

SÍNDROME DE RETT EN ESPAÑA:

ANÁLISIS DE MUTACIONES Y CORRELACIONES CLÍNICAS

E. Monrós, J. Armstrong, E. Aibar, P. Poo, I. Canós y M. Pineda

Sección de Genética y Servicio de Neurología. Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona. España.

Servicio de Bioquímica. Hospital Dr. Pesset. Valencia. España.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Rett (RTT) es una enfermedad del desarrollo neurológico que afecta casi de forma exclusiva a las niñas. Se pueden definir dos formas clínicas, la forma 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 fustre.

El RTT tiene una herencia dominante ligada al cromosoma X, normalmente asociada a letalidad en varones. Se han descrito mutaciones dominantes de novo en la región codificante del gen *MECP2* (Xq28) en un elevado número de pacientes esporádicas [1,2,3] y en algunos casos familiares.

La identificación del gen y el análisis de mutaciones en una larga serie de pacientes de todo el mundo está revelando un espectro insospechado de manifestaciones clínicas de la enfermedad, desde mujeres portadoras asintomáticas hasta varones nacidos con graves encefalopatías letales. Estas observaciones llevan a pensar que la proteína MeCP2 puede estar involucrada en otras formas de retraso mental inespecífico. Además, se ha observado variabilidad clínica en pacientes que tienen la misma mutación, lo cual indica que hay otras variables como el patrón de inactivación del cromosoma X (XCI) y la interacción de otros genes con *MECP2* que deben contribuir al fenotipo final.

El objetivo de este estudio ha sido la caracterización del espectro de mutaciones en una serie de pacientes españoles y establecer correlación entre las características clínicas de estas pacientes y el tipo de mutación identificado.

OBJETIVOS

1. Analizar el espectro de mutaciones de *MECP2* en una serie de pacientes esporádicas españolas.
2. Analizar el gen *MECP2* en un varón de 13 años con RTT clásico.
3. Analizar las características clínicas puedan tener correlación con la mutación en las pacientes.
4. Correlacionar la gravedad de la enfermedad con el tipo de mutación.

METODOLOGÍA

Pacientes

Presentamos 46 pacientes esporádicas y un varón afectado con mutaciones conocidas en MECP2. Éstas forman parte de una serie total de 143 pacientes de RTT españolas no emparentadas que están siendo estudiadas en la actualidad en nuestra Sección. Progenitores sanos y hermanas no afectas fueron también analizados. Doce mujeres normales fueron usadas como población control.

Análisis genético

El ADN fue extraído a partir de linfocitos de sangre periférica por extracción fenólica estándar seguida de precipitación con etanol. Para el análisis de las mutaciones, se ha realizado una combinación de secuenciación directa, digestión con enzimas de restricción y análisis de SSCP/HD. Sólo se ha estudiado la región codificante del gen.

Manejo de los datos clínicos

Todas las pacientes fueron sometidas a una estricta selección y fueron diagnosticadas según los criterios establecidos por el Rett Syndrome Diagnostic Criteria Group [4]. Hemos analizado:

RTT clásico: 34 niñas y un varón

RTT atípico: 10 niñas

Forma congénita: 5

Epilepsia precoz: 0

Lenguaje conservado: 4

Forma frustré: 1

Para las correlaciones fenotipo-genotipo, cada paciente fue clasificada según el tipo de mutación (cambio de aminoácido o proteína truncada). Se seleccionaron características o variables clínicas típicas de la enfermedad y se asignó una puntuación a cada variable según sus distintas manifestaciones o gravedad, siguiendo los criterios que se resumen en la misma Tabla 1. Mayor puntuación indica más gravedad. Las frecuencias de las puntuaciones de cada variable clínica fueron comparadas entre mutaciones de cambio de aminoácido y proteína truncada.

La puntuación global de gravedad para cada paciente se obtuvo mediante la suma de las puntuaciones individuales de cada variable clínica. Las puntuaciones globales fueron clasificadas en cuatro grupos:

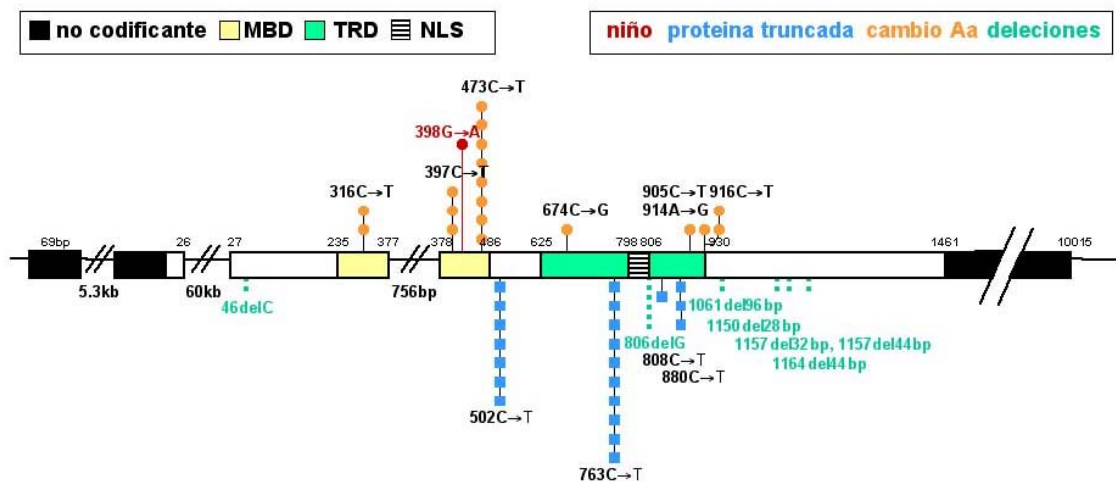
- <10: forma frustré y RTT clásica leve
- 10-14: RTT clásica
- 15-19: RTT clásica severa y congénita
- ≥20: RTT clásica severa y congénita

Se aplicó el test de Fisher para medir la significación estadística de las diferencias observadas.

	Score	Definición		Score	Definición
Edad inicio	1	0-12 m	Función respiratoria	0	no disfunción
	2	12-24 m		1	hiperventilación y/o apneas
	3	> 24 m		0	ausente
Microcefalia	0	ausente	Epilepsia	1	presente y controlada
	1	presente		2	no controlada o epilepsia precoz
Sadestación	0	adquirida < 8 m		Uso de las manos	0
	1	adquirida 8-16 m	1		pérdida uso propositivo: 2-6 años manipulación conservada
	2	adquirida > 16 m	2		pérdida uso propositivo: < 2 años manipulación conservada
	3	nunca adquirida			
	+1	adquisición perdida			
Ambulación	0	adquirida < 18 m	Inicio estereotipias	0	> 10 años
	1	adquirida < 30 m		1	> 36 m
	2	adquirida > 30 m		2	18-36 m
	3	adquisición perdida		3	< 18 m
	4	nunca adquirida			
Lenguaje	0	conservado y propositivo			
	1	perdido			
	2	nunca adquirido			

RESULTADOS

Espectro y distribución de las mutaciones de MECP2



Hasta la fecha, hemos detectado mutación en 46 pacientes no relacionadas y en un varón con RTT clásica. En total se identificaron 18 mutaciones distintas, siete de las cuales no habían sido descritas previamente. El análisis de los progenitores demostró el origen de novo de todas las mutaciones.

Brevemente, hemos encontrado:

- 7 mutaciones de cambio de aminoácido en 17 pacientes
- 4 mutaciones de proteína truncada en 23 pacientes
- 5 mutaciones de cambio de la pauta de lectura en 5 pacientes
- 5 deleciones grandes situadas más allá del dominio represor de la transcripción (TRD) en 5 pacientes

N. Paciente(s)	Exón	Cambio de nucleótido	Mutación	Dominio	Bibliografía
2	2	316C→T	R106W	MBD	Amir et al. 1999 [1]
3	3	397C→T	R133C	MBD	Amir et al. 1999
1	3	398G→A	R133H	MBD	este estudio, niño
7	3	473C→T	T158M	MBD	Amir et al. 1999
1	3	674C→G	P225R	TRD	Cheadle et al. 2000 [3]
1	3	905C→T	P302R	TRD	Cheadle et al. 2000
1	3	914A→G	K305R	TRD	este estudio
2	3	916C→T	R306C	TRD	Wan et al. 1999 [2]
6	3	502C→T	R168X	PTC no TRD	Wan et al. 1999
10	3	763C→T	R255X	PTC en TRD	Amir et al. 1999
1	3	808C→T	R207X	PTC en TRD	Cheadle et al. 2000
3	3	880C→T	R294X	PTC en TRD	Cheadle et al. 2000
1	2	46delC	V31X	PTC no MBD no TRD	este estudio
1	3	1061del96-bp	96bp deletion	Poly Pro	este estudio
1	3	1157del32-bp	32 bp deletion	PTC 392	este estudio
1	3	1164del44-bp	44 bp deletion	PTC 388	este estudio
1	3	1150del28-bp	28 bp deletion	PTC 391	este estudio
1	3	1157del44-bp	44 bp deletion	PTC 398	este estudio
Total: 47					

- Las mutaciones recurrentes R106W, R133C, T158M, R306C, R168X, R255X, V288X y R294X (ya descritas por otros grupos) dan cuenta del 65,2% de las mutaciones encontradas.
- Todas las mutaciones de cambio de aminoácido están localizadas en los dos dominios funcionales de la proteína: 70% en el dominio de unión al DNA metilado (MBD) y 30% en el dominio represor de la transcripción (TRD).
- Todas las mutaciones de proteína truncada están localizadas en el cuarto exón, 74% en el TRD.
- Hemos identificado una nueva deleción de un solo nucleótido (46delC) la cual crea una proteína truncada muy corta V31X. Se supone que causa una pérdida completa de la función de MeCP2.

- Hemos encontrado cinco deleciones largas más allá del TRD, en una zona que ya ha sido descrita como punto caliente para grandes deleciones.

Mutación en MECP2 en un varón con RTT clásico

Datos Clínicos

Informamos el primer caso descrito de un varón con RTT clásico y un cariotipo 46,XY normal. A la edad de siete años cumplía 8/9 de los criterios necesarios, 7/8 de los criterios de apoyo y ninguno de los criterios de exclusión, según descrito por el Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group [4]:

Criterios necesarios

- periodo prenatal y perinatal normal
- desarrollo neurológico normal hasta los 12 meses de edad
- microcefalia adquirida
- pérdida del uso propositivo de las manos
- pérdida del lenguaje
- estereotipias manuales
- apraxia de la marcha
- diagnosticado a los 7 años de edad , en su primera visita al Hospital. El paciente vive en una Institución de Cuidados Especiales debido al fallecimiento de sus padres.
- *El perímetro craneal al nacer no pudo ser documentado*

Criterios de soporte

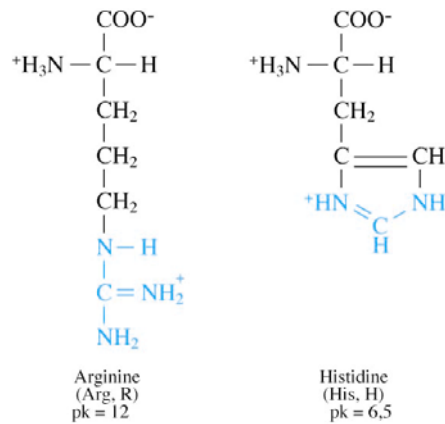
- disfunción respiratoria: hiperventilación intermitente y apneas
- epilepsia, controlada con drogas antiepilépticas
- EEG anormal: actividad paroxística
- espasticidad
- disfunción periférica vasomotora
- escoliosis
- retraso en el crecimiento

En la actualidad tiene 13 años y no ha perdido la deambulaci3n.

Análisis del gen MECP2

El análisis de mutaciones en MECP2 ha mostrado la presencia de un cambio de nucle3tido 398G→A en la posici3n 133, que produce la sustituci3n de Arginina por Histidina (R133H) en la prote3na. La mutaci3n afecta a un residuo conservado dentro de MBD de la prote3na MECP2. Los dos residuos forman parte del grupo de aminoácidos bási3cos.

Esta mutación no ha sido descrita previamente. El origen de novo de la mutación no pudo ser demostrado debido al fallecimiento de los padres. Dado que este cambio no ha sido identificado en ninguna paciente, no podemos predecir su efecto en una mujer. La patogenicidad de la mutación identificada en este varón deberá ser analizada mediante estudios funcionales.



Correlaciones clínicas

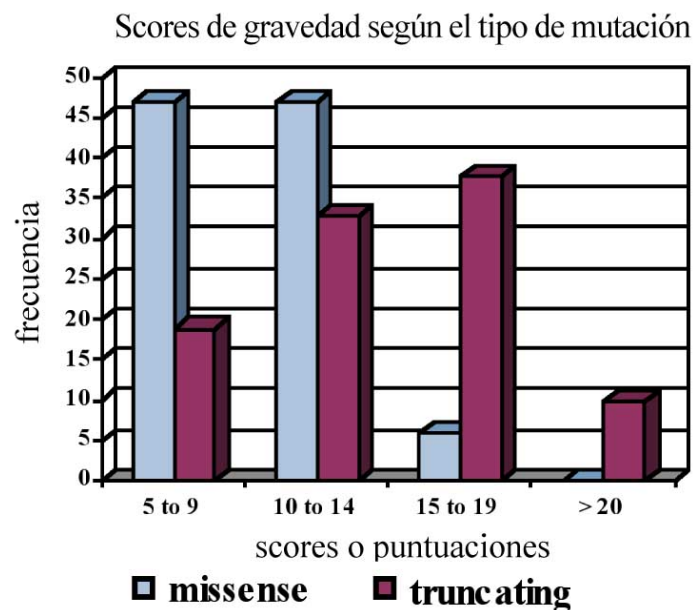
Hemos completado en casi su totalidad los datos clínicos de 46 de las 47 pacientes con mutación identificada. Las mutaciones fueron clasificadas en dos grupos: mutaciones que producen cambio de aminoácido en la proteína (n=18) y mutaciones que producen proteína truncada (PTC) (n=23). El análisis estadístico de los datos clínicos, agrupados según el tipo de mutación, arrojó los siguientes resultados:

1. No se observaron diferencias entre mutaciones de cambio aminoácido y PTC para:
 - edad de adquisición de los primeros síntomas
 - presencia o ausencia de microcefalia adquirida
 - presencia o ausencia de disfunción respiratoria
 - presencia o ausencia de convulsiones. No obstante, las 3 pacientes con epilepsia no controlada con AED eran portadoras de mutaciones PTC.
 - utilización de las manos
 - adquisición y pérdida del lenguaje

2. Diferencias significativas:

	Missense	Proteína Truncada	Fisher test (p)
Sedestación	72% (13/18) se sentó antes 8 m	27% (6/22) se sentó antes 8 m	p=0,01
	100% (18/18) conserva	18% (4/22) pérdida	p<0,05
Ambulación	61% (11/18) caminó antes 18 mo	0% (0/22) caminó antes 18 m	p<0,0001
	94% (16/17) conserva	45% (10/22) nunca caminó	p=0,001
Esterotipias	37% (6/16) inicio despues 36 mo	5% (1/22) inicio despues 36 m	p=0,01
Severidad (score global)	6% (1/15) score>15	48% (10/21) score >15	p<0,01
	47% (7/15) RTT leve, score<10	48% (10/21) severo o congénito, score>15	p=0,01

3. Las mutaciones PTC están asociadas a una mayor gravedad de la enfermedad.



Las cinco grandes deleciones no fueron incluidas en el análisis estadístico debido a que éstas se asocian con presentaciones clínicas variadas:

- 2 fueron identificadas en pacientes gravemente afectadas (puntuaciones globales de 19 y 16, respectivamente)
- 1 se identificó en una paciente con RTT clásico (puntuación global de 11)
- 2 fueron identificadas en pacientes con formas leves de RTT clásico (puntuaciones globales de 5 y 6, respectivamente)

CONCLUSIONES

1. Las mutaciones en la región codificante del gen MECP2 pueden causar todo el espectro de formas clínicas de RTT: formas clásicas y atípicas.
2. Los varones pueden estar afectados por RTT clásico.
3. Se pueden encontrar diferencias significativas entre mutaciones de cambio de aminoácido y proteína truncada en relación con las características clínicas siguientes:

- Capacidad de sentarse sola (edad de adquisición y conservación)
 - deambulaci3n (edad de adquisici3n y conservaci3n)
 - edad de aparici3n de las estereotipias
4. Mutaciones de cambio de amino3cido se asocian preferentemente a formas leves de RTT.
 5. Mutaciones de prote3na truncada se asocian a formas graves de la enfermedad.
 6. Deleciones grandes se encuentran tanto en formas leves de RTT como en formas graves.

AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a la Asociaci3n Valenciana y Catalana de S3ndrome de Rett por su apoyo, y a todas las pacientes RTT y sus familiares por su entusiasta participaci3n. Agradecemos a M. Naud3 su asistencia t3cnica. Este trabajo ha sido subvencionado por el Fondo de Investigaci3n Sanitaria FIS 99/0235 y por la Asociaci3n Catalana y Valenciana de S3ndrome de Rett. J. A. recibe una beca del Fondo de Investigaci3n Sanitaria FIS 99/0235.

BIBLIOGRAF3A

- [1] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Franke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein2. *Nature Genet* 1999;23:185-188.
- [2] Wan M, Sung Jae Lee S, Zhang X, Houwink-Manville I, Song H-R, Amir R, Budden S, et al. (1999) Rett Syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 65:1520-1529.
- [3] Cheadle JP, Gill H, Flemming N, Maylanrd J, Kerr A, Leonard H, Krawczak M, et al. (2000) Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet* 9:1119-1129.
- [4] The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group (1988) Diagnostic Criteria for Rett Syndrome. *Ann Neurol* 23:425-428