones encontradas, podremos brindar un asesoramiento certero y la posibilidad de un pronóstico que tenga ingerencia directa en el manejo adecuado y oportuno de las pacientes. Aunque como vimos el efecto fenotípico no sólo está determinado por una mutación específica, si no por diversos factores modificadores que hacen que el padecimiento sea prácticamente exclusivo de cada paciente. A pesar de esto, el establecimiento de un diagnóstico certero y una aproximación del pronóstico son herramientas invaluable en el manejo de las pacientes.

CONCLUSIONES.

Sí bien el diagnóstico de SR es clínico, el abordaje recomendado es la búsqueda de mutaciones en el exón 3 y 4 del gen *MECP2*, ya que es donde se localizan las mutaciones más frecuentes a nivel mundial y ahora sabemos que también en nuestro país.

En este trabajo, mediante la técnica de PCR y restricción para cuatro mutaciones se obtuvo una tasa de detección de 57.14%, la cual consideramos se incrementará con el empleo de nuevas técnicas así como con el estudio del promotor y de los exones 1 y 2 del gen. La mutación más frecuente fue la p.T158M, seguida por p.R270X y p.R306C y por último por la p.R168X. Sí bien la mutación p.T158M no es la más frecuente a nivel mundial ocupando el tercer lugar en frecuencia, sí lo es para países como Italia, Estados Unidos, Gran Bretaña y China. Llama la atención que la mutación p.R168X es a nivel mundial, la más común y en este estudio fue la de menor frecuencia. La mutación responsable en el presente trabajo se identificó con mayor frecuencia en los casos de SR clásico, lo cual es congruente ya que actualmente se sabe que existen otros genes responsables de SR atípico.

La mutación p.T158M, tiene un amplio grado de severidad, el cual aumenta con la edad. En nuestros casos, algo constante e independiente de la edad fue la alteración severa en el estado de ánimo, por lo que de ser posible, tendrá que ser un aspecto a vigilar de manera temprana en estas pacientes.

La mutación p.R270X, se comportó como severa en nuestros casos y las pacientes se caracterizaron por presentar escoliosis moderada, marcha anormal, epilepsia de difícil control, alteraciones en el patrón de respiración, de la circulación periférica y del estado de ánimo. En la literatura, esta mutación en algunos casos se asocia a SR atípico con preservación del lenguaje o bien en pacientes con SR clásico con lenguaje preservado por lo que actualmente se piensa son parte del mismo espectro.

La mutación p.R306C es severa y las manifestaciones relevantes son la escoliosis moderada, la preservación anormal de la marcha y los cambios vasculares periféricos. Finalmente la mutación p.R168X también se considera severa, la cual aumenta con la edad, lo que se corroboró en este trabajo en las pacientes en las que se identificó esta mutación.

Las asociaciones fenotipo-genotipo al parecer no son exactas, lo que puede explicarse por la presencia de otros factores como modificaciones epigenéticas o polimorfismos en genes blanco que hacen que a pesar de que dos individuos compartan la misma mutación, la enfermedad se manifieste de manera diferente, sin embargo, el estudio molecular permite la confirmación diagnóstica, principalmente en SR atípico y ciertas aproximaciones del pronóstico para un manejo médico más apropiado.

Anexo 1. Escala para las diferentes manifestaciones clínicas

A	Perímetro cefálico durante el primer año de vida.
1	Por debajo de la percentila 3
2	Normal al nacimiento con desaceleración posterior
0	Normal al nacimiento sin desaceleración
B	Desarrollo psicomotor temprano (hasta los 12 meses)
2	Sin progreso
1	Progreso subóptimo
0	Progreso normal
C	Perímetro cefálico actual
2	Debajo de la percentila 3
1	Entre la percentila 3 y 10
0	Por arriba de la percentila 10
D	Peso
2	Por debajo de la percentila 3
1	Entre la percentlia 3 y 10
0	Por arriba de la percentila 10
E	Talla
2	Por debajo de la percentila 3
1	Entre la percentlia 3 y 10
0	Por arriba de la percentila 10
F	Tono muscular
2	Hipotonía severa, distonía o hipertonía
1	Tono moderadamente anormal
0	Normal
G	Postura de columna
2	Escoliosis severa
1	Escoliosis moderada
0	Sin desviación
H	Contracturas
2	Contracturas severa
1	Contracturas moderadas

0	Ninguna
I	Funciones motoras gruesas
2	Sin marcha a pesar de soporte
1	Marcha anormal
0	Marcha normal
J	Movimientos estereotipados de manos
2	Dominantes o constantes
1	Moderados o intermitentes
0	Ninguno
K	Otros movimientos involuntarios (Temblor, corea, distonia y ateatosis)
2	Dominantes o constantes
1	Moderados o intermitentes
0	Ninguno
L	Movimientos voluntarios de manos
2	Ninguno
1	Reducidos o pocos
0	Normales
M	Alteración en la mecánica de la deglución
2	Severa (aversión a al alimentación; náusea; asfixia; requiere gastrostomía)
1	Leve (deglución lenta)
0	Ninguna
N	Discapacidad intelectual
2	Profunda
1	Moderada
0	Ninguna
O	Lenguaje
2	Usado repentinamente sin significado
1	Repentinamente con algunas palabras comprensibles
0	Lenguaje normal
P	Epilepsia
2	No controlada o pobremente controlada

1	En control o historia de alguna crisis convulsiva
0	Nunca ha presentado una crisis convulsiva
Q	Alteración al despertar o alteración en la respiración
2	Severa, con apnea y cambios en la coloración
1	Moderada, sin episodios de apnea o cambios de coloración
0	Ritmo respiratorio normal
R	Circulación periférica de extremidades
2	Frías con cambios de coloración y cambios atróficos
1	Frías con cambios de coloración sin cambios atróficos
0	Color y temperatura normal
S	Alteración en el estado de ánimo
2	Severa; agitación, gritos y llanto
1	Agitación
0	Normal
T	Desordenes del sueño
2	Severas, vigila de noche y somnolencia diurna
1	Presente, pero no severa
0	Patrón normal de sueño

ANEXO 2

ANÁLISIS DEL GEN MECP2 EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE RETT CLÁSICO Y ATÍPICO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F., a ____ de _____ del 20__

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hija _____ participe en el proyecto "Análisis molecular del gen *MECP2* en pacientes con Síndrome de Rett clásico y atípico", que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere la toma de una muestra de sangre de 3 mL, tomada por personal calificado con todos los requisitos de seguridad: equipo nuevo y guantes, la toma de muestra en ocasiones puede condicionar molestias leves locales como dolor o enrojecimiento, las cuales son transitorias. Además, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético de mi hija el cual será utilizado exclusivamente para este estudio, que tiene como objetivo identificar el cambio o mutación en la información genética de mi hija para comprender mejor la causa que origina esta enfermedad.

Así mismo, se me ha indicado que toda la información derivada del análisis de la muestra para este estudio es absolutamente confidencial y que sólo se nos informará de ella a los padres biológicos de la paciente, también se nos ha explicado que este estudio no tendrá ningún costo para nosotros, que nuestra participación es completamente voluntaria y no recibiré ningún pago, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención a mi hija.

Firma, nombre y dirección de Padre o Tutor

Firma, nombre y dirección de Testigo

Firma, nombre y dirección de Testigo

Médico Responsable: Dra. Ariadna González del Ángel. Depto. Genética, Laboratorio de Biología Molecular. Tel. 10840900 ext. 1306.

Dr. Alberto Olaya V. Presidente del comité de ética, Instituto Nacional de Pediatría. Tel. 10-84-09-00 Ext. 1581

ANEXO 3

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN MECP2 EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE
SÍNDROME DE RETT CLÁSICO Y ATÍPICO.**

NO. DE PACIENTE _____ **FECHA:** _____

NOMBRE _____ **EDAD** _____

NO. EXPEDIENTE _____

NOMBRE DE LA MADRE _____

NOMBRE DEL PADRE _____

TELÉFONO _____ **DOMICILIO:** _____

FECHA DE TOMA DE MUESTRA PARA DNA: _____

No. DE MUESTRA _____

1. Árbol Genealógico

2. Escala de severidad

A	Perímetro cefálico durante el primer año de vida.	
2	Por debajo de la percentila 3	
1	Normal al nacimiento con desaceleración posterior	
0	Normal al nacimiento sin desaceleración	
B	Desarrollo psicomotor temprano (hasta los 12 meses)	
2	Sin progreso	
1	Progreso subóptimo	
0	Progreso normal	
C	Perímetro cefálico actual	
2	Debajo de la percentila 3	
1	Entre la percentila 3 y 10	
0	Por arriba de la percentila 10	
D	Peso	
2	Por debajo de la percentila 3	
1	Entre la percentila 3 y 10	
0	Por arriba de la percentila 10	
E	Talla	
2	Por debajo de la percentila 3	
1	Entre la percentila 3 y 10	
0	Por arriba de la percentila 10	
F	Tono muscular	
2	Hipotonía severa, distonía o hipertonía	
1	Tono moderadamente anormal	
0	Normal	
G	Postura de columna	
2	Escoliosis severa	
1	Escoliosis moderada	
0	Sin desviación	
H	Contracturas	
2	Contracturas severa	
1	Contracturas moderadas	
0	Ninguna	

I	Funciones motoras gruesas	
2	Sin marcha a pesar de soporte	
1	Marcha anormal	
0	Marcha normal	
J	Movimientos estereotipados de manos	
2	Dominantes o constantes	
1	Moderados o intermitentes	
0	Ninguno	
K	Otros movimientos involuntarios (Temblor, corea, distonia y ateatosis)	
2	Dominantes o constantes	
1	Moderados o intermitentes	
0	Ninguno	
L	Movimientos voluntarios de manos	
2	Ninguno	
1	Reducidos o pocos	
0	Normales	
M	Alteración en la mecánica de la deglución	
2	Severa (aversión a al alimentación; náusea; asfixia; requiere gastrostomía)	
1	Leve (deglución lenta)	
0	Ninguna	
N	Discapacidad intelectual	
2	Profunda	
1	Moderada	
0	Ninguna	
O	Lenguaje	
2	Usado repentinamente sin significado	
1	Repentinamente con algunas palabras comprensibles	
0	Lenguaje normal	
P	Epilepsia	
2	No controlada o pobremente controlada	
1	En control o historia de alguna crisis convulsiva	
0	Nunca ha presentado una crisis convulsiva	

Q	Alteración al despertar o alteración en la respiración	
2	Severa, con apnea y cambios en la coloración	
1	Moderada, sin episodios de apnea o cambios de coloración	
0	Ritmo respiratorio normal	
R	Circulación periférica de extremidades	
2	Frías con cambios de coloración y cambios atróficos	
1	Frías con cambios de coloración sin cambios atróficos	
0	Color y temperatura normal	
S	Alteración en el estado de ánimo	
2	Severa; agitación, gritos y llanto	
1	Agitación	
0	Normal	
T	Desordenes del sueño	
2	Severas, vigila de noche y somnolencia diurna	
1	Presente, pero no severa	
0	Patrón normal de sueño	

Otra característica _____

Diagnóstico	SR clásico	
	SR Atípico	
Mutación	T158M	
	R168X	
	R270X	
	R306C	
En caso de no presentar las 4 mutaciones previas	SSCP	
En caso de patrón electroforético anómalo	Secuenciación directa	

Resultado _____

Técnica molecular utilizada en la madre _____

Resultado en la madre _____

OBSERVACIONES: _____

ANEXO 4

Escala de severidad

Pacient e	A	B	C	D	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	TOTA L	SEVERIDA D
1	1	0	1	1	2	1	0	1	1	1	1	2	0	2	1	2	1	2	2	2	24	Moderada
2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	1	2	1	0	2	2	0	21	Moderada
3	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	0	2	2	2	2	1	0	2	2	0	28	Severo
4	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	1	0	1	1	1	0	1	2	0	14	Moderada
5	1	1	2	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	1	25	Severo
6	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	0	2	1	2	2	1	1	2	2	0	29	Severo
7	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	0	2	1	2	2	2	1	1	2	0	28	Severo
8	1	0	2	2	2	2	0	0	1	2	1	0	0	2	1	2	0	0	2	0	20	Moderada
9	1	0	2	0	0	2	0	0	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	25	Severo
10	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	0	1	2	32	Muy severo
11	1	1	2	0	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	1	28	Severo
12	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	0	15	Moderada
13	0	0	1	0	0	2	0	0	1	2	1	1	0	1	2	0	0	0	1	0	12	Moderada
14	2	1	2	0	0	2	1	2	1	2	1	2	0	2	2	2	2	1	0	2	27	Severo
15	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	0	1	0	2	2	1	0	0	2	2	26	Severo
16	2	0	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	0	23	Moderada
17	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	0	1	1	1	30	Severo
18	0	0	1	0	0	2	0	0	1	2	0	0	0	2	1	1	0	1	2	1	14	Moderada
19	1	1	2	2	2	2	1	0	1	2	0	1	0	2	1	1	1	1	1	0	22	Moderada
20	1	1	2	0	0	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	0	1	0	0	23	Moderada
21	0	1	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	0	2	2	2	0	0	2	0	18	Moderada

Ver anexo 1 para la relación de las características evaluadas y los valores asignados.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Smeets E.E. and Schrander-Stumpel C. Rett Syndrome. Cassidy S. B. and Allanson J. E. (ed). Management of Genetic Syndromes. Rett Syndrome. Wiley 2005; cap. 38 457-468.
2. Nieto-Barrera, M. Formas atípicas del síndrome Rett. Revista de Neurología 1999; 28 (161): 1001-104.
3. Zoghbi, Y.H. and Chahrour, M. The story of Rett Syndrome: From clinic to Neurobiology. *Neuron* 2007; 56: 422- 437.
4. Amir, R.E and Zoghbi, H.Y. Rett Syndrome: Methyl-CpG Binding Protein 2 Mutations and Phenotype-Genotype Correlations. *Am. J. Med Genet* 2000; 97:147-152.
5. Weaving, L.S., Ellaway, C.J., Gécz, J., Christodoulo, J. Rett syndrome: Clinical review and genetic update. *J. Med. Genet* 2005; 42: 1-7.
6. Hagberg, B. Rett Syndrome: Clinical peculiarities and biological mysteries. *Acta Paediatr* 1995; 84: 971-976.
7. Hagberg, B., Hanefeld F., Percy A., Skjeldal O. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. *Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting Baden Baden, Germany, 11 September 2001.* *European Journal of Pediatric Neurology* 2002; 6: 0611.1-5.
8. Quenard A., Yilmaz S., Fontaine H., Bienvenu T., Moncla A., des Portes V., Rivier F., Mathieu M., Raux G., Jonveaux P., Phillipe, C. Deleterious mutations in exon 1 of MECP2 in Rett syndrome. *Eur. J. Med Genet* 2006; e-publication.
9. Medina Crespo, Violeta. Síndrome demencial en niños. Evaluación Diagnóstica. Universidad Autónoma de México. Instituto Nacional de Pediatría, México D.F.1994.
10. Jan, M., Doodley, J.M., and Gordon, K.E. Male Rett syndrome variant: application of diagnostic criteria. *Pediatr. Neurol.* 1999; 20: 238-240.
11. Budden, S.S., Dorsey, H.C. and Steiner, R.D. Clinical profile of male with Rett syndrome. *Brain Dev* 2005; 27 (Suppl 1): S69-S71.
12. Dayer A.G., Bottani A., Bouchardy I., Fluss J., Antonarakis S.E., Haenggeli C.A., Morris M.A. MECP2 mutant allele in a boy with Rett syndrome and his unaffected heterozygous mother. *Brain Dev* 2007; 29:47-50.

13. Maiwald R., Bönte A., Jung H., Bitter P., Storm Z., Laccone F., Herkenrath P. De novo MECP2 mutation in a 46, XX male patient with Rett syndrome. *Neurogenetics* 2002; 4: 107-108.
14. Masuyama T., Matsuo M., Jing J.J., Tabara Y., Kitsuki K., Yamagata H., Kan Y., Miki T., Ishii K., Kondo I. Classic Rett syndrome in a boy with R133C mutation of MECP2. *Brain Dev* 2005; 27: 439-442.
15. Armstrong, D.D. Neuropathology of Rett syndrome. *J Child Neurol* 2005; 20: 747-753.
16. Jellinger K., Armstrong D., Zoghbi H.Y., Percy A.K. Neuropathology of Rett syndrome. *Acta Neuropathol (Berl.)* 1988; 76: 142-158.
17. Reiss A.L., Faruque F., Naidu S., Abrams M., Beaty T., Bryan R.N., Moser H. Neuroanatomy of Rett syndrome: a volumetric imaging study. *Ann. Neurol* 1993; 34: 227-234.
18. Cassanova M.F., Buxhoeveden D., Switala A., Roy E. Rett syndrome as a minicolumnopathy. *Clin. Neuropathol* 2003; 22: 163-168.
19. Moog, U., Smeets, E.E., van Roozendaal, K.E., Schoenmakers, S., Hegbergs, J., Schoonbrood-Lenssen, A.M., Schrandt-Stumpel, C.T. Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP2). *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2003; 7: 5-12.
20. Fukada, T., Itoh M., Ichikawa T., Washiyama K., Goto Y. Delayed maturation of neuronal architecture and synaptogenesis in cerebral cortex of Mecp2-deficient mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 2005; 64: 537-544.
21. Kauffman, W.E., and Moser, H.W. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex* 2000; 10: 981-991.
22. Chao, H., Zoghbi H.Y. and Rosenmund C. Mecp2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse Lumber. *Neuron* 2007; 56: 1-8.
23. Glaze, D.G. Neurophysiology of Rett syndrome. *J. Child Neurol* 2005; 20: 740-746.
24. Wan, M., Lee, S.S., Zhang, X., Houwink-Manville, I., Song, H.R., Amir, R.E., Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF, Zoghbi NU. Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 65: 1520- 1529.
25. Trappe, R. Laccone F., Cobilanschi J., Meins M., Huppke P., Hanefeld F., Engel W. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J. Hum. Genet* 2001; 68: 1093-1101.

26. Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan M., Tran, C.Q., Franke, U., Zoghbi, H.Y. Rett syndrome is caused by mutation on X-linked MECP2, encoding Methyl CpG binding protein 2. *Nat. Genet.* 1999; 23: 185-23188.
27. Adler, D.A., Quaderi, N.A., Brown, S.D., Chapmen, V.M., Moore, J., Tate, P., Disteché, C.M. The X-Linked methylated DNA binding protein, MECP2, is subject to X inactivation. *Mamm. Genome* 1995; 6: 491-492.
28. Kriaucionis S., Bird A. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucl. Acid Res.* 2004; 32: 1818-1823.
29. Mnatzakanian, G.N., Lahi, H., Munteanu I., Alfred, S.E., MacLead, P.J., Jones, J.R., Scherer, S.W., Schanen, N.C., Friez, M.J., Vincent J.B., Minassian, B.A. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat. Genet.* 2004; 36: 339-341.
30. Dragich, J., Houwink-Manville, I., Shanen, C. Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2365-2375.
31. Klose, R.J., Bird, A. DNA binding selectivity of MeCP2 due to requirement for A/T sequences adjacent to methyl CpG. *Mol. Cell* 2005; 19: 667-668.
32. Bienvenu, T., Chelly, J. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat. Genet. Rev.* 2006; 7: 415-426.
33. Shahbazain, M. Young J., Yuva-Paylor L., Spencer C., Antalfy B., Noebels J., Armstrong D., Paylor R., Zoghbi H. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 2002a; 35: 243-254.
34. Jung, B.P. Jugloff D.G., Zhang G., Logan R., Brown S., Eubanks J.H. The expression of methyl CpG binding factor MECP2 correlates with cellular differentiation in developing rat brain and in culture cells. *J. Neurobiol* 2003; 55: 86-96.
35. Balmer, D., Goldstine J., Rao Y. M., LaSalle J.M. Elevated methyl-CpG-binding Protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *J. Mol. Med* 2003; 81: 61-68.
36. Cohen, D.R., Matarazzo V., Palmer A.M., Tu Y., Jeon O.H., Pevsner J., Ronett G.V. Expression of MeCP2 in olfactory receptor neurons is developmentally regulated and occurs before synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci* 2003; 22: 417-429.

37. Kishi, N. and Mackilis, J.D. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and evolved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol. Cell. Neurosci*, 2004; 27: 306-321.
38. Mullaney, B.C., Johnston M.V., Blue M.E. Developmental expression of methyl-CpG binding protein 2 is dynamically regulated in the rodent brain. *Neuroscience* 2004; 123: 939-949.
39. Shahbazian, M.D., Antalffy B., Armstrong D.L., Zoghbi H.Y. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum. Mol. Genet* 2002b; 11: 115-124.
40. Miyake, K., and Nagai, K. Phosphorylation of methyl-CpG binding protein 2 (MeCp2) regulates the intracellular localization during neuronal cell differentiation. *Neurochem. Int*, 2007; 50: 264-270.
41. Tudor, M., Akbarian S., Chen R.Z., Jaenisch R. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 15539-15541.
42. Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, A.C., Jaenisch R., Greenberg, M.E. Depression on BDNF transcription involves calcium dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*. 2003; 302: 885-889.
43. Makedonski K., Bonte A., Jung H., Bitter P., Storm Z., Laccione F., Herkenrath P. MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression. *Hum. Mol. Genet*. 2005; 14: 1049-1058.
44. McGill, B.E., Bundle S.F., Yaylaoglu M.B., Carson J.P., Thaller C., Zoghbi H.Y. Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased Crh expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 18267-18272.
45. Mount, R.H, Hastings R.P., Reilly S., Cass H., Charman T. Behavioral and emotional features in Rett syndrome. *Disabil. Rehabil*. 2001; 23: 129-136.
46. Bale, T.L., and Vale, W.W. CRF y CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2004; 44: 525-557.
47. Bruhn, T.O., Plotsky P.M., Vale W.W. Effect of paraventricular lesions on corticotropin-releasing factor (CFR)-like immunoreactivity in the stalk-median eminent: studies on the adrenocorticotropine response to ether stress and exogenous CFR. *Endocrinology* 1984; 114: 57-62.

48. Philippe C., Villard L., De Roux N., Raynaud M., Bonnefond J.P., Pasquier L., Lesca G., Mancini J., Jonveaux P., Moncla A., Chelly J., Bienvenu T. Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update. *Eur. J. Med. Genet.* 2005; e-publication.
49. Scala, E., Longo I., Ottimo F., Speciale C., Sampeieri K., Katzaki E., Artuso R., Mencarelli M.A., D'Ambrogio T., et al. MECP2 Deletions and Genotype-Phenotype correlation in Rett Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 2007; Part A 143A: 2775-2784.
50. Christodoulou, J., Grimm A., Maher T., Bennetts B. Rett-base: The IRSA MECP2 variation database-a new mutation database evolution. *Hum. Mutat.* 2003; 21: 466-472.
51. Archer, H.L., Evans J.C., Millar D.S., Thompson P.W., Kerr A.M., Leonard H., Christodoulou J., Ravine D., Lazarou L., Gove L., et al. NTNG1 mutations are rare causes of Rett syndrome. *Am J. Med. Genet. A.* 2006a; 140: 691-694.
52. Ravn, K., Nielsen J.B., Skjeldal O.H., Kerr A., Hulten m., Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum. Mutat.* 2005; 25: 324.
53. Smeets, E., Chenault M., Curfs L., Schrandt-Stumpel C., Frijns J.P. Rett Syndrome and long-term disorder profile. *Am. J. Med. Genet. A.* 2008; 149 A: 199-205.
54. Kim JI, Kim YJ, Son BH, Nam SO, Kang HC, Kim HD, Yoo MA, Choi OH, Kim CM. Diagnostic mutational analysis of MECP2 in Korean patients with Rett syndrome. *Exp. Mol. Med.* 2006; 38: 119-125.
55. Cheadle, J.P., Gill H., Fleming N., Maynard J., Kerr A., Leonard H., Krawczak M., Cooper D.N., Lynch S., Thomas N., Hughes H., Hulten M., Ravine D., Sampson J.R., Clarke A. Long read sequence analysis of MECP2 gene in Rett syndrome patients: correlations of disease severity with mutation type and location. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9:1119-1129.
56. Hupke P, Laccone F, Kramer N, Engel W, Handfeld F. Rett syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 1369-1375.
57. Hampson, K., Mutations in MECP2 gene in a cohort of girls with Rett syndrome. *J. Med. Genet.* 2000; 37: 610-612.
58. Laccone F., Hupke P., Hanefeld F., Meins M. Mutation spectrum in patients with Rett syndrome in the German population: Evidence of hot spot regions. *Hum. Mut.* 2001; 17: 183-190.

59. Buysse I.M., Fang P., Hoon K.T., Amir R.E., Zoghbi H.Y., Roa B.B. Diagnostic testing for Rett syndrome by dHPLC and direct sequencing analysis of the MECP2 gene: identification of several novel mutations and polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: 1428-1436.
60. Vacca M., Filippini F., Budillon A., Rossi V., Della Ragione F., De Bonis M.L., Mercadante G., Manzati E., Gualandi F., Bigoni S., Trabanelli C, Pini G, Calzolari E, Ferlini A, Meloni I, Hayek G, Zappella M., et al. MECP2 gene mutation analysis in the British and Italian Rett syndrome patients: hot spot map of the most recurrent mutations and bioinformatic analysis of a new MECP2 conserved region. *Brain Dev.* 2001; 23: S246-S250.
61. Pan H., Wang Y.P., Bao X.H., Meng H.D., Zhang Y., Wu X.R., Shen Y. MECP2 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2002; 10: 484- 486.
62. Amir R.E., Van den Veyver I.B., Schultz R., Malicki D.M., Tran C.Q., Dahle E.J., Philippi A., Timar L., Percy A.K., Motil K.J., Lichtarge O., Smith E.O., Glaze D.G., Zoghbi H.Y. Influence of mutation type and X Chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann. Neurol.* 2000; 47: 670-679.
63. Charman T., Neilson T.C., Mash V., Archer H., Gardiner M.T., Knudsen G.P., McDonnell A., Perry J., Whatley S.D., Bunyan D.J., Ravn K. Dimensional phenotypic analysis and functional categorization of mutation reveal novel genotype-phenotype associations in Rett syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2005; 13:1121-1130.
64. Kerr A., Momura Y., Armstrong D., Anvret M., Belichenko P.V. Budden S., et al. Guidelines form reporting features in cases with *MECP2* mutations. *Brain & Development.* 2001; 23: 208-211.
65. Ronnett G.V., Leopold D., Cai X., Hoffbuhr K.C., Moses L., Hoffman E.P., Naidu S. Olfactory biopsies demonstrate a defect in neuronal development in Rett syndrome. *Ann. Neurol.* 2003; 54: 206-218.
66. Huppke P., Held M., Hanefeld F., Engel W., Laccone F. Influence on mutation type and location on phenotype in 123 patients with Rett syndrome. *Neuropaediatr.* 2002; 33: 63-68.
67. Leonard H., Colvin L., Christodoulou J., Schiavello T., Williamson S., Davis M., Ravine D., Fyfe S., de Klerk N., Matsuishi T., Kondo I., Clarke A., Hackwell S., Yamashita Y. Patients with the R133C mutation: Is their phenotype different from Rett syndrome patients with other mutations? *J Med Genet.* 2003; 40:e52.

68. Zappella M., Meloni I., Longo I., Hayek G., Renieri A. Preserve speech variants of Rett syndrome: Molecular and clinical analysis. *Am J Med Genet* 2001; 104: 14-22.
69. Miltenberg, G. and Laccone, F. Mutations and polymorphism in the human methyl CpG binding protein 2. *Hum. Mut.* 2003; 22: 107-115.
70. Ariani F., Mari F., Pescucci C., Longo I., Bruttini M., Meloni I., Hayek G., Rocchi R., Zappella M., Renieri A. Real time Quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of MECP2 duplication. *Hum. Mut.* 2004; 24: 172-177.
71. Ariani F. Molecular Defect in MECP2-Negative Patients. 2006 Tesis Doctoral Universidad de Siena.
72. Ferrer-Costa C, Gelpi J, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, Orozco M. 2005. PMUT: a web-based tool form the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics* 21; 3176-3178.
73. Diccionario Mosby de medicina y ciencias de la Salud. Mosby/Doyan Libros. 1995
74. Adams y Victor. Manual de Neurología. 7a edición. Mc Graw Hill. 2003
75. Frustinoni. Semiología del Sistema Nervioso Central. El Ateneo, 1991
76. Surós Batilló, J. Seminología Médica y técnica exploratoria. México Salvat editores 2005.
77. Schwartzman JS, Bernardino A, Nishimura A. Gomes RR, Zatz M. Rett syndrome in a boy with a 47 XXY Karyotype confirmed by a rare mutation in the MECP2 gene. *Neuropediatr.* 2001; 32: 162-164.
78. Topcu M, Akyerli C, Sayi A, Toruner GA, Kocoglu SR, Cimbis M, Ozcelick T. Somatic mosaicism for a MECP2 mutation associated with classic Rett syndrome in a boy. *Eur. J. Hum. Genet.* 2002; 10: 162-164.
79. Traynor J, Agawal P, Lazzeroni L, Franke U. Gene expression patterns vary in clonal cell cultures from Rett syndrome females with eight different mutations. *BMC Med. Genet.* 2002; 3-5.
80. Young J.I. Regulation of RNA splicing by the methylation dependent transcriptional repressor methyl CpG binding protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 1775-1758.
81. Makedonski K. Abuhatzira L, Kaufman Y, Razin A, Shemer R. MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14: 1049-1058.

82. Horike SI, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T. Loss of silent chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat. Genet.* 2005; 37: 31-37.
83. Girard M, Couvert P, Carrie A, Tardieu M, Chelly M, Bienvenu T. Parental Origin of *de novo* MECP2 mutations in Rett syndrome *Eur J Hum. Genet.* 2001; 9 231-236.
84. Jacob FD, Ramaswamy V, Andersen J, Bolduc F. Atypical Rett syndrome with selective FOXP1 deletion by genomic comparative hybridization: case report and review of literature. *Eur J Hum Genet.* 2009; 22: 1-5.
85. Williamson S. and Christodoulou J. Rett syndrome: new clinical and molecular insights. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14: 896-903.
86. Neul J.L., Fang O., Barrish J., Lane J., Caeg E.B., Smith E.O., Zoghbi H., Percy A., Glaze, D.G. Specific mutations in *Methyl-CpG-Binding-Protein 2* confer different severity in Rett syndrome. *Neurology.* 2008; 70: 1313-1321.
87. Archer H., Evans J., Leonard H., Colvin L., Ravine D., Christodoulou J., Williamson S., et al. Correlation between clinical severity in patients with Rett syndrome with a p.R168X or p.T158M mutation, and the direction and degree of skewing of X-chromosome inactivation. *J Med Genet.* 2007; 148: 148-152.
88. Bebbington A., Anderson A., Ravine D., Fyfe S., Pineda, M., de Klerk N., et al. Investigating genotype-phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. *Neurology.* 2008; 70: 868-875.
89. De Bona C., Zapella M., Hayek G., Meloni I, Vitelli F., Bruttini M., Cusano R., et al. Preserve speech variant is allelic of classic Rett syndrome. *Eur J Med Genet.* 2000; 8: 325-330.
90. Ben Zeev B., Bebbington A., Ho G., Leonard H., de Klerk N., Gak E., Veckler M., Christodoulou J. The common *BDNF* polymorphism may be a modifier of disease severity in Rett syndrome. *Neurology.* 2009; 72: 1242-1247.