

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
LUCIANO FARAGE

SÍNDROME DE RETT: AVALIAÇÃO CLÍNICA, GENÉTICA E POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

BRASÍLIA

2009

LUCIANO FARAGE

**SÍNDROME DE RETT: AVALIAÇÃO CLÍNICA, GENÉTICA E POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Professor Doutor Riccardo Pratesi.

Co-orientador: Professor Doutor Peter B. Barker.

Co-orientadora: Professora Doutora Alena Horská.

Brasília, DF

2009

Farage, Luciano

Síndrome de Rett: avaliação clínica, genética e por ressonância magnética / Luciano Farage. – Brasília : UnB / Faculdade de Medicina, 2009.

xiii, 61 f. : il.

Orientador: Riccardo Pratesi

Co-orientadores: Peter B. Barker e Alena Horská

Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Ciências Médicas, 2009.

1. Síndrome de Rett – etiologia. 2. Síndrome de Rett – genética.
3. Imagem por ressonância magnética. I. Pratesi, Riccardo. II. Barker, Peter B. III. Horská, Alena. IV. Título.

Aos meus pais, com todo o amor. Vocês são a
razão de todo o esforço.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais - Miguel e Estela, pelo exemplo, carinho e presença constantes. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Miguel, pelo convívio afetivo.

À cunhada e sobrinhos, Renata, Marianna e Haykal, pelos momentos de alegria.

Ao Professor Doutor Riccardo Pratesi: sua amizade e exemplo sempre foram as melhores formas de orientação e fizeram parte dos estímulos positivos, desde muito antes da graduação.

À Professora Doutora Iris Ferrari, cuja força de vontade, trabalho e liderança são as principais marcas e, desde a graduação, quando abriu a porta do seu laboratório, sempre teve papel central na minha formação científica e médica.

À Professora Doutora Alena Horská, cujo empenho em desenvolver técnicas de ressonância magnética aplicadas à neurorradiologia foi um estímulo e muito lhe devo pelo o que aprendi.

Ao Professor Doutor Peter B. Barker, porque sua amizade e apoio foram fundamentais no transcorrer deste trabalho. Sua energia e conhecimento abriram muitas portas em neurorradiologia.

Aos amigos do Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário e do Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina da UnB, onde trilhei os primeiros passos na investigação científica e onde sempre encontro apoio nos momentos de decisão.

Aos amigos do Setor de Radiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Lincoln Pereira de Souza, Luiz de Freitas, Túlio Augusto Alves Macedo, Mário Augusto Padula Castro e Bruno Leonardo Pegoraro e suas respectivas

famílias. Agradeço a vocês, que me ensinaram e acompanharam os meus primeiros passos na radiologia.

À Neuroradiology Section, Radiology Department, Johns Hopkins Medical Institutions e Neurogenetics Unit, Kennedy Krieger Institute, Baltimore, MD, EUA, onde este trabalho foi desenvolvido e onde obtive ótimas oportunidades de convívio, aprendizado e crescimento pessoal.

À Alessandra Menezes Campos, pelo seu incentivo e apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas dos Setores de Radiologia, Patologia e Genética Médica do Hospital SARAH, pelas oportunidades de aprendizado e convívio.

Ao Professor Doutor Paulo Sérgio Rocha Mendlovitz e aos médicos residentes do Setor de Imagenologia do Hospital Universitário de Brasília da Universidade de Brasília pelo apoio e convívio na execução de alguns projetos relacionados a esta pesquisa.

Ao Professor Doutor Leopoldo Luiz dos Santos Neto e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela dedicação e esforço em criar um programa de alto nível.

Ao Sr. Alessandro e demais funcionários da Secretaria da Pós-Graduação, pelo sempre presente apoio e ajuda com formulários e resoluções.

Aos amigos de sempre, sem os quais os esforços têm pouco sentido.

RESUMO

Introdução A Síndrome de Rett é uma desordem do neurodesenvolvimento ligada ao cromossomo X com um acometimento precoce na infância, que afeta, primariamente, meninas. O lobo frontal é particularmente afetado. A base genética da doença, em 80% das meninas acometidas, está relacionada às mutações no gene da proteína *methyl-CpG binding protein 2* (MeCP2). **Casística e Métodos** Dois grupos de meninas afetadas que preenchem os critérios clínicos e são positivas para mutações foram avaliadas com espectroscopia (MRS) e tensor de difusão (DTI). Os dados foram comparados com controles pareados por idade e sexo. O fenótipo foi avaliado pelo perímetro cefálico, história de crises convulsivas, irregularidades respiratórias, alterações de marcha e fala. O genótipo foi avaliado pelo tipo de mutação existente. Os exames de ressonância magnética (RM) foram realizados em aparelho de 1,5T e incluíram avaliação anatômica (sagital T1, axial T2 e axial FLAIR). Quarenta meninas (idade média de 6,1 anos) foram submetidas à MRS uni-voxel, na substância branca do lobo frontal esquerdo, com TE de 35 ms. Foram obtidas as relações de N-acetil-aspartato (NAA), Colina (Co), mio-inositol (mI), Glutamato e Glutamina (Glx) sobre Creatina (Cr) e suas respectivas concentrações. Trinta e duas meninas (idade média de 5,5 anos) foram avaliadas com DTI, obtidos com *single-shot echo-planar* com *SENSE* (fator de 2,5), espessura de 2,5 mm, 30 orientações e valor *b* de 700 s/mm². As medidas de anisotropia fracionada (FA) foram obtidas com o delineamento manual de dezesseis regiões de interesse nos compartimentos supra e infratentorial. Assimetrias entre os lados foram avaliadas pela medida da FA e pelo índice de lateralidade. **Resultados** Os resultados demonstraram que a NAA/Cr diminuiu e a mI/Cr aumentaram com a idade ($p < 0,03$), enquanto essas razões permanecem estáveis no grupo-controle. A razão de Glx/Cr foi 36% maior nas pacientes ($p = 0,043$). A razão de NAA/Cr foi 12,6% menor na presença de crises convulsivas ($p = 0,017$). Houve

decréscimo da NAA/Cr com a gravidade clínica ($p=0,031$). A presença da mutação R168X tem pior grau de gravidade clínica ($0,01 \leq p \leq 0,11$) e uma razão NAA/Cr mais baixa ($0,029 \leq p < 0,14$), quando comparados com outras mutações. Houve redução da FA no joelho e esplênio do corpo caloso, cápsulas interna e externa, cíngulo anterior, radiação talâmica e substância branca frontal. A FA do fascículo longitudinal superior foi semelhante aos controles ($p=0,542$) e nas pacientes com fala preservada e reduzida ($p<0,001$) nas pacientes com mutismo. Não houve alteração nos valores de FA na presença de crises convulsivas ou de alterações motoras. **Conclusão** A redução da NAA/Cr e o aumento do ml/Cr com a idade sugere que haja uma lesão axonal progressiva e reação astrocitária. O aumento do Glx/Cr pode ser secundário ao aumento do ciclo de glutamato e glutamina nas sinapses. As alterações do NAA/Cr na presença de crises convulsivas e associadas à gravidade da doença e a redução da FA nos casos de comprometimento da fala sugerem que a MRS e DTI podem ser úteis na avaliação evolutiva do comprometimento cerebral da Síndrome de Rett.

Palavras-chave: Síndrome de Rett. Espectroscopia por ressonância magnética. Tensor de difusão.

ABSTRACT

Introduction Rett syndrome is a X-linked neurodevelopmental disorder that affects almost exclusively girls from early childhood. Frontal lobe is particularly affected. Mutations in the methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) gene are identified in more than 80% of affected girls. **Patients and Methods** Two groups of patients who fulfill clinical criteria and were positive for MeCP2 mutations underwent for spectroscopy (MRS) and diffusion tensor imaging (DTI) evaluation. Data were compared with age and sex matched controls. Clinical assessments included neurological status, head circumference, and history of seizures, respiratory irregularities, gait, and speech. Genotype assessment was performed by mutation analysis. Magnetic resonance imaging was performed at 1.5T unit and includes anatomical images. Forty girls (mean age 6.1 years) underwent single voxel MRS in the left frontal lobe white matter, TE 35 ms. Individual metabolite ratios were obtained from N-acetylaspartate (NAA), coline (Co), myoinositol (mI), glutamate e glutamine (Glx) over creatine (Cr) and their concentrations. Thirty-two girls (mean 5.5 years) underwent DTI evaluation, data were acquired using single-shot echo-planar with SENSE (reduction factor of 2.5), thickness of 2.5 mm, 30 encoding directions and b value of 700 s/mm². Fractional anisotropy (FA) was obtained by manually delineated regions of interest of major white matter tracts. Asymmetry between the hemispheres was evaluated by comparison of left and right FA values and laterality index. **Results** NAA/Cr ratios decreased and mI/Cr ratios increased with age in RTT patients (both $p < 0.03$), whereas these ratios were stable in control. The mean glutamate and glutamine/Cr ratio was 36% greater in RTT patients than in control ($p = 0.043$). The mean NAA/Cr ratio was 12.6% lower in RTT patients with seizures compared with those without seizures ($p = 0.017$). NAA/Cr ratios decreased with increasing clinical severity score ($p = 0.031$). Patients with the R168X mutation tended to have the greatest severity score (0.01

□p □0.11) and the lowest NAA/Cr ratio (0.029 □p <0.14). Significant reductions in FA were noted in the genu and splenium of corpus callosum and external capsule with regional reductions in the anterior cingulate, internal capsule, posterior thalamic radiation, and frontal white matter. Differences of FA in superior longitudinal fasciculus (SLF), which has strong correlation with speech, were noted in RTT with preserved speech (phrases and sentences) where FA in SLF was equal to controls (p=0.542) while FA was reduced (p<0.001) in those who were non-verbal or with single words. No correlation with FA values for tracts associated with seizures, gross or fine motor skills were identified. **Conclusion** Decreasing NAA/Cr and increasing mI/Cr with age are suggestive of progressive axonal damage and astroglyosis, respectively, whereas increased Glx/Cr ratio may be secondary to increasing glutamate/glutamine cycling at the synaptic level. The relations between NAA/Cr, presence or absence of seizures, and disease severity, and also reduction of FA at superior longitudinal fasciculus at impaired speech patients suggest that MRS and DTI may provide a noninvasive measure of cerebral involvement in Rett syndrome.

Keywords: Rett Syndrome. Magnetic resonance spectroscopy. Diffusion tensor imaging.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 Definição	1
I.2 Histórico	1
I.3 Prevalência	2
I.4 Aspectos Clínicos	2
I.5 Aspectos Genéticos	5
I.6 Neuroanatomia	8
I.7 Métodos de Imagem	11
I.7-1 Imagens Anatômicas	11
I.7-2 Espectroscopia de Prótons	13
I.7-3 Tensor de Difusão	20
I.7-4 Outros Métodos de Imagem	23
II. OBJETIVOS	25
III. ARTIGO – BRAIN METABOLISM IN RETT SYNDROME: AGE, CLINICAL AND GENOTYPE CORRELATIONS	26
IV. ARTIGO – WHITE MATTER IMPAIRMENT IN RETT SYNDROME: DIFFUSION TENSOR IMAGING STUDY WITH CLINICAL CORRELATIONS	35
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura linear da proteína MeCP2 com seus domínios MBD e TRD e os principais pontos de mutação. Fonte: Figura adaptada de W.E. Kauffman (Comunicação Pessoal).....06
- Figura 2 - Imagens anatômicas ponderadas em T1 e T2, respectivamente de controles com idades pareadas (A e C) e de pacientes (B e D). Notar o alargamento dos sulcos corticais e o aumento *ex-vácuo* dos ventrículos laterais, quando comparados com meninas da mesma idade. Observar a microcefalia adquirida nas pacientes.....13
- Figura 3 - Espectroscopia de prótons, uni-voxel, com técnica *point resolved spectroscopy* (PRESS), em diferentes pacientes, com TE de 144ms (A) e 35ms (B). Notar as diferenças entre os picos e quantidade de metabólitos apresentados..... 16
- Figura 4 - Representação em forma de matriz do tensor de difusão. Fonte: Adaptada de Gillard 2005..... 21
- Figura 5 - Tensor de Difusão de voluntário adulto e saudável com a imagem do mapa de cores (A). A codificação está relacionada à direção dos tratos: vermelho látero-lateral, verde ântero-posterior e azul crânio-caudal. No mapa de anisotropia fracionada (FA) (B), em que a substância branca é realçada, também estão apresentados os valores de FA das pernas posteriores das cápsulas internas.....23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Coefficiente de difusibilidade aparente
ALIC	Perna anterior da cápsula interna
CG	Giro do cíngulo
Co	Colina
[Co]	Concentração de colina
Co/Cr	Razão Colina sobre creatina
Cr	Creatina
[Cr]	Concentração de creatina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTI	Tensor de Difusão
FA	Anisotropia fracionada
FMN	<i>Fórceps minor</i>
GCC	Joelho do corpo caloso
Glx	Glutamato + Glutamina
[Glx]	Concentração glutamato + glutamina
Glx/Cr	Razão glutamato + glutamina sobre creatina
HDAC	gene da histona deacetilase
IFO	Fascículo fronto-occipital inferior
MBD	Domínio de ligação à área metilada
MCP	Pedúnculo cerebelar médio
MeCP2	<i>Methyl-CpG-Biding-Protein 2</i>
mI	Mio-inositol

[mI]	Concentração de mio-inositol
mI/Cr	Razão mio-inositol sobre creatina
MRS	Espectroscopia de prótons
MRSI	Imagem espectroscópica
NAA	N-acetil-aspartato
[NAA]	Concentração de N-acetil-aspartato
NAA/Cr	Razão N-acetil-aspartato sobre creatina
PCR	Coroa radiada posterior
PLIC	Perna posterior da cápsula interna
PRESS	<i>Point resolved spectroscopy</i>
PTR	Radiação talâmica posterior
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucléico
RTT	Síndrome de Rett
SCC	Esplênio do corpo caloso
SCP	Pedúnculo cerebelar superior
SLF	Fascículo longitudinal superior
STEAM	<i>Stimulated echo acquisition mode</i>
TE	Tempo de Eco
TR	Tempo de Repetição
TRD	Domínio de repressão à transcrição

I. INTRODUÇÃO

I.1 Definição

A Síndrome de Rett (RTT) (OMIM 312750) é uma afecção do neurodesenvolvimento que afeta quase exclusivamente meninas, sendo raramente descrita em meninos. (NAIDU, S. B., 1997; SIRIANNI, 1998; NAIDU, 2003)

A doença é dita do desenvolvimento, pois afeta o cérebro em formação, diferindo das doenças neurodegenerativas em que há destruição de um cérebro formado.

Os meninos, em geral, quando afetados apresentam anomalia numérica dos cromossomos, mais tipicamente associado à Síndrome de Klinefelter (47,XXY). (CHRISTEN e HANEFELD, 1995; LACCONE, 2002; SANTOS, 2009)

I.2 Histórico

A descrição original da doença foi feita pelo Professor Andreas Rett, em 1966 (RETT, 1966, 1986), levando em consideração a observação clínica de dois casos seguidos de crises convulsivas, em meninas, com movimentos estereotipados das mãos (HAGBERG, 1983; NAIDU, S., 1997). A primeira descrição da doença em língua inglesa foi realizada por Hagberg e colaboradores em 1983 (HAGBERG, 1983). Estes apresentam uma série retrospectiva de 35 casos europeus. Esse trabalho é tido como seminal e foi o gerador do interesse em vários centros da pesquisa relacionados à doença.

1.3 Prevalência

A doença afeta meninas de todas as etnias e tem uma prevalência estimada, na Austrália, de 1:10.000 a 1:23.000 nascidas vivas. (NAIDU, S., 1997; NAIDU, S. B., 1997; SIRIANNI, 1998; WEAVING, 2005)

A RTT é considerada a segunda causa de retardo mental em meninas (NAIDU, S., 1997; NAIDU, S. B., 1997; SIRIANNI, 1998; WEAVING, 2005), depois da Síndrome de Down que apresenta uma incidência de 1:1000, mas varia com a idade materna. (HOOK, 1983)

No Brasil, encontramos relatos de casos isolados. No entanto, não há um estudo populacional que permita calcular a prevalência da doença no país. (POZZI e ROSEMBERG, 2003; STACHON; ASSUMPCAO e RASKIN, 2007)

1.4 Aspectos Clínicos

A expressão clínica da doença é predominantemente pós-natal, havendo desenvolvimento pré e perinatal normais, assim como a circunferência craniana. Entre o sexto e o 18º mês de vida, a criança apresenta uma parada do desenvolvimento e perda rápida das aquisições com desaceleração do crescimento craniano, desenvolvimento de comportamento autista e movimento estereotipado das mãos. A forma mais comum desse movimento é sua fricção repetitiva, como se as pacientes lavassem continuamente as mãos. Em observações seqüenciais, ficou demonstrado que essas crianças apresentam desaceleração no crescimento encefálico já no 4º mês de vida, levando à microcefalia adquirida. Os achados clínicos iniciais não são específicos e têm superposição com diagnósticos diferenciais. (NAIDU, S., 1997; HAGBERG, 2002a; WEAVING, 2005)

Os diagnósticos diferenciais variam com a idade e com os achados clínicos. Incluem as lesões encefálicas secundárias a eventos hipóxico-isquêmicos, além de

manifestações neurológicas de afecções sistêmicas, como doenças de depósito, metabólicas e neurodegenerativas. Incluem, ainda, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Angelman, autismo, psicose, encefalopatia epiléptica e lipofusinoze ceróide neuronal, entre outras afecções. (NAIDU, S., 1997)

Em 1988, foram estabelecidos critérios diagnósticos por um Painel Internacional (TREVATHAN e NAIDU, 1988), sendo revistos em 2002 com o intuito de se reduzir as ambigüidades diagnósticas. (HAGBERG, 2002b)

A Síndrome de Rett é dividida em dois espectros clínicos: a forma clássica com achados clínicos típicos, e a variante que possui elementos clínicos incompletos. (HAGBERG, 2002a; HAGBERG, 2002b; WEAIVING, 2005)

Esses critérios são o padrão na seleção dos pacientes com RTT e que devem ser avaliados quanto à presença do marcador biológico. (HUPPKE, 2003)

Os critérios diagnósticos incluem:

Aspecto normal ao nascimento;

Desenvolvimento usual até os seis a 18 meses;

Circunferência craniana normal ao nascimento;

Desaceleração da circunferência craniana no período pós-natal;

Perda da capacidade funcional de uso das mãos de seis meses a 2,5 anos;

Desenvolvimento de movimentos estereotipados das mãos;

Perda da capacidade de comunicação, comportamento autista, disfunção cognitiva e deterioração da capacidade de locomoção.

São critérios auxiliares ao diagnóstico:

Distúrbios respiratórios no período de vigília;

Bruxismo;

- # Alteração do padrão de sono na infância;
- # Fraqueza muscular e perda do tônus;
- # Distúrbios vasomotores periféricos;
- # Escoliose ou cifose progressivas;
- # Atraso do crescimento;
- # Mãos e pés hipotróficos e frios.

É necessária a presença da maior parte desses critérios para o diagnóstico de RTT. A forma variante pode ser incluída quando houver ao menos três dos seis critérios maiores ou cinco dos onze critérios auxiliares.

São critérios de exclusão da Síndrome de Rett:

- # Evidências de doenças de depósito;
- # Retinopatia;
- # Catarata;
- # Atrofia óptica;
- # Presença de doença metabólica ou neurodegenerativa;
- # Seqüela de lesão encefálica pré ou perinatal.

A progressão da doença pode ser arbitrariamente dividida em quatro fases:
(HAGBERG e WITT-ENGERSTROM, 1986; HAGBERG, 2002a)

Fase I (Perinatal até 18 meses): Desaceleração da circunferência craniana e hipotonia (raramente reconhecidos clinicamente);

Fase II (1 a 3 anos): Regressão do desenvolvimento - Há um atraso no desenvolvimento, com perda das aquisições e da capacidade motora, especialmente das mãos e distúrbios da fala. É nessa fase que surgem os movimentos estereotipados das mãos e o comportamento autista.

Fase III (2 a 10 anos): Desenvolvimento de crises convulsivas acompanhados de anormalidades respiratórias. Nessa fase pode haver uma estabilidade clínica (*plateau*) em que, eventualmente, pode haver uma melhora da função motora.

Fase IV (>10 anos): Deterioração motora tardia, que pode ser complicada com o desenvolvimento de escoliose e restrição ao leito.

1.5 Aspectos Genéticos

A grande maioria dos casos é de ocorrência esporádica (99%), havendo poucos relatos de comprometimento familiar. Nesses casos, tem sido demonstrada a inativação preferencial do cromossomo X defeituoso nas mães. (SIRIANNI, 1998)

A herança é dominante, ligada ao cromossomo X, com comprometimento em até 80% dos casos, do gene da proteína ligadora à CpG-metilada 2 - *methyl-CpG binding protein-2* (MeCP2), localizado no *locus* Xq28. (SIRIANNI, 1998; AMIR, 1999)

Os demais casos são caracterizados apenas clinicamente. Nenhum outro gene foi confirmado como associado à Síndrome de Rett, até o momento. Entretanto, alguns autores acreditam que a família de genes da histona deacetilase - *histone deacetylases* (HDAC) 1, 2, 3 e 8 ou CDKL5 (RUSSO, 2009) podem estar envolvidos e serem responsáveis por esses casos MeCP2 negativos. Huppke e colaboradores avaliando meninas que preenchem os critérios clínicos para a forma clássica, mas negativas para mutações no gene da MeCP2, num total de sete casos, não encontraram alterações na família de genes HDAC, mesmo assim sugerem a possibilidade de esses estarem envolvidos na patogênese desse grupo específico de pacientes. (HUPPKE, 2005)

A proteína MeCP2 (**Figura 1**) tem ação biológica como um repressor do ácido desoxirribonucléico (DNA) metilado (AMIR, 1999) e sua disfunção afeta a plasticidade e a maturação neuronal. (PALMER; QAYUMI e RONNETT, 2008)

A proteína MeCP2 tem dois sítios ativos: domínio de ligação à CpG-metilada - *methyl-CpG binding domain* (MBD) e o domínio de repressão da transcrição - *transcriptional repressor domain* (TRD). O primeiro domínio tem uma afinidade de 2 a 3 vezes maior pelo DNA metilado, com uma ação silenciadora nos genes e atua efetuando ligação a resíduos CpG. O segundo domínio age, supostamente, na enzima histona deacetilase (HDAC), causando alterações na arquitetura da cromatina, por modificações na cauda de histonas, impedindo atuação da maquinaria transcripcional e silenciando o gene. (AMIR, 1999; HITE, 2009)

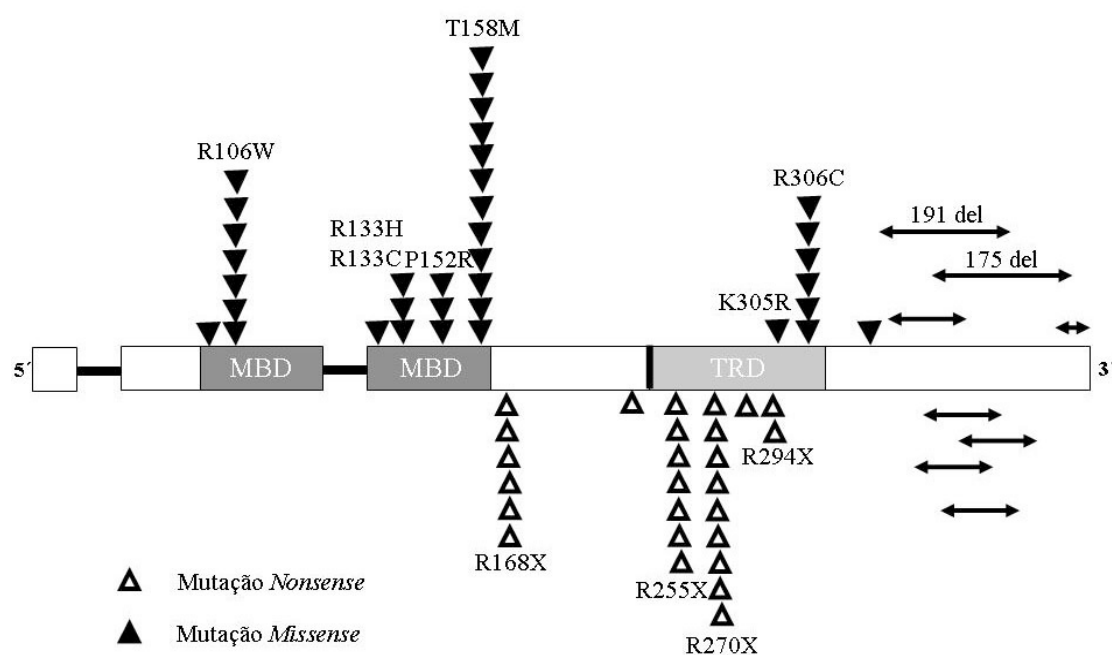


Figura 1 – Estrutura linear da proteína MeCP2 com seus domínios MBD e TRD e os principais pontos de mutação. Fonte: Figura adaptada de W.E. Kauffman (Comunicação Pessoal).

Hite e colaboradores revisaram recentemente a estrutura e funcionalidade da proteína MeCP2. A função de ligação à região metilada foi a primeira descrita e dá nome à proteína. Sequencialmente outras funções foram descobertas, caracterizando, atualmente a proteína como multifuncional exercendo papéis na regulação gênica, organização da arquitetura da cromatina, regulação no processamento e corte (*splice*) do ácido ribonucléico

(RNA) mensageiro, entre outras. Associação da proteína MeCP2 com a Síndrome de Rett tem estimulado as pesquisas sobre sua função e estrutura. (HITE; ADAMS e HANSEN, 2009)

Existem seis regiões estruturais na proteína MeCP2 e, como a maior parte das mutações relacionadas à RTT é pontual, é possível concluir que todas essas partes são necessárias ao adequado funcionamento da MeCP2. (HITE, 2009)

Há mais de 200 mutações relacionadas ao gene MeCP2, incluídas mutações *nonsense* (mutações que determinam a formação de um códon de parada, o que impede a transcrição do gene e ocasiona a formação de uma proteína truncada e, geralmente, não-funcionante); *missense* (mutações em que há a troca de um nucleotídeo por outro, o que determina a alteração do aminoácido transcrito, sem bloquear ou impedir a transcrição) e deleções na porção C-terminal da MeCP2 (mutações que determinam a formação de proteínas não-funcionantes). (PHILIPPE, 2006)

As mutações prevalentes (**Figura 1**), com 80% dos casos descritos, são: R106W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X, R306C, além de deleções no C-terminal (BEBBINGTON, 2008). Essa nomenclatura refere-se às alterações protéicas, onde a primeira letra representa o aminoácido original, seguido pelo número, que indica a posição na estrutura linear e a última letra, que corresponde ao aminoácido inserido. No caso mais freqüente, é uma substituição da arginina (letra R) por qualquer aminoácido (letra X) na posição 270 – R270X. (DEN DUNNEN e ANTONARAKIS, 2001)

A avaliação dos casos de Rett, desde a descoberta do marcador genético, tem sido centrada na mutação apresentada pelo paciente, uma vez que as diferenças genótípicas podem determinar o grau de comprometimento clínico. (HOFFBUHR, K., 2001; HOFFBUHR, K. C., 2002; COLVIN, 2004; LEONARD, 2005; BEBBINGTON, 2008; NEUL, 2008)

As formas mais graves da doença (em que há limitação motora – incapacidade de andar e do uso das mãos - e incapacidade de falar) estão relacionadas às mutações R168X, R255X e R270X. (VAN DEN VEYVER e ZOGHBI, 2001; NEUL, 2008)

Archer e colaboradores avaliaram pacientes portadores da Síndrome, a partir de informações contidas no Banco de Dados Internacional (ARCHER, 2007). Sua avaliação incluiu a análise das mutações (R168X e T158M), o padrão de inativação do cromossomo X e os dados clínicos dos pacientes. Os resultados obtidos denotam maior gravidade da doença em pacientes portadoras da mutação R168X, havendo a inativação preferencial do cromossomo X mutado em menos de 60% das células, sendo esse achado um fator de pior prognóstico clínico. Esses dados apresentaram diferenças estatísticas significantes. (ARCHER, 2007)

1.6 Neuroanatomia

Os cérebros das crianças afetadas, com a Síndrome de Rett, apresentam redução de volume das substâncias branca e cinzenta, com variações regionais e que determinam uma microcefalia adquirida. (REISS, 1993; SUBRAMANIAM; NAIDU e REISS, 1997; KAUFMANN; PEARLSON e NAIDU, 1998; CARTER, 2008)

A avaliação macroscópica do encéfalo das crianças afetadas não demonstra achados patognomônicos, mas mostra, de maneira recorrente, a redução de volume encefálico nos pacientes, quando comparada com controles de mesma idade e sexo. (JELLINGER, K. e SEITELBERGER, 1986; JELLINGER, K. A., 2003; ARMSTRONG, D. D., 2005) Esses achados são confirmados em estudos neurorradiológicos com ressonância magnética (RM) e avaliação volumétrica de todo o encéfalo ou com análise em separado dos três componentes: líquido cefalorraquidiano, substâncias branca e cinzenta. (REISS, 1993; SUBRAMANIAM, 1997; CARTER, 2008)

Estudos histológicos do córtex, em pacientes com RTT, demonstraram corpos celulares e dendritos de tamanho reduzido, aumento da densidade celular por redução da matriz extracelular e reação astrocitária. (ARMSTRONG, D., 1995; BAUMAN; KEMPER e ARIN, 1995a; ARMSTRONG, D. D., 1997) As técnicas histológicas são limitadas na avaliação de anormalidades axonais, pois são avaliadas apenas as regiões subcorticais, onde alterações qualitativas dos axônios e da mielina não podem ser estudadas. (JELLINGER, K., 1986; JELLINGER, K., 1988)

O estudo histológico da estrutura dendrítica, realizado por Armstrong e colaboradores, demonstra que os achados nos pacientes com Síndrome de Rett não são relacionados à destruição, mas a uma parada do desenvolvimento, especialmente da formação de sinapses e da árvore dendrítica. (ARMSTRONG, D., 1995; ARMSTRONG, D. D., 1997, 2005)

Poliakov, nos seus estudos pioneiros de ontogênese, identificou três períodos de desenvolvimento e organização cerebral. A fase intra-uterina em que há desenvolvimento dos neurônios e o estabelecimento de conexões de dois pontos (córtico-subcortical). No nascimento, há uma reorganização das conexões com o envolvimento de mais camadas corticais. Essa fase é chamada de maturação cerebral e permite interações nas áreas de projeção e associação. A última fase processa-se no segundo ano de vida com o aumento dos corpos celulares e dendritos e com desenvolvimento dos interneurônios. (POLIAKOV, 1961) Essas fases são bastante significativas quando comparadas com a progressão da doença, pois há um período de perda das aquisições pelo desenvolvimento insuficiente da remodelação e desenvolvimento da árvore dendrítica. (ARMSTRONG, D., 1995)

Essas alterações na árvore dendrítica podem ser secundárias à deficiência da proteína MeCP2 nas células astrocitárias e não nos neurônios, como recentemente demonstrado *in vitro*. (BALLAS, 2009)

O lobo frontal é particularmente envolvido, dentre as regiões afetadas, apresentando hipoplasia em estudos anatômicos (ARMSTRONG, D. D., 1997, 2005), hipoperfusão nos estudos com tomografia computadorizada com emissão de fóton único – *single photon emission computed tomography* (SPECT) (BURRONI, 1997; LAPPALAINEN, 1997; NAIDU, 2001) e, curiosamente, hipermetabolismo caracterizado nos estudos com glicose marcada com flúor 18 na tomografia com emissão de pósitrons – *positron emission tomography* (PET) (VILLEMAGNE, 2002). Este último é um resultado inesperado frente à hipoperfusão, quando se supõe que o tecido encefálico esteja menos ativo.

Os estudos neuronatômicos macroscópicos e histológicos demonstraram que o cérebro das crianças afetadas com RTT não está relacionado a más formações, desmielinização ou degeneração, sendo, portanto, um cérebro pequeno, mas não necessariamente atrófico. (KAUFMANN; NAIDU e BUDDEN, 1995; KAUFMANN, 1998; ARMSTRONG, D. D., 2005)

O efeito do gene MeCP2 no cérebro em formação foi estudado em pacientes e comparado com controles de idades semelhantes (RONNETT, 2003). Nesse estudo, foram realizadas biopsias do epitélio olfatório nos pacientes e controles, para obtenção de tecido neural. Os autores consideraram o epitélio olfatório como um tecido interessante, pois é de fácil acesso e tem uma neurogênese fracionada, que ocorre durante toda a vida. É, portanto, um bom modelo, para estudo do neurodesenvolvimento. As pacientes com Síndrome de Rett apresentaram redução dos corpos neuronais e pobreza de dendritos e axônios, que quando presentes eram disgenéticos. Na comparação entre o grupo afetado e controles, foi observado o acúmulo de neurônios imaturos em uma razão sobre os maduros, em níveis maiores que nos controles (RONNETT, 2003). Estudos anteriores em camundongos MeCP2 *null* já

havam sugerido que um dos efeitos biológicos da proteína MeCP2 está ligado a maturação neuronal e manutenção. (SAYWELL, 2006)

I.7 Métodos de Imagem

I.7-1 Imagens Anatômicas

Os métodos de imagem têm sido empregados na caracterização dos pacientes com Rett desde o trabalho original de Hagberg e colaboradores (HAGBERG, 1983), no qual, 35 pacientes foram avaliados retrospectivamente, seis das quais foram submetidas à pneumoencefalografia e dezesseis à tomografia computadorizada (TC) do crânio. A disparidade de técnicas de imagem empregadas está relacionada à multiplicidade de centros e épocas, em que os casos foram coletados.

Não foram observadas anormalidades nos estudos de pneumoencefalografia e, em quatro pacientes, a tomografia computadorizada apresentou redução de volume do encéfalo, com a preservação do coeficiente de atenuação da substância branca. A discrepância de resultados está certamente ligada à sensibilidade dos métodos na observação direta do parênquima encefálico.

O desenvolvimento de técnicas de imagem não-invasivas, especialmente a ressonância magnética (RM), que tem uma alta resolução de contraste (diferenciação de tons na escala de cinza), permitindo uma ótima diferenciação tecidual no encéfalo, determinou interesse na avaliação *in vivo* do envolvimento cerebral da Síndrome de Rett (REISS, 1993). Nesse trabalho e em estudos subsequentes (SUBRAMANIAM, 1997; CARTER, 2008) foram confirmadas observações de macroscopia do encéfalo e aqueles apresentados à tomografia computadorizada.

Nos estudos neurorradiológicos com interesse na avaliação morfológica do encéfalo (REISS, 1993; SUBRAMANIAM, 1997; CARTER, 2008), a RM não se mostrou útil ao diagnóstico da RTT, pois seus achados são inespecíficos e há uma superposição com várias outras doenças.

Nos estágios avançados da doença, é possível observar redução difusa do encéfalo, especialmente dos lobos frontais e parietais, com um aumento *ex-vácuo* dos ventrículos (**Figura 2B e D**). (REISS, 1993; KAUFMANN, 1998)

Em estudo recente, usando volumetria por RM (CARTER, 2008), o lobo mais afetado foi o parietal posterior, o que difere dos trabalhos anteriores (REISS, 1993; SUBRAMANIAM, 1997), quando os lobos frontais e temporais eram predominantes. Essa diferença pode estar relacionada à seleção de pacientes, pois no primeiro estudo apenas aqueles com mutação na proteína MeCP2 foram incluídos, o que leva a um viés de seleção entre os trabalhos.

A redução de volume encontrada nos exames de imagem, assim como nos estudos de macroscopia, está relacionada prioritariamente com hipoplasia e não com atrofia ou outro processo destrutivo. (GOKCAY, 2002)

O papel da RM convencional na Síndrome de Rett está restrito ao diagnóstico diferencial da afecção, com a exclusão de pacientes que tenham lesão encefálica associada a eventos pré ou perinatais. (HAGBERG, 2002b)

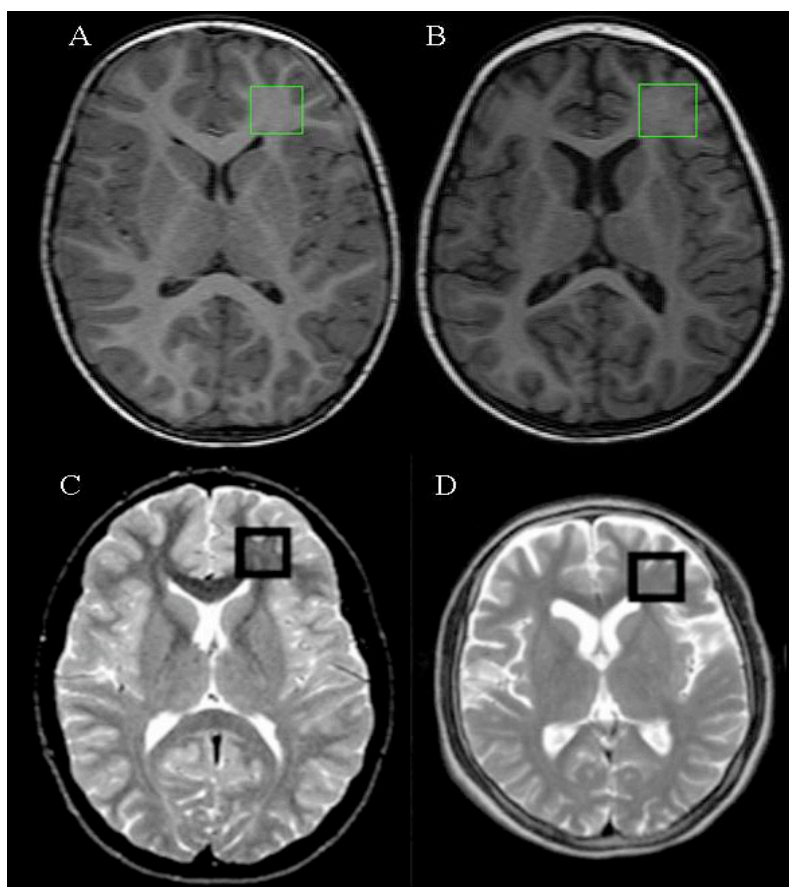


Figura 2 – Imagens anatômicas ponderadas em T1 e T2 respectivamente de controles com idades pareadas (A e C) e de pacientes (B e D). Notar o alargamento dos sulcos corticais e o aumento *ex-vácuo* dos ventrículos laterais, quando comparados com meninas da mesma idade. Observar a microcefalia adquirida nas pacientes.

I.7-2 Espectroscopia de Prótons

Os métodos de imagem por ressonância magnética com técnicas funcionais podem ser úteis, na avaliação do comprometimento encefálico, ajudar a elucidar os mecanismos fisiopatológicos relacionados à RTT e avaliar a integridade e função dos axônios *in vivo*. (NAIDU, 2001)

A espectroscopia de prótons por ressonância magnética - *magnetic resonance spectroscopy* (MRS) é o método de imagem funcional mais largamente utilizado na avaliação dos pacientes com Síndrome de Rett (HANEFELD, 1995; HASHIMOTO, 1998; PAN, 1999; HORSKA, 2000; GOKCAY, 2002; HORSKA, 2002; KHONG, 2002). Isso se

deve ao seu caráter eminentemente não-invasivo e à possibilidade de produzir informações clinicamente úteis na avaliação e seguimento dessas meninas.

A espectroscopia de prótons é uma aplicação relativamente recente em radiologia, mas já bem estabelecida em química básica, onde permite a separação de componente em solução. (BRAND; RICHTER-LANDSBERG e LEIBFRITZ, 1993; VAN ZIJL e BARKER, 1997)

O princípio físico na aquisição da espectroscopia é o mesmo da imagem anatômica, com estímulos de radiofrequência aplicados sobre os prótons de hidrogênio na presença de um campo magnético.

A diferença de energia e na composição química determina uma distribuição dos componentes em espectro de frequência *frequency domain*, cujo cálculo é feito pela transformada de Fourier, sobre o sinal no domínio do tempo *time domain signal*. Esses cálculos produzem imagens de curvas espectrais, diferentemente das imagens anatômicas. (VAN ZIJL, 1997; GILLARD; WALDMAN e BARKER, 2005)

Os prótons de hidrogênio são os mais utilizados em espectroscopia clínica, pois apresentam uma grande disponibilidade no corpo humano, são encontrados na água e têm um grande momento magnético, que gera um sinal melhor na RM. (VAN ZIJL, 1997; GILLARD, 2005)

Os metabólitos detectáveis são limitados por sua concentração no tecido analisado e limitados inferiormente a 10 mm. Água (4,7 ppm) e lipídios (0,1 a 1,5 ppm) têm concentrações maiores (até 80M) e para uma adequada avaliação dos demais metabólitos, estes precisam ser eliminados por um processo denominado *apodization*. Outros processamentos são necessários, mas fogem do interesse mais geral dessa descrição. (VAN ZIJL, 1997; GILLARD, 2005)

Os metabólitos são distribuídos na curva espectral devido à sua composição química em partes por milhão (ppm) (**Figura 3A e B**).

O N-acetil-aspartato (NAA) ressoa de 2,00 a 2,02ppm e é um marcador neurônio-específico. A creatina (Cr) ressoa de 3,00 a 3,02ppm e está relacionada ao metabolismo energético. A replicação da membrana celular é marcada pela colina (Co) que ressoa de 3,20 a 3,23 ppm. A replicação glial e a integridade da árvore dendrítica são marcadas pelo mio-inositol (mI) que ressoa em 3,56 ppm. O neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC é o glutamato (Glu). Sua avaliação individualizada é limitada no campo magnético de 1,5 T, sendo, portanto, expressa como o somatório com a glutamina (Gln) e representado como Glx, que ressoam de 2,0 a 2,45 ppm. O lactato (Lac) é um marcador de respiração anaeróbica e está relacionado à necrose. Ressoa em 1,3 ppm e aparece como um pico duplo *duplet* invertido com tempo de eco de 144 ms. (VAN ZIJL, 1997; HORSKA, 2002; GILLARD, 2005)

Os metabólitos podem ser avaliados segundo aplicações de parâmetros físicos, como tempo de eco (TE), o que altera a ponderação das imagens. Nos exames com TE longo (**Figura 3A**) (aproximadamente 144ms) são observados os seguintes metabólitos: NAA, Cr, Co e Lac. O TE curto – 35ms (**Figura 3B**) - avalia os mesmos metabólitos e ainda mI e Glx, pois permite uma melhor recuperação do sinal. O lactato é de difícil avaliação com TE curto, pois seu pico ressoa junto aos lipídios. Esse é mais bem avaliado com TE longo (144 ou 288ms). A linha de base nos espectros com TE longo é menos ruidosa. Entretanto, há uma diminuição da relação sinal-ruído dentro da área de interesse (voxel), o que leva a uma detecção de menos sensível dos metabólitos. (GILLARD, 2005)

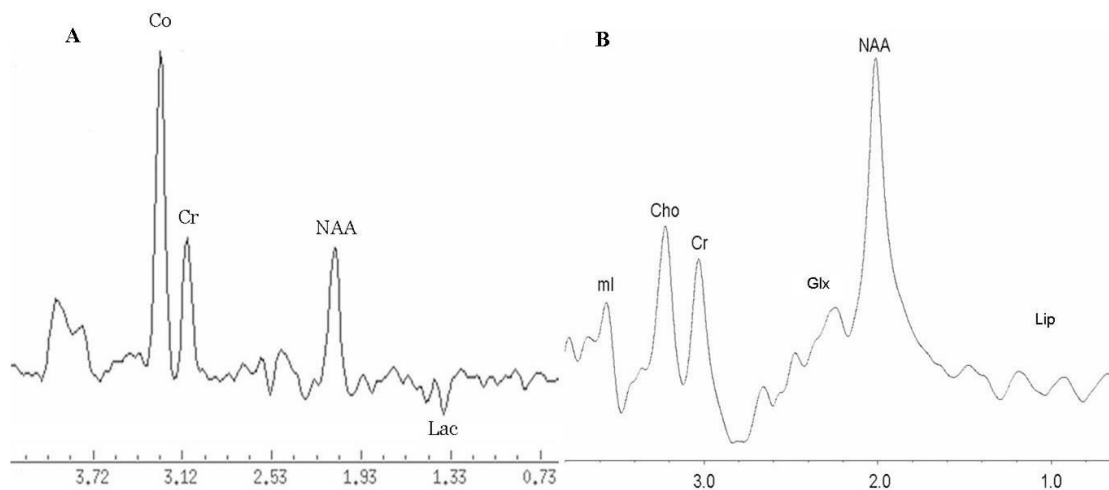


Figura 3 - Espectroscopia de prótons, uni-voxel, com técnica *point resolved spectroscopy* (PRESS), em diferentes pacientes, com TE de 144ms (A) e 35ms (B). Notar as diferenças entre os picos e quantidade de metabólitos apresentados.

A MRS pode ser adquirida como uni-voxel, múltiplos voxéis em corte único e múltiplos voxéis em vários cortes, também chamada de imagem espectroscópica (MRSI). (VAN ZIJL, 1997)

O estudo de voxel único avalia uma única região do encéfalo, realizado com TE curto ou longo e tem um volume de amostragem de 2 a 30 ml, com tempo de aquisição médio de 5 minutos. As técnicas de múltiplos voxéis permitem uma avaliação de várias regiões do encéfalo, com regiões de interesse tão pequenas quanto 0,75 ml e tempo de aquisição de 7 a 30 minutos. (VAN ZIJL, 1997)

A técnica MRSI permite uma ampla cobertura do encéfalo e avaliação em separado das substâncias branca e cinzenta. (HORSKA, 2000; HORSKA, 2002)

Várias técnicas têm sido empregadas com intuito de permitir avaliação quantitativa da MRS. A principal razão para essa avaliação numérica é a detecção de variações de metabólitos, nem sempre demonstráveis pela interpretação das imagens espectrais. (GILLARD, 2005)

As metodologias empregadas na quantificação da espectroscopia são a integral das curvas, onde a área sobre a curva representa sua quantificação em unidades arbitrárias e não está relacionada à concentração dos metabólitos e à razão entre esses, com um deles usado como referência.

A técnica relacionada ao cálculo da integral das curvas é limitada pela superposição dos picos e pela irregularidade da linha de base, foi muito utilizada no início da MRS clínica, mas é muito trabalhosa e tem sido substituída por processos automatizados. O Modelo de Combinação Linear (*LC Model*), descrito por S. Provencher (PROVENCHER, 1993, 2001), realiza, de maneira automatizada, essa avaliação e, quando somada a uma aquisição sem supressão de água, permite o cálculo de concentração dos metabólitos. Os modelos matemáticos envolvidos estão além do interesse desse estudo e podem ser consultados em estudos específicos. (VAN ZIJL, 1997)

A razão ou a relação entre os metabólitos sofre pouca variação dos parâmetros físicos, pois todos os metabólitos são obtidos na mesma aquisição e em condições similares, diminuindo o erro sistemático. Entretanto, é pouco específico, já que verdadeiramente nenhum metabólito é estável no tempo. A creatina usada como referência, é alterada pela idade e pode ser aumentada (esclerose múltipla, encefalite pelo HIV) ou diminuída (tumores, isquemia, abscesso), dependendo do processo patológico envolvido. A baixa especificidade decorre da dificuldade em determinar se a razão está alterada por variação no denominador ou numerador (GILLARD, 2005). Uma solução para sua utilização é calcular a concentração de um metabólito e confirmar sua estabilidade entre casos e controles.

O primeiro estudo aplicando MRS em pacientes com RTT foi publicado em 1993 por Nielsen e colaboradores (NIELSEN, 1993). A casuística compôs-se de quatro pacientes selecionados com base nos critérios clínicos e com idade variando de seis a 17 anos. A técnica empregada foi o *stimulated echo acquisition mode* (STEAM), uni-voxel, em aparelho

de 1,5T. Os metabólitos avaliados não demonstraram alterações significativas. Paralelamente, esses autores avaliaram o sistema energético, sem resultados significativos, utilizando espectroscopia de fósforo.

Hanefeld e colaboradores (HANEFELD, 1995) apresentam uma casuística de nove pacientes selecionadas pelos critérios clínicos. Todas foram submetidas à espectroscopia uni-voxel, com técnica STEAM em aparelho de 2T. O achado mais significativo foi uma redução do NAA com piora associada à idade. Houve uma diminuição do glutamato e da glutamina, relacionado pelos autores como perda sináptica. Colina e creatina não mostraram alterações significativas. Hashimoto e colaboradores realizaram MRS em três pacientes e compararam com controles sadios e com pacientes autistas (HASHIMOTO, 1998). Utilizaram RM de 1,5T, com técnica STEAM, uni-voxel e TE de 270ms. Seus achados são semelhantes aos de Hanefeld e colaboradores com apenas uma paciente de 27 anos apresentando redução das razões de NAA/Cr e NAA/Co.

Utilizando um ultra-alto campo de 4,1T Pan e colaboradores avaliaram seis pacientes e as compararam com quatro controles (PAN, 1999). Os achados são semelhantes aos de Hanefeld, com redução de NAA/Cr na substância branca e relacionados à idade. Como achado adicional, demonstraram leve elevação do glutamato na substância cinzenta em concordância com estudos do líquido cefalorraquidiano.

Horská e colaboradores realizaram, até o nosso estudo, a mais ampla avaliação de pacientes com Síndrome de Rett, utilizando a espectroscopia de prótons. (HORSKA, 2000) Foram analisadas 17 meninas, com média de idade de seis anos, no intuito de estudar as alterações metabólicas precoces. Foi aplicada a técnica multi-voxel em quatro cortes paralelos, em aparelho de 1,5T, o que permitiu uma ampla cobertura do encéfalo. Os dados foram comparados com controles com idade semelhante as das pacientes.

Na fase inicial da RTT, a espectroscopia revelou baixas concentrações de NAA global e especificamente nas substâncias branca e cinzenta dos lobos frontais, ínsulas e hipocampos. (HORSKA, 2000)

A colina global está aumentada, principalmente em crianças com crises convulsivas, mas não apresenta diferenças regionais significativas (HORSKA, 2000). A creatina não mostrou diferenças entre pacientes e controles e o lactato não foi detectado nos dois grupos. (HORSKA, 2000)

No estudo de Horská e colaboradores, o tempo de eco (TE) empregado foi longo (144 ms), o que limita avaliação do mio-inositol, glutamato e glutamina. (HORSKA, 2000)

Khong e colaboradores avaliaram seis meninas de origem chinesa, aparelho de 1,5T, técnica *point resolved spectroscopy* (PRESS), uni-voxel com TE de 288ms (KHONG, 2002). Suas pacientes apresentaram uma redução significativa do NAA, sem, entretanto, demonstrar piora com a idade. Os demais metabólitos avaliados não demonstraram alterações significativas.

No trabalho de Gökçay e colaboradores, com avaliação de sete pacientes em aparelho de 1,5T, técnica multi voxel, com TE 40ms o mio-inositol foi avaliado pela primeira vez (GOKCAY, 2002). Entretanto, não demonstrou alterações em relação aos controles. Os achados desse estudo variam em relação aos anteriores já que apenas quatro das sete pacientes apresentavam redução do NAA e não há uma modificação com a idade.

A variabilidade técnica entre os estudos anteriores pode ser o maior determinante das diferenças dos dados apresentados nos artigos publicados (HANEFELD, 1995; HASHIMOTO, 1998; PAN, 1999; HORSKA, 2000; GOKCAY, 2002; KHONG, 2002)

I.7-3 Tensor de Difusão

Estudos neuropatológicos têm demonstrado que há uma preferência de alterações nos corpos neuronais e na árvore dendrítica, ou seja, da substância cinzenta do encéfalo. Entretanto, os estudos com RM volumétrica mostram uma redução tanto da substância cinzenta como da branca. (REISS, 1993; SUBRAMANIAM, 1997; CARTER, 2008)

O estudo de espectroscopia com técnica MRSI de alta resolução demonstrou redução predominante do NAA na substância branca subcortical (HORSKA, 2000; NAIDU, 2001). Existe a possibilidade de essas alterações estarem relacionadas à reação astrocítica e disrupção axonal leve. A interpretação de proliferação astrogliar é menos provável, pela ausência de aumento concorrente da colina (marcador de membrana) e do mio-inositol (KIM, 2005). O conjunto dos dados de redução do NAA predominante na substância branca subcortical pode traduzir um comprometimento axonal primário e não apenas secundário às alterações dos corpos celulares. A técnica de imagem útil na avaliação da integridade dos tratos é o tensor de difusão. (MORI, S.e BARKER, 1999)

Robert Brown, em 1827, observou o movimento aleatório de partículas macroscópicas (pólen de flores). Esse movimento ficou conhecido como browniano e se repete com todas as moléculas. (GILLARD, 2005)

Há duas formas de movimento browniano. O isotrópico, quando não há barreiras limitando o movimento das moléculas, com difusão em todas as direções e representado pela esfera. No encéfalo, ocorre na substância cinzenta. O movimento anisotrópico ocorre quando há preferência por uma direção e sua melhor representação gráfica é a elipse. Moseley e colaboradores demonstraram que, na substância branca do encéfalo, o movimento das moléculas é anisotrópico e tem preferência pela direção predominante da fibra axonal. (MOSELEY, 1990)

Alguns autores observaram que o fenômeno da ressonância, quando aplicado a líquidos de baixa viscosidade, apresenta sinal independente das ponderações T1 ou T2 e está relacionado à capacidade de difusão das moléculas de água. (MORI, S., 1999)

Na RM, as imagens relacionadas à difusão são obtidas com seqüências rápidas (eco planar), com pulsos aplicados na mesma direção e sentidos invertidos. São geradas duas imagens, cuja diferença entre elas é o fator b (b -value) que determina a sensibilidade ao sinal da difusão. A primeira imagem é denominada B0 e tem sinal semelhante à imagem ponderada em T2. A segunda imagem é denominada de B1000 e tem por objetivo demonstrar, exponencialmente, as alterações determinadas pela difusão da água.

O cálculo matemático resultante entre as duas imagens é denominado coeficiente de difusão aparente - *aparent diffusion coefficient* (ADC), sensível à direção dos gradientes aplicados à obtenção das imagens. Portanto, seus valores são pouco úteis na avaliação entre diferentes regiões do encéfalo no mesmo paciente ou na comparação entre pacientes diferentes. (MORI, S., 1999; XUE, 1999; MORI, N., 2008)

O método que permite a avaliação intra e interpacientes é denominado tensor de difusão - *Diffusion tensor imaging* (DTI) (**D**) (**Figura 4**), onde há o somatório vetorial das resultantes das imagens (são necessárias ao menos seis) obtidas com direções diferentes. (MELHEM, 2002; MORI, S.e VAN ZIJL, 2002; MORI, S.e ZHANG, 2006)

$$\mathbf{D} = \begin{cases} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{cases}$$

Figura 4 – Representação em forma de matriz do tensor de difusão. Fonte: Adaptada de Gillard 2005.

A denominação D_{xx} , D_{yy} e D_{zz} representa a difusão pelos eixos ortogonais. Quando em diagonal, esses valores são iguais aos *eigenvalues*. Esse tensor é simétrico,

assim, D_{xy} é igual a D_{yx} , portanto são necessários, no mínimo, seis aquisições para o cálculo do tensor. (MELHEM, 2002; MORI, S., 2002; MORI, S., 2006)

O tensor é a única técnica de RM que permite uma avaliação qualitativa e quantitativa *in vivo* dos tratos de substância branca. (BASSER; MATTIELLO e LEBIHAN, 1994)

Quando observamos as imagens com codificação de cores ou mapas de anisotropia fracionada, não avaliamos verdadeiramente os axônios, pois com melhor resolução espacial da RM o voxel resultante ($2,5 \times 2,5 \times 2,5$ mm há um volume nominal de 15 mm^3) será sempre muitas vezes maior do que o axônio que tem ordem de grandeza de $10 \text{ }\mu\text{m}$ (XUE, 1999; LEE, 2005). A medida é, na verdade, a média resultante das elipsóides em cada voxel, representando em alguns casos tratos específicos como no corpo caloso ou a soma de tratos com a mesma direção como a radiação talâmica posterior que envolve as radiações ópticas e fibras comissurais posteriores do corpo caloso (*fórcex major*). (MELHEM, 2002; MORI, S., 2002; MORI, S., 2006)

Avaliação qualitativa é dada pelo mapa de cores (**Figura 5A**) e a avaliação quantitativa é feita pela anisotropia fracionada (FA) (**Figura 5B**) (PIERPAOLI e BASSER, 1996) que mede a integridade dos axônios. Seu valor varia de zero, quando o movimento é isotrópico, a um, quando há movimentação em apenas uma direção. (BASSER, 1994; JONES; HORSFIELD e SIMMONS, 1999)

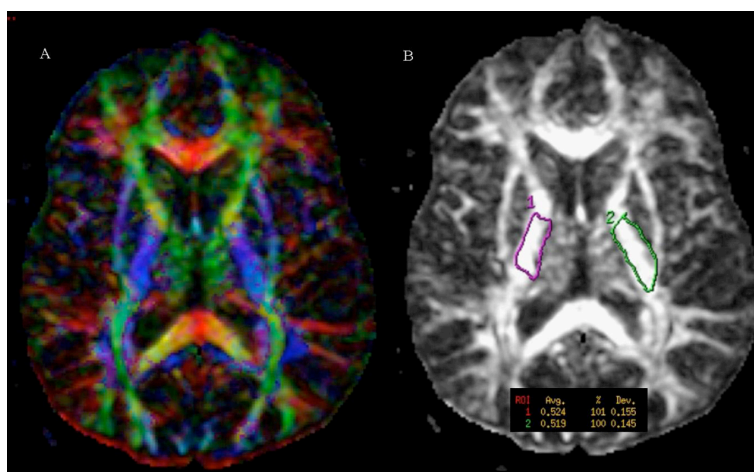


Figura 5 - Tensor de Difusão de voluntário adulto e saudável com a imagem do mapa de cores (A). A codificação está relacionada à direção dos tratos: vermelho látero-lateral, verde ântero-posterior e azul crânio-caudal. No mapa de anisotropia fracionada (FA) (B), em que a substância branca é realçada, também estão apresentados os valores de FA das pernas posteriores das cápsulas internas.

Apenas estudos iniciais estão relatados sobre aplicação de tensor de difusão na Síndrome de RTT, sem resultados consistentes. (NAIDU, 2001)

I.7-4 Outros Métodos de Imagem

Outros métodos funcionais foram aplicados em tecido cerebral *ex-vivo* de pacientes, no intuito de avaliar a neuroquímica dos vários sistemas cerebrais, com a demonstração de deficiência em todos eles. (LAPPALAINEN e RIIKONEN, 1996; BLUE; NAIDU e JOHNSTON, 1999b, 1999a; ARMSTRONG, D. D., 2005) Essas alterações neuroquímicas apresentam, em alguns casos, tradução anatômica com redução específica de algumas estruturas encefálicas como os núcleos do *striatum* (putame e caudado), mesencéfalo e cerebelo. (REISS, 1993; BAUMAN, 1995a; BAUMAN; KEMPER e ARIN, 1995b; SUBRAMANIAM, 1997)

Entre os neurotransmissores, o achado mais interessante é o aumento do glutamato no líquido cefalorraquidiano (LAPPALAINEN, 1996) e em estudo com espectroscopia (PAN, 1999). Esse achado foi confirmado em um estudo com

autorradiografia de segmentos do giro frontal superior de pacientes e controles (material proveniente de Banco de Tecidos), onde ficou demonstrado um aumento na concentração de receptores NMDA em pacientes com idade menor que dez anos e a redução desses receptores nos indivíduos mais velhos, quando comparado com cérebros de controles. (BLUE, 1999b)

As diferenças relacionadas à idade são similares, mas não significantes, e foram descritas em receptores GABA. (BLUE, 1999a)

Os achados de elevação dos receptores de NMDA, o aumento do consumo de glicose no lobo frontal (VILLEMAGNE, 2002) e o aumento dos níveis de glutamato no líquido cefalorraquidiano (LAPPALAINEN, 1996) são sugestivos do aumento da neurotransmissão excitatória na fase inicial da Síndrome de Rett.

II. OBJETIVOS

Avaliar, aplicando espectroscopia de prótons por ressonância magnética (MRS), o comprometimento metabólico da substância branca no lobo frontal de crianças afetadas pela Síndrome de Rett e controles.

Correlacionar os achados de espectroscopia com o escore de gravidade clínico e as mutações do gene MeCP2 entre as pacientes.

Analisar, com tensor de difusão (DTI), o comprometimento da substância branca em pacientes com RTT.

Medir a anisotropia fracionada (FA) entre os diversos tratos de substância branca em pacientes com RTT.

III. ARTIGO – BRAIN METABOLISM IN RETT SYNDROME: AGE, CLINICAL AND GENOTYPE CORRELATIONS – publicado no ANNALS OF NEUROLOGY 2009; 65: 90-97.

**IV. ARTIGO – WHITE MATTER IMPAIRMENT IN RETT SYNDROME:
DIFFUSION TENSOR IMAGING STUDY WITH CLINICAL CORRELATIONS -
submetido para publicação no AMERICAN JOURNAL OF NEURORADIOLOGY.**

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Síndrome de Rett ainda não tem toda sua fisiopatologia entendida, apesar dos muitos avanços científico-tecnológicos dos últimos anos. (NAIDU, S., 1997; SIRIANNI, 1998; WEAIVING, 2005; BALLAS, 2009; ZOGHBI, 2009)

Os métodos de imagem estão presentes na avaliação das pacientes, desde a descrição original de Hagberg (HAGBERG, 1983). Estudos subseqüentes empregando métodos de imagem incluíram avaliações anatômicas (REISS, 1993; SUBRAMANIAM, 1997; CARTER, 2008) e, mais recentemente, incluíram avaliações funcionais. (NAIDU, 2001)

As técnicas funcionais da ressonância magnética têm sido largamente empregadas (NAIDU, 2001), em especial à espectroscopia pelo seu caráter essencialmente não-invasivo. (HANEFELD, 1995; HASHIMOTO, 1998; PAN, 1999; HORSKA, 2000; GOKCAY, 2002; HORSKA, 2002; KHONG, 2002)

Realizamos dois estudos com técnicas funcionais - espectroscopia de prótons e tensor de difusão – com o intuito de compreender o envolvimento da substância branca na Síndrome de Rett.

Os dados sugerem utilidade da MRS e DTI no acompanhamento das pacientes e avaliação de extensão de lesão.

Na espectroscopia, obtivemos redução do NAA (marcador neurônio-específico) nos casos que cursaram com crises convulsivas e, além disso, está associado a determinadas mutações sabidamente mais deletérias.

Esse mesmo tipo de resposta foi observado com relação à DTI, onde houve redução significativa da anisotropia fracionada no fascículo longitudinal superior nas crianças com grave comprometimento da fala.

Outro achado é a inexistência de uma fase de estabilidade, já que observamos um progressivo envolvimento encefálico com o aumento da idade, por provável reação astrocitária e caracterizado pelo aumento do mio-inositol, sem aumento concorrente da colina. Este dado não é observado em estudos anatômicos, onde os resultados progressivos mostram uma estabilidade de volume encefálico.

Estudos futuros com grupos maiores de pacientes em coortes específicas para cada mutação podem ser úteis na avaliação das interações entre genótipo e fenótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIR, R. E.; VAN DEN VEYVER, I. B.; WAN, M.; TRAN, C. Q.; FRANCKE, U. e ZOGHBI, H. Y. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. **Nat Genet**, v. 23, n. 2, p. 185-188, Oct 1999.

ARCHER, H.; EVANS, J.; LEONARD, H.; COLVIN, L.; RAVINE, D.; CHRISTODOULOU, J.; WILLIAMSON, S.; CHARMAN, T.; BAILEY, M. E.; SAMPSON, J.; DE KLERK, N. e CLARKE, A. Correlation between clinical severity in patients with Rett syndrome with a p.R168X or p.T158M MECP2 mutation, and the direction and degree of skewing of X-chromosome inactivation. **J Med Genet**, v. 44, n. 2, p. 148-152, Feb 2007.

ARMSTRONG, D.; DUNN, J. K.; ANTALFFY, B. e TRIVEDI, R. Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 54, n. 2, p. 195-201, Mar 1995.

ARMSTRONG, D. D. Review of Rett syndrome. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 56, n. 8, p. 843-849, Aug 1997.

_____. Neuropathology of Rett syndrome. **J Child Neurol**, v. 20, n. 9, p. 747-753, Sep 2005.

BALLAS, N.; LIOY, D. T.; GRUNSEICH, C. e MANDEL, G. Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 311-317, Mar 2009.

BASSER, P. J.; MATTIELLO, J. e LEBIHAN, D. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. **J Magn Reson B**, v. 103, n. 3, p. 247-254, Mar 1994.

BAUMAN, M. L.; KEMPER, T. L. e ARIN, D. M. Microscopic observations of the brain in Rett syndrome. **Neuropediatrics**, v. 26, n. 2, p. 105-108, Apr 1995a.

_____. Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. **Neurology**, v. 45, n. 8, p. 1581-1586, Aug 1995b.

BEBBINGTON, A.; ANDERSON, A.; RAVINE, D.; FYFE, S.; PINEDA, M.; DE KLERK, N.; BEN-ZEEV, B.; YATAWARA, N.; PERCY, A.; KAUFMANN, W. E. e LEONARD, H. Investigating genotype-phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. **Neurology**, v. 70, n. 11, p. 868-875, Mar 11 2008.

BLUE, M. E.; NAIDU, S. e JOHNSTON, M. V. Altered development of glutamate and GABA receptors in the basal ganglia of girls with Rett syndrome. **Exp Neurol**, v. 156, n. 2, p. 345-352, Apr 1999a.

_____. Development of amino acid receptors in frontal cortex from girls with Rett syndrome. **Ann Neurol**, v. 45, n. 4, p. 541-545, Apr 1999b.

BRAND, A.; RICHTER-LANDSBERG, C. e LEIBFRITZ, D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. **Dev Neurosci**, v. 15, n. 3-5, p. 289-298, 1993.

BURRONI, L.; AUCONE, A. M.; VOLTERRANI, D.; HAYEK, Y.; BERTELLI, P.; VELLA, A.; ZAPPELLA, M. e VATTIMO, A. Brain perfusion abnormalities in Rett syndrome: a qualitative and quantitative SPET study with ⁹⁹Tc(m)-ECD. **Nucl Med Commun**, v. 18, n. 6, p. 527-534, Jun 1997.

CARTER, J. C.; LANHAM, D. C.; PHAM, D.; BIBAT, G.; NAIDU, S. e KAUFMANN, W. E. Selective cerebral volume reduction in Rett syndrome: a multiple-approach MR imaging study. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 29, n. 3, p. 436-441, Mar 2008.

CHRISTEN, H. J. e HANEFELD, F. Male Rett variant. **Neuropediatrics**, v. 26, n. 2, p. 81-82, Apr 1995.

COLVIN, L.; LEONARD, H.; DE KLERK, N.; DAVIS, M.; WEAVING, L.; WILLIAMSON, S. e CHRISTODOULOU, J. Refining the phenotype of common mutations in Rett syndrome. **J Med Genet**, v. 41, n. 1, p. 25-30, Jan 2004.

DEN DUNNEN, J. T. e ANTONARAKIS, S. E. Nomenclature for the description of human sequence variations. **Hum Genet**, v. 109, n. 1, p. 121-124, Jul 2001.

GILLARD, J. H.; WALDMAN, A. D. e BARKER, P. B. **Clinical MR neuroimaging : Diffusion, Perfusion and Spectroscopy**. Cambridge ; New York: Cambridge University Press. 2005. xxiv, 827 p.

GOKCAY, A.; KITAS, O.; EKMEKCI, O.; KARASOY, H. e SENER, R. N. Proton MR spectroscopy in Rett syndrome. **Comput Med Imaging Graph**, v. 26, n. 4, p. 271-275, Jul-Aug 2002.

HAGBERG, B. Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, v. 8, n. 2, p. 61-65, 2002a.

HAGBERG, B.; AICARDI, J.; DIAS, K. e RAMOS, O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. **Ann Neurol**, v. 14, n. 4, p. 471-479, Oct 1983.

HAGBERG, B.; HANEFELD, F.; PERCY, A. e 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. **Eur J Paediatr Neurol**, v. 6, n. 5, p. 293-297, 2002b.

HAGBERG, B. e WITT-ENGERSTROM, I. Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. **Am J Med Genet Suppl**, v. 1, n., p. 47-59, 1986.

HANEFELD, F.; CHRISTEN, H. J.; HOLZBACH, U.; KRUSE, B.; FRAHM, J. e HANICKE, W. Cerebral proton magnetic resonance spectroscopy in Rett syndrome. **Neuropediatrics**, v. 26, n. 2, p. 126-127, Apr 1995.

HASHIMOTO, T.; KAWANO, N.; FUKUDA, K.; ENDO, S.; MORI, K.; YONEDA, Y.; YAMAUE, T.; HARADA, M. e MIYOSHI, K. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in three cases of Rett syndrome: comparison with autism and normal controls. **Acta Neurol Scand**, v. 98, n. 1, p. 8-14, Jul 1998.

HITE, K. C.; ADAMS, V. H. e HANSEN, J. C. Recent advances in MeCP2 structure and function. **Biochem Cell Biol**, v. 87, n. 1, p. 219-227, Feb 2009.

HOFFBUHR, K.; DEVANEY, J. M.; LAFLEUR, B.; SIRIANNI, N.; SCACHERI, C.; GIRON, J.; SCHUETTE, J.; INNIS, J.; MARINO, M.; PHILIPPART, M.; NARAYANAN, V.; UMANSKY, R.; KRONN, D.; HOFFMAN, E. P. e NAIDU, S. MeCP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome. **Neurology**, v. 56, n. 11, p. 1486-1495, Jun 12 2001.

HOFFBUHR, K. C.; MOSES, L. M.; JERDONEK, M. A.; NAIDU, S. e HOFFMAN, E. P. Associations between MeCP2 mutations, X-chromosome inactivation, and phenotype. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, v. 8, n. 2, p. 99-105, 2002.

HOOK, E. B. Down syndrome rates and relaxed selection at older maternal ages. **Am J Hum Genet**, v. 35, n. 6, p. 1307-1313, Nov 1983.

HORSKA, A.; KAUFMANN, W. E.; BRANT, L. J.; NAIDU, S.; HARRIS, J. C. e BARKER, P. B. In vivo quantitative proton MRSI study of brain development from childhood to adolescence. **J Magn Reson Imaging**, v. 15, n. 2, p. 137-143, Feb 2002.

HORSKA, A.; NAIDU, S.; HERSKOVITS, E. H.; WANG, P. Y.; KAUFMANN, W. E. e BARKER, P. B. Quantitative 1H MR spectroscopic imaging in early Rett syndrome. **Neurology**, v. 54, n. 3, p. 715-722, Feb 8 2000.

HUPPKE, P.; KOHLER, K.; LACCONE, F. e HANEFELD, F. Indication for genetic testing: a checklist for Rett syndrome. **J Pediatr**, v. 142, n. 3, p. 332-335, Mar 2003.

HUPPKE, P.; OHLENBUSCH, A.; BRENDEL, C.; LACCONE, F. e GARTNER, J. Mutation analysis of the HDAC 1, 2, 8 and CDKL5 genes in Rett syndrome

patients without mutations in MECP2. **Am J Med Genet A**, v. 137, n. 2, p. 136-138, Aug 30 2005.

JELLINGER, K.; ARMSTRONG, D.; ZOGHBI, H. Y. e PERCY, A. K. Neuropathology of Rett syndrome. **Acta Neuropathol**, v. 76, n. 2, p. 142-158, 1988.

JELLINGER, K. e SEITELBERGER, F. Neuropathology of Rett syndrome. **Am J Med Genet Suppl**, v. 1, n., p. 259-288, 1986.

JELLINGER, K. A. Rett Syndrome -- an update. **J Neural Transm**, v. 110, n. 6, p. 681-701, Jun 2003.

JONES, D. K.; HORSFIELD, M. A. e SIMMONS, A. Optimal strategies for measuring diffusion in anisotropic systems by magnetic resonance imaging. **Magn Reson Med**, v. 42, n. 3, p. 515-525, Sep 1999.

KAUFMANN, W. E.; NAIDU, S. e BUDDEN, S. Abnormal expression of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neocortex in Rett syndrome. **Neuropediatrics**, v. 26, n. 2, p. 109-113, Apr 1995.

KAUFMANN, W. E.; PEARLSON, G. D. e NAIDU, S. The neuronatomy of Rett Syndrome: neuropathological and neuroimaging studies. **Rivista Medica**, v. 4, n. 4, p. 187 - 199, 1998.

KHONG, P. L.; LAM, C. W.; OOI, C. G.; KO, C. H. e WONG, V. C. Magnetic resonance spectroscopy and analysis of MECP2 in Rett syndrome. **Pediatr Neurol**, v. 26, n. 3, p. 205-209, Mar 2002.

KIM, J. P.; LENTZ, M. R.; WESTMORELAND, S. V.; GRECO, J. B.; RATAI, E. M.; HALPERN, E.; LACKNER, A. A.; MASLIAH, E. e GONZALEZ, R. G. Relationships between astrogliosis and 1H MR spectroscopic measures of brain choline/creatine and myo-inositol/creatine in a primate model. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 26, n. 4, p. 752-759, Apr 2005.

LACCONE, F.; ZOLL, B.; HUPPKE, P.; HANEFELD, F.; PEPINSKI, W. e TRAPPE, R. MECP2 gene nucleotide changes and their pathogenicity in males: proceed with caution. **J Med Genet**, v. 39, n. 8, p. 586-588, Aug 2002.

LAPPALAINEN, R.; LIEWENDAHL, K.; SAINIO, K.; NIKKINEN, P. e RIIKONEN, R. S. Brain perfusion SPECT and EEG findings in Rett syndrome. **Acta Neurol Scand**, v. 95, n. 1, p. 44-50, Jan 1997.

LAPPALAINEN, R. e RIIKONEN, R. S. High levels of cerebrospinal fluid glutamate in Rett syndrome. **Pediatr Neurol**, v. 15, n. 3, p. 213-216, Oct 1996.

LEE, S. K.; KIM, D. I.; KIM, J.; KIM, D. J.; KIM, H. D.; KIM, D. S. e MORI, S. Diffusion-tensor MR imaging and fiber tractography: a new method of describing aberrant fiber connections in developmental CNS anomalies. **Radiographics**, v. 25, n. 1, p. 53-65; discussion 66-58, Jan-Feb 2005.

LEONARD, H.; MOORE, H.; CAREY, M.; FYFE, S.; HALL, S.; ROBERTSON, L.; WU, X. R.; BAO, X.; PAN, H.; CHRISTODOULOU, J.; WILLIAMSON, S. e KLERK, N. Genotype and early development in Rett syndrome: the value of international data. **Brain Dev**, v. 27 Suppl 1, n., p. S59-S68, Nov 2005.

MELHEM, E. R.; MORI, S.; MUKUNDAN, G.; KRAUT, M. A.; POMPER, M. G. e VAN ZIJL, P. C. Diffusion tensor MR imaging of the brain and white matter tractography. **AJR Am J Roentgenol**, v. 178, n. 1, p. 3-16, Jan 2002.

MORI, N.; MIKI, Y.; FUSHIMI, Y.; KIKUTA, K.; URAYAMA, S.; OKADA, T.; FUKUYAMA, H.; HASHIMOTO, N. e TOGASHI, K. Cerebral infarction associated with moyamoya disease: histogram-based quantitative analysis of diffusion tensor imaging -- a preliminary study. **Magn Reson Imaging**, v. 26, n. 6, p. 835-840, Jul 2008.

MORI, S. e BARKER, P. B. Diffusion magnetic resonance imaging: its principle and applications. **Anat Rec**, v. 257, n. 3, p. 102-109, Jun 15 1999.

MORI, S. e VAN ZIJL, P. C. Fiber tracking: principles and strategies - a technical review. **NMR Biomed**, v. 15, n. 7-8, p. 468-480, Nov-Dec 2002.

MORI, S. e ZHANG, J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 527-539, Sep 7 2006.

MOSELEY, M. E.; COHEN, Y.; KUCHARCZYK, J.; MINTOROVITCH, J.; ASGARI, H. S.; WENDLAND, M. F.; TSURUDA, J. e NORMAN, D. Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. **Radiology**, v. 176, n. 2, p. 439-445, Aug 1990.

NAIDU, S. Rett syndrome: a disorder affecting early brain growth. **Ann Neurol**, v. 42, n. 1, p. 3-10, Jul 1997.

NAIDU, S.; BIBAT, G.; KRATZ, L.; KELLEY, R. I.; PEVSNER, J.; HOFFMAN, E.; CUFFARI, C.; ROHDE, C.; BLUE, M. E. e JOHNSTON, M. V. Clinical variability in Rett syndrome. **J Child Neurol**, v. 18, n. 10, p. 662-668, Oct 2003.

NAIDU, S.; KAUFMANN, W. E.; ABRAMS, M. T.; PEARLSON, G. D.; LANHAM, D. C.; FREDERICKSEN, K. A.; BARKER, P. B.; HORSKA, A.; GOLAY, X.; MORI, S.; WONG, D. F.; YABLONSKI, M.; MOSER, H. W. e JOHNSTON, M. V. Neuroimaging studies in Rett syndrome. **Brain Dev**, v. 23 Suppl 1, n., p. S62-71, Dec 2001.

NAIDU, S. B. Rett syndrome. **Indian J Pediatr**, v. 64, n. 5, p. 651-659, Sep-Oct 1997.

NEUL, J. L.; FANG, P.; BARRISH, J.; LANE, J.; CAEG, E. B.; SMITH, E. O.; ZOGHBI, H.; PERCY, A. e GLAZE, D. G. Specific mutations in methyl-CpG-binding protein 2 confer different severity in Rett syndrome. **Neurology**, v. 70, n. 16, p. 1313-1321, Apr 15 2008.

NIELSEN, J. B.; TOFT, P. B.; RESKE-NIELSEN, E.; JENSEN, K. E.; CHRISTIANSEN, P.; THOMSEN, C.; HENRIKSEN, O. e LOU, H. C. Cerebral magnetic

resonance spectroscopy in Rett syndrome. Failure to detect mitochondrial disorder. **Brain Dev**, v. 15, n. 2, p. 107-112, Mar-Apr 1993.

PALMER, A.; QAYUMI, J. e RONNETT, G. MeCP2 mutation causes distinguishable phases of acute and chronic defects in synaptogenesis and maintenance, respectively. **Mol Cell Neurosci**, v. 37, n. 4, p. 794-807, Apr 2008.

PAN, J. W.; LANE, J. B.; HETHERINGTON, H. e PERCY, A. K. Rett syndrome: 1H spectroscopic imaging at 4.1 Tesla. **J Child Neurol**, v. 14, n. 8, p. 524-528, Aug 1999.

PHILIPPE, C.; VILLARD, L.; DE ROUX, N.; RAYNAUD, M.; BONNEFOND, J. P.; PASQUIER, L.; LESCA, G.; MANCINI, J.; JONVEAUX, P.; MONCLA, A.; CHELLY, J. e BIENVENU, T. Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update. **Eur J Med Genet**, v. 49, n. 1, p. 9-18, Jan-Feb 2006.

PIERPAOLI, C. e BASSER, P. J. Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. **Magn Reson Med**, v. 36, n. 6, p. 893-906, Dec 1996.

POLIAKOV, G. I. Some results of research into the development of the neuronal structure of the cortical ends of the analyzers in man. **J Comp Neurol**, v. 117, n., p. 197-212, Oct 1961.

POZZI, C. M. e ROSEMBERG, S. Rett syndrome: clinical and epidemiological aspects in a Brazilian institution. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 4, p. 909-915, Dec 2003.

PROVENCHER, S. W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. **Magn Reson Med**, v. 30, n. 6, p. 672-679, Dec 1993.

_____. Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. **NMR Biomed**, v. 14, n. 4, p. 260-264, Jun 2001.

REISS, A. L.; FARUQUE, F.; NAIDU, S.; ABRAMS, M.; BEATY, T.; BRYAN, R. N. e MOSER, H. Neuroanatomy of Rett syndrome: a volumetric imaging study. **Ann Neurol**, v. 34, n. 2, p. 227-234, Aug 1993.

RETT, A. Euber eine eiggenartiges hirnatrophisches Syndrome bei hyperammonamie iim Kindesalter. **Wiener medizinische Wochenschrift**, v. 116, n., p. 723-728, 1966.

_____. Rett syndrome. History and general overview. **Am J Med Genet Suppl**, v. 1, n., p. 21-25, 1986.

RONNETT, G. V.; LEOPOLD, D.; CAI, X.; HOFFBUHR, K. C.; MOSES, L.; HOFFMAN, E. P. e NAIDU, S. Olfactory biopsies demonstrate a defect in neuronal development in Rett's syndrome. **Ann Neurol**, v. 54, n. 2, p. 206-218, Aug 2003.

RUSSO, S.; MARCHI, M.; COGLIATI, F.; BONATI, M. T.; PINTAUDI, M.; VENESELLI, E.; SALETTI, V.; BALESTRINI, M.; BEN-ZEEV, B. e LARIZZA, L. Novel mutations in the CDKL5 gene, predicted effects and associated phenotypes. **Neurogenetics**, v., n., p., Feb 25 2009.

SANTOS, M.; TEMUDO, T.; KAY, T.; CARRILHO, I.; MEDEIRA, A.; CABRAL, H.; GOMES, R.; LOURENCO, M. T.; VENANCIO, M.; CALADO, E.; MOREIRA, A.; OLIVEIRA, G. e MACIEL, P. Mutations in the MECP2 gene are not a major cause of Rett syndrome-like or related neurodevelopmental phenotype in male patients. **J Child Neurol**, v. 24, n. 1, p. 49-55, Jan 2009.

SAYWELL, V.; VIOLA, A.; CONFORT-GOUNY, S.; LE FUR, Y.; VILLARD, L. e COZZONE, P. J. Brain magnetic resonance study of Mecp2 deletion effects on anatomy and metabolism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 340, n. 3, p. 776-783, Feb 17 2006.

SIRIANNI, N.; NAIDU, S.; PEREIRA, J.; PILLOTTO, R. F. e HOFFMAN, E. P. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. **Am J Hum Genet**, v. 63, n. 5, p. 1552-1558, Nov 1998.

STACHON, A.; ASSUMPCAO, F. B., JR. e RASKIN, S. Rett syndrome: clinical and molecular characterization of two Brazilian patients. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 1, p. 36-40, Mar 2007.

SUBRAMANIAM, B.; NAIDU, S. e REISS, A. L. Neuroanatomy in Rett syndrome: cerebral cortex and posterior fossa. **Neurology**, v. 48, n. 2, p. 399-407, Feb 1997.

TREVATHAN, E. e NAIDU, S. The clinical recognition and differential diagnosis of Rett syndrome. **J Child Neurol**, v. 3 Suppl, n., p. S6-16, 1988.

VAN DEN VEYVER, I. B. e ZOGHBI, H. Y. Mutations in the gene encoding methyl-CpG-binding protein 2 cause Rett syndrome. **Brain Dev**, v. 23 Suppl 1, n., p. S147-151, Dec 2001.

VAN ZIJL, P. C. e BARKER, P. B. Magnetic resonance spectroscopy and spectroscopic imaging for the study of brain metabolism. **Ann N Y Acad Sci**, v. 820, n., p. 75-96, May 30 1997.

VILLEMAGNE, P. M.; NAIDU, S.; VILLEMAGNE, V. L.; YASTER, M.; WAGNER, H. N., JR.; HARRIS, J. C.; MOSER, H. W.; JOHNSTON, M. V.; DANNALS, R. F. e WONG, D. F. Brain glucose metabolism in Rett Syndrome. **Pediatr Neurol**, v. 27, n. 2, p. 117-122, Aug 2002.

WEAVING, L. S.; ELLAWAY, C. J.; GECZ, J. e CHRISTODOULOU, J. Rett syndrome: clinical review and genetic update. **J Med Genet**, v. 42, n. 1, p. 1-7, Jan 2005.

XUE, R.; VAN ZIJL, P. C.; CRAIN, B. J.; SOLAIYAPPAN, M. e MORI, S. In vivo three-dimensional reconstruction of rat brain axonal projections by diffusion tensor imaging. **Magn Reson Med**, v. 42, n. 6, p. 1123-1127, Dec 1999.

ZOGHBI, H. Y. Rett syndrome: what do we know for sure? **Nat Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 239-240, Mar 2009.

Brain Metabolism in Rett Syndrome: Age, Clinical, and Genotype Correlations

Alena Horská, PhD,¹ Luciano Farage, MD,^{1,2} Genila Bibat, MD,³ Lídia M. Nagae, MD,^{1,4} Walter E. Kaufmann, MD,³ Peter B. Barker, DPhil,^{1,3} and Sakku Bai Naidu, MD³

Objective: Brain metabolism, as studied by magnetic resonance spectroscopy (MRS), has been previously shown to be abnormal in Rett syndrome (RTT). This study reports the relation of MRS findings to age, disease severity, and genotype.

Methods: Forty RTT girls (1–14 years old) and 12 age-matched control subjects were examined. Single-voxel proton MRS of left frontal white matter was performed.

Results: NAA/Cr ratios decreased and myoinositol/Cr ratios increased with age in RTT patients (both $p < 0.03$), whereas these ratios were stable in control. The mean glutamate and glutamine/Cr ratio was 36% greater in RTT patients than in control ($p = 0.043$). The mean NAA/Cr ratio was 12.6% lower in RTT patients with seizures compared with those without seizures ($p = 0.017$). NAA/Cr ratios decreased with increasing clinical severity score ($p = 0.031$). Compared with patients with T158X, R255X, and R294X mutations, and C-terminal deletions, patients with the R168X mutation tended to have the greatest severity score ($0.01 \leq p \leq 0.11$) and the lowest NAA/Cr ratio ($0.029 \leq p < 0.14$).

Interpretation: Decreasing NAA/Cr and increasing myoinositol/Cr with age are suggestive of progressive axonal damage and astrocytosis in RTT, respectively, whereas increased glutamate and glutamine/Cr ratio may be secondary to increasing glutamate/glutamine cycling at the synaptic level. The relations between NAA/Cr, presence or absence of seizures, and disease severity suggest that MRS provides a noninvasive measure of cerebral involvement in RTT.

Ann Neurol 2009;65:90–97

Rett syndrome (RTT) (MIM 312750) is an X-linked neurodevelopmental disorder that primarily affects girls from early childhood.^{1,2} Clinical features of RTT include acquired microcephaly, loss of purposeful hand use, respiratory irregularities during wakefulness, seizures, failure of speech development, varying degrees of intellectual disability, and behavioral changes.^{3,4} Mutations in the methyl-CpG binding protein-2 (MeCP2) gene, located on chromosome Xq28, are identified in more than 80% of affected girls.^{5,6} MeCP2 is a transcriptional regulator that appears to repress gene expression through binding to methylated DNA.⁵ Its dysfunction contributes to synaptic pathology, mainly by affecting activity-dependent plasticity.⁷ Multiple studies suggest that genotypic differences in RTT may account for differences in clinical profile and disease severity.^{8–13}

Decline in brain development in RTT begins before the age of 1 year. Global reductions in gray and white matter volume, and regional variations in brain matu-

ration lead to microcephaly.^{14–16} The frontal lobe appears to be particularly affected, by tissue reduction,¹⁷ hypoperfusion,^{18–20} and somewhat surprisingly, hypermetabolism.²¹ In early RTT, proton magnetic resonance spectroscopy (MRS) detected lower concentration of *N*-acetylaspartate (NAA; a surrogate neuronal marker²²) in the frontal lobe gray and white matter.²³ Neuroanatomic studies of cortical abnormalities in RTT have shown increased neuronal cell packing density, reduced size of neuronal bodies and dendrites, and astrocytic reaction.^{17,24,25} Investigation of cortical white matter did not show any major qualitative changes in axons or myelin.²⁶

In contrast with neuropathological studies, techniques of physiological magnetic resonance imaging (MRI) can probe axonal integrity and function over the entire brain. Because of the noninvasive nature of these techniques, neuronal tissue can be followed sequentially over the entire life span. One of the advanced methods of physiological imaging is proton

From the ¹Division of Neuroradiology, The Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Science, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, MD; ²Medical School, Brasilia University, Brasilia, DF, Brazil; ³Kennedy Krieger Institute, Baltimore, MD; and ⁴Albert Einstein Hospital, São Paulo, Brazil.

Address correspondence to Dr Horská, The Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Science, Johns Hopkins University, 217 Traylor Building, 720 Rutland Avenue, Baltimore, MD 21205. E-mail: ahorska@jhmi.edu

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Received Jul 31, 2008, and in revised form Sep 11. Accepted for publication Sep 26, 2008.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.21562

MRS, which can detect neurometabolites associated with neuronal integrity and function (NAA), cell membrane turnover (choline-containing compounds [Cho]), glial component of the brain tissue (myoinositol [mI]), and a major neurotransmitter, glutamate (Glu).²² Assessment of these neurometabolites in RTT may potentially provide clinically valuable information. However, variability of technical approaches, differences in brain regions studied, and a relatively small number of RTT subjects in most studies have led to variable results.^{27,28} As the genetic abnormality was identified in late 1999, some observations reported in earlier studies may also not be related to the *MeCP2* gene defect. NAA in RTT is decreased, both in the gray and white matter^{23,27}; however, the decrease was observed only in certain brain regions,^{23,28} including frontal lobes, parietal lobes, and the insula.²³ One study measured lower Glu concentrations compared with control subjects in both gray and white matter,²⁷ but later, slightly increased Glu/NAA ratio in gray matter was detected.²⁹ Mean Cho levels in RTT were reported to be slightly increased, in particular, in patients with seizures.²³ However, no significant increase in Cho concentration was documented in individual brain regions.²³ Levels of the glial marker, mI, were examined only in one study, and normal mI/Cr ratios were found.³⁰ To date, a detailed investigation of the relation between the levels of MRS-detected compounds and genetic impairment has not been conducted.

It is puzzling that despite findings of no major qualitative changes in myelin in RTT,²⁶ cortical white matter is affected by diffuse volume reduction and¹⁴ metabolic abnormalities²³ indicative of impaired tissue integrity.³¹ As discussed earlier in this section, there is a specific involvement of frontal lobe in RTT.¹⁷⁻²¹ In agreement with these findings, frontal white matter impairment was detected in an earlier MRS imaging²³ and a preliminary diffusion tensor imaging study.³¹ The goal of this MRS study was to examine metabolic impairment in the frontal white matter to further evaluate white matter pathology in the frontal lobe. Several hypotheses were considered. First, in RTT patients, white matter NAA levels will be decreased, consistent with axonal impairment; Cho and mI levels will be increased, suggesting presence of gliosis. Second, the concentration of the neuronal marker NAA will decrease with age, consistent with progression of symptoms. Third, Glu levels in RTT will be increased, particularly in younger subjects, in agreement with higher density of *N*-methyl-D-aspartate Glu receptors, demonstrated by postmortem autoradiography studies,³² and increased CSF Glu levels.³³ Finally, the degree of metabolic impairment will be associated with disease severity and will vary among *MeCP2* mutation types.

Subjects and Methods

Study Population

Forty girls diagnosed with RTT (mean age, 6.1 years; range, 1.1–14.1 years; standard deviation, 3.1 years) and 12 healthy girls (mean age, 8.9 years; range, 3.6–14.7 years; standard deviation, 3.5 years) were examined. Diagnosis of RTT was confirmed by identification of the *MeCP2* mutation and presence of clinical features.³⁴ Symptom severity was classified by severity scores.¹² The list of mutations and corresponding age and severity scores ranges are presented in the Table. The girls in the control group were either healthy siblings of the RTT patients or unrelated healthy volunteers. During the MRS examination, all RTT patients were sedated with chloral hydrate; examination in all control subjects was performed without sedation. The study was approved by the local institutional review board, and all families provided written informed consent.

Proton Magnetic Resonance Spectroscopy

Single-voxel proton MRS was performed with the Point Resolved Spectroscopy (PRESS) sequence (repetition time/TE = 1,500/30 milliseconds; 2,048 data points; 2,000Hz spectral width; 128 repetitions) at 1.5 Tesla. Single-voxel proton MRS was a component of an integrated MRI examination, including clinical MRI, volumetric MRI, and diffusion tensor imaging. Because of time constraints in sedated patients, proton MRS examination was limited to one region of interest. The 2.0L × 2.0L × 2.0cm³ voxel was positioned in the left forceps minor and contained predominantly white matter. In 26 RTT patients, spectra without water suppression from the same voxel (acquired with 8 repetitions) were also obtained. LCModel (version 6.1)³⁵ was used for automatic analysis of the spectra. Individual metabolite ratios

Table. MeCP2 Gene Mutations

Mutation	n	Age Range (yr)	Severity Score
P101S	1	3.1	4
R106Q	1	8.4	8
R106W	1	3.2	5
R133C	1	4.3	5
P152R	1	5.1	6
T158M	9	2.5-13.1	4-12
R168X	5	1.1-8.5	5-13
R255X	4	1.1-7.7	3-7
R270X	3	6.6-14.1	6-15
R294X	5	4.3-10.4	4-12
R305R	1	6.6	6
R306C	1	5.0	8
R306H	1	9.3	8
P322L	1	5.7	9
C-terminal deletions	5	2.9-7.5	3-7

were obtained by the LCModel as ratios of NAA, mI, Glu, glutamate and glutamine (Glx), and total Cho concentrations to the creatine (Cr) concentration. It should be noted that concentration ratios are not necessarily the same as peak area ratios, which are reported by other software packages. In 26 RTT patients, apparent concentrations of individual metabolites (in arbitrary units) were also estimated based on white matter water concentration as an internal reference. Because of incomplete resolution of the Glx signals, the intensity of the complex Glx signal was measured. Good-quality spectra were obtained in all subjects. For a given metabolite, only data with the LCModel Cramer-Rao bounds $\leq 20\%$ were included. In the Results section, the total number of subjects is noted for analyses with missing data on metabolite ratios or metabolite concentrations.

Statistical Analysis

Normal distribution of all metabolite ratios was confirmed with the Kolmogorov–Smirnov test. General linear model (GLM) analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the differences in metabolite ratios between the RTT and control groups. Age and group (patients and control subjects) were the independent variables; an interaction term age \times group was also used. Linear regression of metabolite ratios and metabolite concentrations in RTT patients on age was used as a post hoc test to examine age-related differences in RTT patients and control subjects. GLM ANOVA was also applied to examine the differences in metabolite ratios between patients with and without seizures, among different types of *MeCP2* gene mutations, and to assess the relation between metabolite ratios and severity scores, controlling for age. Significance level was set to $p < 0.05$. Data are presented as age-adjusted (marginal) means \pm standard deviations.

Results

Figure 1 shows the region of interest in the left frontal forceps minor and examples of spectra in a RTT patient and a healthy control subject.

The main GLM ANOVA of NAA/Cr ratios detected a significant interaction term: group \times age ($p = 0.027$). In RTT patients, NAA/Cr ratios decreased with age ($p = 0.021$), whereas stable NAA/Cr ratios with age were observed in control subjects (Fig 2). The differences in NAA/Cr ratios were more pronounced in older subjects; in RTT patients younger than 7 years, mean NAA/Cr ratio was similar to control subjects (group: $p = 0.77$). The age-related decrease in NAA/Cr ratios in RTT was due to a decrease in NAA concentration ($n = 26$; $p = 0.05$); Cr concentration was stable ($n = 26$; $p = 0.32$) (Fig 3).

The main GLM ANOVA of mI/Cr ratios detected a significant effect of group ($p < 0.0001$) and age ($p = 0.003$). In RTT patients, mI/Cr ratios increased with age ($n = 39$; $p = 0.020$) but were stable in control subjects (see Fig 2). The age-related increase in mI/Cr ratios in RTT was due to an increase in mI concentration ($n = 25$, $p = 0.016$) (see Fig 3).

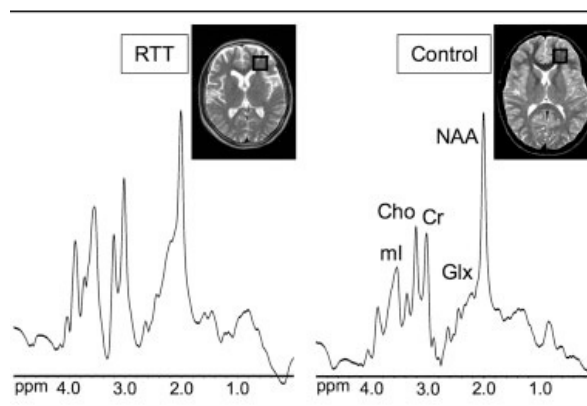


Fig 1. Proton magnetic resonance spectra of the left frontal white matter in a 10.4-year-old girl with Rett syndrome (RTT) and a 10-year-old healthy girl. The T2-weighted localizer images show the position of the region of interest. Microcephaly and prominent sulci are evident in the RTT patient. Lower N-acetylaspartate/creatine (NAA/Cr) and greater myoinositol (mI)/Cr and glutamate and glutamine (Glx)/Cr ratios are apparent in the RTT patient.

The mean Glx/Cr ratio in RTT patients was 36% greater compared with control subjects (group: $p = 0.043$) (see Fig 2). Although no significant age-related differences in Glx/Cr ratios were detected, the observed group differences were due to greater Glx/Cr ratios in patients younger than 10 years ($p = 0.024$). No difference in Glx/Cr ratios was detected between patients older than 10 years ($n = 5$) and control subjects. No group or age differences in the Cho/Cr ratio were found (see Fig 2).

RTT patients with seizures had a 12.6% lower mean NAA/Cr ratio compared with patients without seizures ($p = 0.017$). NAA/Cr decreased linearly with increasing severity score ($p = 0.031$) (Fig 4). Because both NAA/Cr and severity score were age dependent, the effect of age was accounted for by using the residuals on the regression (of NAA/Cr and severity scores) with age. No relation between any other ratio and presence of seizures or severity score was detected.

The most frequent mutations in the examined RTT group were T158M, R168X, R255X, R294X, and C-terminal deletions (see the Table). The R168X mutation tended to be associated with the greatest mean severity score ($0.01 \leq p \leq 0.11$) and the lowest NAA/Cr ratio ($0.029 \leq p < 0.14$) (Fig 5). No significant difference in mean NAA/Cr, mI/Cr, or Glx/Cr ratio between the R168X and T158M mutations was detected (all $p \geq 0.14$). Patients with C-terminal deletions tended to have the greatest mean Glx/Cr ratio compared with patients with the T158M, R168X, and R294X mutations ($0.054 \leq p < 0.15$).

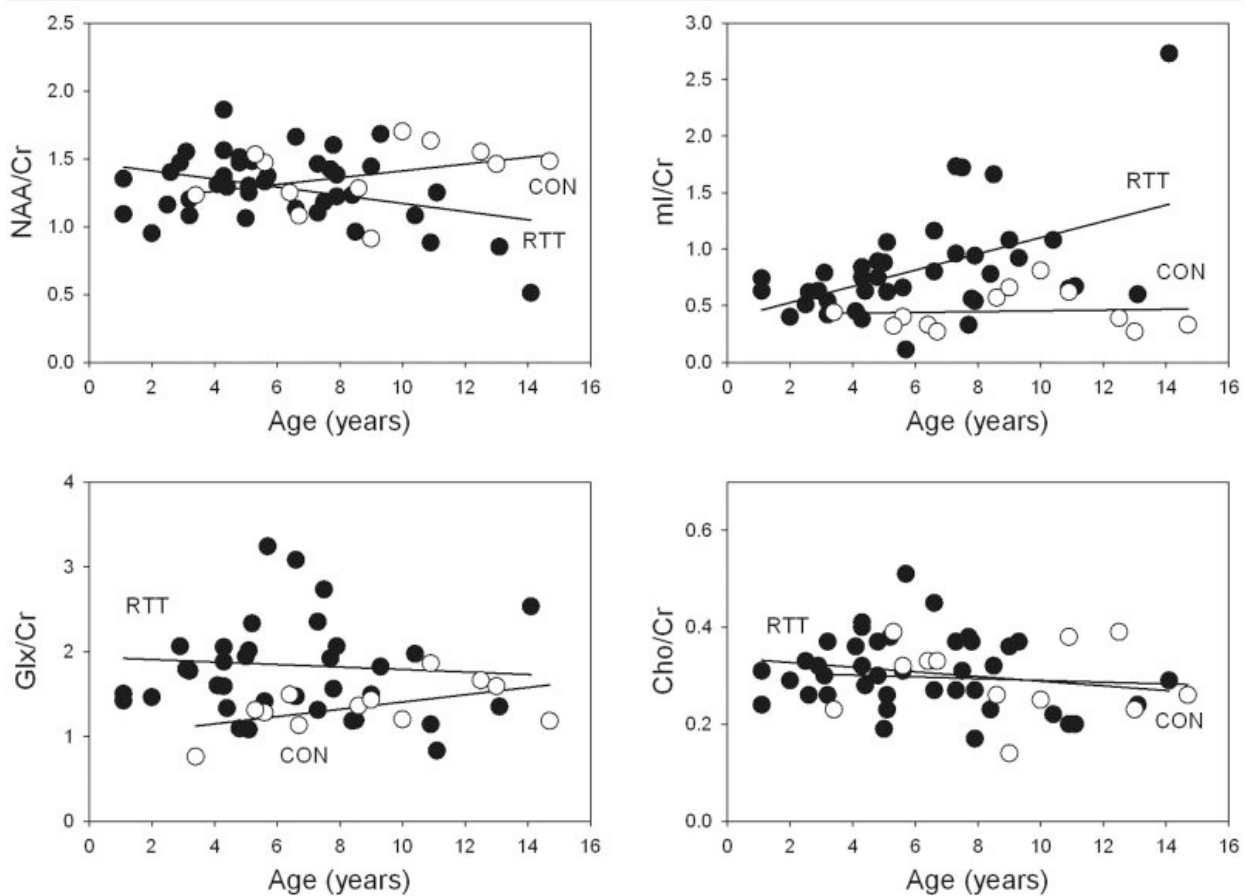


Fig 2. Age-related differences in frontal white matter N-acetylaspartate/creatinine (NAA/Cr), myo-inositol (mI)/Cr, glutamate and glutamine (Glx)/Cr, and total choline (Cho)/Cr ratios in Rett syndrome (RTT) patients (filled circles) and healthy control subjects (open circles). NAA/Cr ratio decreased with age, and mI increased in age in RTT (both $p < 0.03$), whereas stable ratios were detected in control subjects. Glx/Cr ratio was increased in RTT patients younger than 10 years ($p = 0.024$). Cho/Cr ratio was stable across the examined age range in both groups.

Discussion

The main findings of this study were detection of increased levels of mI, considered to be a glial marker, and low levels of NAA, a neuronal marker, in white matter in RTT patients. Compared with healthy children, the mean NAA/Cr ratio was 5% lower and mI/Cr ratio was 54% greater in RTT patients. The MRS results are, therefore, suggestive of mild white matter pathology, in agreement with the neuropathological findings that RTT is not associated with a recognizable degenerative, demyelinating, or gross malformative process.³⁶ Age-related decreases in NAA are consistent with clinical deterioration typically occurring in older subjects.³⁷ NAA/Cr decreased with increasing severity scores, was also low in patients with seizures, and tended to be low in patients with the R168X mutation, which was associated with the greatest mean severity score. Our results therefore suggest that NAA/Cr ratio may be a valuable quantitative marker of clinical status in RTT.

Increased white matter mI concentrations, which progressively increased with age, have not been previously reported in RTT. One earlier MRS study found normal mean white matter mI/Cr in seven girls with RTT, including four girls aged 4 to 10 years who had decreased NAA/Cr ratio.³⁰ The discrepancy may be because of differences in patient populations as the diagnosis of RTT in the previous study was based on clinical criteria alone. Low frontal white matter NAA concentrations and normal Cho concentrations in RTT reported in this study are in agreement with a previous proton MRS imaging study.²³ Although a 12% increase in mean Cho concentration was observed, no significant differences were detected in individual regions.²³ In this study,²³ an MRS imaging technique with higher spatial resolution was performed, but because of the use of a long echo time, mI was not detected. Increased mI concentration, normal Cho levels, and decreased NAA concentration in the frontal white matter may be interpreted as astrocytic

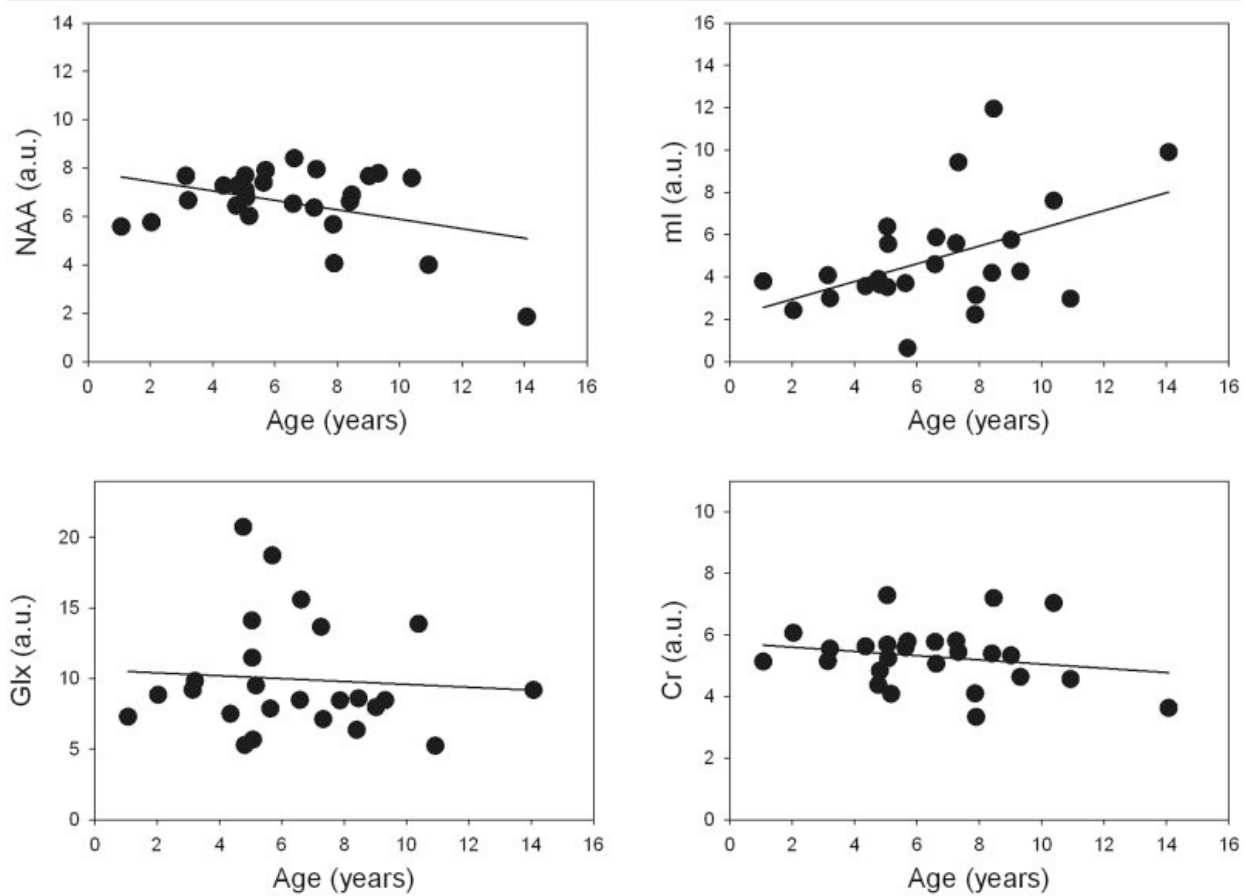


Fig 3. Age-related differences in frontal white matter N-acetylaspartate (NAA), myoinositol (mI), glutamate and glutamine (Glx), and creatine (Cr) concentrations (in arbitrary units [a.u.]) in Rett syndrome (RTT) patients. NAA concentration decreased ($p = 0.05$) and mI concentration increased ($p = 0.016$) with age. Stable Glx and Cr concentrations were detected.

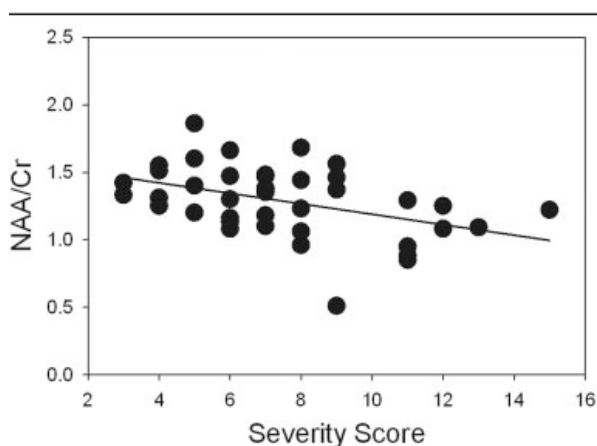


Fig 4. Relation between N-acetylaspartate/creatine (NAA/Cr) ratios in Rett syndrome (RTT) and severity scores. After controlling for age, NAA/Cr linearly decreased with increasing severity score ($p = 0.035$).

reaction in the context of mild axonal disruption (or dysfunction). Astroglial proliferation appears as a less likely correlate, because of lack of concurrent increase in Cho and mI.³⁸ Also, as glial cells have relatively high concentrations of mI and Cr,³⁹ in gliosis, increase of Cr concentration may be present. However, in this study, Cr concentration in control subjects was not measured; thus, this cannot be confirmed. Although an 8% greater mean Cr concentration was previously found in the frontal white matter in the RTT group, the difference was not significant, because of a high variability in Cr levels in both RTT and control groups.²³ Involvement of glial metabolism was also suggested in an *in vivo* MRS study of *MeCP2*-null male mice, though deficit in *MeCP2* in these mice was associated with decreased mI, increased Cho, and decreased NAA concentration.⁴⁰ Comparison with the results of this study suggests a different causative factor for glial pathology in the *MeCP2*-null mouse than in human RTT female patients. Further experiments need to be performed to explain the difference. One of the

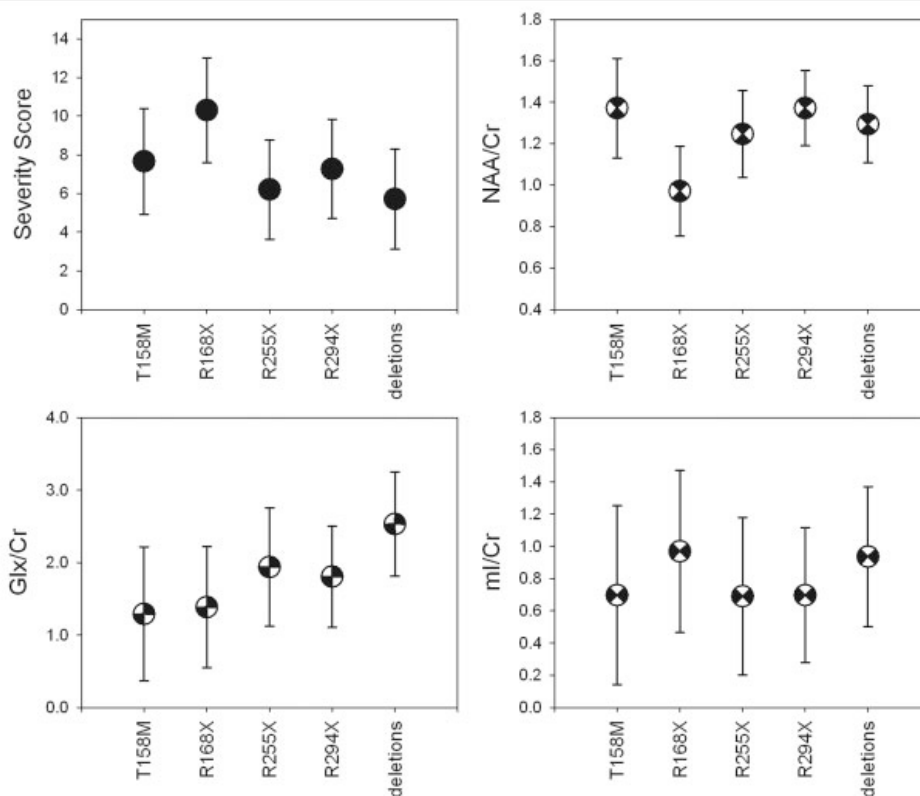


Fig 5. Age-adjusted (marginal) means of severity scores, N-acetylaspartate/creatine (NAA/Cr), glutamate and glutamine (Glx)/Cr, and myoinositol (ml)/Cr ratios in the most frequent mutations in the Rett syndrome (RTT) group: T158M ($n = 9$), R168X ($n = 5$), R255X ($n = 4$), R294X ($n = 5$), and e-terminal deletions ($n = 5$). Patients with the R168X mutation tended to have the greatest severity score ($0.010 < p < 0.11$) and the lowest NAA/Cr ratio ($0.029 < p < 0.14$). A tendency to a high mean Glx/Cr ratio was observed in patients with C-terminal deletions compared with patients with the R168X, T158M, and R294X mutations ($0.054 < p < 0.15$).

limitations of the *MeCP2*-null male mouse model studied, besides difference in magnitude of *MeCP2* gene involvement compared with human RTT subjects, is the severely restricted life span of the mice. *MeCP2*-null mice die at 10 weeks postnatal age, which precludes studies of later developmental stages. Neuropathological studies of RTT brain tissue reported high levels of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and prominent astrocytes^{25,41,42}; however, gene expression profiles characterized by upregulation of astrocytic genes (eg, glial fibrillary acidic protein, alpha B crystalline, glial Excitatory Amino Acid Transporter 1 (EAAT1) suggest that the neuropathological abnormalities may not be typical astrocytic proliferation.⁴¹

Stable frontal white matter NAA concentrations in younger RTT patients were detected both in a previous study²³ and in this work. However, NAA levels were lower and decreased with age in older patients, whereas no age-related differences were detected in control subjects. One recent study including older patients also noted lower NAA/Cr ratio in frontal white matter compared with control subjects.³⁰ However, no age-

related differences were detected, probably because of a limited sample size (total of six subjects, 3–21 years old).³⁰ Lower NAA concentration in older RTT patients compared with younger patients was reported in one of the first MRS studies of RTT, which included nine patients aged 2.3 to 21.3 years old.²⁷ It was noted that the decrease in NAA was less pronounced in the white matter than in the gray matter.²⁷ To date, there are no MRS data from longitudinal studies, which could elucidate the time course of NAA concentration changes in individual patients.

The age-related differences in Glx/Cr found in this study are similar to the pattern of developmental differences between RTT patients and healthy children in Glu receptor binding in the frontal cortex.³² A greater Glx/Cr ratio was found in RTT patients younger than 10 years compared with control subjects, but there was no difference in Glx/Cr between older patients and control subjects. In the Glu receptor binding study, the density of *N*-methyl-D-aspartate Glu receptors was higher in the frontal cortex of patients younger than 10 years but lower in the older RTT group.³² Similar, but

not significant, age-dependent differences in α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), metabotropic, and GABA receptors were detected in the basal ganglia.⁴³ The findings of increased *N*-methyl-D-aspartate Glu receptor density, increased glucose utilization in the frontal lobe,²¹ and increased Glu levels in the cerebrospinal fluid³³ are suggestive of enhanced excitatory neurotransmission in younger patients with RTT. A 4.1-Tesla MRS imaging study of six girls with early RTT (4.5–6 years old) reported increased Glu/NAA ratio in the gray matter and normal Glu/NAA in the white matter.²⁹ However, that study reported mean white matter Glu/NAA ratio in a slice at the level of the cingulate gyrus,²⁹ whereas our study examined only one specific region. Age-related differences for both Glx/Cr and Glu/Cr ratios observed in this study were similar (Glu/Cr results are not reported here); however, statistical significance was reached only for the Glx/Cr ratio because of the difficulty in separating Glu and glutamine at 1.5 Tesla. Increased accuracy in assessment of Glu may be achieved at higher magnetic fields, where the separation between Glu and glutamine resonances is improved.

Mutations in the *MeCP2* gene are associated with a wide range of severity.^{4,44} The common mutations in RTT are the R106W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X, R306C, and small insertions and deletions toward the 3' end of the *MeCP2* gene, leading to C-terminal truncations.^{8,9,44} In our RTT group, the R168X mutation tended to have the greatest mean severity scores and lowest mean NAA/Cr ratio. Subjects with C-terminal deletions had relatively greater mean Glx/Cr ratios. Despite its milder overall severity, this genotype has been linked to a distinctive clinical course characterized by early onset of dystonia.⁴⁵ Although our statistical analysis detected trend to significant differences in metabolites between common mutations, our results (obtained with a small number of patients in individual mutation groups) warrant studies in a larger series, which could permit more detailed understanding of association between genotype, phenotype, and concentration of neurochemicals detected with MRS.

Patients with the same mutation may manifest variable phenotypes likely because of differences in pattern of X-chromosome inactivation.^{13,46,47} Because of the small number of cases, we could not evaluate the effect of X-chromosome inactivation on metabolite levels in individual mutations in this study.

In conclusion, proton MRS demonstrated presence of mild white matter pathological processes, which appear to be complex and progressive in nature. Therefore, future physiological MRI studies in RTT should examine interactions between the glial and neuronal components to evaluate the relation among metabolic, structural, clinical, and genetic impairment.

This work was supported by the NIH (National Institute of Child Health and Human Development, P01 HD 24448) (PI: Dr. Naidu), the Institute for Clinical and Translational Research (UL1RR025005) (PI: Dr. Naidu), National Center for Research Resources (P41 RR 15241) (PI: Dr. Peter van Zijl), and (National Institute of Child Health and Human Development, P30 HD 24061) (PI: Dr. Kaufmann).

References

1. Einspieler C, Kerr AM, Prechtel HF. Is the early development of girls with Rett disorder really normal? *Pediatr Res* 2005;57:696–700.
2. Naidu S. Rett syndrome: a disorder affecting early brain growth. *Ann Neurol* 1997;42:3–10.
3. Jellinger KA. Rett syndrome—an update. *J Neural Transm* 2003;110:681–701.
4. Naidu S, Bibat G, Kratz L, et al. Clinical variability in Rett syndrome. *J Child Neurol* 2003;18:662–668.
5. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23:185–188.
6. Sirianni N, Naidu S, Pereira J, et al. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *Am J Hum Genet* 1998;63:1552–1558.
7. Palmer A, Qayumi J, Ronnett G. *MeCP2* mutation causes distinguishable phases of acute and chronic defects in synaptogenesis and maintenance, respectively. *Mol Cell Neurosci* 2008;37:794–807.
8. Bebbington A, Anderson A, Ravine D, et al. Investigating genotype-phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. *Neurology* 2008;70:868–875.
9. Neul JL, Fang P, Barrish J, et al. Specific mutations in methyl-CpG-binding protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology* 2008;70:1313–1321.
10. Leonard H, Moore H, Carey M, et al. Genotype and early development in Rett syndrome: the value of international data. *Brain Dev* 2005;27(suppl 1):S59–S68.
11. Colvin L, Leonard H, de Klerk N, et al. Refining the phenotype of common mutations in Rett syndrome. *J Med Genet* 2004;41:25–30.
12. Hoffbuhr K, Devaney JM, LaFleur B, et al. *MeCP2* mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome. *Neurology* 2001;56:1486–1495.
13. Hoffbuhr KC, Moses LM, Jerdonek MA, et al. Associations between *MeCP2* mutations, X-chromosome inactivation, and phenotype. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:99–105.
14. Carter JC, Lanham DC, Pham D, et al. Selective cerebral volume reduction in Rett syndrome: a multiple-approach MR imaging study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29:436–441.
15. Subramaniam B, Naidu S, Reiss AL. Neuroanatomy in Rett syndrome: cerebral cortex and posterior fossa. *Neurology* 1997;48:399–407.
16. Reiss AL, Faruque F, Naidu S, et al. Neuroanatomy of Rett syndrome: a volumetric imaging study. *Ann Neurol* 1993;34:227–234.
17. Armstrong DD. Review of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:843–849.
18. Naidu S, Kaufmann WE, Abrams MT, et al. Neuroimaging studies in Rett syndrome. *Brain Dev* 2001;23(suppl 1):S62–S71.
19. Burroni L, Aucone AM, Volterrani D, et al. Brain perfusion abnormalities in Rett syndrome: a qualitative and quantitative SPET study with ⁹⁹Tc(m)-ECD. *Nucl Med Commun* 1997;18:527–534.

20. Lappalainen R, Liewendahl K, Sainio K, et al. Brain perfusion SPECT and EEG findings in Rett syndrome. *Acta Neurol Scand* 1997;95:44–50.
21. Villemagne PM, Naidu S, Villemagne VL, et al. Brain glucose metabolism in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 2002;27:117–122.
22. Barker PB, Lin DDM. In vivo proton MR spectroscopy of the human brain. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2006;49:99–128.
23. Horska A, Naidu S, Herskovits EH, et al. Quantitative 1H MR spectroscopic imaging in early Rett syndrome. *Neurology* 2000;54:715–722.
24. Bauman ML, Kemper TL, Arin DM. Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology* 1995;45:1581–1586.
25. Bauman ML, Kemper TL, Arin DM. Microscopic observations of the brain in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 1995;26:105–108.
26. Jellinger K, Armstrong D, Zoghbi HY, Percy AK. Neuropathology of Rett syndrome. *Acta Neuropathol* 1988;76:142–158.
27. Hanefeld F, Christen HJ, Holzbach U, et al. Cerebral proton magnetic resonance spectroscopy in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 1995;26:126–127.
28. Khong PL, Lam CW, Ooi CG, et al. Magnetic resonance spectroscopy and analysis of MECP2 in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 2002;26:205–209.
29. Pan JW, Lane JB, Hetherington H, Percy AK. Rett syndrome: 1H spectroscopic imaging at 4.1 Tesla. *J Child Neurol* 1999;14:524–528.
30. Gokcay A, Kitis O, Ekmekci O, et al. Proton MR spectroscopy in Rett syndrome. *Comput Med Imaging Graph* 2002;26:271–275.
31. Izbudak I, Farage L, Bonekamp D, et al. Diffusion tensor imaging findings in Rett syndrome patients. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 14th Scientific Meeting*; 2006; Seattle, WA.
32. Blue ME, Naidu S, Johnston MV. Development of amino acid receptors in frontal cortex from girls with Rett syndrome. *Ann Neurol* 1999;45:541–545.
33. Lappalainen R, Riikonen RS. High levels of cerebrospinal fluid glutamate in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 1996;15:213–216.
34. Trevathan E, Naidu S. The clinical recognition and differential diagnosis of Rett syndrome. *J Child Neurol* 1988;3(suppl):S6–S16.
35. Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. *NMR Biomed* 2001;14:260–264.
36. Armstrong DD. Neuropathology of Rett syndrome. *J Child Neurol* 2005;20:747–753.
37. Hagberg B. Rett syndrome: long-term clinical follow-up experiences over four decades. *J Child Neurol* 2005;20:722–727.
38. Kim JP, Lentz MR, Westmoreland SV, et al. Relationships between astrogliosis and 1H MR spectroscopic measures of brain choline/creatine and myo-inositol/creatine in a primate model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005;26:752–759.
39. Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci* 1993;15:289–298.
40. Saywell V, Viola A, Confort-Gouny S, et al. Brain magnetic resonance study of Mecp2 deletion effects on anatomy and metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:776–783.
41. Colantuoni C, Jeon OH, Hyder K, et al. Gene expression profiling in postmortem Rett syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis* 2001;8:847–865.
42. Kaufmann WE, Naidu S, Budden S. Abnormal expression of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neocortex in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 1995;26:109–113.
43. Blue ME, Naidu S, Johnston MV. Altered development of glutamate and GABA receptors in the basal ganglia of girls with Rett syndrome. *Exp Neurol* 1999;156:345–352.
44. Philippe C, Villard L, De Roux N, et al. Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update. *Eur J Med Genet* 2006;49:9–18.
45. Smeets E, Terhal P, Casaer P, et al. Rett syndrome in females with CTS hot spot deletions: a disorder profile. *Am J Med Genet A* 2005;132A:117–120.
46. Huppke P, Maier E, Warnke A, et al. Very mild cases of Rett syndrome with skewed X inactivation. *J Med Genet* 2006;43:814–816.
47. Chae JH, Hwang H, Hwang YS, et al. Influence of MECP2 gene mutation and X-chromosome inactivation on the Rett syndrome phenotype. *J Child Neurol* 2004;19:503–508.

White Matter Impairment in Rett Syndrome: Diffusion Tensor Imaging Study with Clinical Correlations

**Asif Mahmood, MD,MPH¹, Genila Bibat, MD², A-Lai Zhan, MD⁶, Izlem Izbudak, MD⁴,
Luciano Farage, MD^{4,5}, Alena Horska, PhD⁴, Susumu Mori, PhD^{3,4}, SakkuBai Naidu, MD²**

1 Department of Internal Medicine, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX

2 Department of Neurogenetics, Hugo Moser Research Institute, Kennedy Krieger Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, MD

3 F.M. Kirby Research Center, Kennedy Krieger Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, MD

4 Russel H Morgan, Department of Radiology and Radiological Science, Johns Hopkins University, Baltimore, MD

5 Medical School, Brasilia University, Brasilia, DF, Brazil

6 Department of Radiology, Zhangzhou hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou, Fujian Province

ABSTRACT

Background and Purpose: Rett Syndrome (RTT), caused by mutations in Methyl CPG binding protein-2 (MeCP2) gene, is a disorder of neuronal maturation and connections. DTI is performed to examine the status of the white matter axonal tracts in RTT and correlate with clinical phenotype.

Method: Thirty-two females with MeCP2 mutations evaluated for a natural history study underwent neurological assessments and DTI. Thirty-seven age-matched female controls were studied for comparison. Using a 1.5-Tesla MR unit DTI data was acquired using a single-shot echo-planar imaging sequence with the sensitivity-encoding, or SENSE, parallel-imaging scheme. The directionality of water diffusion was quantified by the parameter "fractional anisotropy" (FA)¹¹, to investigate the tract-specific abnormalities in RTT patients.

Results: In RTT, significant reductions in FA were noted in the genu and splenium of corpus callosum and external capsule with regional reductions in the anterior cingulate, internal capsule, posterior thalamic radiation, and frontal white matter. In contrast, visual pathways were similar to controls. Differences of FA in superior longitudinal fasciculus (SLF), which has strong correlation with speech, were noted in RTT with preserved speech (phrases and sentences) where FA in SLF was equal to controls ($p=0.542$) while FA was reduced ($p<.001$) in those who were non-verbal or with single words. No correlation with FA values for tracts associated with seizures, gross or fine motor skills were identified.

Conclusion: DTI, a non-invasive technique of assessing tract pathology, may be add specificity to assessment of clinical severity in RTT that is presently based on mutation and X-inactivation.

Rett Syndrome (RTT), a neurodevelopmental disorder that predominantly affects females, is caused by mutations in the MeCP2 gene located at Xq28^{1,2}. RTT patients appear to develop normally up to six months of life. Nonetheless, deceleration in the velocity of head growth occurs as early as four months of life up to two years leading to microcephaly in most patients³. They lose ability to use words, and develop poor hand use with cognitive and motor deficits.

Pathological studies show that brain weight in RTT is reduced when compared to controls⁴. This decrease in weight of the brain is not generalized. It is more significant in the cerebral hemispheres and less prominent in the cerebellum. Brain volume measurements *in vivo* show regional alterations, with relative preservation in the posterior occipital and posterior temporal regions⁵. The regional reduction in volumes is not attributed to atrophy⁶ but due to poor neuronal maturation⁷ and their connections⁸.

To explore the changes in the white matter anatomy in RTT, DTI was performed. It is a noninvasive technique for *in-vivo* assessment of tract pathology⁹ and is shown to be a sensitive measure of the status of white matter axonal tracts¹⁰. Different quantitative measures can be derived from a DTI study. Our study utilized the directionality of water diffusion, quantified by the parameter "fractional anisotropy" (FA)¹¹, to investigate the tract-specific abnormalities in RTT patients.

METHODS

Subject

Thirty-two girls with RTT syndrome were identified at the Kennedy Krieger Institute, by clinical parameters and mutation analysis. They underwent neuroimaging and neurological evaluation as part of the Natural History study in RTT. In-depth clinical assessments included neurological status, head circumference, history of seizures, respiratory irregularities, gait, and speech. Thirty-seven age-matched normal female control subjects were included for comparison. There was no significant age difference between RTT patients vs. controls subjects (5.5 ± 0.7 vs. 6.1 ± 0.7 years, $t = 0.55$, $p = 0.58$). All RTT patients were sedated for MRI scan, and controls were not.

The Institutional Review Board at Johns Hopkins Medical Institutions approved the study, and informed consent was obtained from legal guardians.

Data Acquisition

A 1.5-Tesla MR unit (Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) was used for data acquisition. Conventional MRI consisted of sagittal T1-weighted, axial T2 fast spin-echo and axial fluid-attenuated inversion recovery images. Conventional brain MRI did not show any apparent abnormalities in all RTT and control subjects. DTI data were acquired using a single-shot echo-planar imaging sequence with the sensitivity-encoding, or SENSE, parallel-imaging scheme (reduction factor, 2.5)¹². The imaging matrix was 96×96 , with a field of view of 240×240 mm (nominal resolution, 2.5 mm), which was zero filled to 256×256 pixels. Transverse sections of 2.5 mm in thickness were acquired parallel to the anterior commissure-posterior commissure line. Diffusion weighting was encoded along 30 independent

orientations¹³, and the b value was 700 sec/mm². Three DTI data sets were acquired for each participant, and the acquisition time per data set was approximately 6 minutes.

Data Processing

For DTI processing, software (DtiStudio) built in-house was used (H. Jiang, S. Mori; Johns Hopkins University and Kennedy Krieger Institute, Baltimore MD, <http://lbam.med.jhmi.edu>)¹⁴. Images were first realigned by using 12-mode affine transformation of the AIR program for co-registration and eddy-current distortion correction¹⁵. The six elements of the diffusion tensor were calculated for each pixel by using multivariate linear fitting.⁹ After the diagonalization, three eigen values and eigen vectors were obtained. For the anisotropy map, fractional anisotropy (FA) was used¹¹.

Strategy for Delineating ROI

The image analysis was based on manually delineated regions of interest (ROIs). To enhance reproducibility of the structure identification, a method aided by a brain normalization scheme was adopted (called “hybrid approach” in our previous publication (Mori et al, NeuroImage 40, 570, 2008)). In this approach, all brains were first normalized to ICBM-DTI-81 atlas http://www.loni.ucla.edu/Atlases/Atlas_Detail.jsp?atlas_id=15) using 12-mode affine transformation. To drive the registration, non-diffusion-weighted images were used. This adjusted the overall brain sizes and orientations across the subjects so that 2D observation slices with consistent orientations and locations could be extracted for the ROI drawing. This initial brain registration was performed using Landmarker (www.mristudio.org) (Mori et al, NeuroImage 40, 570, 2008). After the registration, pre-defined 2D observation places (2 axial slice at $z = 82$ and 65 and 2 coronal slices at $y = 89$ and 125 in the atlas space)

were extracted. **Figure 1** and **Table 2** shows all 45 ROIs placed at the following anatomic locations: Genu of corpus callosum (GC) , splenium of corpus callosum (SCC), corpus callosum (CC), external capsule (EC), inferior fronto-occipital fasciculus (IFO), sagittal stratum (SS), superior longitudinal fasciculus (SLF), posterior corona radiata (PCR), anterior limb of internal capsule (ALIC), posterior limb of internal capsule (PLIC), posterior thalamic radiation (PTR), frontal white matter (FW), cerebral peduncle (CP), superior cerebellar peduncle (SCP), middle cerebellar peduncle (MCP), cingulate gyrus (CG1, CG3, CG4), cingulum (CG2), fornix/Stria terminalis (FX/ST). The shape of these ROIs followed White Matter Parcellation Map (WMPM) defined in the ICBM-DTI-81 atlas.

Statistical Method

T-test was used for comparison of diffusion parameters between RTT patients and age-matched female control subjects. A *p* value of 0.05 or less was considered statistically significant. To investigate the asymmetry between FA of the left and right hemispheres, we used two methods; a) comparison of left and right FA values, and b) Laterality Index(LI) for FA in all examined fiber tracts by utilizing the formula $L = (\text{left} - \text{right}) / [(\text{left} + \text{right})]$. Significance of the hemispheric differences was assessed with paired t-test for left to right comparison and unpaired t-test for LI comparison. All statistical analyses were done using STATA version 8.0 (STATA, College Station, TX).

RESULTS

The demographic and clinical characteristics of the subjects are given in **Table 1**.

Table 2 shows the comparisons of FA between RTT patients and controls. FA was not different in regions comprising the limbic system, namely fornix and posterior cingulate gyrus. However, in RTT patients, FA for anterior cingulum bundles was significantly reduced. Of cerebellar tracts, only the right middle cerebellar tract showed reduced FA. Significant reductions in FA were noted in the genu and splenium of corpus callosum, external capsule, with regional reductions in the anterior and posterior limbs of internal capsule, posterior thalamic radiation, and frontal white matter in RTT. In addition there was no difference in FA between RTT and controls in three of the 4 ROIs in PTR with significantly higher FA in posterior corona radiata of RTT patients (Table 2).

RTT patients were categorized by their capacity to speak: 1) Mute (n=13), 2) Single words (n=13), 3) Could speak in phrases or sentences (n=6). As shown in **Figure 2**, mean FA of SLF in controls and Group 3 patients was not different (0.38 ± 0.04 vs 0.375 ± 0.02 , $t=0.615$, $p=0.542$). Similarly, there was no difference in the FA of Group 1 and Group 2 RTT patients (0.32 ± 0.05 vs. 0.33 ± 0.05 , $t=-0.089$, $p=0.929$). But the Groups 1 and 2 with minimal speech were significantly different from the Group 3 and controls (Group 1 vs. group 3: $t=-2.12$, $p=0.046$, group 1 vs. control: $t=3.77$, $p<0.001$, Group 2 vs. Group 3: $t=-2.03$, $p=0.055$, Group 2 vs. control: $t=3.58$, $p<0.001$). This trend was not seen in any other region.

Our study did not find any correlation with FA values for seizures, head circumference, or walking disability. Hemispheric asymmetry analysis looking at left/right differences showed that in contrast to controls asymmetry was not present in IFO ($t= -0.6$, $p=0.55$), EC ($t= -0.659$, $p=0.515$), SLF ($t=0.257$, $p=0.798$), and PTR ($t=0.627$, $p=0.535$) in RTT patients. Additional LI analysis only showed lack of asymmetry reaching significance in IFO tracts ($t=-2.08$, $p=0.041$), and a trend in SLF ($t=-1.79$, $p=0.077$)

when compared to controls. Surprisingly, we noted left sided asymmetry in posterior cingulated gyrus and cerebral peduncles of the RTT patients when compared to controls who showed no asymmetry.

DISCUSSION

We observed that the FA was reduced especially in corpus callosum, internal capsule, and frontal white matter of RTT patients when compared to controls, but in contrast most of the regions comprising the limbic system and cerebellar tracts were similar in both groups. Posterior corona radiata was the only region in the RTT girls where FA was greater than that of controls.

We noted three major correlations with clinical findings in RTT, the most significant of which was correlation of FA in SLF with ability to speak. SLF is one of main association bundles that connect the external surface of temporo-parieto-occipital regions with the convexity of the frontal lobe and in part associated with phonologic speech. The asymmetry Lt>Rt in SLF, as seen in the controls, was not found in RTT patients with no speech.

Secondly, the presence of intact visual capabilities, which are utilized by some girls with RTT to communicate, may be in accord with normal to increased FA in PCR. This observation was in contrast to FA that was significantly reduced by greater margins in all regions of the corpus callosum affecting inter-hemispheric connectivity probably due to immature neurons and their poor dendritic arborization¹⁶. Study data also argue that with few exceptions white matter tracts in RTT are diffusely affected in comparison to controls. Except for the right middle cerebellar tract, other cerebellar tracts were

generally spared. Limited right-to-left differences in some brain regions of RTT patients suggest that neuronal connectivity may have become restricted before development of specific skills contributing to inter hemispheric asymmetry in these patients.

The third significant preliminary observation is that of reduced FA in anterior cingulated gyrus, which is particularly revealing in view of the characteristic mood and behavioral changes seen in RTT patients. Similarly, changes in ACG and other components of the limbic system are also reported in schizophrenic¹⁷ and autistic¹⁸ patients. In addition, cingulum and PCG showed right side asymmetry which was not present in the controls. Larger studies are required, however, to investigate the correlation between severe behavioral and emotional problems in RTT patients and limbic system components.

CONCLUSION

Our results parallel findings in volumetric MRI studies in RTT, which showed significantly reduced cerebral volume; affecting both gray and white matter^{5, 19, 20}. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) showed significant decreases in average concentrations of N-acetylaspartate in both gray and white matter of frontal and parietal lobes and insula when compared with controls, demonstrating axonal involvement in RTT²¹. In summary, this *in vivo* observation confirms diffuse involvement of white matter tracts with areas of selective vulnerability in limbic system components.

Serial evaluations and studies in older subjects are needed for better understanding of changes in FA and other MRI parameters in relation to motor regression, and loss of speech noted in the older RTT girls.

Clinical variability is currently assessed by neurological exams and mutation type. DTI studies would

add specificity to these observations and help to understand effects of individual mutations whose clinical effects are modified by age, and X-inactivation in females. Therapeutic benefits may also be ascertained by their effects on neurons and their tracts.

ACKNOWLEDGMENT

Supported by P01 HD 24448, AG20012, RR15241, and UL1RR025005 Institute for Clinical and Translational Research grant. We thank Terri Brawner and Kathleen Kahl for their technical support in acquiring MRI's as well as Carolyn Gillen for nursing assistance during MRI examinations.

REFERENCES

1. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature genetics*. 1999;23:185-188.
2. Sirianni N, Naidu S, Pereira J et al. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *American journal of human genetics*. 1998;63:1552-1558.
3. Naidu S. Rett syndrome: natural history and underlying disease mechanisms. *European child & adolescent psychiatry*. 1997;6 Suppl 1:14-17.
4. Armstrong D, Dunn JK, Antalffy B, Trivedi R. Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1995;54:195-201.
5. Carter JC, Lanham DC, Pham D et al. Selective cerebral volume reduction in Rett syndrome: a

multiple-approach MR imaging study. *AJNR*. 2008;29:436-441.

6. Kaufmann WE. Cortical development in Rett Syndrome: Molecular, neurochemical, and anatomic aspects. In: Kerr A, Engerstrom I, eds. *Rett Disorder and the Developing Brain*. Oxford, UK: Oxford University Press, 2001, pp 85-110.
7. Ronnett GV, Leopold D, Cai X et al. Olfactory biopsies demonstrate a defect in neuronal development in Rett's syndrome. *Annals of neurology*. 2003;54:206-218.
8. Armstrong DD. Neuropathology of Rett syndrome. *Journal of child neurology*. 2005;20:747-753.
9. Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *J. Magn. Reson. B*. 1994;103:247-254.
10. Mori S, Barker PB. Diffusion magnetic resonance imaging: its principle and applications. *The Anatomical record*. 1999;257:102-109.
11. Pierpaoli C, Basser PJ. Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. *Magn.Reson.Med*. 1996;36:893-906.
12. Pruessmann KP, Weiger M, Scheidegger MB, Boesiger P. SENSE: sensitivity encoding for fast MRI. *Magn Reson Med*. 1999;42:952-962.
13. Jones DK, Horsfield MA, Simmons A. Optimal strategies for measuring diffusion in anisotropic systems by magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 1999;42:515-525.
14. Jiang H, van Zijl PC, J. K et al. DtiStudio: resource program for diffusion tensor computation and fiber bundle tracking. *Comput Methods Programs Biomed*. 2006;81:106-116.
15. Woods RP, Grafton ST, Holmes CJ et al. Automated image registration: I. General methods and intrasubject, intramodality validation. *J Comput Assist Tomogr*. 1998;22:139-152.
16. Kishi N, Macklis JD. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is

involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Molecular and cellular neurosciences* 2004;27:306-321.

17. White T, Cullen K, Rohrer LM et al. Limbic structures and networks in children and adolescent with schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*. 2008;34:18-29.

18. Craig MC, Zaman SH, Daly EM et al. Women with autistic-spectrum disorder: magnetic resonance imaging study of brain anatomy. *Br J Psychiatry*. 2007;191:224-228.

19. Reiss AL, Faruque F, Naidu S et al. Neuroanatomy of Rett syndrome: a volumetric imaging study. *Annals of neurology*. 1993;34:227-234.

20. Naidu S, Kaufmann WE, Abrams MT et al. Neuroimaging studies in Rett syndrome. *Brain & development*. 2001;23 Suppl 1:S62-71.

21. Horska A, Naidu S, Herskovits EH et al. Quantitative 1H MR spectroscopic imaging in early Rett syndrome. *Neurology*. 2000;54:715-722.

Table 1: Characteristics of RTT patients and controls.

	RTT (n=32)	Control (n=37)	Test value	p-value
Mean Age [mean (SD)] years	5.5 (4.1)	6.1 (4.6)	t = 0.552	582
Age of patients: n (RTT vs. controls) Mean (SD)				
Under 5 years (19 vs. 22)	2.8 (0.86)	2.7 (1.45)	t = -0.123	9
Under 5 years (19 vs. 22)	2.8 (0.86)	2.7 (1.45)	t = -0.123	9
Between 5-10 years (8 vs. 5)	7 (1.09)	7.6 (1.34)	t = 0.849	414
Above 10 years (5 vs. 10)	13.5 (2.72)	12.8 (1.2)	t = -0.741	472
Speech				
Mute (group 1)	13 (40.6%)			
Single words (group 2)	13 (40.6%)			
Phrases or sentences (group 3)	6 (18.8%)			

Table 2: Comparisons of FA between RTT patients and control subjects.

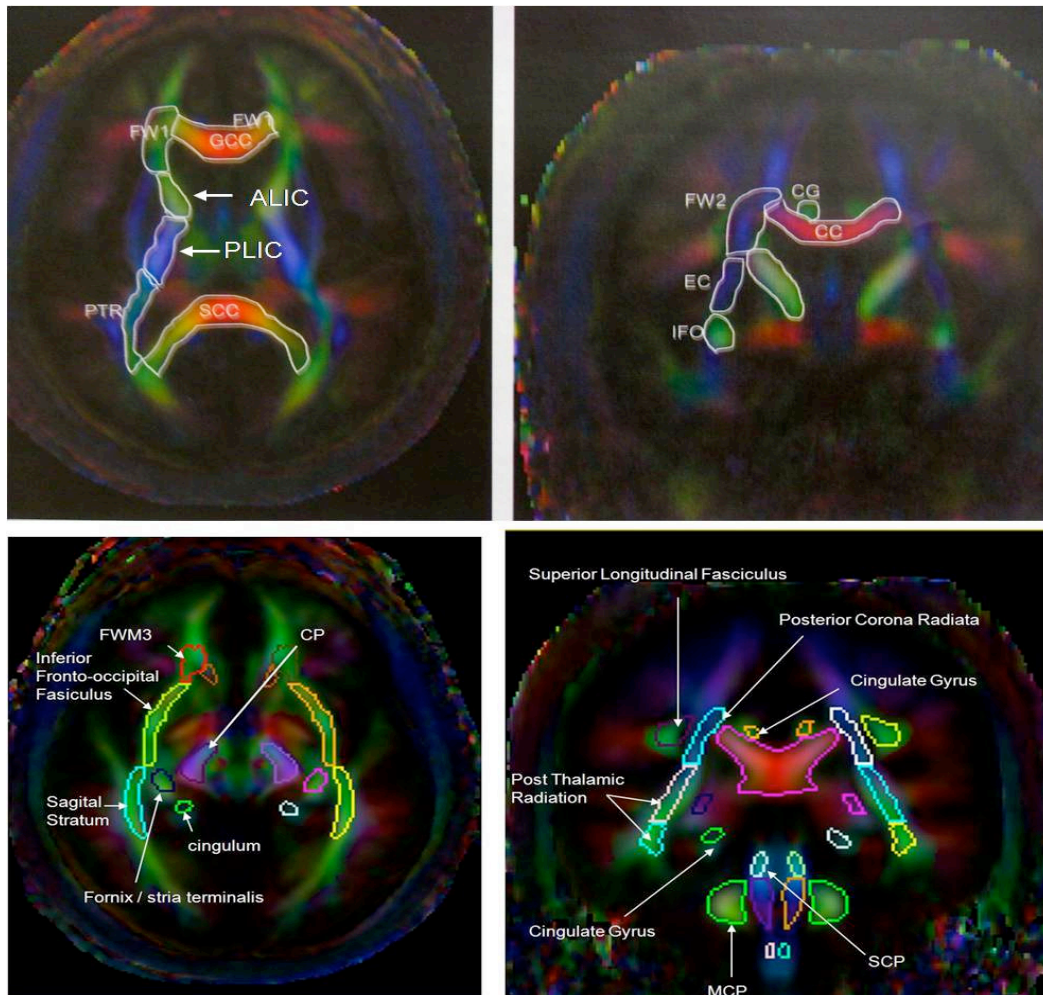
ROI	Side	RTT	Control	p-value
GC		0.555 (0.052)	0.67 (0.033)	1
SCC		0.56 (0.08)	0.682 (0.04)	1
CC		0.419 (0.046)	0.498 (0.056)	1
EC	R	0.291 (0.059)	0.321 (0.037)	4
	L	0.296 (0.042)	0.337 (0.038)	1
IFO1	R	0.37 (0.051)	0.444 (0.044)	1
	L	0.374 (0.051)	0.427 (0.045)	1
IFO2	R	0.338 (0.039)	0.392 (0.051)	1
	L	0.341 (0.034)	0.384 (0.057)	9
SS	R	0.403 (0.047)	0.433 (0.043)	17
	L	0.392 (0.044)	0.435 (0.046)	5
SLF	R	0.338 (0.062)	0.369 (0.049)	28
	L	0.34 (0.055)	0.402 (0.052)	1
PCR	R	0.413 (0.042)	0.383 (0.049)	9
	L	0.413 (0.044)	0.387 (0.055)	26
ALIC	R	0.481 (0.043)	0.478 (0.052)	72
	L	0.473 (0.049)	0.482 (0.046)	46
PLIC	R	0.547 (0.033)	0.565 (0.024)	1
	L	0.548 (0.037)	0.566 (0.029)	8
ALIC2	R	0.475 (0.051)	0.509 (0.042)	6
	L	0.463 (0.047)	0.51 (0.042)	1
PTR1	R	0.428 (0.046)	0.455 (0.04)	9
	L	0.424 (0.051)	0.439 (0.045)	173

PTR2	R	0.46 (0.032)	0.474 (0.032)	9
	L	0.462 (0.037)	0.479 (0.038)	6
FW1	R	0.356 (0.059)	0.394 (0.052)	7
	L	0.352 (0.046)	0.401 (0.051)	1
FW2	R	0.356 (0.038)	0.345 (0.043)	27
	L	0.367 (0.048)	0.361 (0.041)	66
FW3	R	0.394 (0.047)	0.455 (0.05)	1
	L	0.388 (0.048)	0.457 (0.049)	1
CP	R	0.552 (0.06)	0.557 (0.058)	824
	L	0.525 (0.06)	0.544 (0.047)	202
SCP	R	0.542 (0.098)	0.567 (0.084)	353
	L	0.537 (0.091)	0.568 (0.099)	342
MCP	R	0.518 (0.053)	0.55 (0.046)	39
	L	0.531 (0.059)	0.535 (0.057)	914
CG1	R	0.275 (0.056)	0.336 (0.045)	1
	L	0.298 (0.053)	0.377 (0.05)	1
CG2*	R	0.301 (0.059)	0.31 (0.055)	575
	L	0.281 (0.038)	0.301 (0.056)	125
CG3	R	0.294 (0.05)	0.307 (0.061)	452
	L	0.278 (0.035)	0.296 (0.058)	114
CG4*	R	0.296 (0.05)	0.321 (0.049)	8
	L	0.298 (0.061)	0.302 (0.049)	828
FX/ST	R	0.413 (0.087)	0.426 (0.065)	535
	L	0.418 (0.074)	0.442 (0.063)	167

Footnote:

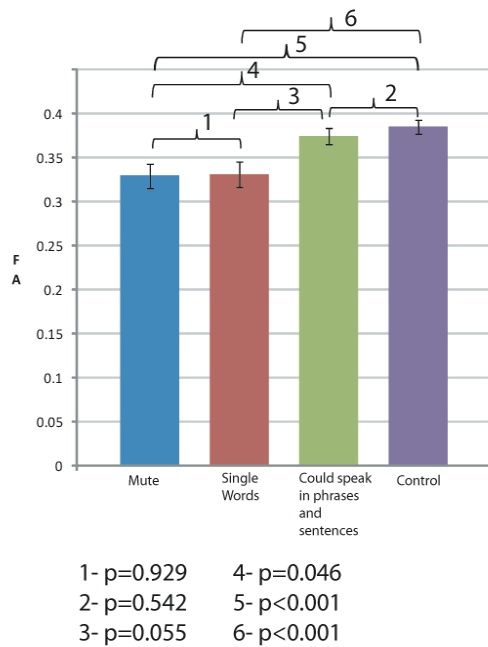
ROI-region of interest; RTT-Rett syndrome; GC- genu of corpus callosum; SCC- splenium of corpus callosum; CC- corpus callosum; EC- external capsule; external capsule, IFO- inferior fronto-occipital fasciculus; SS- sagittal stratum: SLF- superior longitudinal fasciculus; PCR-, posterior corona radiata ALIC- anterior limb of internal capsule, PLIC- posterior limb of internal capsule; PTR- posterior thalamic radiation; FW- frontal white matter; CP- cerebral peduncle: SCP- superior cerebellar peduncle; MCP- middle cerebellar peduncle; CG1, CG3, CG4- cingulate gyrus; CG2-cingulum; FX/ST -fornix/ stria terminalis.

Figure 1:



42 ROIs, 21 in each hemisphere and 3 in corpus callosum), splenium of corpus callosum (SCC), corpus callosum (CC), external capsule (EC), inferior fronto-occipital fasciculus (IFO), sagittal stratum (SS), superior longitudinal fasciculus (SLF), posterior corona radiata (PCR), anterior limb of internal capsule (ALIC), posterior limb of internal capsule (PLIC), posterior thalamic radiation (PTR), frontal white matter (FW), cerebral peduncle (CP), superior cerebellar peduncle (SCP), middle cerebellar peduncle (MCP), cingulate gyrus (CG1, CG3, CG4), cingulum (CG2), fornix/Stria terminalis (FX/ST).

Figure 2:



Comparison of FA among patients categorized by speech capacity and controls in superior longitudinal fasciculus (SLF).