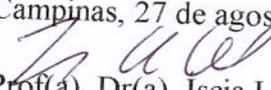


**MARIA ISABEL CALDEIRA RODRIGUES MORAIS**

Este exemplar corresponde à versão final da  
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-  
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Médi-  
cas, área de Neurologia do(a) aluno(a) **Maria  
Isabel Caldeira Rodrigues Moraes.**

Campinas, 27 de agosto de 2003.

  
Prof(a). Dr(a). Iscia Lopes Cendes  
Orientador(a)

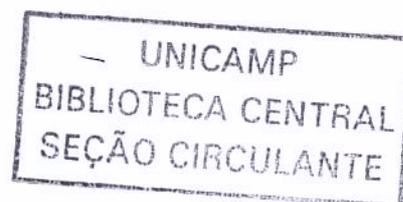
**AValiação Sistemática dos Aspectos Clínicos  
E Genéticos de Pacientes com Epilepsias  
Mioclônicas Progressivas**

2004107854

**CAMPINAS**

**2003**

**Apoio FAPESP**



**MARIA ISABEL CALDEIRA RODRIGUES MORAIS**



***AValiação Sistemática dos Aspectos Clínicos  
E Genéticos de Pacientes com Epilepsias  
Mioclônicas Progressivas***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Médicas, área de Neurologia*

***Orientadora:*** *Profa. Dra Iscia Lopes-Cendes*

***Co-orientadores:*** *Profa Dra Marilisa Mantovani Guerreiro*

*Prof. Dr. Fernando Cendes*

***CAMPINAS***

***2003***

**Apoio FAPESP**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	M792a
V	EX
TOMBO BC/	580 41
PROC.	16 P1117104
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/5/04
Nº CPD	

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

CM00198028-7

BIB ID 316888

M792a                      **Morais, Maria Isabel Caldeira Rodrigues**  
                                     Avaliação sistemática dos aspectos clínicos e genéticos de pacientes  
                                     com epilepsias mioclônicas progressivas / Maria Isabel caldeira  
                                     Rodrigues Moraes. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

                                    Orientadores : Iscia Lopes Cendes, Fernando Cendes, Marilisa  
                                     Mantovani Guerreiro

                                    Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
                                     Faculdade de Ciências Médicas.

                                    1. Neurologia infantil. 2. Ataxia. 3. Demência. I. Iscia Lopes  
                                     Cendes. II. Fernando Cendes. III. Marilisa Mantovani Guerreiro. IV.  
                                     Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
                                     V. Título.

---

## **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a).**

---

---

---

**Membros:**

---

1.

---

2.

---

3.

---

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

---

**Data:**

---

## ***DEDICATÓRIA***

Aos meus pais maravilhosos, Alberto (*in memorium*) e Isabel, que são tudo em minha vida e são o alicerce de minhas atitudes.

À Dra. Íscia e ao Dr. Fernando Cendes, meus agradecimentos pela confiança e dedicação, que em muitos momentos ultrapassaram a esfera profissional. Souberam compreender os limites do ser humano, suas dificuldades e tristezas; Ensinam dando exemplo de dedicação e perseverança.

À Dra. Marilisa Guerreiro, que é responsável por boa parte de minha formação em Neurologia Infantil, especialmente em epilepsia, e que me aconselhou a buscar aquilo que desejava.

À Dra. Ana Maria Piovesana, que é a grande responsável pela minha escolha. Meu interesse por Neurologia Infantil surgiu, quando entrei em contato com os pacinetes com PC.

Agradeço a oportunidade de ter ampliado a minha “família” ao longo destes dois anos, pois ganhei muitos irmãos, entre eles o Fábio. Meu grande amigo e aquele que me ensinou como trabalhar em um laboratório. Minhas amigas Neide e Marilza, que com firmeza e docilidade souberam ser amigas, irmãs e conselheiras. A “turma” da Íscia e da “Carmem”, que tornaram o ambiente de trabalho muito prazeroso e onde fiz muitos amigos.

Suzana , Renatinha, Lisiane e Guga, pelo companheirismo dentro da Neurologia e pelo grande apoio nos bons e maus momentos.

Minha segunda mãe, Imaculada (Imá), que ao meu lado viu meu crescimento e permitiu que os dias tão difíceis fossem superados e não deixou que eu desistisse.

Agradeço a todos que colaboraram com esta tese, como a equipe de técnicas do EEG, aos profissionais do Centro Cirúrgico Ambulatorial e ao Departamento de Anatomia Patológica.

Ao Dr. S. Carpenter, pela sua amizade e desprendimento ao me ensinar sobre as EMPs.

Finalmente, eu agradeço a minha mãe, que sempre me apoiou e me dá exemplo de sua fortaleza, e ao meu amado pai que não pôde compartilhar comigo esta alegria.

À FAPESP, pelo apoio científico a este projeto.

*... Há um tempo para tudo nesta vida,  
Há tempo para plantar e  
Há tempo para colher o que foi plantado...  
... Há tempo para chorar,  
E há tempo, para sorrir...  
Eclesiástes*

---

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxi</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxxvii</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	41
1.1- Aspectos históricos.....	44
1.2- Epidemiologia.....	45
1.3- Causas específicas.....	46
1.3.1- Doença de Unverricht-Lundborg.....	46
1.3.2- Doença de Lafora (DL).....	49
1.3.3- Lipofuscinose Ceróide Neuronal.....	50
1.3.4- Encefalomiopatias Mitocondriais.....	58
1.3.5- Sialidoses.....	61
1.3.6- Formas raras de EPM.....	62
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	65
2.1- Objetivo geral.....	67
2.2- Objetivos específicos.....	67
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	69
3.1- Seleção dos pacientes.....	71
3.2- Avaliação clínica neurológica (Nível diagnóstico I).....	71
3.3- EEG e RNM de crânio (Nível diagnóstico II).....	71
3.4- Exames específicos (Nível diagnóstico III).....	73
3.4.1- Exames histopatológicos.....	73
3.4.2- Testes moleculares.....	73

3.4.3- Detecção do dodecâmero no gene da Cistatina B.....	78
3.4.4- Outras técnicas moleculares.....	79
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
4.1- Avaliação Clínica Neurológica (Nível diagnóstico I).....	83
4.2- EEG e RNM de crânio (Nível diagnóstico II).....	85
4.3- Exames específicos (Nível diagnóstico III).....	87
4.4- RESULTADOS ESPECÍFICOS.....	87
4.4.1- Doença de Unverricht-Lundborg.....	87
4.4.2- Doença de Lafora.....	94
4.4.3- Lipofuscinoses ceróides neuronais (LCN).....	101
4.4.4- Encefalomiopatia Mitochondrial.....	106
4.4.5- Sialidoses.....	113
4.4.6- Formas raras de EMP.....	115
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>123</b>
5.1- DUL.....	126
5.2- Doença de Lafora.....	130
5.3- Lipofuscinoses Ceróides Neuronais.....	132
5.4- Encefalomiopatias mitocondriais.....	133
5.5- Formas raras de EMP.....	134
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>137</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>141</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>155</b>
Formulário de consentimento para pesquisa médica.....	157
SCA-7 disease presenting as Progressive Myoclonic Epilepsy in childhood.....	163

	<i>PÁG.</i>
<b>Tabela 1-</b> Distribuição das várias etiologias em 128 pacientes com EMP. Experiência do Centre Saint Paul, 1960-2002.....	45
<b>Tabela 2-</b> Principais características clínicas, histopatológicas e genéticas das quatro formas mais comuns das LCNs.....	51
<b>Tabela 3-</b> Formas raras de EMP.....	62
<b>Tabela 4-</b> Apresentação dos oligonucleotídeos utilizados para PCR, SSCP e sequenciamento do gene Cistatina B.....	75
<b>Tabela 5-</b> Apresentação dos oligonucleotídeos para PCR, SSCP e sequenciamento para o gene EMP2A responsável pela doença de Lafora.....	76
<b>Tabela 6-</b> Condições das reações de PCRs.....	77
<b>Tabela 7-</b> Dados gerais em 24 famílias não relacionadas, avaliação do nível diagnóstico I.....	84
<b>Tabela 8-</b> Achados clínicos dos pacientes com diagnóstico provável de DUL..	88
<b>Tabela 9-</b> Descrição do padrão de alteração no EEG dos pacientes suspeitos de DUL.....	89
<b>Tabela 10-</b> Achados de RNM de crânio dos pacientes suspeitos de DUL.....	91
<b>Tabela 11-</b> Achados clínicos, sintomas e sinais dos pacientes suspeitos de DL....	95
<b>Tabela 12-</b> Achados mais recentes dos EEGs, dos pacientes suspeitos de DL..	96
<b>Tabela 13-</b> Descrição dos achados de RNM de crânio dos casos suspeitos de DL.....	98
<b>Tabela 14-</b> Aspectos clínicos dos pacientes suspeitos de LCN.....	102

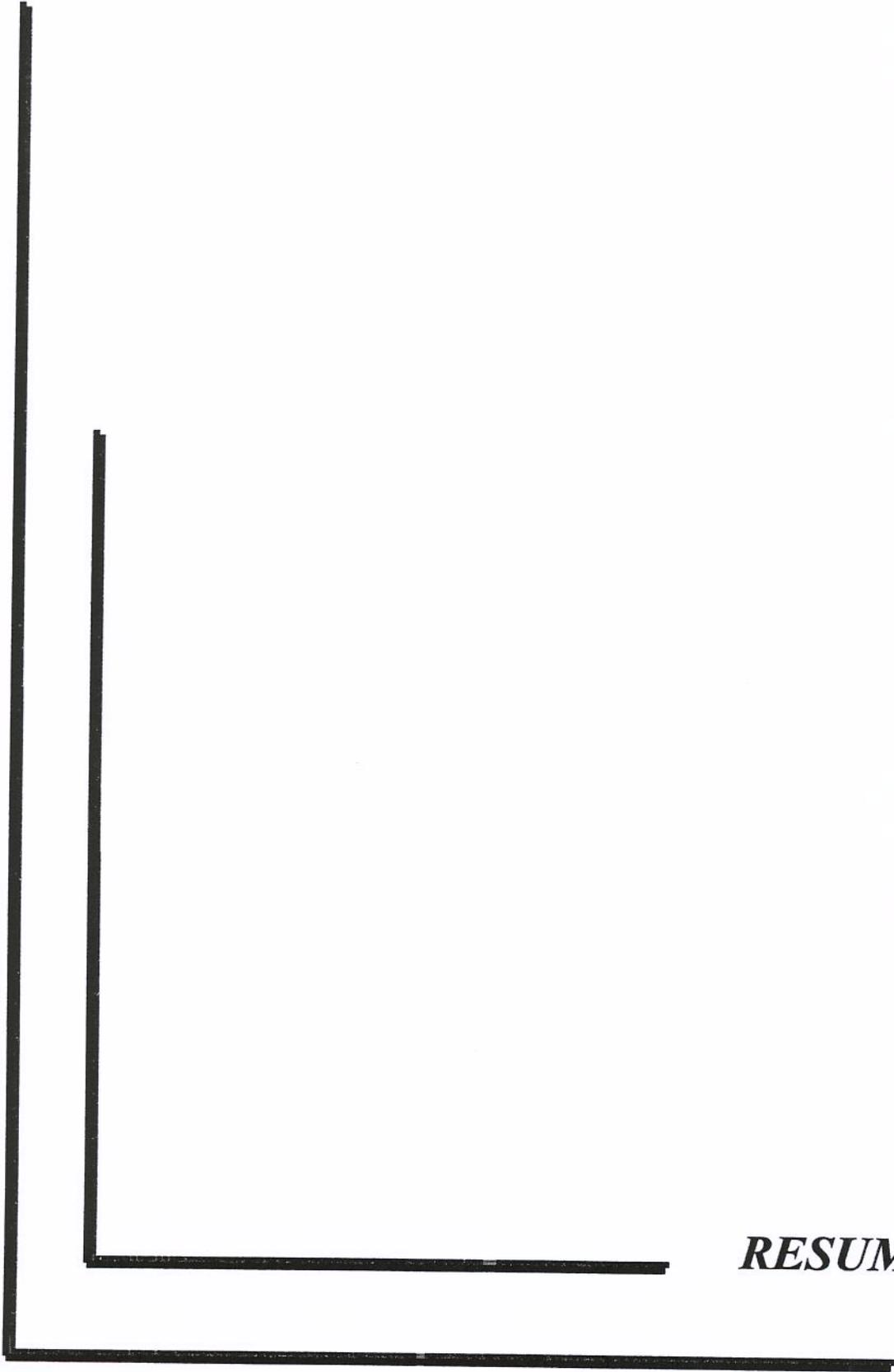
<b>Tabela 15-</b>	Achados dos EEGs dos pacientes suspeitos de LCN.....	104
<b>Tabela 16-</b>	Achados de neuroimagem nos pacientes com diagnóstico clínico de LCN.....	105
<b>Tabela 17-</b>	Descrição dos aspectos clínicos das encefalomiopatias mitocondriais.....	107
<b>Tabela 18-</b>	Resultados conclusivos do estudo sobre as causas específicas das EMPs, de acordo com as diferentes etiologias, número de famílias/pacientes e confirmação diagnóstica.....	121

	<i>PÁG.</i>
<b>Figura 1-</b> Microscopia eletrônica, dos depósitos ultraestruturais granulares osmiofílicos (GROD), cedidas por Dr. S. Carpenter.....	52
<b>Figura 2-</b> Microscopia eletrônica mostrando os corpos curvilineares (CV)-LCN tipo 2 (Foto cedida pelo Dr. S. Carpenter).....	54
<b>Figura 3-</b> Imagens de microscopia eletrônica ilustrando os chamados finger printer (FP) (cedidas pelo Dr. S. Carpenter).....	56
<b>Figura 4-</b> Representação esquemática do gene Cistatina B.....	75
<b>Figura 5-</b> Representação esquemática da estrutura do gene EPM2A.....	76
<b>Figura 6-</b> Mostram dois cortes axiais da RNM de crânio da paciente (família 23) com atrofia e lesão destrutiva extensa de lobo temporal esquerdo.....	86
<b>Figura 7-</b> EEG realizado em aparelho com 14 canais, de um dos pacientes da família 1 (E. L. 31 anos). Esta montagem parassagital, apresenta ondas lentas teta-delta em regiões posteriores, lentificação difusa e ondas agudas na região parassagital esquerda.....	90
<b>Figura 8-</b> (A) Paciente do sexo masculino, com mais de 20 anos de evolução da doença. Observar em corte coronal, atrofia cortical moderada com preservação da substância branca, e a atrofia cerebelar. (B) Paciente do sexo feminino, com história típica de DUL, RNM com atrofia cerebelar e de tronco cerebral.....	92
<b>Figura 9-</b> Padrão de corrida eletroforética alterado (família 6) com três indivíduos suspeitos de DUL. Este gel poliacrilamida deixa evidente a diferença entre os alterados e os normais.....	93

<b>Figura 10-</b>	Traçado mostra intensa atividade epileptiforme, com espículas e poliespículas, onda-lenta generalizados. Atividade de base difícil de ser avaliada (família 8, com quadro típico de DL).....	97
<b>Figura 11-</b>	A e B pertencem ao paciente da família. Corte coronal em T1, mostra atrofia cortical, dilatação dos ventrículos laterais e preservação de substância branca. Corte sagital, mostra atrofia cortical de predomínio anterior e atrofia cerebelar discreta.....	98
<b>Figura 12-</b>	A e B. Fotomicroscopia de biópsia de pele da região axilar, corada por PAS, destacando os corpúsculos de Lafora ( família 8). A e B são fotos em menor e maior aumento, de uma glândula sudorípara...	99
<b>Figura 13-</b>	Autorradiografia de gel de poliacrilamida. Este SSCP para o éxon 2 do gene EPM2A, confirma o padrão de corrida alterado nos pacientes suspeitos de DL.....	100
<b>Figura 14-</b>	Sequenciamento automático da fita anti-sense, do éxon 2 do gene EPM2A, da família 7 que possui padrão de corrida alterado no SSCP.....	101
<b>Figura 15-</b>	O traçado de EEG após de 2 anos de evolução da doença. Fotoestimulação de baixa frequência com 1, 2 e 3 hertz exibiu atividade epileptiforme nas regiões posteriores, conforme mostra a seta ( LCN tipo 2 ).....	103
<b>Figura 16-</b>	Microscopia eletrônica aumento de 40 X, procura demonstrar a presença de corpos curvilineares, patognomônicos de LCN forma infantil tardia.....	106
<b>Figura 17-</b>	A e B, mostram áreas hipodensas em regiões posteriores, sem distribuição compatível com territórios vasculares. Nota-se atrofia cortical.....	108

<b>Figura 18-</b>	RNM de crânio da paciente com MERRF, em corte axial; observamos alargamento do sistema ventricular supratentorial, em T2, hipersinal de substância branca periventricular, dos centros semiovais, cápsula interna e externa.....	109
<b>Figura 19-</b>	Imagem foi obtida do corno posterior do ventrículo lateral esquerdo, da RNM de crânio da paciente com MERRF, a seta aponta para a curva invertida, que representa o lactato.....	110
<b>Figura 20-</b>	Biópsia de músculo com a coloração do Tricrômio de Gomori. A seta indica acúmulo de mitocôndrias anormais e as fibras vermelhas rajadas.....	111
<b>Figura 21-</b>	Esta fotomicroscopia destaca a reação SDH, onde vemos grande presença de mitocôndrias anormais (em escuro). A seta aponta para os locais ricos em mitocôndrias.....	112
<b>Figura 22-</b>	Gel de poliacrilamida 12% com corrida eletroforética após digestão enzimática com enzima Bgl I. Apresenta três fragmentos: 108pb (normal), e dois outros fragmentos com tamanhos de 73pb e 35pb, gerados somente na presença no ponto de mutação A8344G no, mtDNA.....	113
<b>Figura 23-</b>	O traçado mostra lentificação da atividade de base, com descarga epileptiforme generalizada, sendo clinicamente associada com mioclonias. Este paciente exibia mioclonias associadas ou não a alterações no EEG.....	116
<b>Figura 24-</b>	RNM de crânio no paciente com SCA-7, atrofia cerebelar e de tronco cerebral. Cortes sagital e axial, obtidos em aquisição T1. Constatada atrofia cerebelar e de tronco cerebral; cerebelo atrófico. O corte axial, demonstra que as estruturas supratentorial estão bem preservadas.....	117

<b>Figura 25-</b>	Autorradiografia de gel de uréia desnaturante (SCA-7). Onde utilizamos uma sonda marcada radioativamente com P32. O paciente mostra alelos com 60 repetições (expandido) e 10 repetições (normal). Sua mãe exibe alelos com 46 repetições (expandido) e 10 repetições (normal). O paciente e sua mãe são respectivamente os indivíduos 1 e 2.....	118
<b>Figura 26-</b>	Autorradiografia de um gel de uréia desnaturante. Onde observamos os diferentes tamanhos de alelos de diferentes pacientes. A seta em negrito aponta os alelos normais (16/24) do paciente da família 22, que está em duplicata. As demais setas sinalizam os alelos expandidos de outros indivíduos estudados.....	120
<b>Figura 27-</b>	Algoritmo para diagnóstico para as principais causas de EMP.....	136



***RESUMO***

As Epilepsias Mioclônicas Progressivas (EMPs), formam um grupo raro de desordens geneticamente determinadas e freqüentemente familiares. Caracterizam-se por apresentarem a tríade clínica: epilepsia, mioclonias e declínio neurológico progressivo, como demência e ataxia. As cinco principais causas desta síndrome são: doença de Unverricht-Lundborg (DUL), doença de Lafora (DL), as lipofuscinoses ceroides neuronais (LCN), as encefalomiopatias mitocondriais com fibras vermelhas rajadas (MERRF) e as sialidoses.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar um grupo de pacientes com EMP, visando chegar ao diagnóstico das causas específicas, através da história clínica, exames de propedêutica armada e testes específicos. Tais estratégias pretendiam: **a)** determinar as causas mais freqüentes da EMP em nosso meio, **b)** determinar a utilidade, na prática clínica, dos testes empregados em nosso trabalho, **c)** estabelecer correlações entre o fenótipo (quadro clínico) e o genótipo (identificação de mutações gênicas específicas), e **d)** propor um algoritmo diagnóstico adequado a nossa realidade.

Para atingirmos os objetivos utilizamos: avaliação clínica neurológica, eletroencefalograma (EEG), ressonância magnética de crânio (RNM), exames histopatológicos e a análise molecular de alguns genes candidatos. Estudamos 25 pacientes pertencentes a 21 famílias não-relacionadas. Incluímos todos os pacientes com o diagnóstico provável de EMP avaliados em nosso serviço entre outubro de 2000 a agosto de 2002. O critério inclusão foi a presença da tríade clínica. A avaliação diagnóstica foi feita em três níveis: **nível diagnóstico I**, composto de história clínica, história famílias e exame neurológico; **nível diagnóstico II**, EEG e a RNM de crânio; **nível diagnóstico III**, exames específicos, tais como testes bioquímicos, exames histopatológicos e testes moleculares de genes candidatos: *Cistatina B*, *EPM2A*, mutação A3243G no DNA mitocondrial (mtDNA), mutação A8344G no mt DNA, *HD* e *SCA7*.

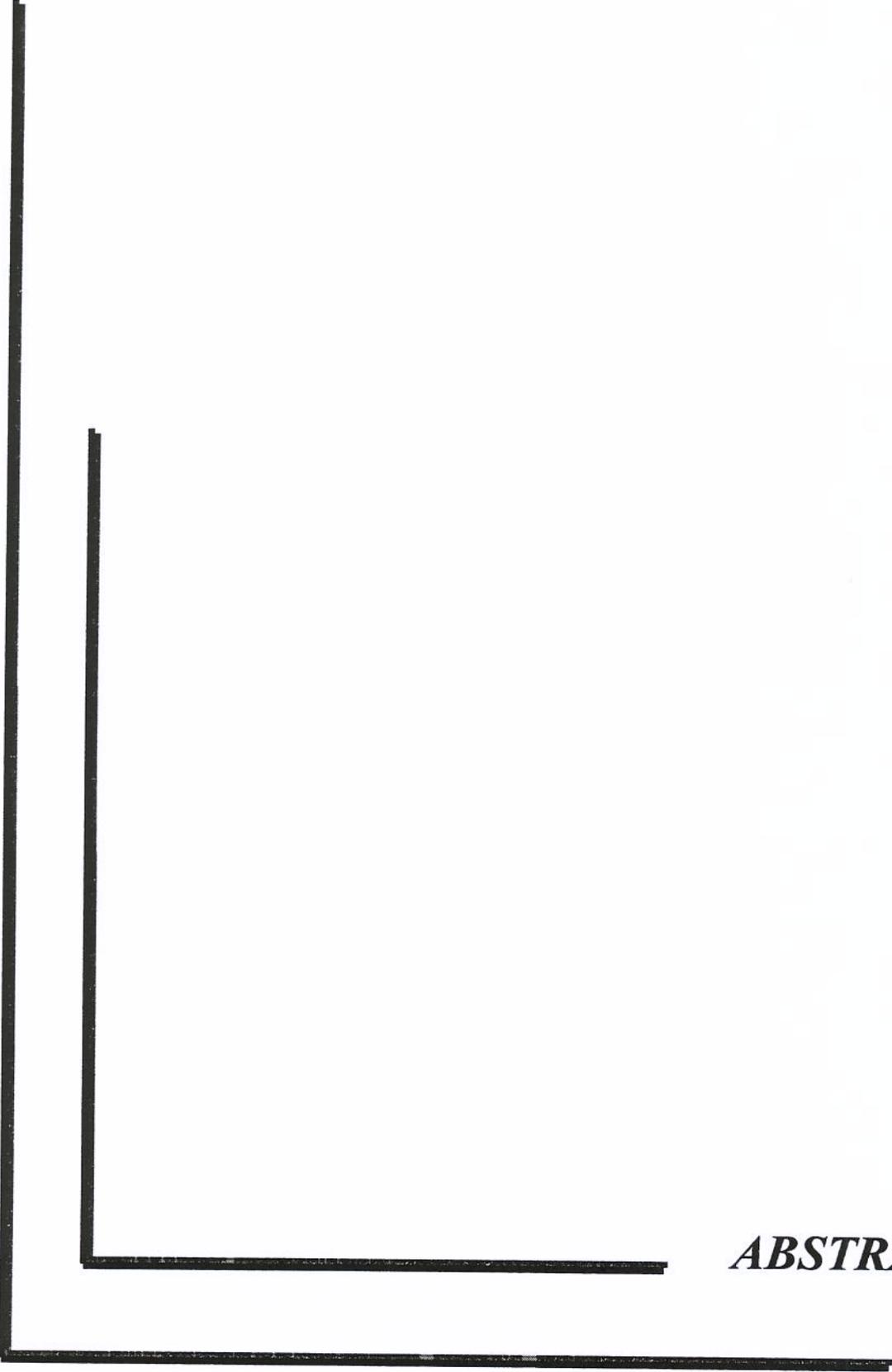
O **nível diagnóstico I**, indicou suspeita diagnóstica de DUL em 9 pacientes (6 famílias). Enquanto, DL foi o diagnóstico provável em 5 pacientes. A suspeita clínica de algum tipo de LCN, estava presente em 5 pacientes (4 famílias). Outros 4 pacientes, tiveram a suspeita clínica de algum tipo de encefalomiopatia mitocondrial enquanto 1 paciente teve a suspeita clínica de doença de depósito e 1 paciente com o suspeita de doença de Huntington (DH) juvenil.

O **nível diagnóstico II**, não avançou na elucidação diagnóstica das causas específicas, porém nos permitiu excluir uma paciente do estudo, por apresentar lesão destrutiva na RNM de crânio.

No **nível diagnóstico III**, 6/9 pacientes com DUL foram submetidos a biópsia de pele e a análise histopatológica foi sugestiva de DUL em 3/9 pacientes. O estudo molecular do gene *Cistatina B* realizado nos 9 pacientes, confirmou a presença de mutações em 3 pacientes, pertencentes a uma família. Dos 4 pacientes com suspeita diagnóstica de DL, todos foram submetidos a biópsia de pele e análise molecular do gene *EPM2A*. Em apenas 2 pacientes, a análise histopatológica demonstrou a presença inequívoca de corpúsculos de Lafora. A análise molecular não evidenciou a presença de mutações deletérias no gene *EPM2A*. Quatro dos 5 pacientes com suspeita clínica de LCN foram submetidos a biópsia de pele. Dois pacientes apresentaram os achados típicos da forma infantil tardia. Os 4 pacientes com suspeita clínica de encefalomiopatia mitocondrial, foram submetidos a análise molecular para dois pontos de mutação no mt DNA. Dois pacientes demonstraram alterações moleculares, um com a mutação de ponto A3243G (MELAS), e 1 com a mutação A8344G (MERRF). Nestes a biópsia de músculo, confirmou a presença de fibras vermelhas rajadas. Um dos pacientes com suspeita de doença mitocondrial que apresentou resultado molecular negativo para as duas mutações no mtDNA pesquisadas, teve resultado molecular positivo, para uma forma de ataxia espinocerebelar autossômica dominante tipo 7 (SCA-7). O paciente com suspeita clínica de doença de depósito teve o diagnóstico de sialidose confirmado por testes bioquímicos específicos (baixos níveis de sialidase na urina). O único paciente com suspeita clínica de DH teve o teste molecular negativo para *DH*.

Em conclusão, fomos capazes de chegar a causa específica da EMP em 11/25 (43%) dos pacientes ou 9/21 famílias (44%). As causas específicas de EMP mais frequentes em nosso meio foram: DUL (3 pacientes), DL (2 pacientes), LCN (2 pacientes) e encefalomiopatias mitocondriais (2 pacientes). O diagnóstico definitivo foi possível graças a uma combinação de testes seguindo um algoritmo diagnóstico orientado pela suspeita clínica. Desse modo propomos que: a análise molecular deve ser o procedimento de escolha para a confirmação diagnóstica da DUL e das encefalomiopatias mitocondriopatias. No entanto, o exame

histopatológico (biópsia de pele) ainda é o teste de escolha para o diagnóstico definitivo das LCNs e da DL.



***ABSTRACT***

Progressive Myoclonic Epilepsies (PME) are a rare heterogeneous group of genetically determined disorders characterized by epilepsy, myoclonic jerks and progressive neurological decline including dementia and ataxia. There are five main disorders which can cause PME: Unverricht-Lundborg disease (ULD) and Lafora disease (LD), ceroides neuronal lipofuscinoses (LCN), mitochondrial encephalomyopathies and sialidoses.

The objective of this work was to establish specific diagnosis in a group of patients with PME. We also intended to: a) determine the most frequent causes of PME in our cohort of patients, b) determine the usefulness of a number of tests in determining the specific diagnosis, c) establish phenotype-genotype correlation in our patients and d) propose a more appropriate scheme for the diagnosis of specific causes of PME, in our patients.

All patients included in this work had the probable diagnosis of PME. Diagnostic criterion was the presence of the classical symptoms. Patients were analyzed by neurological evaluation, electroencephalogram (EEG), magnetic resonance imaging (MRI), histopathologic exams and molecular analysis.

Initially, probable diagnoses of PME, was based exclusively in information obtained by clinical family histories and neurological exam (**diagnostic level I**). EEG and MRI (**diagnostic level II**) were performed in all patients, whose information guided us to more specific tests (biochemical and histopathologic exams). In addition we performed muscle, skin biopsy and molecular analysis of *Cistatina B*, *EPM2A*, *HD*, *SCA-7* genes and A3243G, A8344G point mutations in the mitochondrial DNA (**diagnostic level III**).

We have studied a total of belongs to 25 patients/ 21 unrelated families. The probable diagnosis of ULD (diagnostic level I) was present in 9 patients (6 families), LD was the probable diagnosis in 5 patients (5 families) and LCN was probably in 5 patient (4 families). Other 4 unrelated patients had probably mitochondrial encephalomyopathies, while 1 patient had probably a metabolic disease and 1 patient had the possible diagnosis of Huntington disease (HD) juvenile form.

EEG and MRI (diagnostic level II) were not useful to establish the specific cause of PME; however MRI in one patient allowed to excluded the diagnosis of PME, since her MRI showed the presence of a destructive lesion in the central nervous system.

Skin biopsy was performed in 6/9 patients with probable ULD and 9/9 were screened for mutation in the *Cistatin B* gene (diagnostic level III). Histopathologic analysis suggest the diagnosis of ULD in 6 patients belongs to 3 families. Molecular analysis confirmed the presence of *Cistatin B* point mutations in 3 patientes in one only family. Four patients with probable diagnosis LD were submitted to skin biopsy and *EPM2A* gene. Histopathologic analysis confirmed the presence of Lafora bodies in two patients. Molecular analysis did not revealed the presence of pathogenic mutations in the EPM2A gene, in our cohort of patients. Four patients with probable LCN were submitted to skin biopsy. Ttwo of these patients presented the typical histopathologic of the late infantile type. All patients with probable mitochondrial encephalomyopathies were submitted to molecular analysis of the mtDNA and three of them had muscle biopsy. Two patients demonstrated molecular alterations, one presented a point mutation at positive the A3243G of in mtDNA confirming MELAS and another had the A8344G point mutation that is found in the MERRF. Muscular biopsy confirmed the presence of ragged red fibers in these patients. Found in the patient with probable mitochondrial disease had a positive molecular result a type of spinocerebellar ataxia, SCA-7. The patient with clinical a metabolic deposit disease had the diagnosis confirmed by specific biochemical tests (low sialidase levels in the urine) the sialidose. The patient of with probable diagnosis of juvenile HD had negative molecular results.

In conclusion we established the specific diagnosis of PME in 11/25 patients (43%) or in 9/21 (44%) families. The most frequently causes of PME were: ULD (3 patients), LD (2 patients), LCN (2 patients) and mitochondrial encephalomyopathies (2 patients). Definitive diagnosis was possible combining clinical evaluation and laboratory tests, following a diagnostic scheme: molecular analysis necessary to confirm the diagnosis of ULD and mitochondrial encephalomyopathies; however, skin biopsy is still the gold standart for the diagnosis of LCNs and LD.



***1- INTRODUÇÃO***

As Epilepsias Mioclônicas Progressivas (EMPs), formam um grupo heterogêneo de doenças raras, geneticamente determinadas. Caracterizam-se clinicamente por mioclonias, crises generalizadas tônico-clônicas e declínio neurológico progressivo, como ataxia e demência (BERKOVIC et al., 1986). Em sua maioria são doenças autossômicas recessivas (BERKOVIC et al., 1997). Apesar de agrupadas em uma mesma síndrome, diferem quanto as características clínicas, etiológicas e patogênicas, assim como quanto ao prognóstico.

As cinco principais etiologias são: a doença de Unverricht-Lundborg (DUL), doença de Lafora (DL), as lipofuscinoses ceróides neuronais (LCN), as encefalomiopatias mitocondriais, MELAS e MERRF e as sialidoses. A idade de início dos sintomas é variável podendo ocorrer na infância, adolescência ou vida adulta (BERKOVIC et al., 1986; BERKOVIC et al., 1997).

O quadro completo da síndrome de EMP, é caracterizado pelas seguintes associações (GENTON et al., 2002):

- 1- Mioclonias que podem ser parciais ou segmentares, arrítmicas ou assíncronas
- 2- Epilepsia frequentemente com crise tônico-clônicas generalizadas (CTCG) ou clônicas, embora possam ocorrer outros tipos de crises, como ausências e crises focais
- 3- Deterioração neurológica progressiva, sob a forma de demência e/ou ataxia.

A combinação e intensidade destas várias características clínicas, variam de acordo com a causa específica.

Em 1989, a classificação Internacional das Epilepsias e Síndromes Epilépticas (ILAE), incluiu as EMPs na categoria de epilepsias generalizadas sintomáticas (ILAE-Commission on classification and terminology of the ILAE, 1989). Em recente classificação, as EMPs estão listadas separadamente, como um grupo entre as várias síndromes epilépticas causadas por doenças específicas (ENGEL, 2001).

## 1.1- ASPECTOS HISTÓRICOS

A primeira descrição clínica de EMP, foi apresentada por Heirich Unverricht, 1891 que descreveu uma família de origem báltica, onde alguns irmãos eram acometidos por uma anormalidade neurológica progressiva, com mioclonias e crises epiléticas generalizadas. Lundborg, na Suécia em 1901, também relata uma família com as mesmas características. Tais descrições, evidenciavam a tendência familiar desta síndrome (LUNDBORG, 1903).

Em 1911, Gonzalo Lafora e Glueck, descreveram pela primeira vez, os achados de autópsias cerebrais de pacientes adolescentes que possuíam EMP. Eles observaram a presença de estruturas esféricas que se depositavam em neurônios e se coravam fortemente pelo PAS, os chamados corpúsculos de Lafora (LAFORA et al., 1911).

Estudos patológicos da década de 30, estabeleceram a existência de três substratos patológicos para a síndrome de EMP- corpúsculos de Lafora, distúrbios do estoque de lipídios e as doenças degenerativas. Tal divisão não auxiliou a prática clínica pois o diagnóstico final era possível somente após a morte (BERKOVIC et al., 1997).

A classificação das EMPs manteve-se controversa durante vários anos, devido a inúmeros fatores, entre eles:

- 1- Pacientes com doenças diferentes eram avaliados tanto por neurologistas interessados em epilepsia, quanto por profissionais interessados em estudos sobre movimentos involuntários;
- 2- Existência de enorme variação na distribuição geográfica das doenças específicas;
- 3- Até a década de 90, era impossível confirmar o diagnóstico em vida.

Com o intuito de estabelecer critérios para a definição da síndrome das EMPs, foi realizada uma conferência internacional em Marselha-França, em 1989 que resultou em ampla revisão nosológica das EMPs (Marseille Consensus Group, 1990).

Os avanços conquistados com a biologia molecular durante a década de 90, permitiram aumentar a compreensão a respeito das diferentes causas das EMPs, assim como tornou possível a realização do diagnóstico destes pacientes, em vida.

## 1.2- EPIDEMIOLOGIA

As EMPs são condições raras, sendo responsáveis por aproximadamente 1% de todos os casos de epilepsias, nos grandes centros especializados em epilepsia (BERKOVIC, 1997). A distribuição é mundial, porém ocorrem diferenças quanto origem geográfica e étnica das populações (NORIO et al.,1979; BERKOVIC, 1997).

Uma população seguida em um centro de referência para epilepsias na França, o Centre Saint-Paul, as EMPs foram menos de 1% de todos os casos de epilepsia. Entre 1986 e 1995, eles avaliaram 2273 pacientes com epilepsia, e diagnosticaram 22 pacientes com EMP. A distribuição dos pacientes avaliados neste centro entre 1960 e 2002, estão na tabela 1, onde se constata alta a prevalência da DUL e baixa prevalência das LCN, fato este não observado em outros centros de pesquisa. A possível justificativa para isto, talvez seja o grande contingente de pessoas provenientes da região do Mediterrâneo (GENTON et al., 2002).

**Tabela 1-** Distribuição das várias etiologias em 128 pacientes com EMP. Experiência do Centre Saint Paul, 1960-2002.

<b>Doença</b>	<b>Nº pacientes</b>
Lipofuscinose Ceróide	15
Infantil tardia	10
Juvenil	02
Adulta (Kufs)	03
MERRF	02
Doença de Gaucher tipo 2	01
Doença de Lafora	40
Doença de Unverricht-Lundborg	58
Atrofia dentato-rubro-palido-luisiana	02
Outras/ não classificadas	10

A DUL, é mais freqüente ao redor do mar Báltico, especificamente na Finlândia onde a incidência é 1:20.000 nascimentos (NORIO et al.,1979). Fenótipo idêntico é encontrado no restante da Europa, norte da África e Japão (GENTON et al., 1990). Também é mais freqüente na região ocidental do Mediterrâneo (GOUIDER et al., 1998).

A DL já foi relatada como de maior prevalência no sul da Europa e norte da África (ACHARYA et al.,1993), porém é encontrada no mundo todo, aparentemente sem preferência racial ou étnica.

As LCNs têm alta prevalência na região da Escandinávia, onde variam entre 0,1 a 7 por 100.000 nascidos vivos (NORIO et al., 1979; SANTAVUORI, 1988; UVEBRANT et al., 1997).

Algumas etiologias são freqüentes em grupos étnicos ou regiões específicas, como a DRPLA (atrofia dentatorrubropalidoluisiana) e as galactosialidoses, que são freqüentes no Japão (GENTON et al., 2002). As encefalomiopatias mitocondriais têm sido relatadas em porcentagens variáveis em diferentes populações, porém parece não ter predileção étnica (BERKOVIC, 1997; GENTON et al., 2002).

A verdadeira freqüência das várias formas de EMPs não está definida, principalmente nos países subdesenvolvidos, onde nem sempre o diagnóstico é realizado, não havendo dados epidemiológicos documentados (GENTON et al., 2002).

### **1.3- CAUSAS ESPECÍFICAS**

#### **1.3.1- Doença de Unverricht-Lundborg**

Os primeiros sintomas ocorrem em crianças previamente normais, entre os 6 e 15 anos de idade. Em metade dos pacientes, a primeira manifestação caracteriza-se por abalos mioclônicos provocados por estímulos externos como luz, barulho, exercício físico e estresse. As mioclonias podem ser generalizadas ou segmentares e evoluem para crises tônico-clônicas generalizadas, somente em raros casos essas crises não ocorrem. Alguns pacientes podem ter crises de ausências, crises psicomotoras ou sinas focais motores. As

crises epiléticas são infrequentes no início dos sintomas, mas tornam-se comuns após 3 a 7 anos do início da doença. Em geral, as crises tônico-clônicas generalizadas são proeminentes durante a adolescência e melhoram nos adultos, chegando mesmo a desaparecerem (LEHESJOKI, 2002).

As alterações neurológicas estão ausentes ou são mínimas no início da doença, mas a disartria, ataxia e tremor de ação, se manifestam em todos os casos com a evolução da doença. Em geral a inteligência destes pacientes é normal por vários anos, ocorrendo no entanto, declínio intelectual lento e progressivo sendo comuns a presença de labilidade emocional e depressão. A taxa de progressão da doença é variável podendo ocorrer períodos de estabilização. A sobrevida até a vida adulta é freqüente, e alguns pacientes chegam a sexta década de vida pois os cuidados com reabilitação motora e apoio psicológico, permitem que os pacientes tenham vida independente e constituam família (GENTON et al.,1990; LEHESJOKI, 2002)

O eletroencefalograma (EEG) tem sido descrito como anormal, porém inespecífico, em todos os pacientes com DUL. A atividade de base (fundo) é instável, geralmente mais lentificada que o normal, embora a atividade alfa possa persistir por vários anos, a partir do início dos sintomas. Paroxismos de poliespículas e espícula-onda lenta, generalizados, simétricos e de alta voltagem, são característicos, assim como a resposta a fotossensibilidade (GENTON et al., 1990; GOUIDER et al., 1998). No referente ao tratamento, as crises tônico-clônicas generalizadas são bem controladas com valproato de sódio. O clonazepam tem sido muito utilizado como droga coadjuvante, assim como o piracetam. A fenitoína não é indicada para o tratamento, pois pode piorar as mioclonias, além de causar lesão cerebelar irreversível (ELDRIDGE et al., 1983).

Os achados de neuroimagem na DUL, utilizando ressonância nuclear magnética (RNM), demonstraram que não há alteração de sinal em substância branca, principalmente em tronco ou cerebelo; os pacientes possuíam perda de volume da ponte, medula e hemisférios cerebelares, e não foi encontrada correlação entre a severidade da doença e perda volumétrica do tronco (MASCALCHI et al., 2002).

Nenhum trabalho com estudos anátomo-patológicos evidenciou material de acúmulo, em sistema nervoso central. Registram-se apenas, perda das células de Purkinje do cerebelo, ressaltando sempre que tal fato pode ser decorrente do uso de fenitoína (ELDRIDGE et al., 1983).

Apenas um trabalho procurou relacionar achados histopatológicos à DUL. Através de biópsias de pele de pacientes clinicamente suspeitos de DUL, foram descritos vacúolos em glândulas sudoríparas écrinas sugerindo que tal achado pudesse auxiliar no diagnóstico (COCHIUS et al., 1994). Porém, com os avanços nos conhecimentos a respeito dos mecanismos moleculares da doença, verificou-se que tais biópsias podem ser sugestivas, porém não definitivas para o diagnóstico, sendo a análise molecular a única maneira segura para tal.

A DUL possui padrão de herança autossômico recessivo e através do estudo de ligação realizado em 12 famílias da Finlândia, foi possível localizar o gene responsável pela doença, no cromossomo 21, banda q22.3 (LEHESJOKI et al., 1991). Esta ligação foi confirmada nos pacientes do Mediterrâneo (MALAFOSSE et al 1992) e o gene *Cistatina B*, foi o primeiro gene relacionado as EMPs. O gene identificado codifica uma pequena proteína de 98 aminoácidos, a cistatina B que é inibidora da cisteína protease. Mutações neste gene, acarretam perda ou redução da função desta proteína, o que aumenta a atividade das catepsinas B, L e S em linfócitos. Esta enzima provavelmente atua na prevenção da apoptose celular (DELGADO-ESCUETA et al., 2001).

Na maioria dos pacientes, a doença está associada com a expansão de uma seqüência de dodecâmero (CCCCGCCCGCG), na porção 5' não transcrita do gene. Apenas um paciente até o momento apresentou homozigose para mutação de ponto neste gene (LALIOTI et al., 1997b). Todas as outras mutações de ponto identificadas são heterozigotos compostos, com um alelo contendo a expansão. Podemos também encontrar homozigotos para a expansão, principalmente em pacientes originários do Mediterrâneo. (LALIOTI et al., 1997a). O número de repetições das expansões em pacientes afetados, varia entre 30 a 70 cópias não estando, no entanto relacionada com a gravidade ou antecipação dos sintomas (LALIOTI et al., 1998).

### 1.3.2- Doença de Lafora (DL)

Os sintomas da DL surgem no final da infância ou início da adolescência, entre 11 e 18 anos. Em alguns, as alterações de comportamento e dificuldades escolares, podem ser as primeiras manifestações da doença. Assim como as demais EMPs, DL caracteriza-se por mioclonias, crises generalizadas e demência. Crises occipitais focais podem ocorrer em até 50% dos pacientes, nos estágios iniciais da doença (ROGER et al 1993; TINUPER et al 1993). Com a progressão da doença as mioclonias de ação e repouso aumentam de intensidade e no estágio final, a deterioração cognitiva é grave sendo constatada tetraparesia e muitas crises mioclônicas. A morte ocorre 2 a 10 anos depois do início dos sintomas, freqüentemente devido estado de mal epilético, sendo a idade média 20 anos (GENTON et al., 2002).

O estudo de famílias tem mostrado que o EEG pode revelar alterações antes do início dos sintomas clínicos, sendo semelhante a uma epilepsia idiopática generalizada, mostrando-se multifocal ou focal, com freqüentes descargas nas regiões posteriores. Com a evolução da doença, freqüentemente em meses, o padrão do EEG se altera passando a mostrar lentificação da atividade de base com paroxismos de espículas e poliespículas onda-lenta e atividade occipital (GENTON et al., 2002). Quanto aos estudos de neuroimagem, não há relatos na literatura.

Os achados histopatológicos muito bem descritos por Lafora (LAFORA et al., 1911), são ainda considerados padrão ouro para o diagnóstico preciso da doença. Os corpúsculos de Lafora, são compostos por poliglicossanos (polissacarídes) e estudos mostram tratar-se de 80% a 93% de glicose (sacarídes), além de 6% de proteínas. Estes corpúsculos são encontrados no cérebro, músculo estriado, fígado, coração, retina e pele. Como os corpúsculos de Lafora podem ser visualizados nas células mioepiteliais dos ácinos das glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas, a biópsia de pele de região axilar (CARPENTER et al., 1981), tem sido comprovadamente o procedimento de escolha para o diagnóstico.

Esta doença possui padrão de herança autossômico recessivo e através de estudos de clonagem posicional, foi realizada a identificação de um gene causador da doença. Nove famílias num total de 19 pacientes, com biópsia positiva, tiveram seu DNA

tipado com marcadores microssátélites, o que permitiu a localização do gene no cromossomo 6q23-25 (SERRATOSA et al., 1995). Em 1998, MINASSIAN e colaboradores, relataram mutações no gene *EPM2A*, que codifica uma proteína chamada laforina. Acima de 80% dos pacientes com Lafora, tem mutação no gene *EPM2A*, que é uma proteína específica tirosina fosfatase, primariamente associada a ribossomos (GANESH et al., 2000). Os estudos demonstram que há grande heterogeneidade alélica na doença de Lafora, sendo encontrada cerca de 25 mutações. O gene possui 4 exons e já foram descritas mutações em todos eles. No entanto, 13 a 20% das famílias com confirmação histopatológica da DL, não estão ligadas no 6q23-q25 (GOMEZ-GARRE et al., 2000; MINASSIAN, 2001), caracterizando a presença de heterogeneidade não alélica também.

O controle das crises no início do tratamento deve ser feito com valproato de sódio, clonazepam ou clobazam, assim como tentamos controlar as mioclonias com o uso do piracetam. Com a evolução da doença torna-se difícil o controle dos abalos mioclônicos, pois tanto estruturas corticais como subcorticas podem estar sendo geradoras das mioclonias.

### **1.3.3- Lipofuscinose Ceróide Neuronal**

As LCNs representam um grande grupo de doenças de depósito lisossomial, que ocorrem na infância e adolescência, nas quais um lipopigmento autofluorescente é acumulado nos lisossomos. Atualmente já estão descritas oito formas diferentes de LCN (WISNIEWSKI et al., 2001).

Entre as várias características clínicas, estão a involução do desenvolvimento neuropsicomotor com perda visual progressiva e epilepsia. Para que se possa realizar a classificação das diferentes formas, deve-se levar em conta, a idade de início dos sintomas, os sinais clínicos e os diferentes achados histopatológicos. Todas possuem padrão de herança autossômico recessivo exceto a forma adulta que também pode ser autossômica dominante. Recentes avanços na década de 90, proporcionaram a caracterização dos genes associados com as lipofuscinoses. O padrão ouro para o diagnóstico, é obtido através da

biópsia de vários tecidos, incluindo pele e conjuntiva. Cinco genes associados as lipofuscinoses foram isolados e alguns possuem seu produto identificado, são eles: *CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN5* e *CLN8* mais outros dois genes estão sendo mapeados. Nenhum gene foi identificado e associado com a forma adulta. Os produtos dos genes *CLN1* e *CLN2* são conhecidos (CAMP et al., 1993; CAMP ET AL., 1994), são a enzima palmitoiltoesterase e tripeptidil peptidase 1, respectivamente. Na tabela 2, apresentamos resumidamente, as quatro principais formas de LCN, com os principais achados histopatológicos e genes envolvidos.

**Tabela 2-** Principais características clínicas, histopatológicas e genéticas das quatro formas mais comuns das LCNs.

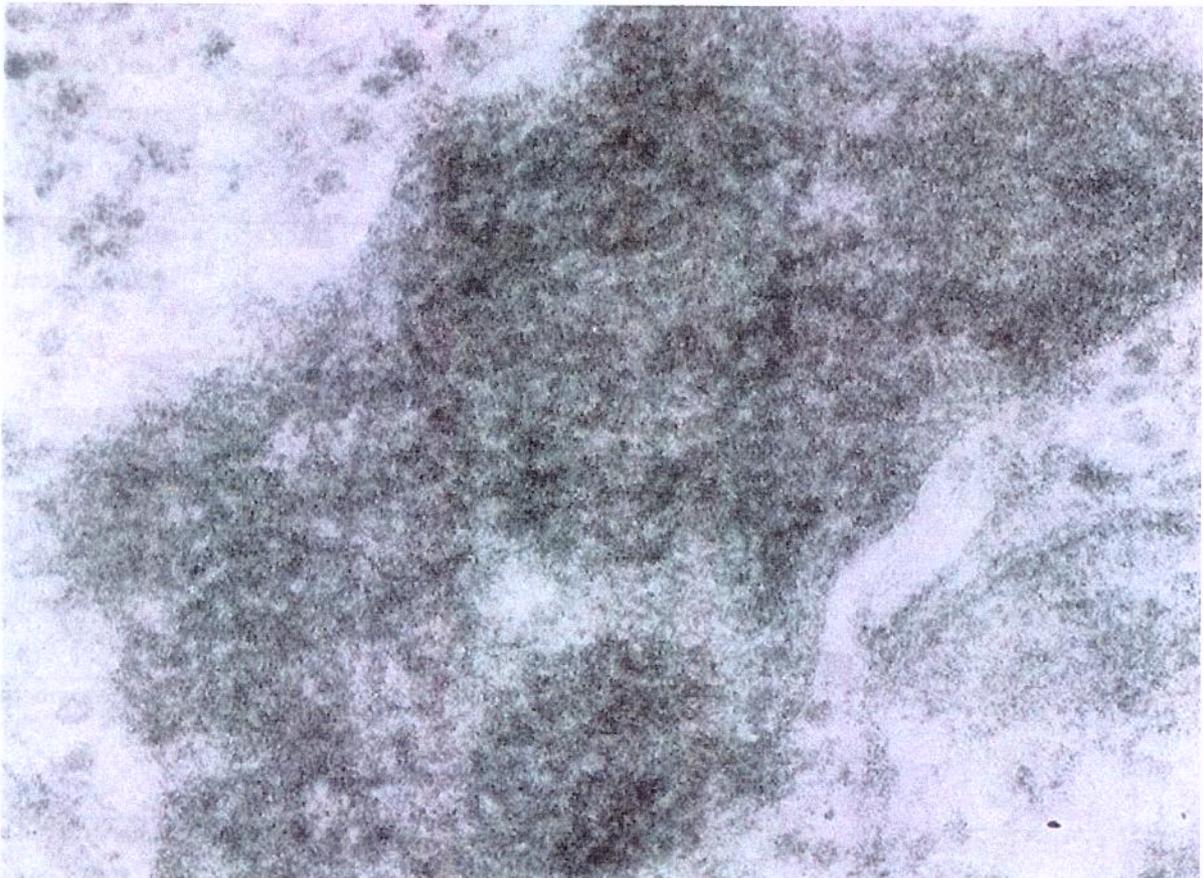
Formas clínicas	Idade de início da doença	Principais sintomas	Padrão de herança	Achados histopatológicos	Gene Identificado e produto gênico
Infantil	6m até 2ª	Crises, atraso do DNPM, perda visual	AR	GROD	<i>LCN 1</i> Palmitoiltoesterase
Infantil tardia	2a até 8a	Crises, atraso do DNPM, perda visual	AR	CV	<i>LCN 2</i> Tripeptidil Peptidase
Juvenil	4a até 10a	Crises, perda visual, atraso do DNPM, sinais extra- piramidais	AR	FP	<i>LCN 3</i> Proteína Transmembrana
Adulta	15a até 50a	Crises, alterações do comportamento	AR ou AD	Misto	Desconhecida

Notas: LCNs: lipofuscinoses ceróides neuronais; DNPM: desenvolvimento neuropsicomotor; GROD: depósito ultraestruturais granulares osmiofílicos; CV: corpúsculos curvilineares; FP: impressões digitiformes; AR: Autossômico Recessivo; AD: Autossômico Dominante.

As diferentes formas clínicas serão descritas a seguir:

#### 1.3.3.1- Forma infantil (Haltia-Santavuori) ou LCN1

O início dos sintomas ocorre tipicamente ao redor dos 6 meses a 2 anos de idade. Os sintomas iniciais são: hipotonia e irritabilidade evoluindo para crises, ataxia, demência, cegueira e microcefalia adquirida. A expectativa de vida é entre 5 e 10 anos. O achado histopatológico característico é a presença de depósitos ultraestruturais granulares osmiofílicos (GROD), figura 1. O diagnóstico em alguns países europeus também está sendo feito com auxílio de técnicas moleculares, que procuram mutações no gene *CLN1* ou através de testes que estudam a atividade da enzima palmitoiltoesterase (HALTIA et al., 1973; SANTAVUORI, 1988; CAMP et al., 1993).



**Figura 1-** Microscopia eletrônica, dos depósitos ultraestruturais granulares osmiofílicos (GROD), cedidas por Dr. S. Carpenter.

O EEG demonstra em vigília grave comprometimento da atividade de base com atividade teta-delta irregular sem localização definida. Durante o sono, o traçado é desorganizado sem os achados característicos normais, como ondas do vértex. Nesta forma de lipofuscinose não há eliciação de resposta peculiar com a fotoestimulação de baixa frequência.

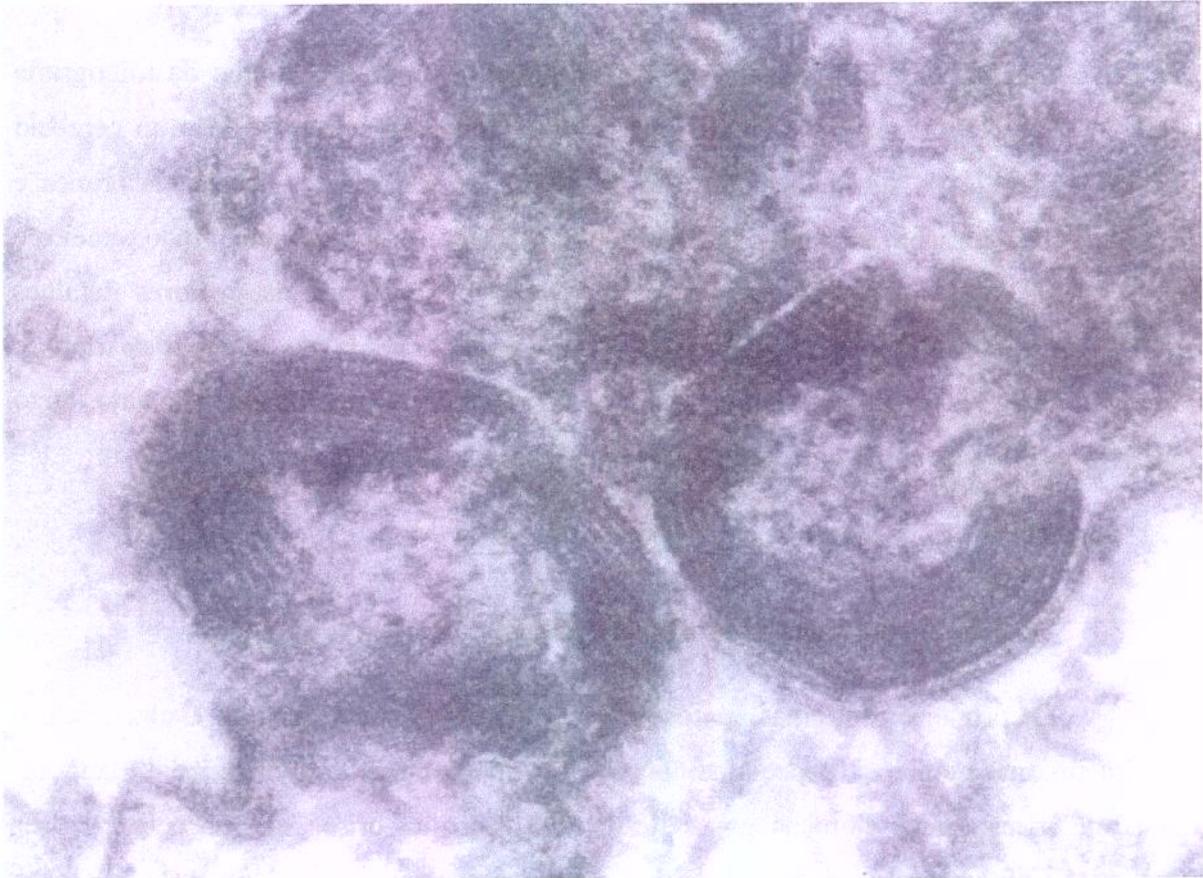
Estudos de neuroimagem realizados inicialmente com o auxílio da tomografia de crânio (TC) revelavam grave atrofia dos hemisférios cerebrais em relação ao cerebelo com acometimento da substância branca e pobre diferenciação entre substância branca e cinzenta. Todos possuem dilatação dos ventrículos laterais e progressivamente do terceiro e quarto ventrículo. Com os estudos através de RNM e espectroscopia, maiores detalhes foram acrescentados, como a comprovação da completa perda de N-acetilaspato e marcante redução na creatina e colina, assim como elevação do mioinositol e lactato, tanto em substância branca como cinzenta (VANHANEN et al., 1995).

#### **1.3.3.2- Forma infantil tardia (Bielschowsky-Jansky) ou LCN2**

Os primeiros sintomas aparecem por volta dos 2 aos 4 anos de idade, sendo o primeiro sintoma a epilepsia especialmente as crises mioclônicas. Podem também inaugurar o quadro, crises tônico-clônicas generalizadas assim como crises de ausência e crises parciais. Inicialmente são crianças com desenvolvimento neurológico adequado, e com o evoluir da doença vão perdendo suas aquisições, tornando-se marcante após alguns anos. O comprometimento visual é percebido pelos familiares ao redor dos 4 aos 6 anos de idade, juntamente com a ataxia e demência. Sinais de comprometimento do sistema piramidal são evidentes. A expectativa de vida fica entre os 8 e 12 anos de vida (WISNIEWSKI et al., 2001).

O diagnóstico na maior parte dos pacientes é confirmado através de biópsia (conjuntiva, pele ou reto) ou estudo de linfócitos, onde podem ser identificados depósitos ultraestruturais descritos como corpos curvilineares (CV), conforme mostra a figura 2 (WISNIEWSKI et al., 1992). Através de análise de células do líquido amniótico, pele fetal

e vilosidade coriônica, estes achados são precoces, podendo-se fazer o diagnóstico portanto, intra-útero. Atualmente em países que dispõem de tecnologia, o diagnóstico está sendo feito através da dosagem da atividade enzimática da tripeptidil peptidase 1 (CHOW et al., 1993; ZHONG et al., 2000).



**Figura 2-** Microscopia eletrônica mostrando os corpos curvilineares (CV)-LCN tipo 2 (Foto cedida pelo Dr. S. Carpenter).

Estudos em genética molecular, já descreveram mais de 30 mutações e 14 polimorfismos no gene *CLN2* e duas mutações mais comuns foram encontradas em aproximadamente 60 a 78% dos pacientes com LCN2 (SLEAT et al., 1997). Em nosso país, confirmamos a doença através da presença de CV, no material obtido por biópsia.

O EEG, já demonstrou sua importância no auxílio do diagnóstico precoce desta entidade. Nas fases iniciais da doença é possível através da fotoestimulação de baixa frequência (1 e 2 Hz), evidenciar espículas nas regiões parieto-occipitais. A atividade de base é irregular e lentificada além de apresentar muitas descargas epileptiformes, sem um padrão fixo. Alguns trabalhos descrevem séries de pacientes que apresentam complexo espícula-onda lenta 2-2,5 Hz, muito pequenas ou poliespículas entremeadas por atividade lenta sendo registrado também desorganização da atividade do sono. O eletrorretinograma e o potencial evocado visual mostram suas respostas abolidas no estágio final da doença (WISNIEWSKI et al., 2001).

A RNM de crânio, revela que nos estágios mais precoces a atrofia cerebelar é mais marcante. Com a evolução da doença, a atrofia cerebral e alterações de substância branca ficam evidentes, contudo menos drásticas que na forma infantil. Este achado pode auxiliar na distinção destas duas formas nos estágios mais precoces. Os achados de espectroscopia são idênticos aos da forma infantil e apontam para degeneração Walleriana, que ocorre após morte de neurônios (VANHANEN et al., 1995).

### **1.3.3.3- Forma juvenil (Doença de Batten) ou LCN3**

Esta forma também é chamada de Spielmeyer-Vogt-Sjogren, é descrita como a mais comum doença neurodegenerativa da infância, cuja incidência é maior que 1 em 25.000 nascimentos. Esta prevalência é maior entre os países do norte europeu, do que entre outras populações. A doença começa com perda visual entre os 5 e 10 anos evoluindo para cegueira (WISNIEWSKI et al., 2001) e estudos oftalmológicos mostram degeneração da retina e atrofia do nervo óptico. Distúrbios da fala e declínio cognitivo aparecem depois dos 8 aos 14 anos de idade. As crises epilépticas podem ser tônico-clônicas generalizadas,

parciais complexas e mioclônicas. Completam o quadro clínico alterações de comportamento, sinais extrapiramidais e distúrbios do sono. A expectativa de vida destes pacientes é ao redor dos 20 -30 anos de idade. O diagnóstico é realizado através de biópsias com achados característicos da doença. Tipicamente são encontradas descrições como impressões digitais ou *finger printer* (FP) (Figura 3). Nenhum método bioquímico é capaz de confirmar o diagnóstico.



**Figura 3-** Imagens de microscopia eletrônica ilustrando os chamados *finger printer* (FP) (cedidas pelo Dr. S. Carpenter).

Estudos através de genética molecular tem revelado 30 ou mais diferentes mutações e dois polimorfismos no gene *CLN3*. A maior deleção remove o éxon 7 e 8. Esta mutação foi encontrada em 96% dos pacientes em um dos alelos e em 85% nos dois alelos. O produto deste gene codifica uma proteína de 438 aminoácidos de função desconhecida (INTERNATION BATTEN DISEASE CONSORTION, 1995)

Os achados do EEG mostram desorganização do sono e em vigília anormalidades epileptiformes compostas por espícula-onda irregulares difusas. Durante a evolução da doença, a atividade de base torna-se lentificada com perda do ritmo posterior e pode aparecer resposta fotoparoxística durante a estimulação de baixa frequência (GENTON et al., 2002). O eletrorretinograma e o potencial evocado visual são anormais precocemente. Nos estágios iniciais da doença, a RNM de crânio pode mostrar-se dentro dos limites da normalidade. As alterações encontradas nesta forma de LCN, são semelhantes a forma infantil tardia, porém aparecem tardiamente e mais moderadas. A atrofia cerebelar nem sempre é vista nos estágios iniciais, como na LCN2. Assim como nas demais formas, 80% dos pacientes tem alteração de sinal em substância branca periventricular (VANHANEN et al., 1995).

#### **1.3.3.4- Forma adulta (Doença de Kuffs) ou LCN4**

É a forma mais rara de LCN e pouco caracterizada sendo reconhecido dois padrões de herança, autossômica dominante e recessiva. Os sinais e sintomas aparecem ao redor dos 30 anos de idade, podendo em alguns pacientes iniciar-se na segunda década de vida sendo descritos dois grandes fenótipos (BERKOVIC et al., 1988; CONSTANTINIDIS et al., 1992): um tipo caracterizado por apresentar inicialmente CTCG, ao redor dos 30 anos e evoluir com ataxia e disartria; outro fenótipo, apresenta sinais de alterações neuropsiquiátricas particularmente distúrbios do comportamento e demência. Os indivíduos com Kuffs, não possuem acometimento visual ou qualquer tipo de degeneração de retina. Cerca de 50 casos já foram descritos na literatura e verificou-se que 16 deles foram considerados esporádicos e 34 aparentemente familiares. Diferentemente das outras formas de LCN, esta não possui o defeito genético conhecido. O diagnóstico é feito através dos

achados histopatológicos obtidos por autópsia, cujos descrição é de uma miscelânea de inclusões como FP, CV e GROD. Os achados de EEG não são específicos, sendo que alguns relatos de caso descrevem, desde atividade de base irregular até exames normais. Os estudos de neuroimagem mostram atrofia cerebral e cerebelar difusas (WISNIEWSKI et al., 2001).

O tratamento para as diferentes formas de LCN até o momento, não tem se mostrado eficaz. Cuidados sintomáticos, buscam amenizar os distúrbios causados pelo defeito genético. A escolha das drogas anti-epiléticas de acordo com as crises, tem recebido grande atenção, depois de relatos de piora das crise com fenitoína e carbamazepina (ABERG et al., 1997; ABERG et al., 2000). As drogas escolhidas para o tratamento são, o ácido valpróico, lamotrigina e benzodiazepínicos, que podem estar associados ou não, nunca se esquecendo dos seus efeitos colaterais. Os contínuos progressos alcançados com o melhor conhecimento genético e bioquímico das LCN, poderão proporcionar o estudo em modelos animais e potencialmente a descoberta de novas terapias.

### **1.3.4- Encefalomiopatias Mitocondriais.**

#### **1.3.4.1- Encefalopatia Mitocondrial com Fibras Vermelhas Rajadas (MERRF)**

A encefalopatia mitocondrial com fibras vermelhas rajadas (MERRF), é uma anormalidade multissistêmica, cuja etiologia baseia-se na mutação do DNA mitocondrial (mtDNA). Caracteriza-se por mioclonias, epilepsia generalizada, ataxia e na biópsia muscular, fibras vermelhas rajadas. Outras manifestações comuns são a perda auditiva, neuropatia periférica, demência, baixa estatura e intolerância aos exercícios. São características menos comuns a cardiomiopatia, retinopatia pigmentar, sinais piramidais, oftalmoparesia e múltiplos lipomas (FUKURARA et al., 1980).

O início dos sintomas habitualmente ocorre na infância podendo também aparecer na vida adulta. É uma doença sem predileção étnica onde o padrão de herança é mitocondrial, portanto via materna. Estudos bioquímicos revelam que ocorre a presença de mitocôndrias normais e anormais, num mesmo tecido, sendo este achado consistente com o que chamamos de heteroplasmia, comum nas mutações mitocondriais. O grau de heteroplasmia nos diferentes tecidos, é que proporciona a variabilidade do fenótipo (SHOFFNER et al., 1990).

SHOFFNER e colaboradores, foram os primeiros pesquisadores a demonstrar a típica substituição de adenina por guanina (A → G) no nucleotídeo 8344 no mtDNA. Esta mutação está presente em 90% dos pacientes com MERRF. Vale ressaltar que este defeito molecular foi o primeiro a ser associado com uma forma específica de epilepsia. Duas outras mutações, T8356C e G8363A também tem sido associadas com MERRF. A mutação T8356C está relacionada a famílias que possuem a sobreposição de sintomas com “stroke-like”, já a mutação G8363A, tem o quadro clínico é dominado por cardiomiopatia. No entanto, 80 a 90% dos casos típicos de MELAS, são causados pela mutação A3243G mtRNA<sup>leu(UUR)</sup> (ZEVIANI et al., 1993; DiMAURO et al., 2002).

A expressão clínica de qualquer mutação de ponto do mtDNA, incluindo a A8344G, depende de três fatores: o grau de heteroplasmia; a distribuição da mutação no tecido e finalmente , o limiar do tecido para as específicas mutações (DiMAURO et al., 2002).

Os pacientes com MERRF típico, tem elevados níveis de lactato e piruvato no sangue sendo que o líquido cefalorraquiano demonstra taxa de proteínas elevadas.

O EEG mostra espículas generalizadas e ondas agudas com lentificação da atividade de base porém descargas focais podem ser descritas. Todos estes achados são inespecíficos (CANAFIOLIA et al., 2001).

Os estudos com RNM de crânio ou TC, mostram atrofia cerebral e calcificação dos gânglios da base (BARKOVICH et al., 1993).

A biópsia de músculo revela agregados subsarcolemais de mitocôndrias e as chamadas fibras vermelhas rajadas. Tais fibras são intensamente coradas pelo tricrômio de gomori, que demonstra as fibras rajadas em até 90% dos casos. Estas fibras também reagem intensamente com a dehidrogenase succinato (SDH), que é mais sensível para indicar a excessiva proliferação mitocondrial (HASEGAWA et al., 1991).

O diagnóstico pode ser feito associando-se os achados clínicos aos de biópsia muscular, no entanto é possível através da análise do mtDNA, chegarmos ao diagnóstico de MERRF e/ou MELAS de maneira rápida e precisa. Os estudos através de enzimas de restrição confirmam o diagnóstico de maneira muito menos invasiva, assim como podem detectar a presença de portadores assintomáticos. É possível quantificar a porcentagem de DNA mutante e a partir de então fazer um adequado aconselhamento aos portadores (SILVESTRI et al., 1993).

O tratamento na maioria dos pacientes é empírico, com a utilização de vitaminas e co-fatores incluindo co-enzima Q-10 e L-carnitina. O uso de drogas anti-epiléticas, inclui clonazepam e valproato com o cuidado de associar sempre a L-carnitina (DiMAURO et al., 2002).

#### **1.3.4.2- MELAS ( encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e stroke-like )**

MELAS é outra doença de herança mitocondrial que pode ser responsável pela síndrome das EMP. Clinicamente caracteriza-se por apresentar episódios *stroke-like*, isto é episódios vasculares semelhantes a AVC (acidente vascular cerebral), que no entanto não respeitam os territórios vasculares e ocorrem em pacientes jovens; crises epiléticas, demência; acidose láctica e fibras vermelhas rajadas (PAVLAKIS et al., 1984). Outras características podem estar presentes como mioclonias, ataxia, baixa estatura e surdez portanto como MERRF, é uma doença multissistêmica.

É incomum a mesma família possuir mais de um probando com o quadro de MELAS, os demais são oligossintomáticos ou assintomáticos.

Nos pacientes com MELAS, os exames de neuroimagem freqüentemente mostram lesões compatíveis com episódios de AVC, que tipicamente acometem as regiões posteriores e geralmente não respeitam a distribuição das grandes artérias. Os achados de EEG são inespecíficos. (CANAFOLIA et al., 2001).

MELAS está associado a vários pontos de mutação no mtDNA, sendo que a mutação mais freqüente é a troca de bases na posição 3243, A→G 3243 do mtDNA. Esta troca é responsável por cerca de 80 a 90% dos casos de MELAS.(HIRANO et al., 1994). Nestes pacientes o diagnóstico pode ser feito somente através da análise molecular, no entanto diferente de MERRF, as porcentagens de DNA mutante são mais baixa no sangue que no músculo (SILVESTRI et al., 1993).

Comparando-se a evolução entre MERRF e MELAS, os pacientes com MERRF apresentam sobrevida maior com moderado comprometimento cognitivo e de comportamento, enquanto que os indivíduos com MELAS, possuem um curso mais rápido e debilitante (DiMAURO et al., 2002).

As considerações sobre tratamento destes pacientes podem seguir o mesmo raciocínio das demais encefalomiopatias mitocondriais.

### **1.3.5- Sialidoses**

As sialidoses pertencem ao grupo de doenças lisossomiais e estão associadas à deficiência da alfa-N-acetilneuraminidase e em alguns fenótipos, com a deficiência beta-galactosidase. A característica clínica marcante é a constatação no exame de fundo de olho da mancha vermelho-cereja. O padrão de herança é autossômico recessivo (FRANCESCHETTI et al., 1980) sendo descritos dois fenótipos:

**Sialidose tipo I**, caracteriza-se por ter início na adolescência, com mioclonias e perda visual progressiva, embora a típica “mancha vermelho-cereja”, possa aparecer somente anos mais tarde. Outras características incluem: CTCG, ataxia, opacificação de cristalino e neuropatia periférica moderada. A demência é uma característica ausente. Mas

o coeficiente de inteligência (QI) pode estar abaixo do esperado pela deficiência visual (BERKOVIC et al., 1986).

**Sialidose tipo II**, apresenta-se com mioclonias, CTCG e “mancha vermelho-cereja”. Os sintomas podem aparecer entre a segunda e a terceira década de vida. Clinicamente cursam também com retardo mental, hepatoesplenomegalia, displasia esquelética, surdez e comprometimento cognitivo. Estes pacientes podem apresentar deficiência da neuroaminidase como também deficiência parcial da  $\beta$ -galactosidase. Inclusões PAS positivas podem ser vistas em linfócitos de células da medula óssea, neurônios e células de Kupffer (BERKOVIC et al., 1986). A confirmação diagnóstica é obtida demonstrando-se níveis elevados de oligossacarídes na urina. Cultura de fibroblastos e linfócitos demonstram deficiência de sialidase, com ou sem a deficiência associada da  $\beta$ -galactosidase. O gene responsável pelas sialidoses foi mapeado no cromossomo humano 6p21.3 (PSHEZHETSKY et al., 1997).

### 1.3.6- Formas raras de EPM

Conforme já descrevemos as EMPs são raras porém existem formas pouco freqüentes dentro desta síndrome. Não vamos nos prender a detalhes maiores, ficando apenas com breves resumos. Na tabela 3, citamos as formas raras de EMP.

**Tabela 3-** Formas raras de EMP

Formas raras de EMP
Atrofia dentatorrubropalidoluisiana (DRPLA)
Doença de Gaucher forma não-infantil
GM2 gangliosidose, forma infantil tardia e juvenil
Distrofia neuroaxonal, forma juvenil
Síndrome da falência renal com mioclônus
Doença de corpos de inclusão atípicos
Doença de Huntington, forma juvenil

A **atrofia dentatorrubropalidoluisiana (DRPLA)** é uma doença neurodegenerativa, cuja maioria dos casos foi descrita no Japão. O padrão de herança é autossômico dominante, é causada por uma repetição de tripletos (CAG) cujo gene já foi mapeado no cromossomo 12p13.31 (KOIDE et al., 1994). Clinicamente possuem ataxia cerebelar, coreoatetose, mioclonias, epilepsia, demência e sintomas psiquiátricos. Indivíduos que apresentam os primeiros sintomas na terceira ou quarta década de vida, desenvolvem síndrome cerebelar progressiva, com ligeiro declínio cognitivo. Porém, aqueles que apresentam o início da doença na primeira ou segunda décadas, desenvolvem quadro típico de EMP (GENTON et al., 2002).

A **doença de Gaucher forma não-infantil**, inicialmente manifesta-se como uma EMP, com paralisia supranuclear e esplenomegalia sem demência. Os sintomas neurológicos podem aparecer na infância ou na quarta década de vida. Os exames laboratoriais mostram pancitopenia, elevados níveis de fosfatase ácida e baixos níveis atividade de  $\beta$ -glucocerebrosidase, em leucócitos (KING, 1975; BERKOVIC et al., 1986).

As **formas infantil tardia e juvenil das GM2 gangliosidose**, podem apresentar mioclonias ou crises epiléticas como características marcantes, acompanhadas de demência, ataxia, espasticidade ou distonia. A “mancha vermelho-cereja” está ausente e o diagnóstico pode ser feito através da dosagem da  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase em cultura de fibroblastos (BERKOVIC et al., 1986).

A **forma juvenil da distrofia neuroaxonal** tem características clínicas de EPM, com demência, ataxia, coreoatetose e neuropatia em alguns pacientes. O diagnóstico é feito demonstrando-se a presença de axônios esferóides que podem ser vistos em nervos periféricos e no cérebro (BERKOVIC et al., 1997).

**Síndrome de falência renal com mioclônus**, foi primeiramente descrita em uma família francesa do Canadá. Caracteriza-se por ter um padrão de herança autossômico recessivo, com início entre a segunda e terceira década de vida. Os sintomas renais ou neurológicos podem começar primeiro. Clinicamente possuem mioclonias, tremores, ataxia, proteinúria com falência renal e ausência de demência. Os achados neuropatológicos

compreendem: pigmentos em astrócitos, na primeira e terceira camada do córtex cerebral e lesão renal com colapso glomerular (ANDERMANN et al., 1986).

**Doença de corpos de inclusão atípicos** (acúmulo de neuroserpina), as inclusões são limitadas ao cérebro e são completamente diferentes dos corpúsculos de Lafora. Os corpúsculos de Lafora e os de inclusão atípicos, coram-se com o PAS porém para diferenciá-los em algum caso de dúvida, pode-se usar a prata como método de coloração, através do qual os corpúsculos de Lafora não se coram. A microscopia eletrônica também confirma que os materiais são de natureza diferentes (comunicação pessoal por S. Carpenter). Atualmente já sabemos que estes corpos de inclusão são devidos ao acúmulo de neuroserpina, que é uma serina protease inibitória expressa somente no sistema nervoso central. Os sintomas clínicos iniciam-se entre os 7 e 31 anos e a demência é marcante (BERKOVIC et al., 1997).

**Doença de Huntington forma juvenil**, é rara e freqüentemente se apresenta como uma EMP, sem movimentos coreicos. O início da epilepsia é geralmente 2 anos antes, com CTCG, ausências atípicas e mioclonias maciças. A fotosensibilidade, pode estar presente, e o EEG mostra paroxismos de poliespículas e espículas. O prognóstico é ruim, e a morte ocorre entre 4 a 6 anos depois do início da doença. O padrão de herança é autossômico dominante (JERVIS, 1963; McDONALD et al., 1993; GENTON et al., 2002).



## ***2- OBJETIVOS***

## **2.1- OBJETIVO GERAL**

Estudar um grupo de pacientes com epilepsia mioclônica progressiva (EMP), procurando chegar ao diagnóstico das causas específicas, através da avaliação clínica neurológica, exames de propedêutica armada e testes específicos.

## **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar as causas mais freqüentes das EMPs em um hospital terciário;
2. Determinar a utilidade, na prática clínica, dos testes diagnósticos utilizados em nosso trabalho;
3. Estabelecer correlações entre o fenótipo (quadro clínico) e o genótipo (identificação de mutações gênicas específicas), nos referidos pacientes;
4. Propor um algoritmo, do ponto de vista prático, para direcionamento do diagnóstico.



***3- MATERIAIS E  
MÉTODOS***

### **3.1- SELEÇÃO DOS PACIENTES**

Entraram para o estudo, todos os pacientes que possuíam o diagnóstico provável de EMP, avaliados em nosso serviço entre o período de outubro de 2000 a agosto de 2002, num total de 25 pacientes/21 famílias não-relacionadas.

Deveriam preencher os critérios clínicos para as EMPs (mioclonias, CTCG e declínio neurológico progressivo, como ataxia e demência). Estes pacientes foram encaminhados para avaliação a partir dos ambulatórios de Epilepsia Infantil e Epilepsia Adulto do Hospital de Clínicas-HC da UNICAMP, sob coordenação do Departamento de Neurologia, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM). Referente aos estudos laboratoriais especializados, envolvendo os aspectos genéticos, houve co-participação do Departamento de Genética Médica da FCM-UNICAMP, através do Laboratório de Biologia Molecular, da mesma instituição. Os pacientes e/ou responsáveis foram convidados a participarem do estudo, sendo explicado o objetivo do trabalho e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo CEP-FCM-UNICAMP e CONEP (anexos).

### **3.2- AVALIAÇÃO CLÍNICA NEUROLÓGICA (NÍVEL DIAGNÓSTICO I)**

Esta primeira avaliação, que chamamos de **Nível diagnóstico I**, compreendeu a realização da história clínica, história familiar e exame neurológico. A partir disto, agrupamos os pacientes de acordo com o diagnóstico provisório, obtido após esta avaliação.

### **3.3- EEG E RNM DE CRÂNIO (NÍVEL DIAGNÓSTICO II)**

Todos os pacientes incluídos no presente estudo foram submetidos ao exame de EEG. O procedimento seguiu a padronização internacional de colocação de eletrodos, o sistema 10-20. As aquisições foram em aparelhos de 14 e 21 canais, em aparelhos analógicos e digitais, respectivamente, aparelhos Nihon Koden®. As montagens utilizadas foram: sagitais, coronais, com a média, com o vértex e com eletrodo zigomático. As técnicas de facilitação foram, a hiperpnéia e a fotoestimulação. Nos casos suspeitos de LCN

foi realizada, fotoestimulação de baixa frequência com 1, 2 e 3 Hz. A duração do exame variou entre 20 e 30 minutos e em alguns pacientes foi necessário sedação com hidrato de cloral a 10%, via oral na dose de 30 a 50 mg/Kg de peso em dose única, podendo ser repetido até 3 vezes.

As imagens de RNM de crânio foram obtidas em um sistema de 2 T (Elcint Prestige®), com aquisições no plano coronal, sagital e axial. Os parâmetros de imagem para as diferentes aquisições foram:

Imagens sagitais T1 ponderadas “spin echo”, ângulo de excitação – “flip angle”- de 180°; TR=430, TE=12, matriz de 200x350, FOV=25X25cm). Estas imagens são utilizadas para orientar o plano de aquisição das demais imagens.

Imagens no plano coronal oblíquo obtidas em um plano perpendicular ao longo eixo da formação hipocampal, definido nas imagens sagitais.

a-) T2 ponderadas “fast spin echo” (espessura de 3 a 4mm, ângulo de excitação de 120°; TR=4800, TE=129, matriz de 252X320, FOV=18X18cm).

b-) T1 ponderadas “inversion recovery”(espessura de 3mm, ângulo de excitação de 200°; TR=2800, TE=14, TI=840, matriz de 130X256, FOV=16X18cm).

Imagens no plano axial: “duplo spin echo” (T2 ponderadas e densidade de prótons): T2 ponderadas (espessura de 6mm, ângulo de excitação de 120°, TR=6800, TE=129, matriz de 252X328, FOV=21X23cm).

Aquisição volumétrica (3D) T1 gradiente echo (GRE), para reconstrução multiplanar, com espessura de 1 mm (flip angle=35°, TR=22, TE=9, matriz=256 x 256, FOV=23 x 25 cm).

Com as informações obtidas nestes dois níveis diagnósticos, orientamos a realização de exames mais específicos, necessários e suficientes para a confirmação da causa específica da EMP.

### 3.4- EXAMES ESPECÍFICOS (NÍVEL DIAGNÓSTICO III)

Compreendem este nível diagnóstico, os exames histopatológicos, como biópsia de pele e músculo; testes moleculares de genes candidatos como a *Cistatina B*, *EMP2A*, mutação A3243G no mtDNA, mutação A8344G no mtDNA, pesquisa para a doença de Huntington e ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes. Além da realização de testes bioquímicos específicos, como a dosagem da sialidase, quando a suspeita clínica for de sialidose. Descreveremos a seguir cada um destes exames.

#### 3.4.1- Exames histopatológicos

Os exames histopatológicos, como as biópsias de pele profunda, para obtenção do diagnóstico foram executadas em centro cirúrgico ambulatorial do HC-UNICAMP, sob anestesia local e acondicionadas em duas soluções diferentes: formol e glutaraldeído 2%. As amostras foram provenientes da região axilar, pela riqueza de glândulas sudoríparas e um único caso foi obtido da região palmar. A análise do material foi realizada através de microscopia óptica (MO) nas colorações hematoxilina-eosina (HE) e PAS obrigatoriamente. O estudo de microscopia eletrônica (ME) necessita de cortes ultra-finos e estes foram realizados em toda suspeita diagnóstica de LCN. Para o estudo das demais causas específicas, realizamos estudo com ME somente se houvessem dúvidas ou por interesse acadêmico, como nos pacientes com DL.

As biópsias de músculo foram obtidas em ambiente cirúrgico, por profissionais do setor de doenças neuromusculares do Departamento de Neurologia-FCM-UNICAMP, sob supervisão da Dra. Anamarli Nucci.

#### 3.4.2- Testes moleculares

A análise molecular para a pesquisa de mutações nos genes da *Cistatina B* e *EPM2A*, foram realizadas nos pacientes clinicamente suspeitos de DUL e DL, respectivamente. Para tal procedimento, foram necessárias várias etapas, conforme descreveremos a seguir:

### 3.4.2.1- Extração de DNA genômico do sangue periférico

A extração do DNA genômico é realizada através de parâmetros descritos nos protocolos manuais de extração, com fenol e clorofórmio a partir de vinte a trinta mililitros de sangue periférico. Tal procedimento fornece grande quantidade de DNA.

### 3.4.2.2- Análise Molecular

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP. Como estratégia inicial para a detecção de mutações, foi utilizada a técnica de polimorfismos unifilamentares conformacionais (SSCP), através da qual é possível detectar alterações no padrão de migração das amostras de DNA, previamente amplificadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

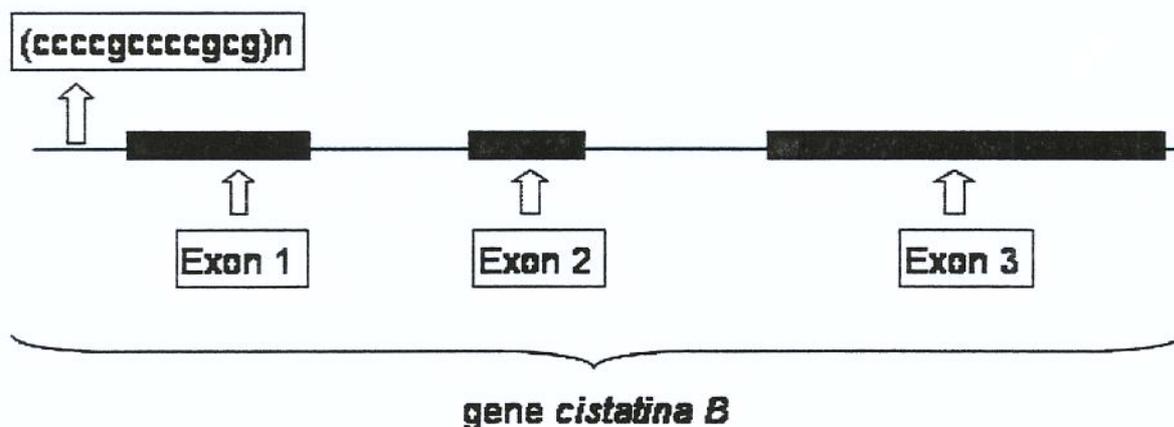
A eletroforese é realizada em gel não desnaturante de poliacrilamida a 6% que em alguns casos pode ser acrescido de glicerol (5% do volume total). Caso ocorra uma troca de pares de base, a fita de DNA adquire uma conformação secundária diferente, resultando em alteração de sua mobilidade no gel.

Os fragmentos de DNA genômico foram amplificados pela técnica da PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada uma das regiões a serem amplificadas.

Utilizamos esta técnica para todas as regiões codificadoras (exons) dos genes: *Cistatina B*, gene responsável pela DUL, com 3 exons (figura 4).

O gene *EPM2A* responsável pela DL, com 4 exons (figura 5) teve somente os exons 2, 3 e 4 foram amplificadas pela PCR. Os oligonucleotídeos utilizados em nosso projeto estão descritos nas tabelas 5 e 6.

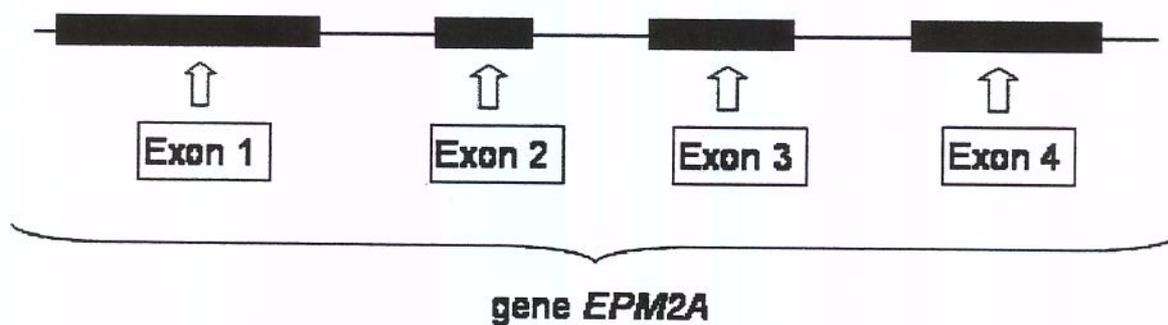
As condições da PCR foram otimizadas para cada par de oligonucleotídeo, estão descritas conforme a tabela 4.



**Figura 4-** Representação esquemática do gene *Cistatina B*

**Tabela 4-** Apresentação dos oligonucleotídeos utilizados para PCR, SSCP e sequenciamento do gene Cistatina B .

Nome	Oligonucleotídeos
Exon 1	PF4: cgc agg gga ctc cga agc caa agt g
	4R : caa agc ggc ttc tt cgc ctc
	R14: cca ctt tta gca aga agc ct
Exon 2	F11: cca ccg tac cca gct gga act g
	5R: cct gca cag gcg gtt tcc tac
	1R: gat cac agg tga acg ctc tg
Exon 3	4L: ggc gca gca agg tga ctt gg
	dR3: gtc taa aag caa agg agg caa tc
	1R: gat cac agg tgc acg ctc tg



**Figura 5-** Representação esquemática da estrutura do gene *EPM2A*

**Tabela 5-** Apresentação dos oligonucleotídeos para PCR, SSCP e sequenciamento para o gene *EMP2A*, responsável pela doença de Lafora.

Nome	Oligonucleotídeos
Exon 1	LAF1F: gtg atg cat ccc aaa gaa ggc
	LAF1R: agg gaa tca gta gga agc cgg
	LAF1FB: cgc aga aca gca cgt gtt ctc
	LAF1RB: tgc gcc ggg ggc agg cgt c
Exon 2	LFR2F: gta tca gct gct tga gga ta
	LFR2R: ctt gtc cta ctt cta tgc cta
	LFRS2: gta tca gct gct tga gga ta
	LFR2S: ctt gtc cta ctt cta tgc cta
Exon 3	LFR3F: acc aaa tat ctg gct ggg ta
	LFR3R: tgc tca tat ctg gtg ttg gc
	LFRS3: cta cat gtt tta tgc agc tcc
	LF3S: att tat tcc att tct acc att cat
Exon 4	LFR4F: gcc gag tac aga tgc tgc
	LFR4R: tcg tca atg tag aca gcc g
	LFRS4: gag aga gcc tct ggc ctc
	LF4S: cag aag aac gaa cct tcc ca

**Tabela 6-** Condições das reações de PCRs

Exon/ gene	Ciclos	Temperatura	Tempo
Exon 1/ Cistatina B	35 ciclos	94° C	5 min.
		94° C	30s
		65° C	30s
		72° C	1 min.
		72° C	7 min.
Exon 2 e 3/ Cistatina B	20 ciclos	94° C	5 min.
		94° C	30s
		65° C *	20s
		72° C	2 min.
		94° C	30s
Exon 1, 2 e 3/ EPM2A	30 ciclos	10 ciclos	30s
		55° C	20s
		72° C	2 min.
		94° C	2 min.
Exon 4/ EPM2A	30 ciclos	94° C	30s
		94° C	30s
		60° C	1 min.
		72° C	30s
		72° C	2 min.

\*touch-down”, isto é -1°C, em cada ciclo.

### 3.4.2.3- Sequenciamento

Após a triagem pelo SSCP, submetemos os fragmentos que apresentaram alteração no padrão de migração eletroforética, ao sequenciamento manual e/ou automático. O sequenciamento dos produtos da PCR foi realizado utilizando-se a técnica de terminação de cadeia, desenvolvida por Sanger et al.1977, e com o kit da Thermo Sequenase (Amersham/Pharmacia/Biotech®). Os fragmentos amplificados foram tratados com a enzima exonuclease por 30 min. Em seguida são executadas as reações de sequenciamento sense e anti-sense, utilizando-se em cada uma os oligonucleotídeos específicos, juntamente com nucleotídeos radioativos ( $\alpha$ -dNTP  $P^{33}$ ) e um preparado contendo dGTP. Após realização das reações para cada uma das quatro bases aminadas que constituem o DNA humano: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T), o produto das 4 reações é submetido a eletroforese em gel de uréia. A leitura dos alelos é feita por autorradiografia, após aproximadamente 3 dias de exposição do gel a filmes de raios-X, sob temperatura ambiente.

O sequenciamento automático foi realizado utilizando-se o Big Dye Terminator Sequencing kit for megaBACE®1000.

### 3.4.3- Detecção do dodecâmero no gene da Cistatina B

Para a detecção da repetição do dodecâmero, localizado no gene da *Cistatina B*, foi necessário realizar a técnica de hibridização com sonda marcada radioativamente. Através desta técnica é possível quantificar o número de repetições do dodecâmero, presente na extremidade 5' do gene.

Esta técnica molecular é utilizada em nosso laboratório e podemos dividi-la em duas fases:

Na primeira fase, realiza-se a PCR fria, isto é, não marcado radioativamente; em seguida submetemos esta reação a uma corrida eletroforética, em gel de uréia por cerca de 4 horas. Transfere-se este material para uma membrana de nylon, por capilaridade.

Na segunda fase marca-se a sonda, neste caso um dodecâmero, com o  $P^{32}$ . Coloca-se este material em contato com a membrana de nylon ( que contém o DNA ) em um cilindro de vidro, por 24 horas, em um forno a 42°C. Após este período a mesma será seca e exposta em um filme de raios- X .

#### **3.4.4- Outras técnicas moleculares**

Quando necessário, em presença de forte suspeita clínica, ampliamos os testes moleculares para detecção de mutações de ponto no DNA mitocondrial. Para o diagnóstico das encefalomiopatias mitocondriais, utilizamos enzimas de restrição e posteriormente confirmaremos através do sequenciamento manual. Para tal, utilizamos as enzimas de restrição *Hae* III para a mutação A3243G (principal responsável pelo fenótipo de MELAS) e a enzima *Bgl* I para a mutação A8344G (principal responsável pelo fenótipo de MERRF). Esta técnica consiste em utilizar enzimas de restrição, que fazem a digestão de regiões previamente amplificadas pela técnica da PCR. As amostras digeridas são submetidas a eletroforese em géis de acrilamida 12% ou agarose 2% a 150V, com tempos de corrida específicos para o tamanho dos fragmentos. Após a corrida eletroforética os géis são corados com brometo de etídio e levados ao transluminador com lâmpada ultravioleta. Para a documentação é utilizado o sistema Polaroid® de fotografia instantânea.

Em alguns casos, o diagnóstico etiológico específico das EMPs, nos obriga a pesquisar também causas pouco frequentes da síndrome, entre elas a doença de Huntington (DH) e a ataxia espinocerebelar do tipo 7 (SCA7). As técnicas utilizadas nesses casos, são semelhantes à descrita para a detecção do dodecâmero no gene da *Cistatina B*.

##### **3.4.4.1- Testes bioquímicos**

Para a confirmação diagnóstica das sialidoses, é necessário recorrer a exames bioquímicos específicos como níveis de oligossacarídes na urina, detecção da deficiência de sialidase, com ou sem associação da deficiência da  $\beta$ -galactosidase.



## ***4- RESULTADOS***

#### **4.1- AVALIAÇÃO CLÍNICA NEUROLÓGICA (NÍVEL DIAGNÓSTICO I)**

Os pacientes com diagnóstico provável de EMP, que nos foram encaminhados, passaram por este nível de diagnóstico para estabelecermos qual a possível causa específica de seu quadro clínico.

De acordo com esta avaliação inicial, obtivemos 9 pacientes (6 famílias) com suspeita de DUL, 5 pacientes (5 famílias) com DL, 8 pacientes com LCN (6 famílias), 5 pacientes com encefalomiopatia mitocondrial (5 famílias), um paciente com suspeita de doença de depósito (1 família) e um paciente com suspeita de DH juvenil (1 família).

A idade de início dos sintomas variou entre 1 ano de idade até 34 anos, demonstrando tratar-se de um grupo de pacientes heterogêneo, como é esperado para a síndrome das EMP. A consangüinidade esteve presente em apenas 5 famílias. Todas as causas mais comuns de EMP estão representadas neste grupo. Totalizamos neste primeiro nível de diagnóstico 24 famílias não relacionadas, num total de 29 pacientes (Tabela 7).

**Tabela 7-** Dados gerais em 24 famílias não relacionadas, avaliação do nível diagnóstico I

Famílias	Pacientes (sexo)	Início dos Sintomas e Idade	Hipótese diagnóstica	Consangüinidade
1	E. L. fem L. A. L. mas	9 anos ( 33 a) 13 anos ( 39 a)	UL	Presente
2	C. A. Z. fem	8 anos ( 42 a)	UL	Ausente
3	T. T. L. G. fem	9 anos ( 15 a)	UL	Ausente
4	C. J. C. fem	18 anos ( 47 a)	UL	Presente
5	O. L. M. mas	15 anos ( 41 a)	UL	Ausente
6	A. P. O. fem T. P. O. fem N. P. O. fem	7 anos ( 27 a) 9 anos ( 23 a) 7 anos ( 21 a)	UL	Ausente
7	M. V. O. A. mas	12 anos (22a)	DL	Ausente
8	P. R. C. fem	14 anos ( 17 a)	DL	Ausente
9	A. S. R. mas	9 anos ( 18 a)	DL	Ausente
10	M. W. S. fem	12 anos ( 14 a)	DL	Ausente
11	S. A. S. fem L. S. mas	4 anos ( 13 a) 4 anos ( 8 a)	LCN	Presente
12	A. P. R. fem E. H. S*. mas	5 anos ( 12 a) 3 anos ( 5 a)	LCN	Presente
13	J. G. R. fem	4 anos ( 6 a)	LCN	Ausente
14	R. P. S. fem	1 ano ( 9 a)	LCN	Ausente
15	V. C. P. fem	4 anos ( 9 a)	LCN	Ausente
16	J. A. mas	9 anos ( 18 a)	LCN	Ausente
17	R. R. P. mas	6 anos ( 16 a)	MELAS	Ausente
18	M. A. L. fem	34 anos ( 41 a)	MERRF	Ausente
19	A. C. B. mas	14 anos ( 19 a)	Sialidose	Presente
20	M. O. B. mas	5 anos ( 10 a)	MERRF	Ausente
21	L. C. B. M. fem	6 anos ( 14 a)	MELAS	Ausente
22	M. B. mas	4 anos ( 18 a)	Huntington	Ausente
23	A. L. B. fem	14 anos ( 23 a)	DL	Ausente
24	T. D. S. fem	2 anos ( 15 a)	MERRF	Ausente

Notas: UL: Unverricht-Lundborg; DL: Doença de Lafora; LCN: Lipofuscinose Ceróide Neuronal; MERRF: Encefalomiopatia Com Fibras Vermelhas Rajadas; MELAS: Encefalomiopatia Acidose Láctica e Stroke Like. (\*) Este paciente possui dois irmãos falecidos, com as mesmas características clínicas e o diagnóstico final em sua irmã nosso serviço, foi LCN tipo 2.

## 4.2- EEG E RNM DE CRÂNIO (NÍVEL DIAGNÓSTICO II)

Todos os pacientes foram submetidos aos exames de EEG e RNM de crânio; dois pacientes foram excluídos, pois não realizaram a RNM de crânio (um membro da família 12 e o paciente que constitui a família 21). Excluiu-se portanto, uma família e dois pacientes.

A TC foi realizada em dois pacientes das famílias 17 e 19, uma vez que não tiveram condições de realizar a RNM de crânio. No entanto, não consideramos este um fator limitante para o prosseguimento da nossa investigação.

Este passo da investigação (nível diagnóstico II) foi importante para realização ou não de exames mais invasivos ou que exigem uma técnica mais específica, como a realização de testes moleculares. Tal fato foi confirmado durante a investigação da paciente da família 23. Após a realização da RNM de crânio não prosseguimos com a investigação para DL, pois concluímos que se tratava de outra etiologia, que a princípio sobrepunha-se a EMP. Portanto também esta família foi excluída do estudo. A seguir descrevemos o caso clínico desta paciente.

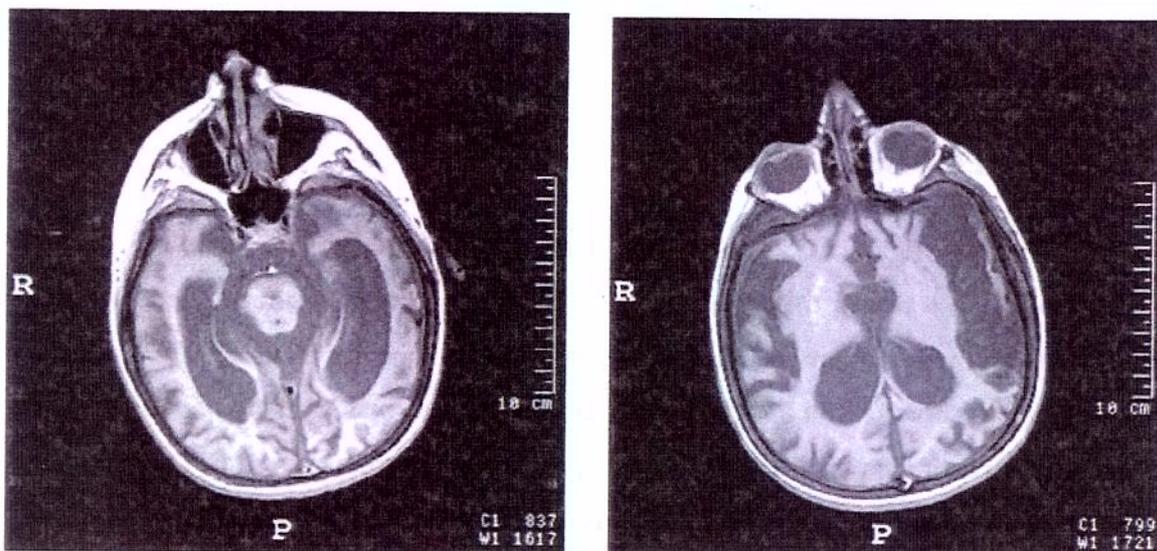
### **Família 23- Descrição clínica:**

Paciente A . L. B. 23 anos, sexo feminino, natural e procedente de Conceição de Minas (MG). É a terceira filha de um casal jovem, não consanguíneo, que apresentou desenvolvimento neurológico adequado nos primeiros anos de vida e teve calendário vacinal completo. Frequentou a escola até o quinto ano do ensino fundamental, com bom rendimento. A partir dos 12 anos de idade, apresentou progressiva queda no rendimento escolar com conseqüente interrupção da vida acadêmica. Aos 16 anos, teve a primeira CTCG, na ausência de processo infeccioso. Desde então evoluiu com alteração de comportamento, perda das habilidades manuais e alteração da marcha. Progressivamente apresentou alteração da fala até o estado de mutismo. Quanto as crises epilépticas, estas foram de difícil controle e multiformes (CTCG, mioclônias e crises parciais). Aos 20 anos de idade já estava afásica com tetraparesia, perda do contato visual e tendo diariamente mioclonias e CTCG. Diante do evidente o quadro involutivo com mioclonias, declínio

cognitivo começando por distúrbio de aprendizado, comportamento e possível quadro atáxico a primeira hipótese dentre as EMPs, foi de DL.

Solicitados exames gerais, entre eles o líquido cefaloraquiano (LCR), EEG e RNM de crânio. O resultado do exame do LCR revelou somente alteração nos títulos de IgG e IgM para CMV, sem alteração nos títulos de gama-globulina ou outras proteínas. A PCR para CMV no LCR e no plasma mostrou-se negativa.

A RM de crânio evidenciou atrofia extensa difusa e lesão destrutiva extensa em topografia de ambos lobos temporais pior a esquerda. O EEG teve como alteração, atividade periódica lateralizada, em uma única ocasião. Diante destes exames descritos, a hipótese inicial de EMP foi descartada, sendo o diagnóstico provável seqüela de encefalite, sem agente etiológico definido. A paciente foi re-encaminhada ao ambulatório de Neurologia Geral de Adultos, do HC-UNICAMP. A figura 6, mostra o exame de RNM de crânio da referida paciente.



**Figura 6-** Mostram dois cortes axiais da RNM de crânio da paciente (família 23) com atrofia e lesão destrutiva extensa de lobo temporal esquerdo.

### **4.3- EXAMES ESPECÍFICOS (NÍVEL DIAGNÓSTICO III)**

Obedecendo os critérios iniciais, excluímos a família 16 composta por um paciente, que não compareceu ao procedimento de realização de biópsia de pele, a hipótese diagnóstica era de LCN.

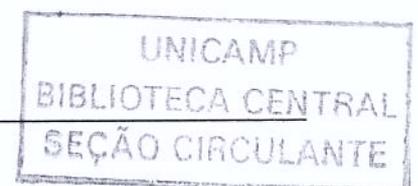
Portanto, foram excluídas as famílias 16, 21 e 23, além de um componente da família 12, ficando o trabalho com 25 pacientes/21 famílias não-relacionadas. Descreveremos a seguir, com detalhes os resultados obtidos de acordo com as causas específicas das EMP.

### **4.4- RESULTADOS ESPECÍFICOS**

#### **4.4.1- Doença de Unverricht-Lundborg**

##### **4.4.1.1- Nível diagnóstico I (avaliação clínica e neurológica)**

Do total de 21 famílias não-relacionadas, 6 famílias (9 pacientes), possuíam a hipótese de DUL. A idade de início dos sintomas variou entre 7 a 18 anos de idade. Nossos pacientes caracterizam-se por possuírem um longo período de evolução, a maioria apresentando mais de 10 anos de sintomas. As mioclonias são incapacitantes, em todas as famílias, exceto em duas (família 4 e 5), onde é preponderante a ataxia. O declínio cognitivo não foi quantificado objetivamente, porém foi observado durante a anamnese e confirmado pelos familiares. A tabela 8, resume os achados clínicos desta fase de investigação.



**Tabela 8-** Achados clínicos dos pacientes com diagnóstico provável de DUL

<b>Família</b>	<b>Idade de início e sexo</b>	<b>Tipos de crise</b>	<b>Sinas e Sintomas Neurológicos</b>	<b>Evolução</b>	<b>Particularidades</b>
1*	E.L. 9a, F L.A.L 13a, M	CTCG mioclônias	tremores, ataxia declínio cognitivo lento, fala escandida, liberação piramidal	24a 26a	piora catamenial, melhora em ambos com piracetam
2	C.A.Z. 8a, F	CTCG mioclônias	tremor cefálico, ataxia axial global, demência	34a	raras mioclônias e quadro demencial moderado a grave
3	T.T.L.G. 9 a, F	Mioclônias raras CTCG	mioclônia incapacitante, ataxial global, fala escandida	6a	piora catamenial, debilitação motora rápida e pouco declínio cognitivo
4*	C.J.C. 18a, F	Mioclônias raras CTCG	mioclônia incapacitante, declínio cognitivo lento, fala escandida, Ataxia	29a	controle das CTCG e raras mioclônias
5	O.L.M. 15a, M	CTCG mioclônias	ataxia global, fala escandida, pouco declínio cognitivo	26a	marcha muito difícil e bom controle sobre as crises
6	A.P.O. 7a, F T.P.O. 9a, F N.P.O. 7a, F	Mioclônias raras CTCG	Mioclônia incapacitante, fala escandida, ataxia global	20a 14a 14a	Depressão, tentativa de suicídio, mioclonias debilitantes, pouca declínio cognitivo

OBS: \*São filhos de consangüíneos.

#### 4.4.1.2- Nível diagnóstico II (EEG e RNM de crânio)

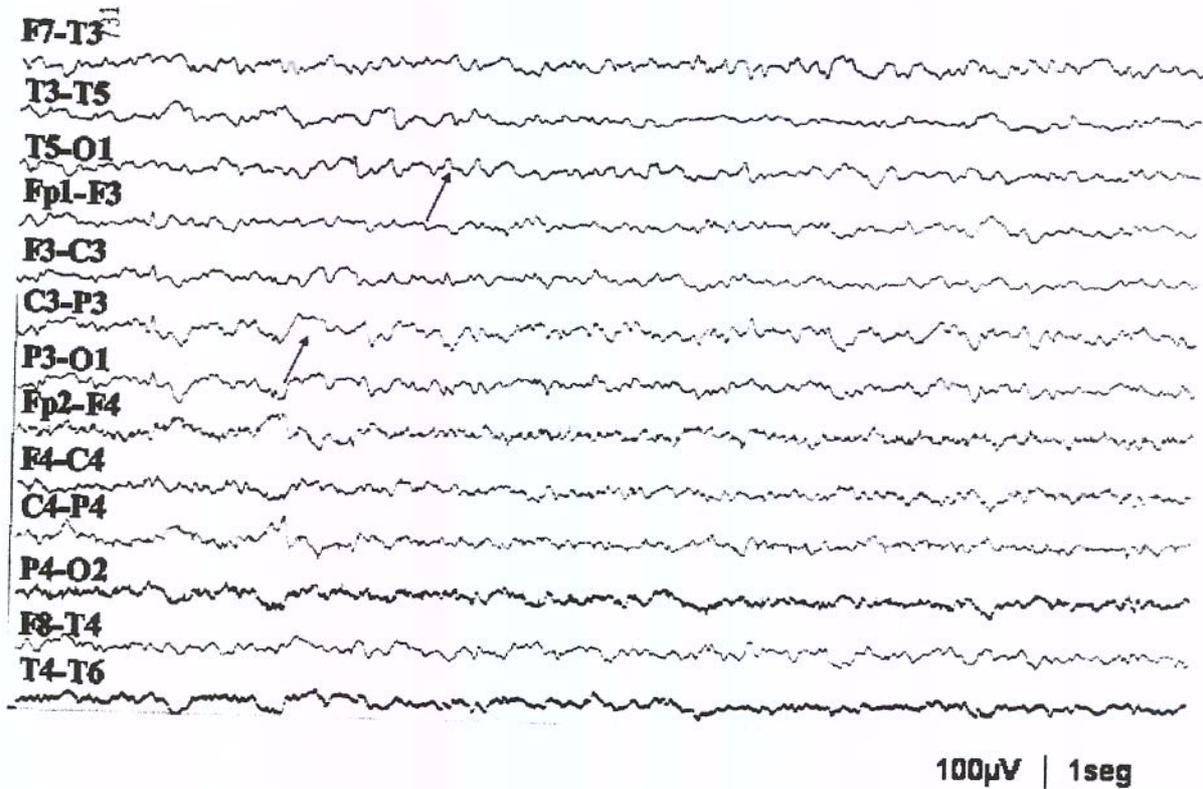
Os nove pacientes realizaram EEG e RNM de crânio. O EEG revelou distúrbio da atividade de base, entre leve a moderado. As alterações epileptiformes generalizadas ou focais, também foram registradas, sendo que em alguns pacientes as mioclonias foram exacerbadas pela fotoestimulação. Todos estes achados são inespecíficos, porém compatíveis com o quadro clínico da DUL. Na tabela 9, descrevemos as alterações encontradas em cada paciente.

**Tabela 9-** Descrição do padrão de alteração no EEG dos pacientes suspeitos de DUL.

Famílias	Idade e sexo	Padrão de alteração no EEG
1	E. L. 33 a, F  L.A.L. 39 a, M	Ativ. epileptiforme nas reg. frontais bilaterais, pouco freqüente ocasionalmente generalizada, ondas lentas difusas. Distúrbio lento e moderado da atividade de base.  Ativ. epileptiforme nas reg. temporais independentes, ondas lentas difusas. Distúrbio lento de leve a moderado da atividade de base.
2	C.A.Z. 42 a, F	Ondas lentas intermitentes generalizadas e distúrbio lento leve a moderado da atividade de base
3	T.T.L.G. 15 a, F	Paroxismos de poliespículas onda lenta generalizadas, freqüentes irregulares de média-alta amplitude. Distúrbio leve da atividade de base.*
4	C.J.C. 47 a, F	Atividade epileptiforme generalizada e focal na reg. parieto-temporal direita, distúrbio cerebral lento e difuso da atividade de base.
5	O.L.M. 41 a, M	Ondas lentas intermitentes polimórficas generalizadas e distúrbio lento e inespecífico da atividade de base.
6	A.P.O. 27 a, F  T.P.O. 23 a, F  N.P.O. 21 a, F	Distúrbio não epileptiforme em quadrantes posteriores com distúrbio leve a moderado da atividade de base.  Distúrbio leve da atividade de base.  Distúrbio não epileptiforme em reg. frontais e centro-temporais independentes e distúrbio leve da atividade de base.

\*Durante um dos traçados a paciente apresentou CTCG, na fotoestimulação.

Na figura 7, mostramos um traçado com lentificação da atividade de base e ondas agudas na região parassagital esquerda, conforme mostram as setas.



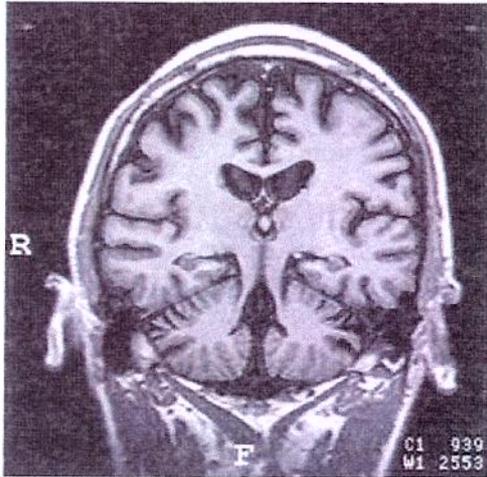
**Figura 7-** EEG realizado em aparelho com 14 canais, de um dos pacientes da família 1 (E. L. 31 anos). Esta montagem parassagital, apresenta ondas lentas teta-delta em regiões posteriores, lentificação difusa e ondas agudas na região parassagital

Em nenhum dos exames de RNM de crânio, encontrou-se alteração de sinal em substância branca ou cinzenta. Em 6 pacientes encontramos atrofia de cerebelo e em 4 pacientes, atrofia cortical. Foi possível constatar também exames dentro dos limites da normalidade. Entre nossos pacientes com 20 anos ou mais de evolução, foram encontradas alterações estruturais (Tabela 10).

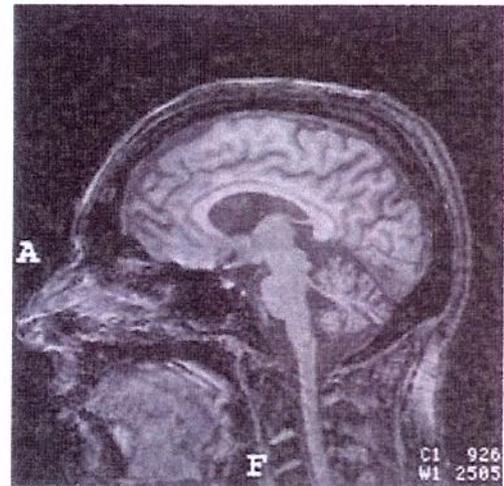
**Tabela 10-** Achados de RNM de crânio dos pacientes suspeitos de DUL.

<b>Famílias</b>	<b>Idade e sexo</b>	<b>Achados de neuroimagem</b>
1	E. L. 33 a, F L.A.L. 39 a, M	Atrofia córtico-subcortical difusa, alargamento discreto dos ventrículos laterais. Atrofia cerebelar incluindo vermix. Atrofia cortical e cerebelar discreta/moderada, proeminência do sistema ventricular .
2	C.A.Z. 42 a, F	Atrofia cerebelar, alargamento ex-vácuo do 4º ventrículo
3	T.T.L.G. 15 a, F	Sem anormalidades
4	C.J.C. 47 a, F	Atrofia cerebral e cerebelar, redução das pirâmides, insula e vermix. Alargamento ex-vácuo dos ventrículos laterais.
5	O.L.M. 41 a, M	Atrofia leve/moderada dos hemisférios cerebrais. Atrofia moderada/acentuada do cerebelo. Redução das dimensões do bulbo e pedúnculo cerebelares. Alargamento do sistema ventricular mais intensamente do 4º ventrículo.
6	A.P.O. 27 a, F T.P.O. 23 a, F N.P.O. 21 a, F	Alargamento generalizado e leve dos sulcos e cisternas cerebelares. Sem anormalidades Sem anormalidades

Os exames de neuroimagem de duas famílias serão mostrados para exemplificar os principais achados de RNM de crânio. Figuras 8 a e b, são respectivamente cortes coronal e sagital em T 1 dos pacientes da família 1 e 6.



**Figura 8A**



**Figura 8B**

**Figura 8-** (A) Paciente do sexo masculino, com mais de 20 anos de evolução da doença. Observar em corte coronal, atrofia cortical moderada com preservação da substância branca, e a atrofia cerebelar. (B) Paciente do sexo feminino, com história típica de DUL, RNM com atrofia cerebelar e de tronco cerebral.

#### 4.4.1.3- Exames Específicos (Nível diagnóstico III)

As biópsias de pele foram realizadas em um membro de cada família, totalizando 6 amostras. Os resultados foram sugestivos de DUL em três pacientes, sendo constatado presença de vacúolos em glândulas sudoríparas. Tais lâminas foram revisadas por Dr. Carpenter, que considerou-as compatíveis com seus achados.

Em um paciente, foi descrito presença de focos de lipofuscina e grânulos PAS positivos. Em duas outras não foram encontradas anormalidades. Estes resultados foram obtidos após estudos de MO e com PAS.

## Resultados da análise molecular

A análise molecular foi realizada em todos os 9 pacientes suspeitos de DUL. Este estudo foi composto de duas etapas: 1º pesquisa de mutação de ponto ou polimorfismos, em um dos três exons, pela técnica do SSCP ; 2º detecção da presença da expansão do dodecâmero.

A técnica de detecções de mutações ou polimorfismos (SSCP), que é capaz de detectar uma simples substituição de bases, do gene da *cistatina B*, foi escolhida uma vez que o gene responsável pela DUL, possui apenas 3 exons e cada fragmento contém cerca de 200 pares de base, o que é considerado perfeito para a utilização deste método.

O padrão de migração mostrou-se alterado em três pacientes, todos pertencentes a família 6. A alteração localizou-se no éxon 2 da *cistatina B*. Os demais pacientes suspeitos, não exibiram padrão de corrida alterado para nenhum dos três exons.

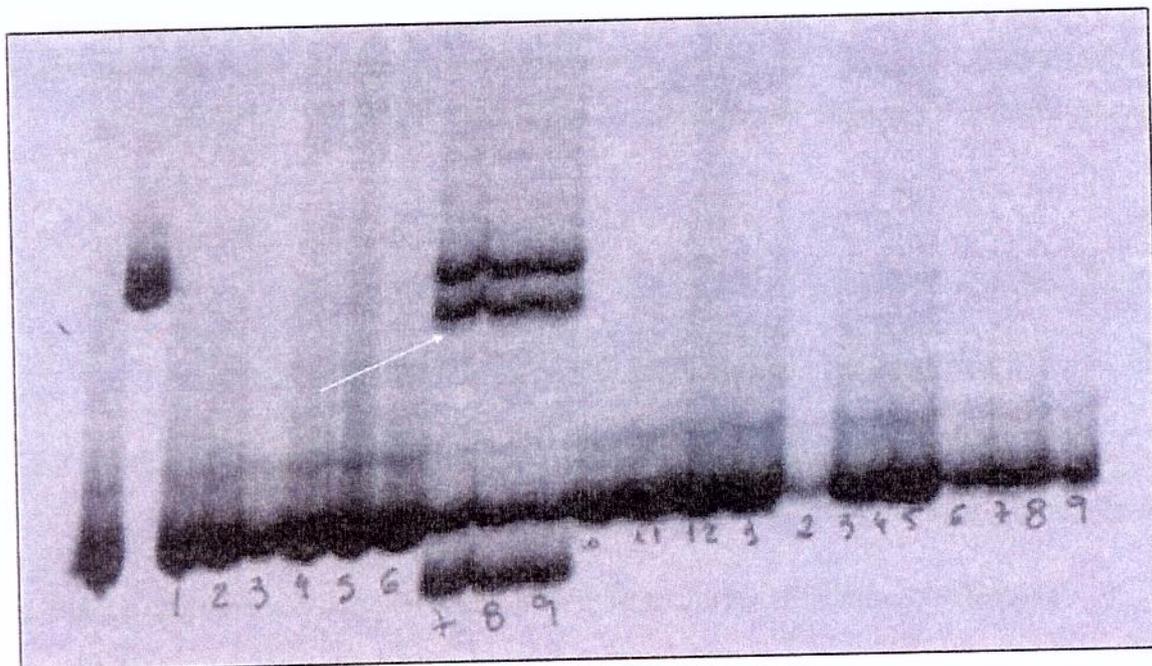


Figura 9- Padrão de corrida eletroforética alterado (família 6) com três indivíduos suspeitos de DUL. Este gel poliacrilamida deixa evidente a diferença entre os alterados e os normais.

A figura 9, mostra a autorradiografia de um gel, onde aplicamos o produto da PCR do éxon 2, de todos os suspeitos e alguns controles normais. O padrão de corrida eletroforético está nitidamente alterado em três pacientes, pertencentes a mesma família.

Através deste resultado podemos inferir que ocorreu troca de bases, não podendo no entanto, afirmar se é realmente uma mutação ou um polimorfismo. Para tal, foi necessário procedermos ao sequenciamento manual do éxon 2, para os pacientes com padrão de migração alterado. Vale a pena lembrar que o éxon 1 e 3 do gene da *Cistatina B* não foram seqüenciados, pois não se mostraram alterados ao SSCP.

A detecção da expansão do dodecâmero, foi realizada nos 9 pacientes suspeitos de DUL. Porém encontramos grandes dificuldades para a otimização desta técnica, pois tal expansão é uma região rica em GC, o que dificulta sua amplificação pelas técnicas convencionais de PCR. No entanto, conseguimos confirmar a presença da expansão do dodecâmero (pelo menos três vezes maior que o alelo normal) em 3 pacientes pertencentes a uma única família. Essas foram as mesmas pacientes que apresentaram a mutação de ponto no éxon 2, do gene *Cistatina B*, caracterizando portanto o estado de heterozigose composta, levando a perda de função de ambos os alelos.

#### **4.4.2- Doença de Lafora**

##### **4.4.2.1- Avaliação clínica e neurológica (Nível diagnóstico I)**

Na população em estudo 4 pacientes tiveram a suspeita clínica de DL e em nenhuma família havia descrição de consangüinidade entre os pais.

O início dos sintomas variou entre 9 a 14 anos, sendo que a evolução da doença ocorreu rapidamente. Os distúrbios de comportamento com acentuada agressividade, foi relatado em 2 pacientes (família 7 e 8). Estes antes de exibirem as primeiras CTCGs, começaram a apresentar dificuldades escolares, que não possuíam antesdo início da doença.

A fotosensibilidade foi marcante em 2 pacientes (família 9 e 10), que tinham suas crises desencadeadas por estímulo luminoso, ao ligarem aparelhos de televisão ou interruptores. Nestes o declínio cognitivo era evidente sem no entanto, possuírem agressividade. As mioclonias foram intensas e debilitantes em todos os pacientes assim como suas CTCGs foram de difícil controle. A tabela 11, descreve os principais achados deste nível diagnóstico.

**Tabela 11-** Achados clínicos, sintomas e sinais dos pacientes suspeitos de DL.

<b>Família</b>	<b>Idade início e sexo</b>	<b>Tipos de crise</b>	<b>Sinais e Sintomas Neurológicos</b>	<b>Evolução</b>	<b>Particularidades</b>
7	M.V.O.A 12 a, M	CTCG mioclonias	Ataxia apendicular, mioclonias faciais lib. piramidal global	8 a	Iniciou com dificuldade do aprendizado, evoluindo para intensa agressividade. *
8	P.R.C. 14 a, F	CTCG mioclonias	Ataxia global, fala escandida, mioclonias faciais, dist. psíquico	1 a	Crises incontroláveis, intensa agressividade rápida deterioração*
9	A.S.R. 9 a, M	CTCG mioclonias	Ataxia global, fala escandida, lib. piramidal	7 a	Crises desencadeadas por fotoestímulo
10	M.W.S. 12 a, F	CTCG mioclonias	Ataxia global, fala escandida, liberação piramidal e declínio cognitivo rápido	2-3 a	Crises desencadeadas por fotoestímulo, agressividade moderada, ataxia rapidamente incapacitante

\* Apresentaram durante o curso clínico episódios de estado de mal epiléptico.

#### 4.4.2.2- EEG e RNM de crânio (Nível diagnóstico II)

O EEG obtido em todos os 4 pacientes, confirmou a fotossensibilidade em 2 pacientes (família 9 e 10) com crise eletroclínica em um; atividade focal occipital em 2 pacientes, sem haver relatos de crises focais por parte dos familiares.

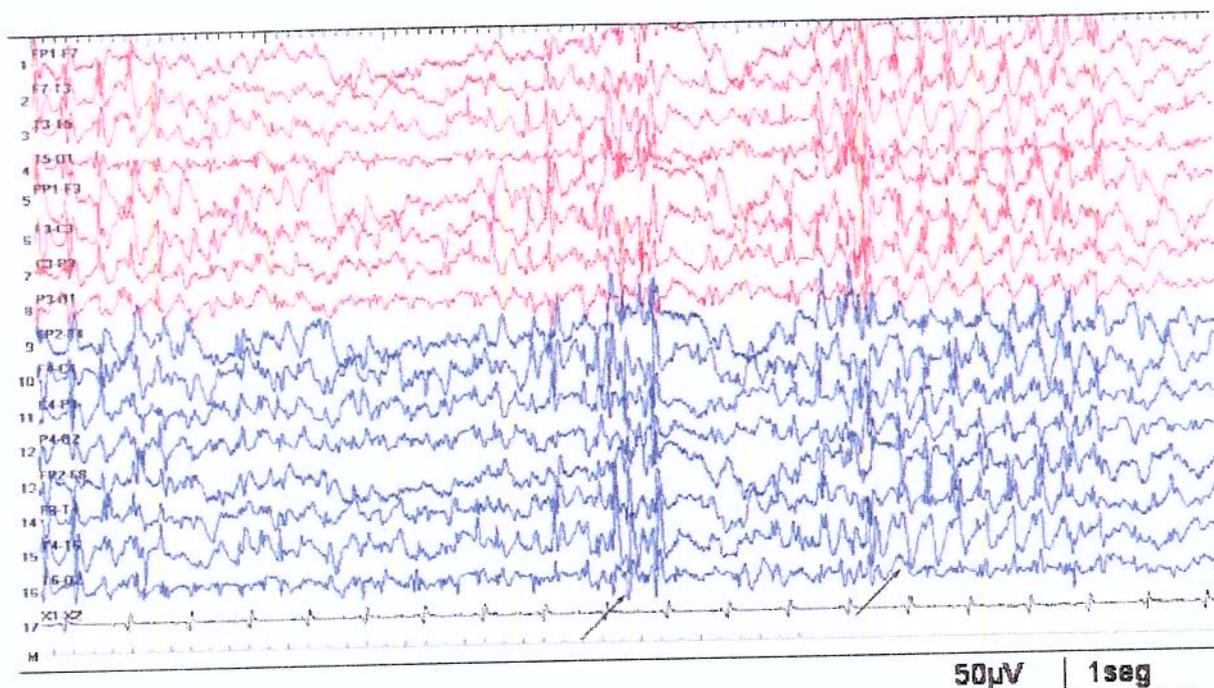
Todos os pacientes tiveram no EEG, distúrbio da atividade de base (moderado a severo) e intensa atividade epileptiforme generalizada, tabela 12.

**Tabela 12-** Achados mais recentes dos EEGs, dos pacientes suspeitos de DL.

Famílias	Idade e sexo	Padrão de alteração no EEG
7	M.V.O.A.* 18 a, M	Ondas agudas, espículas e poliespículas e independente em ambos hemisférios cerebrais. Distúrbio moderado/severo da atividade de base.
8	P.R.C.* 14 a, F	Espícula e poliespícula freqüente generalizadas, quase contínuas. Distúrbio severo da atividade de base.
9	A.S.R. 16 a, M	Atividade epileptiforme generalizada muito freqüente, crises eletroclínicas concomitante a fotoestimulação. Distúrbio moderado da atividade de base.
10	M.W.S. 14 a, F	Atividade teta- delta difusa, freqüentes paroxismos de atividade delta, rítmicas de alta amplitude (150-200 $\mu$ v) difusa com predomínio em regiões posteriores**

\* Diagnóstico confirmado

\*\* fotoestimulação nada acrescentou.



**Figura 10-** Traçado mostra intensa atividade epileptiforme, com espículas e poliespículas, onda-lenta generalizados. Atividade de base difícil de ser avaliada (família 8, com quadro típico de DL)

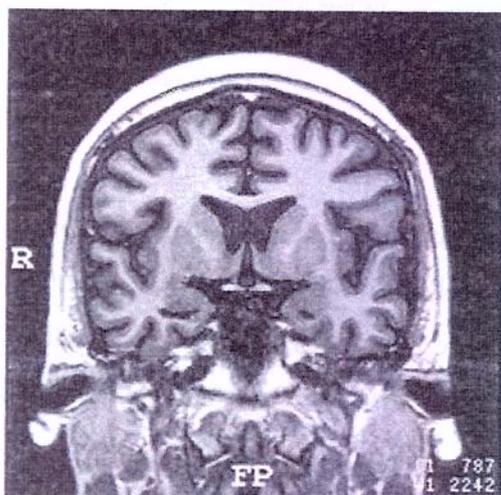
As RNM de crânio obtidas mostraram-se pouco alteradas, sendo que em um paciente, foi considerada normal. Discreta atrofia cerebelar, foi o achado mais relevante em três pacientes (família 8, 9, 10). Não houve descrição de alterações de sinal em substância branca e nenhuma lesão focal foi encontrada. A tabela 13, descreve os achados de RNM de crânio nos pacientes com suspeita de DL.

**Tabela 13-** Descrição dos achados de RNM de crânio dos casos suspeitos de DL.

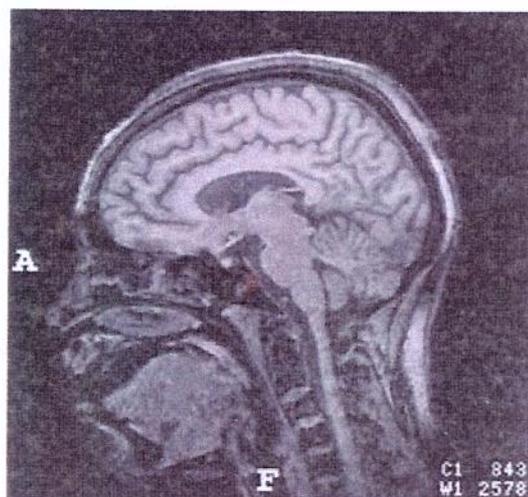
Famílias	Idade e sexo	Achados de neuroimagem
7	M.V.O.A.* 18 a, M	Sem anormalidades
8	P.R.C.* 14 a, F	Proeminência generalizada dos sulcos cerebrais, de predomínio anterior, com dilatação dos ventrículos. Cerebelo com discreta atrofia.
9	A.S.R. 16 a, M	Discreta proeminência dos sulcos cerebelares, restante sem anormalidades
10	M.W.S. 14 a, F	Alargamento dos sulcos cerebelares hemisféricos e vermianos. Redução das dimensões dos pedúnculos cerebelares médios. Alargamento das cisternas e do 4 <sup>o</sup> ventrículo.

\*diagnóstico confirmado.

Levando-se em conta os achados descritos, as figuras 11 A e B exemplificam os principais achados dos casos confirmados de DL.



**Figura 11A**



**Figura 11B**

**Figura 11-** A e B pertencem ao paciente da família. Corte coronal em T1, mostra atrofia cortical, dilatação dos ventrículos laterais e preservação de substância branca. Corte sagital, mostra atrofia cortical de predomínio anterior e atrofia cerebelar discreta.

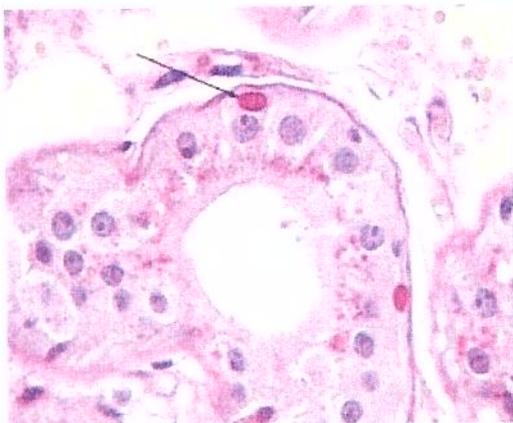
#### 4.4.2.3- Nível diagnóstico III (Resultados de exames específicos)

Para os pacientes com o diagnóstico clínico de DL, os exames específicos propostos foram: a biópsia de pele e análise molecular do gene *EPM2A*.

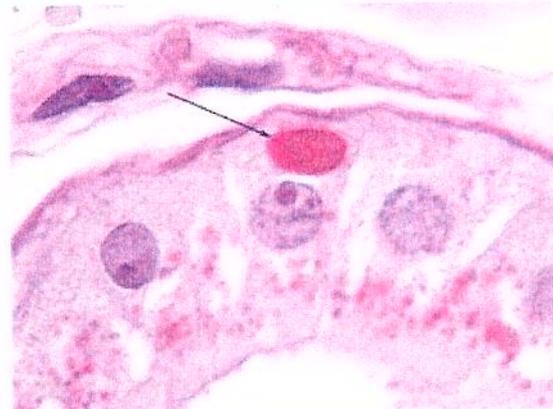
A biópsia de pele foi realizada nos 4 pacientes estudados, sendo que em um caso, obtivemos a amostra da região palmar. Este foi nosso primeiro caso, e apesar de ser uma região rica em glândulas écrinas, não foi escolhido como padrão para as subseqüentes biópsias, pois trata-se de uma região rica em queratina, dificultando não somente a cicatrização como o procedimento. As demais foram da região axilar.

Todas as amostras de pele foram enviadas para a MO e ME, porém o principal estudo foi óptico e com coloração PAS. O estudo com ME, pode ser realizado, caso restem dúvidas quanto aos achados de MO.

Dos quatro pacientes suspeitos de DL, dois apresentaram corpúsculos PAS positivos em glândulas sudoríparas écrinas (família 8 e 9). As figuras 12 A e B, mostram os corpúsculos de Lafora.



**Figura 12A**

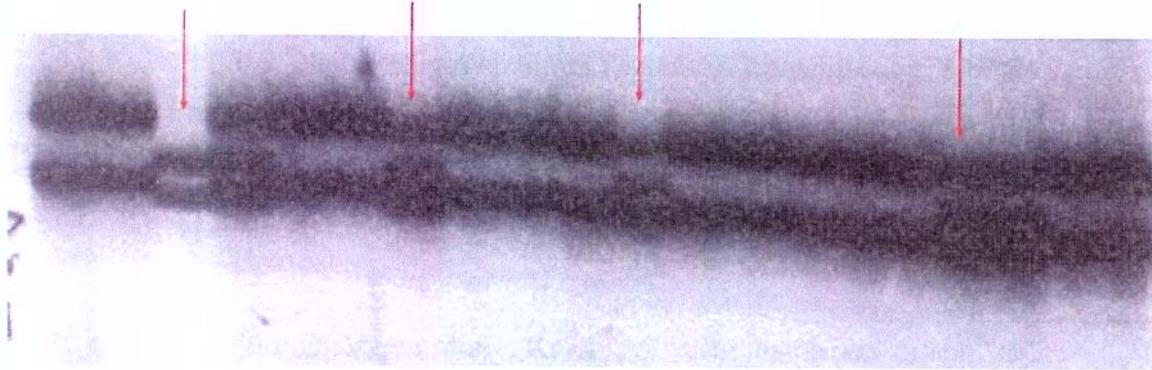


**Figura 12B**

**Figura 12-** A e B. Fotomicroscopia de biópsia de pele da região axilar, corada por PAS, destacando os corpúsculos de Lafora ( família 8). A e B são fotos em menor e maior aumento, de uma glândula sudorípara.

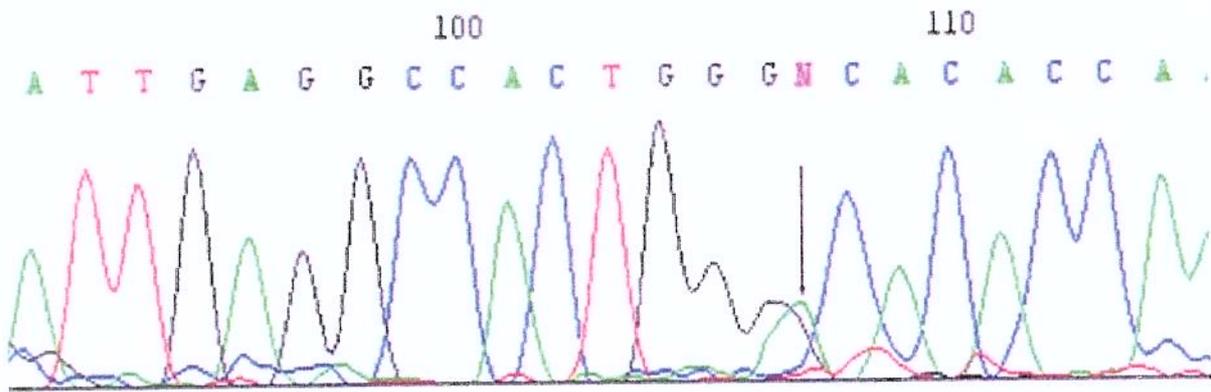
A análise molecular do gene *EPM2A*, foi realizada nos quatro pacientes com diagnóstico clínico de DL, utilizando a técnica de triagem de mutações, o SSCP, para os exons 2, 3 e 4.

O estudo do éxon 2, revelou padrão de migração alterado para os quatro pacientes estudados. A figura 13, mostra o padrão de mobilidade no gel, do produto da PCR para o éxon 2. As setas indicam os pacientes com diagnóstico clínico de DL.



**Figura 13-** Autorradiografia de gel de poliacrilamida. Este SSCP para o éxon 2 do gene *EPM2A*, confirma o padrão de corrida alterado nos pacientes suspeitos de DL.

Procedemos portanto ao sequenciamento automático das famílias 7, 8, 9 e 10 (neste caso foi possível utilizarmos o seqüenciador automático Megabace®). O sequenciamento no entanto, confirmou uma troca de A→G na posição 106, e esta não modifica a seqüência de aminoácidos na proteína, sendo portanto um polimorfismo. A figura 14 é um exemplo de sequenciamento automático e em destaque a troca que resultou em um polimorfismo.



**Figura 14-** Sequenciamento automático da fita anti-sense, do éxon 2 do gene *EPM2A*, da família 7 que possui padrão de corrida alterado no SSCP.

Os demais exons, 3 e 4 para o gene *EPM2A* não exibiram alteração no padrão de corrida no gel de SSCP, dispensando a etapa do sequenciamento. Conclusão: diagnosticamos 2 pacientes com DL através da biópsia de pele.

#### 4.4.3- Lipofuscinoses ceróides neuronais (LCN)

##### 4.4.3.1- Nível diagnóstico I (Avaliação clínica e neurológica)

Nosso trabalho incluiu 5 famílias não relacionadas, com diagnóstico clínico de LCN, num total de 6 pacientes.

A idade de início dos sintomas variaram de 1 ano aos 5 anos de idade. Os sinais neurológicos foram rapidamente aparecendo, sendo a baixa acuidade visual, um dos primeiros sintomas percebidos pelos familiares. Em seguida, quedas frequentes precipitadas tanto pela ataxia quanto pelas mioclonias. Quando foram avaliadas já possuíam quadro típico das EMP.

Clinicamente tivemos somente duas formas de LCN: LCN forma infantil (família 14) e LCN forma infantil tardia (família 11, 12, 13 e 15) (Tabela 14)

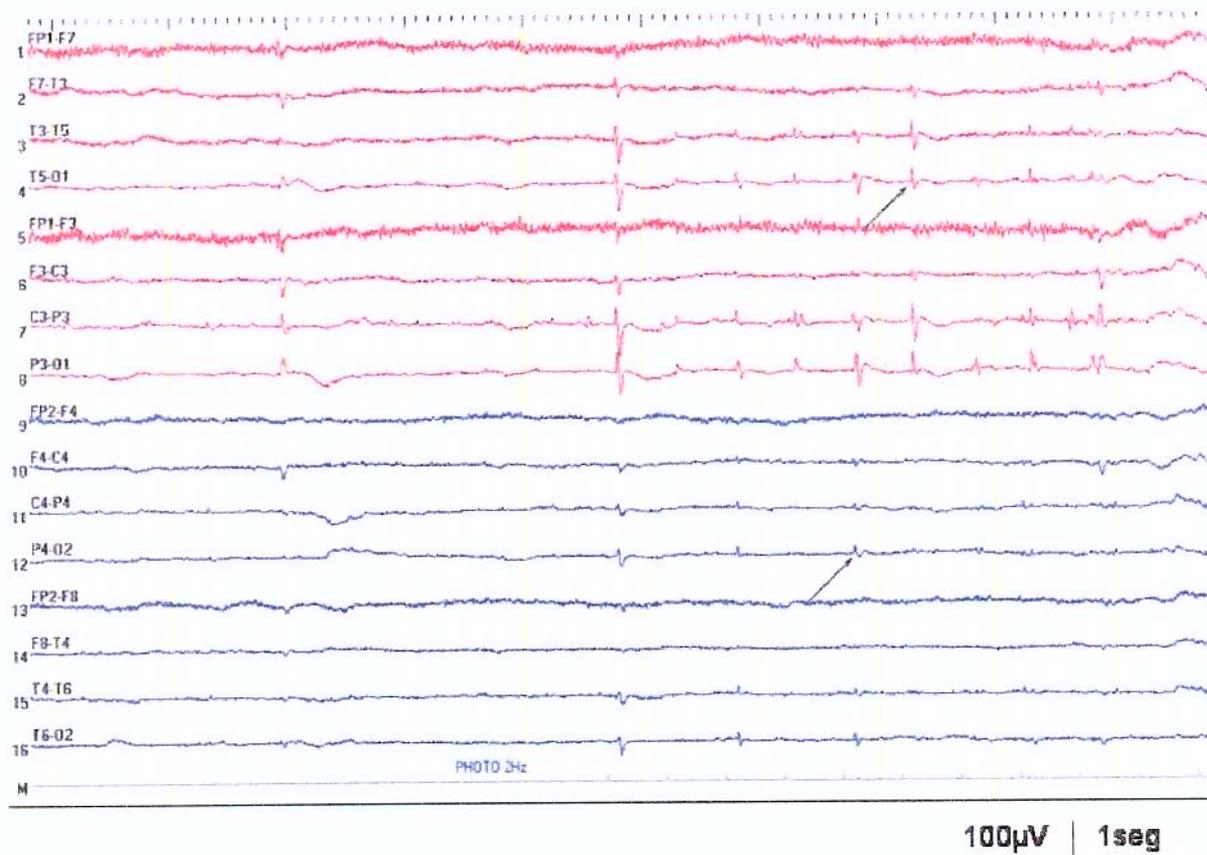
**Tabela 14-** Aspectos clínicos dos pacientes suspeitos de LCN

<b>Família</b>	<b>Idade de início e sexo</b>	<b>Tipos de crise</b>	<b>Achados Neurológicos</b>	<b>Evolução</b>	<b>Particularidades</b>
11	S.A.S. 4 a, F L.S. 4 a, M	CTCG atônicas CTCG mioclônias	Involução motora e perda visual, com ataxia de marcha (ambos irmãos)	9 a  4 a	Perda visual acentuada com Demência no mais velho Mioclônias pouco frequentes
12	A.P.R. 5 a, F	CTCG mioclônias	Baixa acuidade visual, alt. de marcha, lib. Piramidal global	7 a	Crise mioclônicas incontroláveis
13	J.G.R. 4 a, F	mioclônias	Ataxial global, fala escandida, involução	2 a	Nunca teve CTGG
14	R.P.S. 1 a, F	CTCG mioclônias	Involução do DNPM, ataxia, lib. piramidal	8 a	Microcefalia
15	V. C.P. 4 a, F	crises tônicas CTCG mioclônicas	Ataxia global, liberação piramidal, baixa acuidade visual	5 a	Inicialmente sd. de Rett atípico

#### 4.4.3.2- Nível diagnóstico II (EEG e RNM de crânio)

Todos os pacientes tiveram os EEGs com atividade de base alterada, variando desde lentificados a distúrbios severos. Atividade epileptiforme foi registrada em todos e em somente um caso a fotoestimulação de baixa frequência, revelou alterações consideradas típicas das LCNs.

A figura 15, mostra EEG deste paciente, com a LCN forma infantil tardia e tabela 15 descreve os achados dos EEGs.



**Figura 15-** O traçado de EEG após de 2 anos de evolução da doença. Fotoestimulação de baixa frequência com 1, 2 e 3 hertz exibiu atividade epileptiforme nas regiões posteriores, conforme mostra a seta ( LCN tipo 2 ).

**Tabela 15-** Achados dos EEGs dos pacientes suspeitos de LCN.

<b>Famílias</b>	<b>Idade e sexo</b>	<b>Padrão de alteração no EEG</b>
11	S.A .S. 13 a, F  L. S. 8 a, M	Espículas e poliespículas generalizadas, predominando nos quadrantes posteriores. Dist. leve a moderado da atividade de base  Lentificação difusa da atividade de base, ondas agudas generalizadas pouco freqüente.
12	A.P.R. 12 a, F	Ondas agudas e espículas muito freqüentes de baixa amplitude, máximas nas reg. occipitais. Severo distúrbio da atividade de base.
13	J.G.R. 6 a, F	Espícula onda lenta, irregulares de predomínio central bilateral. Distúrbio leve a moderado da atividade de base.
14	R.P.S. 9 a, F	Distúrbio epileptiforme muito freqüente nas reg. fronto-centrais. Distúrbio moderado da atividade de base.
15	V.C.P. 9 a, F	Espículas nas reg. temporo-parieto-occipitais, máximas occipitais, ora síncronas ora independentes. Durante a fotoestimulação, observaram-se descargas rítmicas epileptiformes concomitantes a fotoestimulação de baixa freqüência.

Os seis pacientes com o diagnóstico clínico de LCN realizaram RNM de crânio, que mostraram-se alteradas em todos os casos.

Atrofia cortical e cerebelar foi o achado mais freqüente e pode ser inferido quando se descreve alargamento dos sulcos e dilatação ventricular ex-vácuo. Alterações de substância branca, não foram descritas. Na tabela 16, colocamos as descrições dos achados de RNM de crânio de cada família afetada.

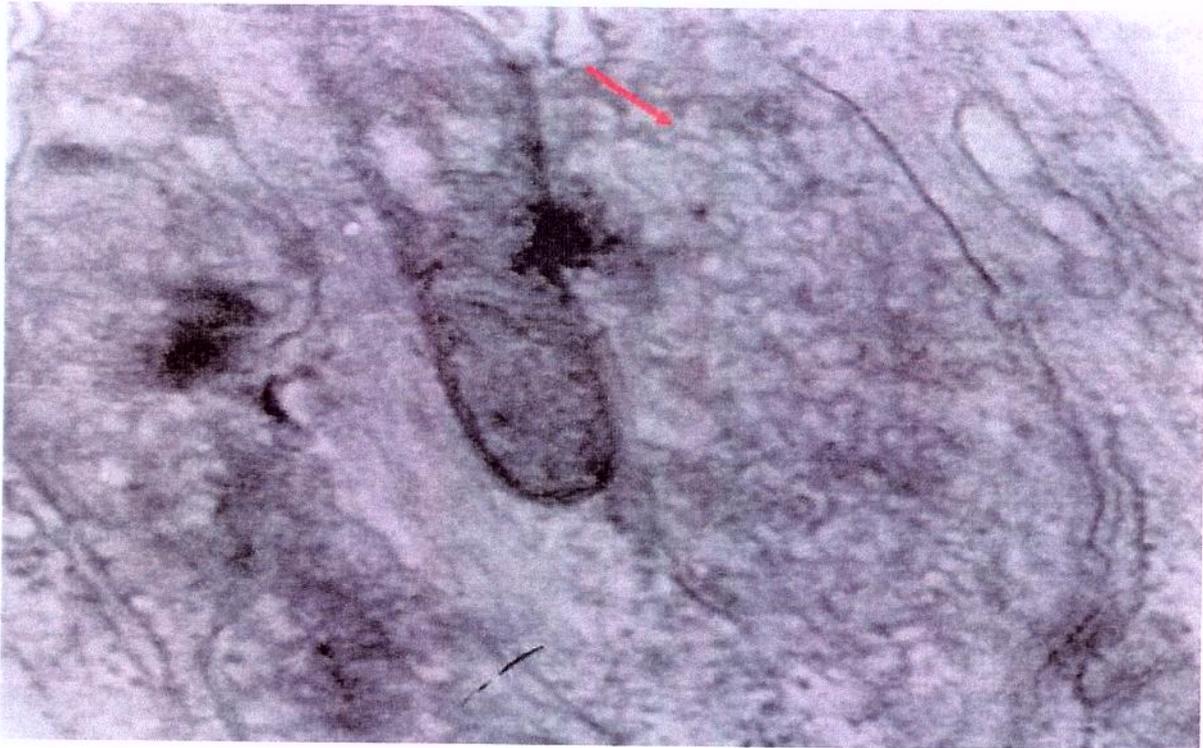
**Tabela 16-** Achados de neuroimagem nos pacientes com diagnóstico clínico de LCN.

<b>Famílias</b>	<b>Idade e sexo</b>	<b>Achados de neuroimagem</b>
11	S.A.S. 13 a, F  L. S. 8 a, M	Atrofia generalizada dos sulcos cerebrais e cerebelares leve/moderado. Redução dos braços da ponte. Alargamento dos ventrículos  Atrofia cerebral e cerebelares leve, discreto alargamento dos ventrículos.
12	A.P.R. 12 a, F	Intenso alargamento dos espaços subaracnóides supra e infratentoriais e do sistema ventricular ex-vácuo. Redução intensa do córtex e da substância branca . Atrofia moderada do tronco cerebral e corpo caloso.
13	J.G.R* 6 a, F	Alargamento difuso dos ventrículos , sulcos e cisternas da base, estando as estruturas da fossa posterior comprometidas. Hemisfério cerebral e cerebelo normais.
14	R.P.S. 9 a, F	Alargamento dos sulcos cerebrais fronto-temporo-parietais e das cisternas silvianas interhemisféricas. Tronco e cerebelo normais.
15	V.C.P* 9 a, F	Alargamento difuso e acentuado dos sulcos corticais cerebrais e cerebelares

\*Pacientes com o diagnóstico de LCN forma infantil tardia, confirmado.

#### 4.4.3.3- Nível diagnóstico III (Exames específicos)

A análise molecular não foi proposta para este estudo. Realizamos biópsias nas 5 famílias (um paciente por família), com o diagnóstico clínico de LCN. Conseguimos concluir o diagnóstico histopatológico em 2 pacientes /2 famílias (família 13 e 15), e ambas tiveram o diagnóstico da forma infantil tardia, devido a presença dos CV. A figura 16, mostra a biópsia de pele da paciente da família 13.



**Figura 16-** Microscopia eletrônica aumento de 40 X, procura demonstrar a presença de corpos curvilineares, patognomônicos de LCN forma infantil tardia.

#### **4.4.4- Encefalomiopatia Mitocondrial**

##### **4.4.4.1- Nível diagnóstico I (Avaliação clínica e neurológica)**

As encefalomiopatia mitocondriais estão representadas na presente pesquisa, por um paciente com diagnóstico de MELAS e outro de MERRF.

A suspeita diagnóstica foi dirigida em ambos os casos, primeiramente para doenças mitocondriais, tendo em vista a história clínica altamente sugestiva de cada paciente.

Estas duas famílias ilustram com uma grande riqueza de detalhes, os principais sinais e sintomas das doenças mitocondriais. Na tabela 17, as características clínicas destes dois pacientes.

**Tabela 17-** Descrição dos aspectos clínicos das encefalomiopatias mitocondriais

<b>Família</b>	<b>Idade início e sexo</b>	<b>Tipos de crise</b>	<b>Sinais e Sintomas Neurológicos</b>	<b>Evolução</b>	<b>Particularidades</b>
17	R.R.P. 6a, M	CTCG, Crises parciais complexas mioclonias	Involução do DNPM, amaurose pós-ictal, marcha atáxica, demência e lib. piramidal	9a	baixa estatura, microcefalia, hipoacusia. Aumento de CKe lactato sérico.
18	M.A.L. 34a, F	CTCG mioclonias	Ataxia global, fala escandida, demência mioclonias, CTCG lib. piramidal	7a	Lipomas gigantes, surdez neurossensorial, neuropatia periférica em MMII, aumento de CK e lactato sérico.

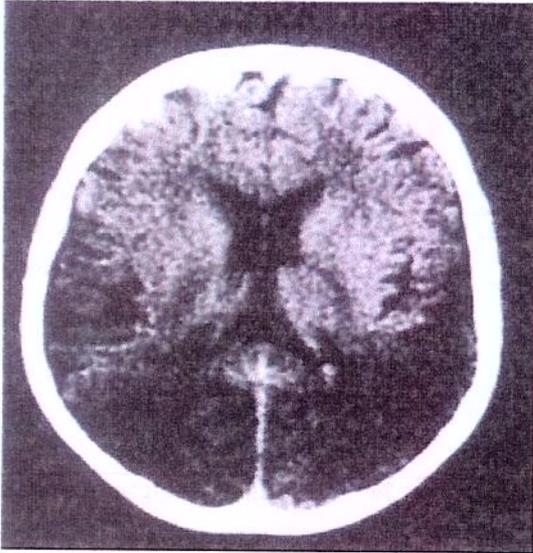
#### 4.4.2.2- Nível de diagnóstico II (EEG e RNM de crânio)

O EEG realizado em ambos os pacientes, mostrou-se alterado, com lentificação da atividade de base e atividade epileptiforme generalizada.

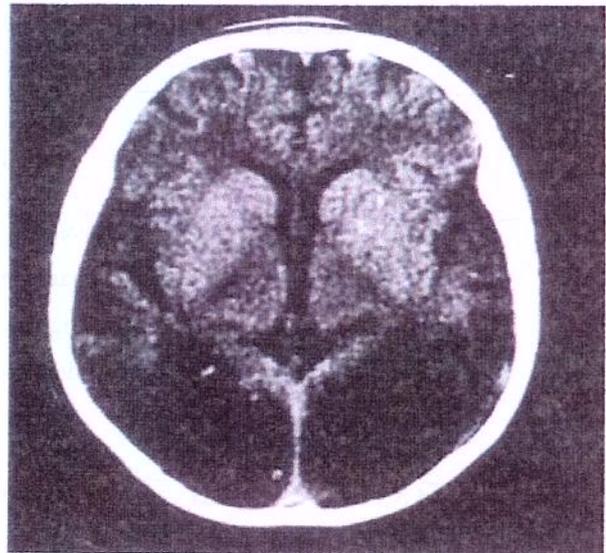
O paciente com MELAS apresentou EEG com distúrbio da atividade de base de leve a moderada intensidade, e atividade epileptiforme focal nos quadrantes posteriores, com atividade generalizada pouco freqüente.

A paciente com MERRF, no início de seu acompanhamento estava com subdose de drogas anti-epiléticas, e mostrava no EEG ondas agudas generalizadas correspondentes a mioclonias. Após ajuste da droga, houve mudança no traçado, ficando sem atividade epileptiforme generalizada, porém com lentificação difusa de todo o traçado.

O paciente com o diagnóstico de MELAS possui tomografia de crânio com alteração no território de fronteira nas regiões posteriores, além de atrofia cortical difusa.. Não foi possível realizar a RNM de crânio A figura 17, mostra tais alterações de neuroimagem que estão muito bem descritas nos casos de MELAS.



**Figura 17A**

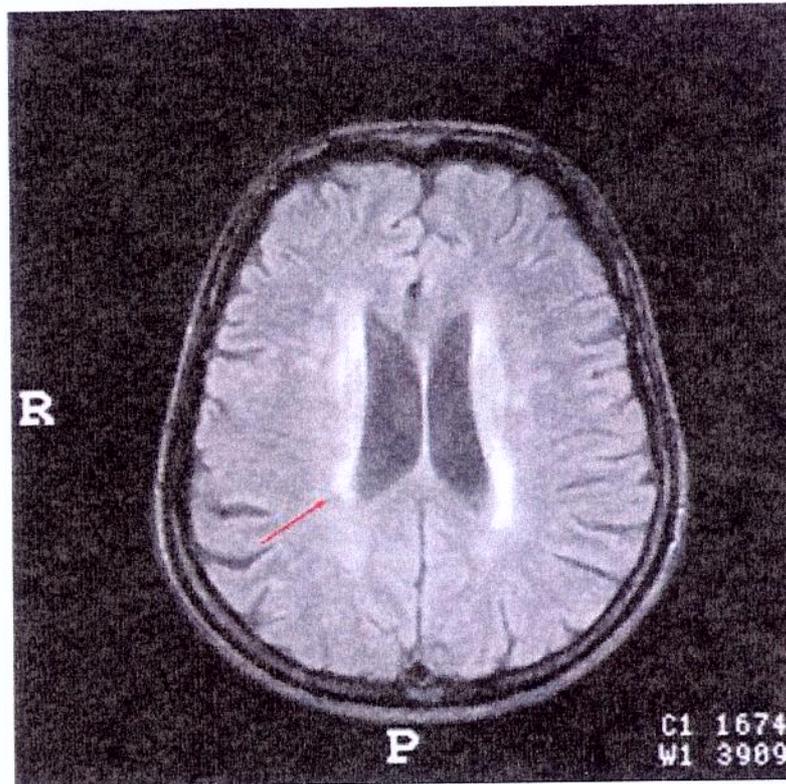


**Figura 17B**

**Figura 17-** A e B, mostram áreas hipodensas em regiões posteriores, sem distribuição compatível com territórios vasculares. Nota-se atrofia cortical.

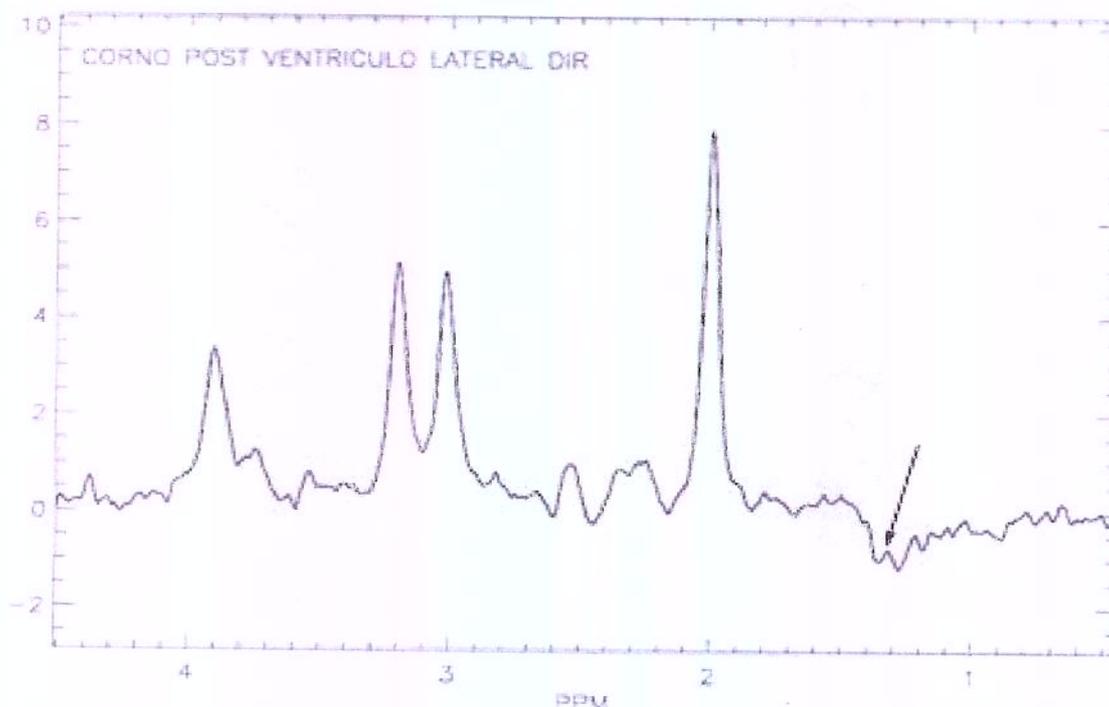
A paciente com diagnóstico de MERRF, possui RNM de crânio com alteração de sinal em substância branca periventricular, e alargamento dos ventrículos laterais (figura 18).

Devido imagem alterada em substância branca, optamos por realizar espectroscopia desta região, para verificarmos qual a possível natureza da lesão.



**Figura 18-** RNM de crânio da paciente com MERRF, em corte axial; observamos alargamento do sistema ventricular supratentorial, em T2, hipersinal de substância branca periventricular, dos centros semiovais, cápsula interna e externa.

Realizamos a espectroscopia com voxel único nas regiões com alteração de sinal em substância branca, e a mesma revelou presença da curva de lactato aumentado (Figura 19).

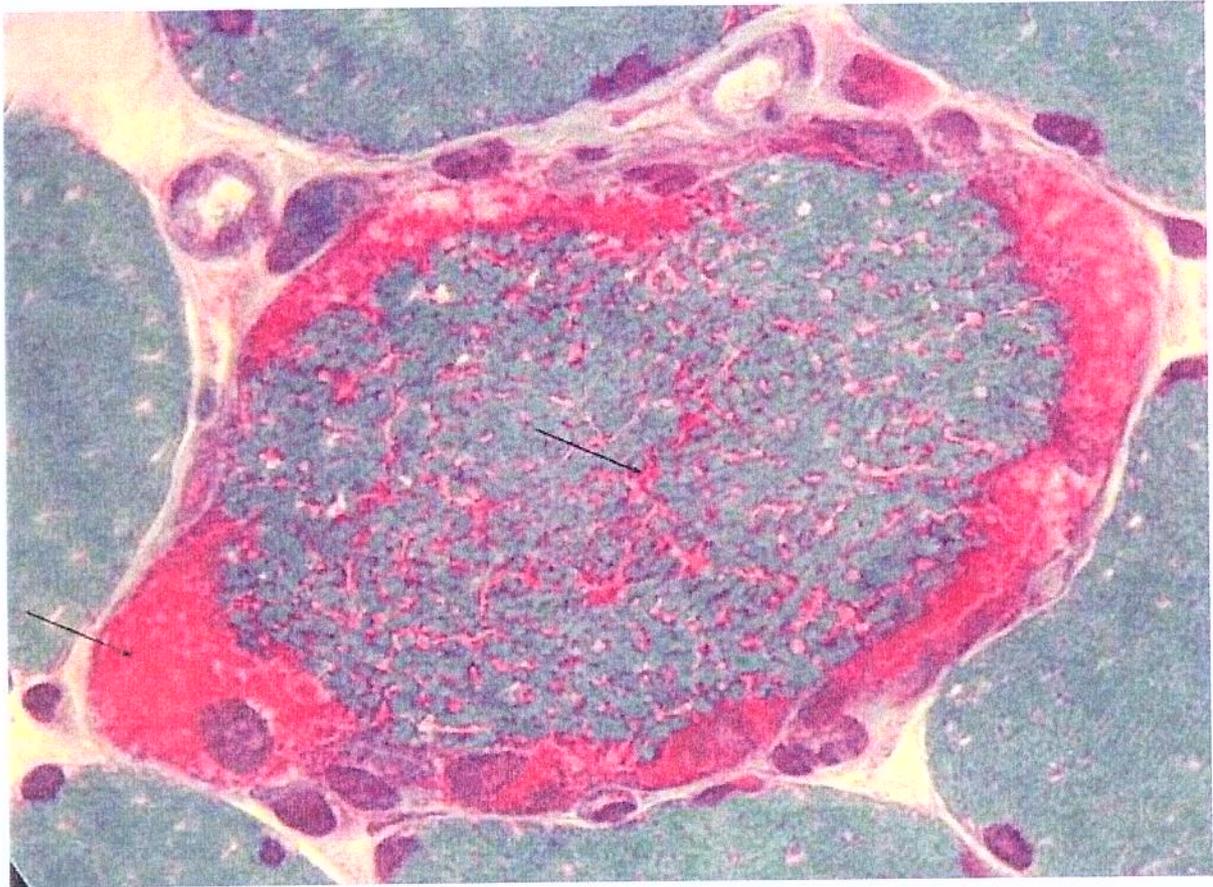


**Figura 19-** Imagem foi obtida do corno posterior do ventrículo lateral esquerdo, da RNM de crânio da paciente com MERRF, a seta aponta para a curva invertida, que representa o lactato.

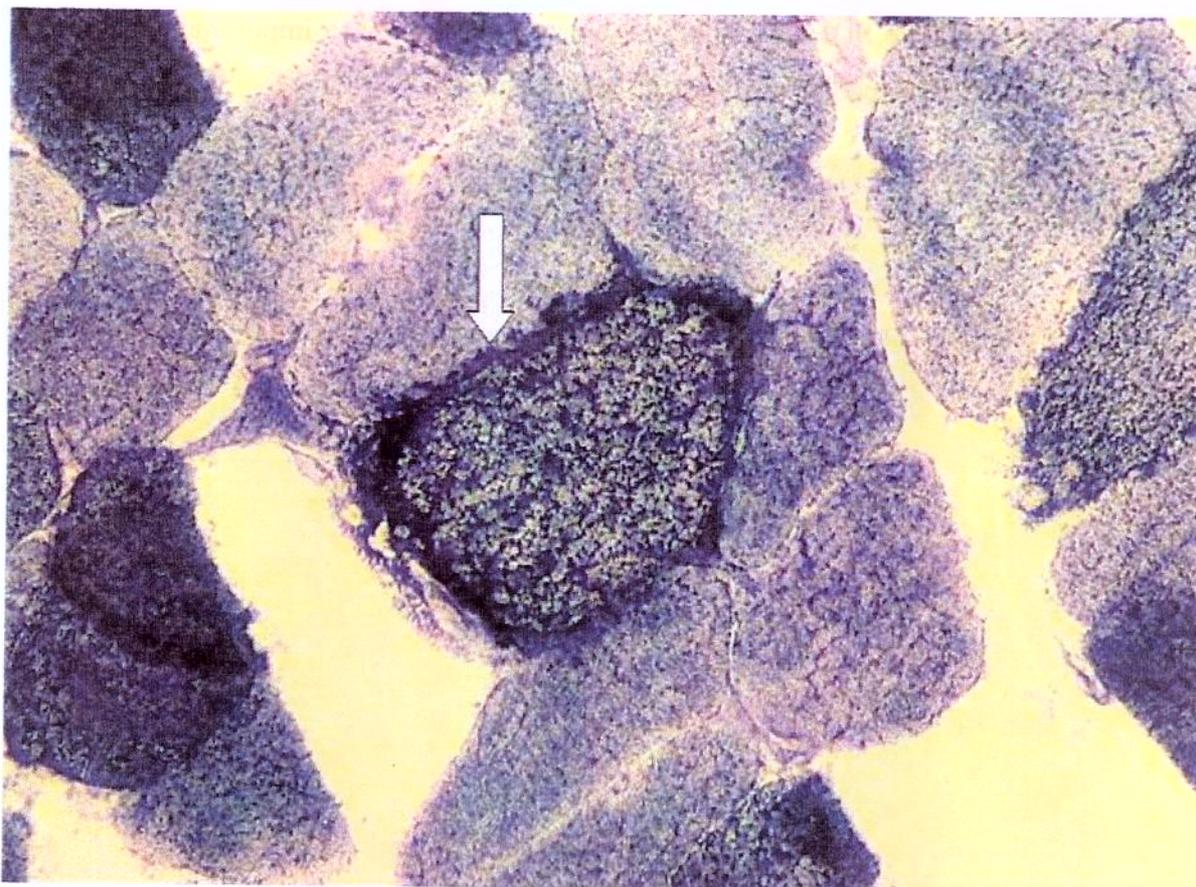
#### 4.4.4.3- Nível diagnóstico III (Exames específicos)

Nos casos de encefalomiopatia mitocondrial, os exames específicos foram biópsia de músculo e análise molecular. Nestes dois pacientes as biópsias foram obtidas do músculo braquial e realizadas pelo setor de Neuromuscular do HC-Unicamp. Ambas demonstraram proliferação anormal de mitocôndrias e possuem as fibras vermelhas rajadas (ragged red fibers). As figuras 20 e 21, mostram biópsias de músculo com colorações de

Tricrômio de Gomori e SDH (succinato de-hidrogenase), que são importantes métodos de coloração para confirmação de proliferação mitocondrial.



**Figura 20-** Biópsia de músculo com a coloração do Tricrômio de Gomori. A seta indica acúmulo de mitocôndrias anormais e as fibras vermelhas rajadas .

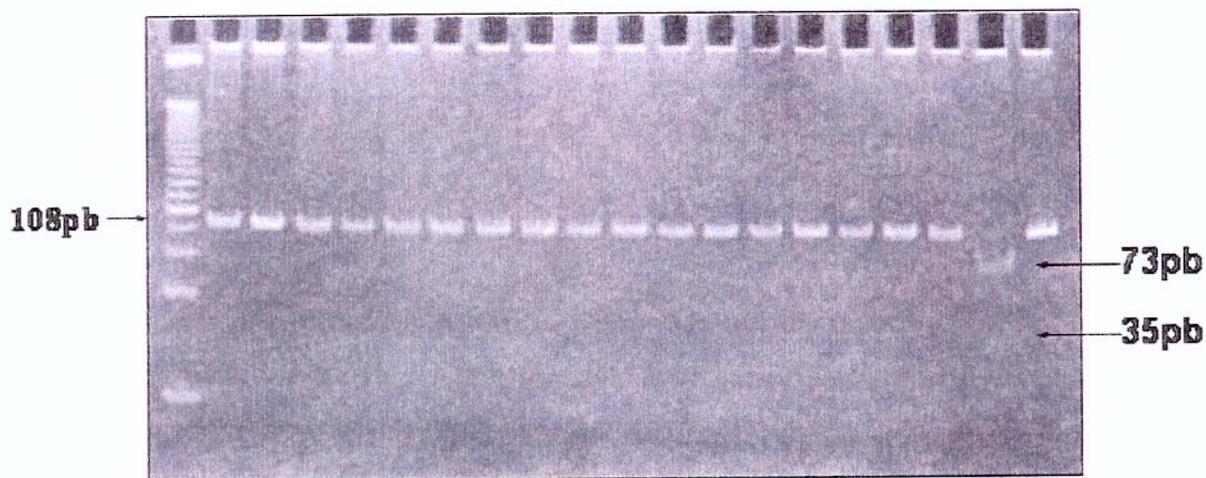


**Figura 21-** Esta fotomicroscopia destaca a reação SDH, onde vemos grande presença de mitocôndrias anormais (em escuro). A seta aponta para os locais ricos em mitocôndrias.

A análise molecular foi realizada para as principais mutações responsáveis por MELAS e MERRF. Realizou-se a técnica de digestão enzimática onde as mutações A3243G e A8344G, respectivamente para MELAS e MERRF, foram pesquisadas em ambos pacientes.

O estudo revelou que o paciente da família 17 possui mutação na posição A3243G do DNA mitocondrial (mtDNA). Sua mãe e irmãs são portadoras assintomáticas.

A paciente da família 18, possui a mutação de ponto na posição A8344G, do mtDNA. A figura 22 , mostra a foto de um gel de acrilamida 12% onde é possível verificar a presença das bandas alteradas.



**Figura 22-** Gel de poliacrilamida 12% com corrida eletroforética após digestão enzimática com enzima *Bgl* I. Apresenta três fragmentos: 108pb (normal), e dois outros fragmentos com tamanhos de 73pb e 35pb, gerados somente na presença no ponto de mutação A8344G no, mtDNA.

#### 4.4.5- Sialidoses

##### 4.4.5.1- Avaliação clínica e neurológica (Nível diagnóstico I)

Neste grupo houve suspeita clínica de sialidose, apenas para a família 19, composta por um paciente.

Trata-se de um paciente filho de pais consangüíneos, em uma família onde existem vários indivíduos cegos. Clinicamente, iniciou quadro de abalos mioclônicos frequentes que pioravam com o movimento, caracterizando-se como polimioclônus, iniciando aos 14 anos e segundo sua mãe ele nunca enxergou.

O exame neurológico revelou fâcies grosseira, com protrusão de mandíbula, escoliose, liberação piramidal global em membros superiores e retrações tendíneas em membros inferiores e comportamento aquém do esperado para a idade. O exame de fundo de olho, mostrou apenas atrofia de papila com pigmentação difusa, sendo formulada a hipótese de doença de depósito.

#### **4.4.5.2- Nível diagnóstico II (EEG e RNM de crânio)**

O EEG foi realizado em duas ocasiões, e comprovamos que suas mioclonias tinham origem epiléptica . O traçado em duas ocasiões demonstrou atividade de base lentificada. Em um dos exames ficou registrado a atividade epileptiforme focal e generalizada, sendo esta associada a mioclonias.

O exame de RNM de crânio, não foi realizado devido a constatação de polimioclônus em excesso e grave comprometimento neurológico.

#### **4.4.5.3- Nível diagnóstico III (Exames específicos)**

Como o diagnóstico inicial foi de uma possível doença de depósito, encaminhamos este paciente para o ambulatório de erros inatos do metabolismo. Diante dos sinais dismórficos e de sua história familiar, foi indicada cromatografia de oligossacarídeos e sialil-oligossacarídeos no sangue e urina, e dosagem de neuroaminidase sérica.

O diagnóstico de sialidose tipo I (forma juvenil), foi então confirmado por exames bioquímicos.

#### **4.4.6- Formas raras de EMP**

##### **4.4.6.1- Nível diagnóstico I (Avaliação clínica e neurológica)**

Durante o estudo sobre as EMPs, a família 20 composta inicialmente de apenas um paciente suspeito, teve sua investigação direcionada para as encefalomiopatias mitocondriais.

O paciente na época, com 6 anos de idade apresentava quadro de ptose palpebral bilateral, oftalmoparesia e ataxia axial. Durante o seguimento clínico, surgiram as mioclônias e o quadro involutivo ficou marcante assim como o déficit visual.

Após 8 meses de acompanhamento, notamos que sua mãe também começava a exibir marcha atáxica, que não trazia como queixa. Diante deste dado, nosso enfoque diagnóstico foi direcionado para as doenças autossômicas dominantes, e as ataxias autossômicas dominantes foram pesquisadas para esta família.

##### **4.4.6.2- Nível diagnóstico II (EEG e RNM de crânio)**

O EEG do paciente da família 20, foi realizado e mostrou-se alterado, confirmando inclusive que tratava-se de mioclônias, associadas a descargas epileptiformes generalizadas durante o exame. A atividade de base mostrou-se lentificada. A figura 23, mostra o traçado deste paciente.

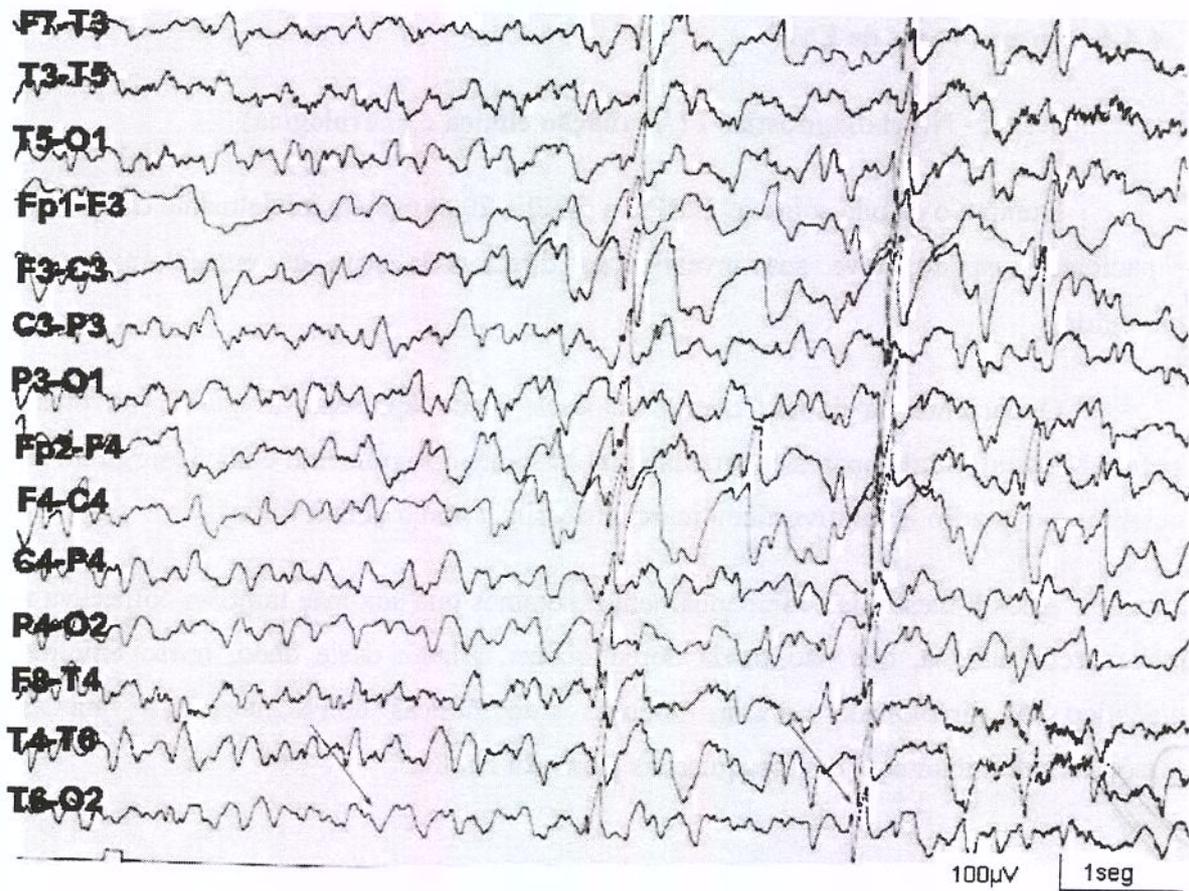
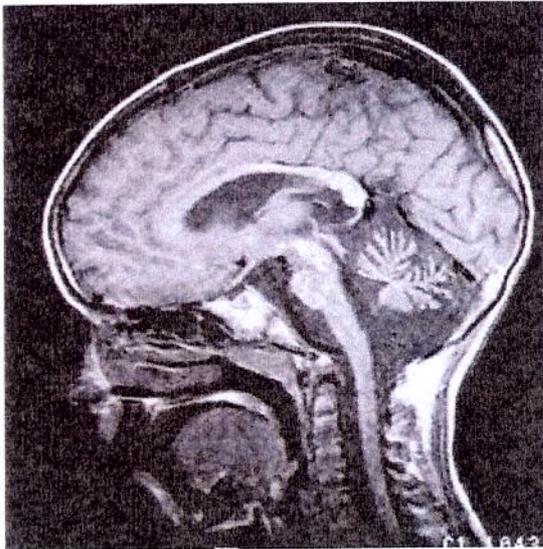
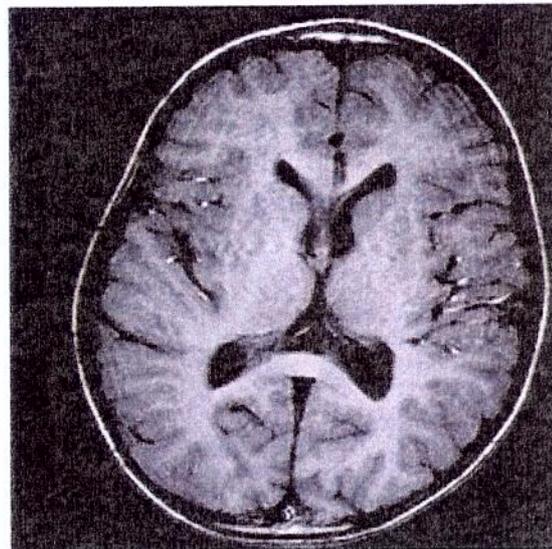


Figura 23- O traçado mostra lentificação da atividade de base, com descarga epileptiforme generalizada, sendo clinicamente associada com mioclonias. Este paciente exibiu mioclonias associadas ou não a alterações no EEG.

O exame de RNM de crânio mostrou atrofia acentuada das estruturas da fossa posterior em especial cerebelo e tronco cerebral. Não foram encontradas alterações em substância branca (Figura 24 A e B).



**Figura 24A**



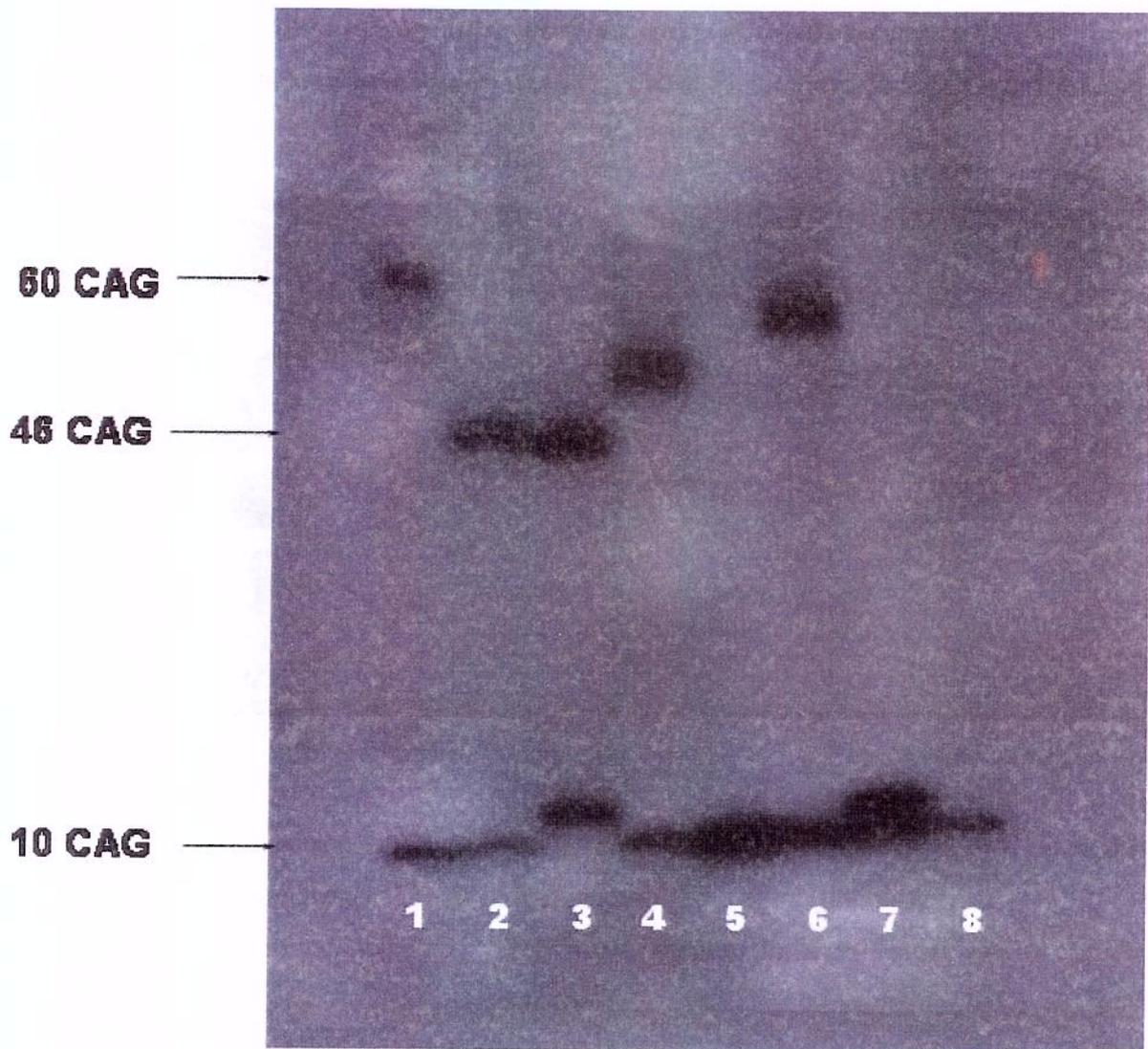
**Figura 24B**

**Figura 24-** RNM de crânio no paciente com SCA-7, atrofia cerebelar e de tronco cerebral. Cortes sagital e axial, obtidos em aquisição T1. Constatada atrofia cerebelar e de tronco cerebral; cerebelo atrófico. O corte axial, demonstra que as estruturas supratentorial estão bem preservadas.

#### 4.4.6.3- Nível diagnóstico III (Exames específicos)

O estudo molecular foi dirigido primeiramente para a ataxia espinocerebelar autossômica dominante tipo 7, devido alteração visual e pelo marcante padrão de antecipação.

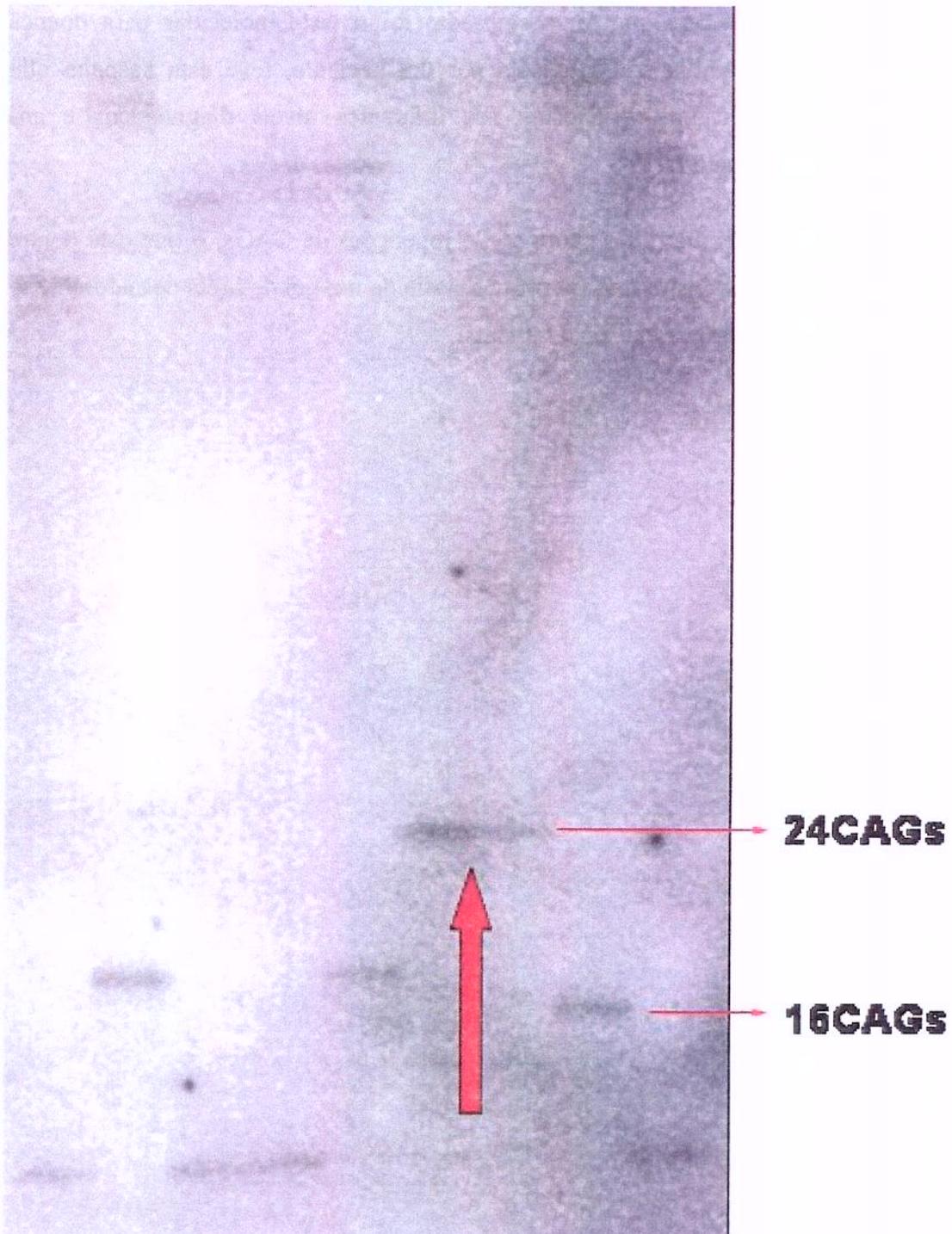
O resultado foi positivo para SCA-7, tanto para o paciente quanto para sua mãe. A figura 23, mostra uma autorradiografia, que confirma a presença das expansões de tripletos CAGs.



**Figura 25-** Autorradiografia de gel de uréia desnaturalante (SCA-7). Onde utilizamos uma sonda marcada radioativamente com P32. O paciente mostra alelos com 60 repetições (expandido) e 10 repetições (normal). Sua mãe exibe alelos com 46 repetições (expandido) e 10 repetições (normal). O paciente e sua mãe são respectivamente os indivíduos 1 e 2.

Outra forma rara que foi pesquisada, foi o teste molecular para doença de Huntington (HD). A família 22, composta por um paciente, teve esta suspeita clínica. Realizamos todos os exames propostos nos diferentes níveis diagnósticos e análise molecular foi negativa para DH.

O paciente exibiu alelos com 16/24 repetições de CAGs, o que está dentro do normal. A figura 26, demonstra uma autorradiografia de um gel de uréia desnaturante, onde temos amostras de pacientes afetados e normais.



**Figura 26-** Autorradiografia de um gel de uréia desnaturante. Onde observamos os diferentes tamanhos de alelos de diferentes pacientes. A seta em negrito aponta os alelos normais (16/24) do paciente da família 22, que está em duplicata. As demais setas sinalizam os alelos expandidos de outros indivíduos estudados.

Diante deste resultado, não conseguimos obter a causa específica desta EMP, para esta família 22.

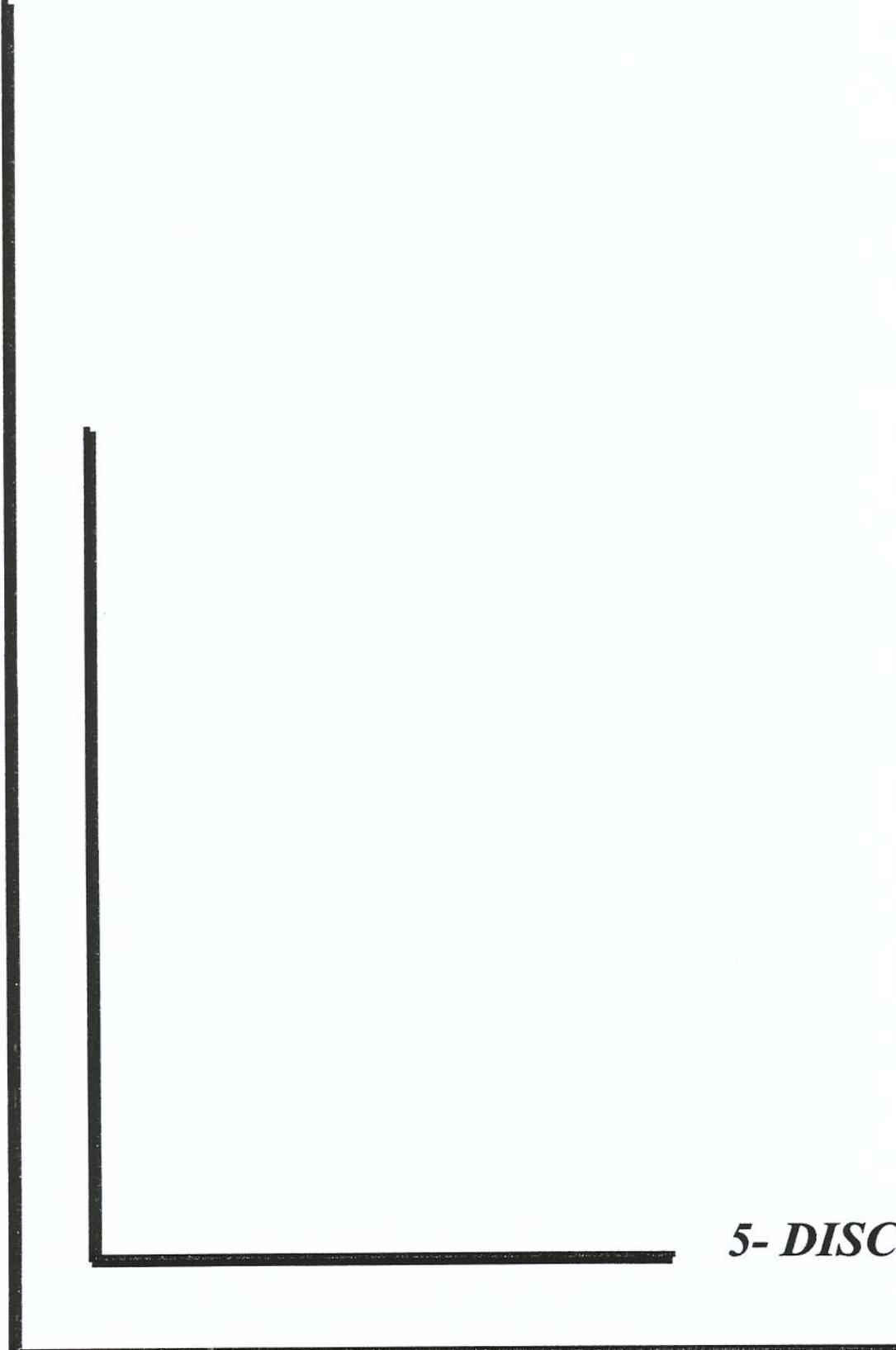
Assim como neste caso, não conseguimos obter resposta para a causa da EMP para a família 24, composta por uma paciente. O diagnóstico clínico inicial foi de encefalomiopatia mitocondrial, porém após termos realizado todos os níveis diagnósticos excluímos esta hipótese.

Colocamos na tabela 18, os resultados obtidos neste trabalho, de acordo com os diferentes diagnósticos, número de famílias e pacientes.

**Tabela 18-** Resultados conclusivos do estudo sobre as causas específicas das EMPs, de acordo com as diferentes etiologias, número de famílias/pacientes e confirmação diagnóstica.

<b>Etiologias</b>	<b>Famílias</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Diagnóstico</b>
Doença de Lafora	2	2	Biópsia de pele
Lipofuscinose ceróide neuronal	2	2	Biópsia de pele
Doença de Unverricht-Lundborg	1	3	Teste molecular
MERRF	1	1	Teste molecular
MELAS	1	1	Teste molecular
Sialidose	1	1	Bioquímico
Outras formas (SCA-7)	1	1	Teste molecular
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	-

Dos 25 pacientes/21 famílias que entraram para o estudo, conseguimos realizar o diagnóstico das causas específicas em 11 pacientes/9 famílias. Obtivemos resultado em 44% dos pacientes estudados o que corresponde a 43% das famílias.



***5- DISCUSSÃO***

Nosso estudo incluiu todos os pacientes com o diagnóstico clínico provável de EMP, atendidos nos ambulatórios de epilepsia adulto e infantil do HC-UNICAMP, do Departamento de Neurologia da FCM, no período de outubro de 2000 a agosto de 2002.

Neste espaço de tempo, participaram do trabalho 24 famílias não relacionadas, num total de 29 pacientes. Estabelecemos níveis de diagnóstico, como etapas a serem preenchidas para obtermos o diagnóstico das causas específicas. Diante desta estratégia, nossa amostra ao final do estudo foi de 25 pacientes/21 famílias.

A frequência estimada das EMPs no centro Saint-Paul (Marselha-França), é de menos de 1% de todos os casos de epilepsia. Eles chegaram a este dado após terem visto 2273 pacientes com epilepsia confirmada, entre o período de 1986-1995 e destes, 22 tiveram o diagnóstico de EMP. O mesmo centro descreve que num período de 42 anos diagnosticou 128 casos de EMP (ROGER et al. 2002). Todas estas informações nos levam a concluir que em média surgem 2 a 3 casos novos de EMP, por ano, naquela instituição.

A princípio poderemos pensar que nosso serviço deverá concentrar maior número de casos do que a literatura descreve, porém isto não corresponde a verdade, pois os pacientes que participaram deste estudo, não são apenas os casos novos, mas também fizeram parte aqueles já seguidos no serviço. O paciente com maior tempo de seguimento remonta de 1987.

As dificuldades encontradas em nosso trabalho, como falta de profissionais especializados em diagnosticar algumas das causas específicas de EMP (LCN), são descritas na literatura ((WISNIEWSKI et al. 2001). Poucos centros no mundo possuem locais especializados neste tipo de diagnóstico, o que leva a diferenças de incidências das EMPs. Os autores consideram que em países de terceiro mundo a frequência não está estabelecida, porque o diagnóstico não é feito precisamente (ROGER et al. 2002).

Este trabalho não possui dados suficientes para pensarmos em estabelecer a frequência das EMPs no Brasil, porém vem demonstrar que mesmos em países subdesenvolvidos é possível realizar o diagnóstico das diferentes causas específicas de EMP. Nossos dados, apesar de em pequeno número, mostram uma tendência de nosso

serviço abrigar todas as formas de EMP, sem no entanto apontar para alguma forma mais freqüente.

A suspeita diagnóstica de DUL estava presente em 9 famílias, porém obtivemos diagnóstico definitivo somente em uma família, num total de três pacientes (família 6). Consideramos diagnóstico definitivo, a confirmação molecular da doença, pois os achados de biópsia são inespecíficos. Para a DL dos 4 pacientes com suspeita clínica, confirmamos o diagnóstico em 2 pacientes, pertencentes a duas famílias não relacionadas (família 7 e 8). A suspeita de LCN foi levantada em 5 pacientes, pertencentes a 4 famílias não relacionadas. No entanto, o diagnóstico definitivo foi confirmado somente em 2 pacientes, pertencentes a 2 famílias não relacionadas (família 13 e 15). As encefalomiopatias mitocondriais foram levantadas como hipótese diagnóstica em 4 pacientes/4 famílias e confirmadas em 2 pacientes/2 famílias. As demais causas de EMP, como doença de depósito e uma forma rara de ataxia espinocerebelar (SCA-7), foram confirmadas em 1 paciente cada.

Portanto, o diagnóstico definitivo das causas específicas de EMP foi obtido em 11 pacientes/ 9 famílias. Isto significa que 44% dos pacientes (43 % das famílias) tiveram o diagnóstico confirmado de EMP. A mais freqüente foi DUL, num total de 3 pacientes (12% do total), em seguida temos: DL (2 pacientes), LCN (2 pacientes) e as encefalomiopatias mitocondriais (2 pacientes), cada uma correspondendo a 5% dos pacientes. Discutiremos a seguir os diagnósticos específicos confirmados neste trabalho.

## 5.1- DUL

No estudo das famílias com o diagnóstico clínico de DUL, o fato de termos conseguido realizar o diagnóstico molecular em somente uma família, chama a atenção e podemos encontrar explicações para tal fato, nas dificuldades técnicas encontradas.

Na maioria dos pacientes com DUL, nenhuma mutação é encontrada nas regiões codificadoras do gene *Cistatina B* (PENNACHIO et al., 1996; LALIOTI et al., 1997). Para se ter uma idéia, no estudo feito por LALIOTI et al de 1997, foram

encontradas 4 mutações e 3 polimorfismos, em 7 pacientes dos 29 estudados. Neste estudo, novamente se reforçou a hipótese de que deveria haver outro elemento regulador, fora destas regiões estudadas que fosse responsável pela atividade alterada da *cistatina B*. Em nossa proposta de análise molecular, utilizamos a mesma estratégia descrita neste trabalho, utilizando o SSCP e posteriormente o sequenciamento dos pacientes que exibissem padrão de migração alterado.

Tendo em vista que, já sabíamos que apenas uma minoria dos pacientes com DUL, possuiriam mutações de ponto, não nos surpreendeu o fato de termos encontrado somente uma família com alteração no SSCP. Este resultado é esperado no estudo desta doença, não estando nossa amostra, neste ponto diferente do descrito na literatura.

Porém, quando pesquisamos a alteração mais freqüente, que é a presença de uma grande expansão de um dodecâmero, localizado na região onde se inicia a transcrição do gene da *cistatina B*, (LAFRENIERE, et al., 1997; LALIOTI et al., 1998) encontramos muitas dificuldades. Vários trabalhos salientam a dificuldade desta etapa diagnóstica (LALIOTI et al., 1997b, 1997c; LALIOTI et al 1998) devido ao fato do dodecâmero ser composto somente de seqüência de GC. Sabemos que, qualquer região rica em GC é resistente a amplificação pela PCR, sendo necessárias várias adaptações da técnica, para a amplificação desta área de interesse. Para determinarmos o tamanho das expansões, foi necessário um protocolo de amplificação da PCR e subseqüentemente realizarmos a hibridização com uma sonda que contenha a repetição. Como o tamanho da expansão não está relacionada com a idade de início da doença (LALIOTI et al., 1998), não nos preocupamos em determinar o tamanho exato da expansão.

Realizamos a análise como descrito em LALIOTI et al. 1998, porém não conseguimos obter a mesma reprodutibilidade do estudo em questão. A técnica foi realizada várias vezes, com mudanças que consideramos pertinentes. Somente conseguimos amplificação em gel de agarose, dos pacientes com a hipótese clínica de DUL, que foram comparados com marcadores de peso molecular previamente conhecidos. Neste experimento foi possível verificar que uma paciente apresentava uma banda, correspondente a um de seus alelos, com aproximadamente 800 Kb. Tal resultado sugere

que ela possui um de seus alelos com uma expansão da região do dodecâmero, pelo menos três vezes maior que o alelo normal.

Clinicamente todos os pacientes com suspeita diagnóstica de DUL, iniciaram o quadro neurológico entre 6 a 13 anos de idade. Todos possuíam quadro epiléptico, em sua totalidade caracterizado por CTCG e mioclônias incapacitantes. Notadamente o declínio cognitivo foi lento em todas as famílias. Os dados da história clínica e neurológica, foram todos concordantes com a literatura (BERKOVIC et al., 1986; LEHESJOKI et al., 1998; SERRATOSA, et al., 1999).

O estudo eletrofisiológico foi realizado através do EEG, e mostrou-se com resultados inespecíficos. A fotosensibilidade esteve presente em 50% de nossas famílias estudadas (famílias 1, 3 e 6). Comparando com os dados apresentados na literatura, que descrevem 90% dos pacientes como sensíveis a fotoestimulação (TASSINARI et al., 1974; MAUGUIERE et al., 1981; TASSINARI et al., 1989) nossa amostra é diferente. Porém não consideramos este dado relevante para o diagnóstico da doença, pois os estudos descritos a respeito da eletrofisiologia, datam de uma época anterior ao diagnóstico molecular da DUL, onde detalhes do EEG poderiam auxiliar no diagnóstico (TASSINARI et al. 1974; MAUGUIERE et al. 1981; TASSINARI et al. 1989). Consideramos portanto, que os dados eletrofisiológicos são importantes para o seguimento e tratamento da epilepsia, mas não contribuídos para o diagnóstico da DUL.

A RNM de crânio obtida em todos os pacientes, evidenciou em sua maioria, atrofia cortical e cerebelar, em graus variados assim como exames normais. Podemos no entanto, discutir nossos achados, tendo em vista a única família com diagnóstico confirmado. Nesta, que possui três pessoas acometidas, os exames de RNM de crânio, mostraram-se sem anormalidades em dois pacientes e somente um exame apresentou atrofia cerebelar discreta. Este exame alterado foi da paciente com maior tempo de evolução da doença.

Podemos a princípio, pensar que aqueles indivíduos com maior tempo de doença deveriam exibir maiores alterações de neuroimagem. Porém, segundo estudos com RNM de crânio e espectroscopia (MASCALCHI et al., 2002), não há correlação entre a

duração da doença ou severidade da mesma. Dentro desta família por nós estudada, estes dados se confirmam pois nossas pacientes possuem pelo menos 14 anos de evolução, e clinicamente possuem diferentes graus de acometimento. A paciente que apresenta atrofia leve a moderada de cerebelo, usou por muito tempo fenitoína, fato este sempre muito enfatizado, como um dos possíveis responsáveis pelos achados neuropatológicos (ELDRIGE et al., 1983). É importante ressaltar, que essas descrições neuropatológicas foram realizadas antes da descoberta do defeito genético responsável pela DUL (ELDRIGE et al., 1983; HABIB et al., 1985; KOSKINIEMI, ML. 1986).

Estudos de RNM de crânio, em pacientes diagnosticados por testes moleculares são reduzidos, sendo o estudo de MASCALCHI et al , 2002, o único encontrado na literatura a respeito da DUL. Fato este que ressalta a importância de nosso trabalho que apesar de uma amostra reduzida, mostrou que nossos pacientes com o diagnóstico molecular possuem as mesmas características clínicas e de imagem, como os demais casos descritos na literatura. Além disso, é importante lembrar que dados sobre a DUL na América do Sul são inexistentes. A literatura coloca que nas Américas, a DUL deve ser também a mais freqüente sem no entanto existirem dados epidemiológicos a este respeito (ROGER et al., 2002).

A realização ou não da biópsia de pele de região axilar, é outro ponto importante para a discussão. Por um longo período, este foi o único exame complementar, capaz de ajudar no diagnóstico de DUL. A biópsia de pele demonstrava vacúolos em glândulas écrinas e ausência de corpúsculos de Lafora (COCHIUS *et al.*, 1994), o que associado às características clínicas e de EEG, faziam o diagnóstico de DUL. Tal fato, foi nossa justificativa para a realização de biópsia de pele em todos os pacientes suspeitos. Encontramos as alterações descritas como sugestivas de DUL, em três famílias e destas, uma apresentou confirmação através de testes moleculares. Porém até mesmo Dr. S. Carpenter, um dos autores deste artigo de 1994, considera que não podemos afirmar que exista esta clara correlação entre os achados de biópsia e as alterações moleculares (comunicado pessoal). A confirmação da doença reside no teste molecular, uma vez que o achado patológico é inespecífico e pode ser encontrado em outros pacientes com outras formas de epilepsia e uso crônico de drogas anti-epilépticas (COCHIUS *et al.*, 1994).

## 5.2- DOENÇA DE LAFORA

Realizamos o diagnóstico de DL em 2 famílias não relacionadas (50% dos casos suspeitos). As características clínicas e neurológicas foram muito sugestivas da doença, sendo os dados semelhantes aos da literatura (TASSINARI et al. , 1978; SERRATOSA et al., 1999; MINASSIAN, 2002).

As características das crises epiléticas dos dois pacientes que fizeram parte de nosso trabalho, não foram possíveis de serem detalhadas pois estes possuíam importante alteração de comportamento. Portanto, não podemos afirmar se eles possuíam ou não as crises parciais occipitais, descritas como presentes em 50 % dos pacientes nos estágios iniciais da doença (ROGER *et al.*, 1983).

A RNM de crânio, em ambos os pacientes, mostrou intensa atrofia do córtex cerebral em contraposição ao córtex cerebelar e por conseguinte à atrofia cerebelar. Estes dados isoladamente pouco contribuem para o diagnóstico de específico de DL. Não encontramos dados de literatura para podermos compará-los e possuímos poucos pacientes diagnosticados, para levantarmos hipóteses ou conclusões, a respeito destes achados. Talvez um dos motivos para a ausência de artigos sobre neuroimagem e DL, sejam as inúmeras descrições de achados de autópsia de sistema nervoso central (CARPENTER S, et al., 1974; MINASSIAN, B. A . 2002).

A realização da biópsia de pele como um dos métodos para o diagnóstico de DL, teve grande importância não somente para a confirmação diagnóstica, assim como para estabelecer em nosso serviço, parâmetros para a identificação dos corpúsculos de Lafora, em amostras de pele.

Apesar dos trabalhos já publicados, destacarem e defenderem a biópsia de pele como método para obtenção do diagnóstico (CARPENTER et al., 1981; BUSARD et al., 1986; BUSARD et al., 1987; KARIMIPOUR et al., 1999) estes dois pacientes, são os primeiros casos diagnosticados dessa maneira, em nosso serviço de Anatomia Patológica (comunicado pessoal).

A análise das biópsias de pele realizadas em nossos pacientes, revelou a presença de numerosas inclusões PAS-positivas, nas células dos ductos das glândulas écrinas, conforme proposto por Carpenter, em 1981. Tais inclusões são patognômicas e não necessitam obrigatoriamente de confirmação através de microscopia eletrônica (CARPENTER et al., 1981).

O estudo molecular dos quatro pacientes suspeitos de DL, foi realizado pesquisando-se as mutações mais comuns, segundo MINASSIAN e colaboradores, descritas como presentes nos exons 2, 3 e 4 do gene *EPM2A* (MINISSAIAN et al., 2000).

A análise molecular através do SSCP, mostrou nos quatro pacientes, alteração no padrão de migração, sugerindo uma possível mutação. O sequenciamento automático, identificou uma troca de bases na posição 106 A→G, do exón 2 do gene *EPM2A*. Esta alteração corresponde a um polimorfismo do gene. O estudo através de triagem de mutações para os demais éxons, não mostrou alterações, portanto não encontramos em nossa amostra nenhuma mutação, nem mesmo nos casos confirmados por biópsia. Ao propormos o estudo molecular para a DL, sabíamos da possibilidade de não encontrarmos mutação nos pacientes estudados, devido a alguns fatores:

1º) Apenas três mutações foram encontradas presentes em mais do que duas famílias (MINASSIAN 2002). Portanto, a grande heterogeneidade alélica e não-alélica, torna difícil a realização do diagnóstico molecular (MINASSIAN et al 2000; SERRATOSA et al; 1999), fazendo com que o exame histopatológico, seja padrão ouro para o diagnóstico para a confirmação.

2º) Apesar de clinicamente existir uma homogeneidade do fenótipo, cerca de 20% das famílias, não apresentam ligação do gene *EPM2A* na região crítica 6q23-q25 (SERRATOSA et al., 1995; GOMEZ-GARRE et al., 1998). Havendo portanto, pelo menos mais um outro gene implicado na DL (SERRATOSA et al 1999). Mutações em um segundo gene devem estar presentes, especialmente em famílias franco-canadenses, que possuem DL e não fazem ligação no locus *EPM2A* do cromossomo 6q23-25.

3º) Não realizamos o estudo do éxon 1, o qual contém o menor número de mutações descritas (SERRATOSA et al 1999).

### 5.3- LIPOFUSCINOSES CERÓIDES NEURONAIS

Nossos resultados a respeito da investigação dos casos suspeitos de LCN, finalizaram com o diagnóstico definitivo de duas famílias não relacionadas, num total de dois pacientes. Confirmamos o diagnóstico somente da forma infantil tardia ou LCN tipo 2, caracterizada pela presença dos CV na histopatologia .

As apresentações clínicas nestas duas famílias foram típicas (SANTAVORI et al., 1988; UVEBRANT et al., 1997), porém não podemos afirmar que são genotipicamente, idênticas as formas já descritas na literatura. Vale a pena ressaltar este aspecto, uma vez que esta categoria de doenças de depósito, possui inúmeras variantes fenotípica e heterogeneidade genética alélica e não-alélica (SERRATOSA et al., 1999; WISNIEWSKI et al., 2001).

O estudo eletrofisiológico realizado em nossos dois pacientes com LCN tipo 2, que consistiu da realização do EEG, pouco colaborou para chegarmos ao diagnóstico de LCN. A fotoestimulação com 1 e 2 hertz, mostrou espículas na região occipital em apenas um caso, dos dois confirmados. A literatura descreve que na forma de LCN tipo 2, a fotoestimulação de baixa frequência auxiliaria no diagnóstico, nos estágios iniciais da doença (VENESELLI et al., 2001). Nosso trabalho, confirmou este achado porém, não temos dados suficientes para considerar que este exame auxiliou de maneira marcante, o diagnóstico desta forma de EMP.

Os estudos patológicos com microscopia eletrônica, realizado nos pacientes suspeitos, conseguiram confirmar o diagnóstico em dois pacientes. Apesar de clinicamente considerarmos que haviam cinco famílias com este possível diagnóstico, não conseguimos alcançar um número maior de casos positivos, devido a dificuldade em se identificar as estruturas que são patognomônicas de cada variante.

O número de famílias com o diagnóstico de LCN pode estar subestimado, uma vez que possuímos dificuldades em realizar o diagnóstico por microscopia eletrônica. Esta observação vai de encontro com que inicialmente já esperávamos neste estudo, e também com o que a literatura descreve. WISNIEWSKI et al 2001, discute que o estudo com

microscopia eletrônica, é a maneira mais eficiente para o diagnóstico das LCN, porém poucos patologistas tem experiência nestas doenças. Muitos ficam desencorajados para este tipo de estudo, devido o grande número de estruturas que devem ser analisadas e o tempo necessário para tal estudo.

Vale ressaltar que através de nosso estudo, entramos em contato com Dr. Stirling Carpenter, neuropatologista experiente, que em sua visita ao Brasil, estudou alguns de nossos casos. Este contato veio de encontro com as necessidades que a Anatomia Patológica do HC-Unicamp precisava, e serviu de incentivo para a continuação deste tipo de estudo.

#### **5.4- ENCEFALOMIOPATIAS MITOCONDRIAIS**

Em nossa amostra final, contamos com um caso de MERRF e outro de MELAS. Clinicamente estes pacientes possuem sinais e sintomas variáveis, confirmando que realmente estamos diante de uma doença multisistêmica. (FUKUHARA et al. 1980; SHOFFNER et al. 1990).

A apresentação clínica da primeira paciente merece destaque pois além dos sinais e sintomas comuns a MERRF, apresentava também lipomas gigantes. Esta forma de apresentação é considerada pouco comum, vista em menos da metade dos casos (DiMAURO et al., 2002). A hipótese que tenta explicar a presença destes lipomas é que, uma disfunção mitocondrial pode comprometer a lipomatose nos tecidos, o que resultaria em um acúmulo excessivo de gordura e formação de tumores (BERKOVIC et al., 1991).

O diagnóstico molecular dessa paciente, foi dirigido imediatamente para o estudo do ponto de mutação do mtDNA, que pesquisou a mutação mais freqüente responsável por cerca de 90% dos casos, A8344G (SHOFFNER et al., 1990). Não nos preocupamos inicialmente em realizar a biópsia de músculo, pois sabíamos que a mutação A8344G, estaria em uma condição de heteroplasmia e deveria estar em altos níveis para causar os sintomas (SHOFFNER et al., 1990). A realização posterior da biópsia de músculo foi por motivos de melhor documentar este primeiro caso de MERRF com lipomatose gigante e realmente confirmou a presença das fibras vermelhas rajadas.

O exame de RNM de crânio da paciente com MERRF, revelou além da atrofia cortical e cerebelar, comum aos pacientes com MERRF (FUKUHARA et al., 1991; BARKOVIC et al., 1993), alterações de substância branca periventricular com aumento de lactato a espectroscopia. Esta descrição não é comum, sendo descrita como um achado não usual nos casos de MERRF (MARRIE et al., 2001). Outro achado característico desses pacientes são as calcificações dos gânglios da base (BARKOVIC et al., 1993).

O paciente com MELAS pertence a uma família de negros, com uma irmandade de quatro indivíduos, onde foi detectado o ponto de mutação A3243G no paciente índice, em sua mãe e nas três irmãs, que são assintomáticos até o momento. Este foi o único paciente cuja família também foi estudada mesmo que assintomática, para que assim pudessemos verificar a proporção de mtDNA normal e mutante (grau de heteroplasmia).

De acordo com a literatura (DiMAURO et al., 2002), comparando-se pacientes com MERRF-8344 e MELAS-3243, está se concluindo que há maior severidade dos sintomas neurológicos em pacientes com MELAS. A conclusão é que MERRF tem um curso mais arrastado e moderado enquanto que MELAS está associado com uma progressão mais rápida e devastadora (DiMAURO et al., 2002). Apesar de podermos comparar apenas dois pacientes, estes confirmam os dados descritos por este trabalho.

O paciente com o diagnóstico de MELAS está entre aqueles que não realizaram RNM de crânio. Tal fato não o levou a exclusão do estudo, pois a CT de crânio foi capaz de demonstrar que os acidentes vasculares, não respeitam o território das grandes artérias (PAVLAKIS et al., 1984; SUZUKI et al., 1990), sendo que a realização deste exame pode auxiliar no diagnóstico de MELAS.

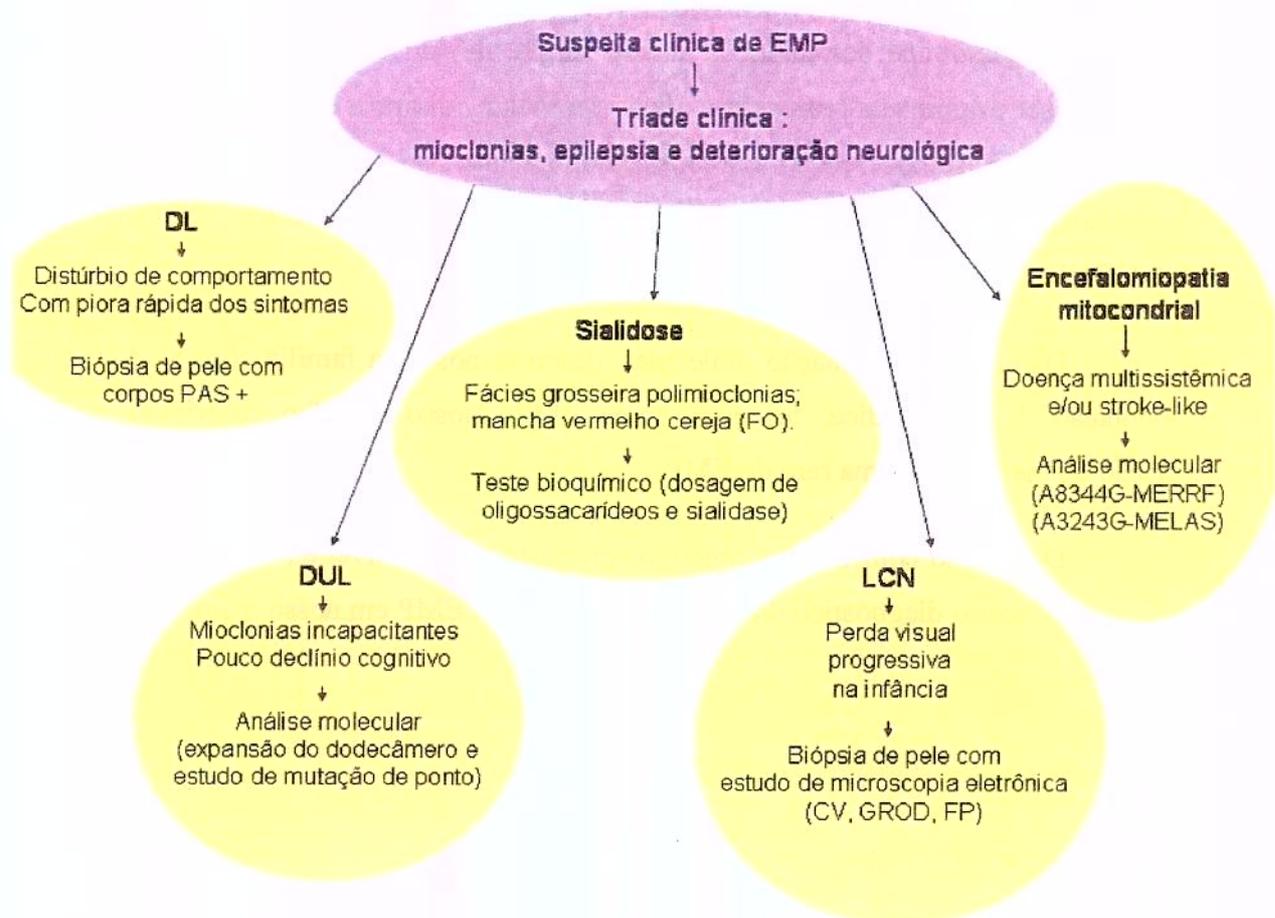
## **5.5- FORMAS RARAS DE EMP**

As formas raras de EMP, devem ser pesquisadas quando as outras causas mais comuns forem excluídas. Em nosso estudo realizamos o diagnóstico de uma forma rara de EMP, que não havia sido ainda descrita como tal, a SCA-7. O paciente apresentava a tríade clássica das EMPs, sendo que pela idade e multiplicidade de sintomas, os principais diagnósticos levantados, foram de encefalomiopatia mitocondrial ou LCN.

Durante o seguimento, notamos que tratava-se de uma doença cujo padrão de herança, era autossômico dominante. Tal fato surgiu, devido quadro clínico exibido pela mãe, que ao ser examinada demonstrou ataxia cerebelar , disartria e oftalmoparesia. Nossa hipótese de ataxia espinocerebelar autossômica dominante tipo 7, foi confirmada através do diagnóstico molecular (GOUW et al., 1995; DAVID et al., 1997; JOHANSSON et al., 1998; GOUW et al., 1998).

Diante da confirmação molecular, descrevemos uma família com SCA-7, cuja apresentação do caso índice, foi como uma EMP. Nosso trabalho contribuiu com a descrição de mais uma forma rara de EMP.

De acordo com um dos objetivos propostos foi possível elaborar um algoritmo para se estabelecer o diagnóstico das principais causas de EMP em nosso meio.



**Figura 27-** Algoritmo para diagnóstico para as principais causas de EMP.

OBS: A realização dos exames de EEG e RNM de crânio, devem ser considerados como parte da investigação de qualquer paciente que encontre-se em estudo de uma entidade clínica rara como as EMP. Os procedimentos em negrito correspondem ao padrão ouro para o diagnóstico.



## ***6- CONCLUSÕES***

Nosso trabalho foi capaz de realizar o diagnóstico específico em 44% dos pacientes estudados o que corresponde a 43% das famílias, no período de cerca de dois anos. Isto significa que dos 25 pacientes com provável EMP realizamos o diagnóstico específico em 11 pacientes.

Entre as causas mais frequentes estão a DUL, as LCN tipo 2, a DL e as encefalomiopatias mitocondriais. A capacidade de chegarmos ao diagnóstico específico demonstrou-se bastante reduzida nos casos de DUL e LCN, se levarmos em conta o número de suspeitos, que iniciaram o estudo. Isto nos leva a crer que precisamos de mais tempo para formar especialista e consolidar protocolos moleculares.

Os exames utilizados para o diagnóstico específico como EEG e RNM de crânio apresentaram-se com resultados inespecíficos, não contribuindo de maneira decisiva para o diagnóstico etiológico final. Tais exames mostraram-se relevantes na determinação e seguimento da epilepsia e na exclusão de possíveis lesões destrutivas em sistema nervoso central.

As biópsias de pele mostraram-se um importante instrumento diagnóstico para a DL e LCN, sendo que a mesma não se aplica para a DUL. Vale a pena ressaltar que, apesar de ser um método pouco invasivo e simples tecnicamente, sua interpretação depende do local escolhido, da maneira como foi fixado o material e por último da experiência do examinador.

A correlação fenótipo/genótipo, foi realizada somente em três famílias (1 família com DUL e duas com encefalomiopatia mitocondrial). A correlação não apresentou surpresas, sendo perfeitamente compatível os achados moleculares com a clínica apresentada pelos pacientes, com exceção da SCA-7, que se apresentou de maneira pouco usual

O trabalho foi capaz de concluir e elaborar um algoritmo de diagnóstico, que prioriza a informação clínica neurológica, voltando-se para os pontos essenciais do diagnóstico e para a execução dos exames específicos como biópsias de pele, testes moleculares e bioquímicos. Não indicando que se gaste tempo e recursos na realização de outros exames que não serão capazes por si, de fazer o diagnóstico definitivo das EMP.

Podemos pontuar que:

Para o diagnóstico da DUL, é necessário recorrer a análise molecular como primeiro exame para o diagnóstico. Especificamente pesquisar a região que contém a expansão do dodecâmero, sendo este porém, um teste tecnicamente difícil.

O exame de escolha para obter o diagnóstico de certeza, na DL, é a biópsia de pele, sendo este procedimento rápido, pouco invasivo e que permite englobar 100% dos casos possíveis de DL.

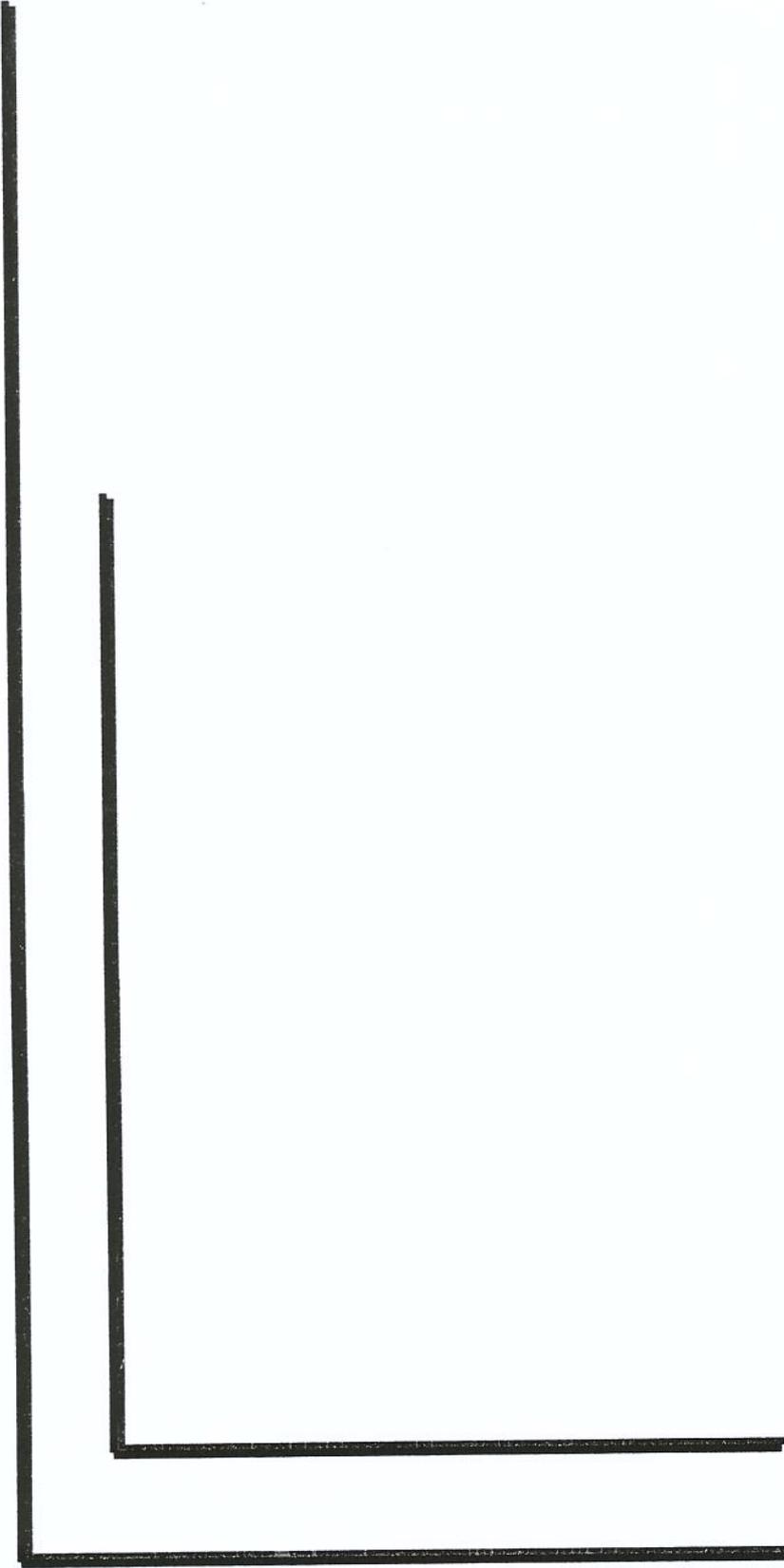
O diagnóstico da DL, somente pela análise molecular, não deve ser realizado isoladamente

A biópsia de pele seguida da análise por microscopia eletrônica é o exame de escolha para o diagnóstico de certeza, das LCN.

A análise molecular deve o exame de escolha para a confirmação do diagnóstico dos casos suspeitos de MERRF e MELAS.

Para os casos de sialidose, o diagnóstico de certeza é obtido com a análise bioquímica.

As formas raras de EMP devem ser pesquisadas como última possibilidade diagnóstica e não podemos nos esquecer que outras doenças neurodegenerativas, podem sindromicamente serem classificadas como EMP, como foi o caso da SCA-7.



***7- REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

ABERG, L.E.; BACKMAN, M.; KIRVESKARI, E.; SANTAVUORI, P. - Epilepsy and antiepileptic drug therapy in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. **Epilepsia**. 41(10): 1296-302, 2000.

ABERG, L.; HEISKALA, H.; VANHANEN, S.L.; HIMBERG, J.J.; HOSKING, G.; YUEN, A.; SANTAVUORI, P. - Lamotrigine therapy in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL). **Neuropediatrics**. 28(1): 77-9, 1997.

ACHARYA, J.N.; SATISCHANDRA, P.; ASHA, T.; SHANKAR, S.K. - Lafora's disease in south India: a clinical, electrophysiologic, and pathologic study. **Epilepsia**. 34(3): 476-87. 1993

ANDERMANN, E.; ANDERMANN, F.; CARPENTER, S.; WOLFE, L.S.; NELSON, R.; PATRY, G.; BOILEAU, J. - Action myoclonus-renal failure syndrome: a previously unrecognized neurological disorder unmasked by advances in nephrology. **Adv Neurol**. 43: 87-103, 1986.

BARKOVICH, A.J.; GOOD, W.V.; KOCH, T.K.; BERG, B.O. - Mitochondrial disorders: analysis of their clinical and imaging characteristics. **AJNR Am J Neuroradiol**. 14(5): 1119-37, 1993.

BERKOVIC S.F.; ANDERMANN, F.; CARPENTER, S.; WOLFE, L.S. - Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. **N Engl J Med**, 315: 296-305, 1986.

BERKOVIC, S.F.; CARPENTER, S.; ANDERMANN, F.; ANDERMANN, E. WOLFE, L.S. - Kufs' disease: a critical reappraisal. **Brain**. (Review) 111: 27-62, 1988.

BERKOVIC, S.F.; SO, N.K.; ANDERMANN, F. - Progressive myoclonus epilepsies: clinical and neurophysiological diagnosis. **J Clin Neurophysiol**. 8(3): 261-74, 1991.

BERKOVIC, S.F. - Progressive Myoclonus Epilepsies. In: Engel, J.Jr.; Pedley, T.A. ed - **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997. p.2455-2468.

BUSARD, B.L.; RENIER, W.O.; GABREELS, F.J.; JASPAR, H.H.; VAN HAELST, U.J.; SLOOFF, J.L. - Lafora's disease. Comparison of inclusion bodies in skin and in brain. **Arch Neurol.** 43(3): 296-9, 1986.

BUSARD, H.L. GABREELS-FESTEN, A.A.; RENIER, W.O.; GABREELS, F.J.; STADHOUDERS, A.M. - Axilla skin biopsy: a reliable test for the diagnosis of Lafora's disease. **Ann Neurol.** 21(6): 599-601, 1987.

CAMP, L.A.; HOFMANN, S.L. - Purification and properties of a palmitoyl-protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras. **J Biol Chem.** 268(30): 22566-74, 1993.

CAMP, L.A.; VERKRUYSE, L.A.; AFENDIS, S.J.; SLAUGHTER, C.A.; HOFMANN, S. - Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase. **J Biol Chem.** 269(37): 23212-9, 1994.

CANAFOLIA, L.; FRANCESCHETTI, S.; ANTOZZI, C.; CARRARA, F.; FARINA, L.; GRANATA, T.; LAMANTEA, E.; SAVOIARDO, M.; UZIEL, G.; VILLANI, F.; ZEVIANI, M.; AVANZINI, G. - Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders. **Neurology.** 56(10): 1340-6, 2001.

CARPENTER, S.; KARPATI, G. - Sweat gland duct cells in Lafora disease: diagnosis by skin biopsy. **Neurology.** 31(12): 1564-8, 1981.

CARPENTER, S.; KARPATI, G.; ANDERMANN, F.; JACOB, J.C.; ANDERMANN, E. - Lafora's disease: peroxisomal storage in skeletal muscle. **Neurology** 24(6): 531-8, 1974.

CARPENTER, S.; KARPATI, G.; ANDERMANN, F.; GOLD, R. - Giant axonal neuropathy. A clinically and morphologically distinct neurological disease. **Arch Neurol.** 31(5): 312-6.,1974.

CARPENTER, S.; KARPATI, G. - Sweat gland duct cells in Lafora disease: diagnosis by skin biopsy. **Neurology.** 31(12): 1564-8, 1981.

CHOW, C.W.; BORG, J.; BILLSON, V.R.; LAKE, B.D. - Fetal tissue involvement in the late infantile type of neuronal ceroid lipofuscinosis. **Prenat Diagn.** 13(9): 833-41, 1993.

COCHIUS, J.; CARPENTER, S.; ANDERMANN, E.; ROULEAU, G.; NOUSIAINEN, U.; KALVIAINEN, R.; FARRELL, K.; ANDERMANN, F. - Sweat gland vacuoles in Unverricht-Lundborg disease: a clue to diagnosis? **Neurology**. 44(12): 2372-5, 1994.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILAE). Proposal for revised classification of epilepsy and epileptic syndromes. **Epilepsia** 30: 389-99, 1989.

CONSTANTINIDIS, J.; WISNIEWSKI, K.E.; WISNIEWSKI, T.M. - The adult and a new late adult forms of neuronal ceroid lipofuscinosis. **Acta Neuropathol** 83(5): 461-8, 1992.

DAVID G, ABBAS N, STEVANIN G et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. **Nature Genetics**, 17: 65-70, 1997.

DELGADO-ESCUETA, A.V.; GANESH, S.; YAMAKAWA, K. - Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy. **Am J Med Genet**. (Review) 106(2): 129-38, 2001.

DiMAURO, S.; HIRANO, M.; KAUFMANN, P.; TANJI, K.; SANO, M.; SHUNGU, D.C.; BONILLA, E.; DEVIVO, D.C.; - Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. **Adv Neurol**. (Review) 89: 217-29, 2002.

ELDRIDGE, R.; IIVANAINEN, M.; STERN, R.; KOERBER, T.; WILDER, B.J. - Baltic" myoclonus epilepsy: hereditary disorder of childhood made worse by phenytoin. **Lancet**. 2(8354): 838-42, 1983.

ENGEL, J.JR. - Classification of epileptic disorders. **Epilepsia**. 42(3): 316, 2001

FRANCESCHETTI, S.; UZIEL, G.; DIDONATO, S.; CAIMI, L.; AVANZINI, G. - Cherry-red spot myoclonus syndrome and alpha-neuraminidase deficiency: neurophysiological, pharmacological and biochemical study in an adult. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 43(10): 934-40, 1980.

FUKUHARA, N.; TOKIGUSHI, S.; SHIRAKAWA, K.; TSUBAKI, T. – Myoclonus epilepsy associated with regged-red fibers (mitochondrial bnormalities): disease entity or sindrome? Light and electron microscopic studies of two cases and review of the literature. **J Neurol Sci.** 47: 117-133, 1980.

FUKUHARA, N. - MERRF: a clinicopathological study. Relationships between myoclonus epilepsies and mitochondrial myopathies. **Rev Neurol (Review)** 147(6-7): 476-9, 1991.

GAMBETTI, P.; DiMAURO, S.; HIRT, L.; BLUME, R.P. - Myoclonic epilepsy with lafora bodies. Some ultrastructural, histochemical, and biochemical aspects. **Arch Neurol.** 5(6): 483-93, 1971.

GANESH, S.; AGARWALA, K.L.; UEDA, K.; AKAGI, T.; SHODA, K.; USUI, T.; HASHIKAWA, T.; OSADA, H.; DELGADO-ESCUETA, A.V.; YAMAKAWA, K. - Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. **Hum Mol Genet.** 9(15): 2251-61, 2000.

GENTON, P.; MALAFOSSE, A; MOULARD, B; ROGEL-ORTIZ, F; DRAVET, C; BUREAU, M; ROGER, J. - Progressive Myoclonus Epilepsies. In: Engel, J.Jr.; Pedley, T. eds, Roger, J.; Bureau, M; Dravet, Ch.; Genton, P.; Tassinari, C. A; Wolf, P ed - **Epileptic Syndromes in Infancy. Childhood and Adolescence.** John Libbey & Co Ltd, 2002. p 407-430.

GENTON, P.; MICHELUCCI, R.; TASSINARI, C.A.; ROGER, J. - The Ramsay Hunt syndrome revisited: Mediterranean myoclonus versus mitochondrial encephalomyopathy with ragged-red fibers and Baltic myoclonus. **Acta Neurol Scand.** 81(1): 8-15, 1990.

GOMEZ-GARRE, P.; ANTA, B.; CASTRO-GAGO, M.; LINDHOUT, D.; TASSINARI, C.A.; MICHELUCCI, R.; MALAFOSSE, A.; TOPCU, M.; GRID, D.; DRAVET, C.; SERRATOSA, J.- Reduction of the lafora disease candidate gene region to a 2 cM interval in chromosome 6q24 and evidence for genetic heterogeneity. **Eur. J. Hum. Genet.** 6, 152,1998.

GOMEZ-GARRE, P.; SANZ, Y.; RODRIGUEZ, D.E.; CORDOBA, S.R.; SERRATOSA, J.M. - Mutational spectrum of the EPM2A gene in progressive myoclonus epilepsy of Lafora: high degree of allelic heterogeneity and prevalence of deletions. **Eur J Hum Genet.** 8(12): 946-54, 2000.

GOUIDER, R.; IBRAHIM, S.; FREDJ, M.; GARGOURI, A.; SAIDI, H.; OUEZZANI, R.; MALAFOSSE, A.; YAHIAOUI, M.; GRID, D.; MRABET, A. - [Unverricht-Lundborg disease: clinical and electrophysiologic study of 19 Maghreb families]. **Rev Neurol** 154(6-7): 503-7, 1998.

GOUW, L.G.; KAPLAN, C.D.; HAINES, J.H.; DIGRE, K.B.; RUTLEDGE, S.L.; MATILLA, A.; LEPPERT, M.; ZOGHBI, H.Y.; PTACEK, L.J. - Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. **Nat Genet.** 10(1): 89-93, 1995.

GOUW, L.G.; CASTANEDA, M.A.; MCKENNA, C.K.; DIGRE, K.B.; PULST, S.M.; PERLMAN, S.; LEE, M.S.; GOMEZ, C.; FISCHBECK, K.; GAGNON, D.; STOREY, E.; BIRD, T.; JERI, F.R.; PTACEK, L.J. - Analysis of the dynamic mutation in the SCA7 gene shows marked parental effects on CAG repeat transmission. **Hum Mol Genet.** 7(3): 525-32, 1998.

HABIB, M.; ROGER, J.; KHALIL, R.; et al - Epilepsie myoclonique progressive degenerative. Lesions olivo-cerebelleuses systematisees. **Rev Neurol** 141 ; 274-288, 1985.

HALTIA, M.; RAPOLA, J.; SANTAVUORI, P.- Infantile type of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis. Histological and electron microscopic studies. **Acta Neuropathol** 26(2): 157-70, 1973.

HASEGAWA, H.; MATSUOKA, T.; GOTO, Y.; NONAKA, I. - Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. **Ann Neurol.** 29(6): 601-5, 1991.

HIRANO, M.; PAVLAKIS, S.G. - Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): current concepts. **J Child Neurol.** (Review) 9(1):4-13, 1994.

INTERNATION BATTEN DISEASE CONSORTION, 1995 - Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The International Batten Disease Consortium. **Cell.** 82(6): 949-57, 1995.

KARIMIPOUR, D.; LOWE, L.; BLAIVAS, M.; SACHS, D.; JOHNSON, T.M. - Lafora disease: diagnosis by skin biopsy. **J Am Acad Dermatol.** 41(5 Pt 1): 790-2, 1999

KING, J.O. - Progressive myoclonic epilepsy due to Gaucher's disease in an adult. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 38: 849-854, 1975.

KOIDE, R.; IKEUCHI, T.; ONODERA, O.; TANAKA, H.; IGARASHI, S.; ENDO, K.; TAKAHASHI, H.; KONDO, R.; ISHIKAWA, A.; HAYASHI, T.; et al. - Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluyisian atrophy(DRPLA). **Nat Genet.** 6(1): 9-13,1994.

KOSKINIEMI ML. Baltic myoclonus. **Adv Neurol.** 43:57-64, 1986.

LAFORA, G.R.; GLUECK, B. - Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. **ZG Esamte Neurol Psychiatr.** 6: 1-14, 1911.

LAFRENIERE, R.G.; ROCHEFORT, D.L.; CHRETIEN, N.; ROMMENS, J.M.; COCHIUS, J.I.; KALVIAINEN, R.; NOUSIAINEN, U.; PATRY, G.; FARRELL, K.; SODERFELDT, B.; FEDERICO, A.; HALE, B.R.; COSSIO, O.H.; SORENSEN, T.; POULIOT, M.A.; KMIEC, T.; ULDALL, P.; JANSZKY, J.; PRANZATELLI, M.R.; ANDERMANN, F.; ANDERMANN, E.; ROULEAU, G.A. - Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, EPM1. **Nat Genet.** 15(3): 298-302, 1997.

LALIOTI, M.D.; SCOTT, H.S.; ANTONARAKIS, S.E. - What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? **Nat Genet.** 17(1): 17, 1997a.

LALIOTI, M.D.; MIROTSOU, M.; BURESI, C.; PEITSCH, M.C.; ROSSIER, C.; OUAZZANI, R.; BALDY-MOULINIER, M.; BOTTANI, A.; MALAFOSSE, A.; ANTONARAKIS, S.E. - Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). **Am J Hum Genet.** 60(2): 342-51, 1997b.

LALIOTI, M.D.; SCOTT, H.S.; BURESI, C.; ROSSIER, C.; BOTTANI, A.; MORRIS, M.A.; MALAFOSSE, A.; ANTONARAKIS, S.E. - Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. **Nature.** 386(6627): 847-51, 1997c.

LALIOTI, M.D.; SCOTT, H.S.; GENTON, P.; GRID, D.; OUAZZANI, R.; MRABET, A.; IBRAHIM, S.; GOUIDER, R.; DRAVET, C.; CHKILI, T.; BOTTANI, A.; BURESI, C.; MALAFOSSE, A.; ANTONARAKIS, S.E. - A PCR amplification method reveals instability of the dodecamer repeat in progressive myoclonus epilepsy (EPM1) and no correlation between the size of the repeat and age at onset. **Am J Hum Genet.** 62(4): 842-7, 1998.

LEHESJOKI, A.E.; KOSKINIEMI, M.; SISTONEN, P.; MIAO, J.; HASTBACKA, J.; NORIO, R.; De La CHAPELLE, A. - Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88(9): 3696-9, 1991.

LEHESJOKI, A.E.; KOSKINIEMI, M. - Clinical features and genetics of progressive myoclonus epilepsy of the Unverricht-Lundborg type. **Ann Med. (Review)** 30(5):474-80, 1998.

LEHESJOKI, A.E. - Clinical features and genetics of Unverricht-Lundborg disease. **Adv Neurol (Review)** 89: 193-7, 2002.

LUNDBORG, H. - Die rogressive myoclonus Epilepsie (Unverricht's Myoklonie). **Uppsala: Almqvist and Wiksell:** 1-207, 1903.

MACDONALD RL, KELLY KM .Antiepileptic drug mechanisms of action. **Epilepsia;** 34 Supp 15:S1-8. 1993, Review.

MALAFOSSE, A.; LEHESJOKI, A.E.; GENTON, P.; LABAUGE, P.; DURAND, G.; TASSINARI, C.A.; DRAVET, C.; MICHELUCCI, R.; De La CHAPELLE, A. - Identical genetic locus for Baltic and Mediterranean myoclonus. **Lancet**. 339(8801): 1080-1, 1992.

MARSEILLE CONSENSUS GROUP - Classification of progressive myoclonus epilepsies and related disorders: a consensus statement. **Ann Neurol**, 28: 113-116, 1990.

MARRIE, R.A.; SHOUBRIDGE, E.A.; ANTEL, J.P.; ARNOLD, D.L.; CHEN, J.; ANDERMANN, E.; ANDERMANN, F. - Unusual imaging findings in progressive myoclonus epilepsy. **Epilepsia**. 42(3): 430-2, 2001.

MASCALCHI, M.; MICHELUCCI, R.; COSOTTINI, M.; TESSA, C.; LOLLI, F.; RIGUZZI, P.; LEHESJOKI, A.E.; TOSETTI, M.; VILLARI, N.; TASSINARI, C.A. - Brainstem involvement in Unverricht-Lundborg disease (EPM1): An MRI and (1)H MRS study. **Neurology**. 58(11): 1686-9, 2002.

MAUGUIERE, F.; BARD, J.; COURJON, J. - Short-latency somatosensory evoked potentials (SEPs) in dyssynergia cerebellaris myoclonica (author's transl) **Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin**. 11(2): 174-82, 1981.

MINASSIAN, B.A.; LEE, J.R.; HERBRICK, J.A.; HUIZENGA, J.; SODER, S.; MUNGALL, A.J.; DUNHAM, I.; GARDNER, R.; FONG, C.Y.; CARPENTER, S.; JARDIM, L.; SATISHCHANDRA, P.; ANDERMANN, E.; SNEAD, O.C. 3RD.; LOPES-CENDES, I.; TSUI, L.C.; DELGADO-ESCUETA, A.V.; ROULEAU, G.A.; SCHERER, S.W. - Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. **Nat Genet**. 20(2): 171-4, 1998.

MINASSIAN, B.A.; IANZANO, L.; DELGADO-ESCUETA, A.V.; SCHERER, S.W. - Identification of new and common mutations in the EPM2A gene in Lafora disease. **Neurology** 54: 488-490, 2000.

MINASSIAN, B.A. - Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. **Pediatr Neurol**. (Review) 25(1): 21-9, 2001.

MINASSIAN, B.A. - Progressive Myoclonus epilepsy with polyglucosan bodies: Lafora disease. In S. Fahn, et al. ed - **Myoclonus and paroxysmal dyskinesias, advances in neurology**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, vol.89, 2002. p.199-210.

NORIO, R.; KOSKINIEMI, M. - Progressive myoclonus epilepsy: genetic and nosological aspects with special reference to 107 Finnish patients. **Clin Genet**, 15:382-398, 1979.

PAVLAKIS, S.G.; PHILLIPS, P.C.; DiMAURO, S.; DeVivo, D.C.; ROWLAND, L.P.; - Mitochondrial myopathy encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. **Ann Neurol**, 16: 481-8, 1984.

PENNACCHIO, L.A.; LEHESJOKI, A.E.; STONE, N.E.; WILLOUR, V.L.; VIRTANEVA, K.; MIAO, J.; D'AMATO, E.; RAMIREZ, L.; FAHAM, M.; KOSKINIEMI, M.; WARRINGTON, J.A.; NORIO, R.; De La CHAPELLE, A.; COX, D.R.; MYERS, R.M.; - Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). **Science**. 271(5256): 1731-4, 1996.

PSHEZHETSKY, A.V.; RICHARD, C.; MICHAUD, L.; IGDOURA, S.; WANG, S.; ELSLIGER, M.A.; QU, J.; LECLERC, D.; GRAVEL, R.; DALLAIRE, L.; POTIER, M. - Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis. **Nat Genet**. 15(3): 316-20, 1997.

ROGER, J.; DRAVET, C. - [Treatment of epilepsy]. **Soins**. (409-10): 39-46, 1983.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**;74(12):5463-7, Dec 1977.

SANTAVUORI, P. - Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood. **Brain Dev**. (Review) 10(2): 80-3, 1988.

SCHWARZ, G.; YANOFF, M. - Lafora's disease. **Arch. Neurol**. 12: 173-88, 1965.

SLEAT DE, DONNELLY RJ, LACKLAND H, LIU CG, SOHAR I, PULLARKAT RK, LOBEL P. Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. **Science**. Sep 19;277(5333):1802-5. 1997.

SERRATOSA, J.M.; DELGADO-ESCUETA, A.V.; POSADA, I.; SHIH, S.; DRURY, I.; BERCIANO, J.; ZABALA, J.A.; ANTUNEZ, M.C.; SPARKES, R.S. - The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q. **Hum Mol Genet.** 4(9): 1657-63, 1995.

SERRATOSA, J.M.; GOMEZ-GARRE, P.; GALLARDO, E.M.; ANTA, B.; BELTRAN-VALERO de BERNABÉ, D.; LINDHOUT, D.; AUGUSTIJN, P.B.; TASSINARI, C.A.; MICHELUCCI, R.; MALAFOSSE, A.; TOPCU, M.; GRID, D.; DRAVET, C.; BERKOVIC, S.F.; RODRIGUEZ DE CÓRDOBA, S. - A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the lafora type (EPM2). **Hum. Mol. Genet.**, 8: 345-52, 1999.

SHOFFNER, J.M.; LOTT, M.T.; LEZZA, A.M.; SEIBEL, P.; BALLINGER, S.W.; WALLACE, D.C. - Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. **Cell.** 61(6):931-7, 1990.

SILVESTRI, G.; CIAFALONI, E.; SANTORELLI, F.M.; SHANSKE, S.; SERVIDEI, S.; GRAF, W.D.; SUMI, M.; DiMAURO, S. - Clinical features associated with the A-->G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). **Neurology.** 43(6): 1200-6, 1993.

SUZUKI, T.; KOIZUMI, J.; SHIRAISHI, H.; ISHIKAWA, N.; OFUKU, K.; SASAKI, M.; HORI, T.; OHKOSHI, N.; ANNO, I. - Mitochondrial encephalomyopathy (MELAS) with mental disorder. CT, MRI and SPECT findings. **Neuroradiology.** 32(1):74-6, 1990

TASSINARI, C.A.; BUREAU-PAILLAS, M.; GRASSO, E.; ROGER, J. - Electroencephalographic study of myoclonic cerebellar dyssynergia with epilepsy (Ramsay-Hunt syndrome)]. **Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin.** 4(3): 407-28, 1974.

TASSINARI, C.A.; BUREAU-PAILLAS, M.; DALLA BERNARDINA, B.; PICORNELL-DARDER, I.; MOUREN, M.C.; DRAVET, C.; ROGER, J. - [Lafora disease (author's transl)] **Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin.** 8(1): 107-22, 1978.

- TASSINARI, C.A.; MICHELUCCI, R.; GENTON, P.; PELLISSIER, J.F.; ROGER, J. - Dyssynergia cerebellaris myoclonica (Ramsay Hunt syndrome): a condition unrelated to mitochondrial encephalomyopathies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 52(2): 262-5, 1989.
- TINUPER P, AGUGLIA U, PELLISSIER JF, GASTAUT H. Visual ictal phenomena in a case of Lafora disease proven by skin biopsy. **Epilepsia**. Apr;24(2):214-8, 1983.
- UNVERRICHT, H – Die myoclonie. Leipzig: Franze Deuticke, pp: 1-128, 1891.
- UVEBRANT, P.; HAGBERG, B. - Neuronal ceroid lipofuscinoses in Scandinavia. Epidemiology and clinical pictures. **Neuropediatrics**. 28(1): 6-8, 1997
- VANHANEN, S.L.; RAININKO, R.; AUTTI, T.; SANTAVUORI, P. - MRI evaluation of the brain in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. Part 2: MRI findings in 21 patients. **J Child Neurol**. 10(6): 444-50, 1995.
- VENESELLI, E.; BIANCHERI, R.; BUONI, S.; FOIS, A. - Clinical and EEG findings in 18 cases of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. **Brain Dev**. 23(5):306-11, 2001.
- ZEVIANI, M.; MUNTONI, F.; SAVARESE, N.; SERRA, G.; TIRANTI, V.; CARRARA, F.; MARIOTTI, C.; DIDONATO, S. - A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. **Eur J Hum Genet**. 1(1): 80-7, 1993. Erratum in: **Eur J Hum Genet** 1(2): 124, 1993.
- ZHONG, N.A.; WISNIEWSKI, K.E.; JU, W.; MOROZIEWICZ, D.N.; JURKIEWICZ, A.; MCLENDON, L.; JENKINS, E.C.; BROWN, W.T. - Molecular diagnosis of and carrier screening for the neuronal ceroid lipofuscinoses. **Genet Test**. 4(3): 243-8, 2000.
- WISNIEWSKI, K.E.; GORDON-MAJSZAK, W.; MASLINSKI, S.; HEANEY-KIERAS, J. - Altered protein patterns in brains of children with neuronal ceroid lipofuscinosis. **Am J Med Genet**. 42(4): 568-74, 1992.
- WISNIEWSKI, K.E.; ZHONG, N.; PHILIPPART, M. - (Pheno/genotypic correlations of neuronal ceroid lipofuscinoses. **Neurology**. (Review) 28;57(4): 576-81, 2001.



**8- ANEXOS**

## FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: Estudos Genéticos nas Epilepsias Mioclônicas Progressivas

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Dra. Maria Isabel C. R. Moraes

### OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com suspeita clínica de Epilepsia Mioclônica Progressiva. O objetivo geral do estudo é o de determinar a frequência de algumas mutações encontradas em pacientes com Epilepsia Mioclônica Progressiva. Esses estudos poderão levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado das Epilepsias Mioclônicas Progressivas de modo geral. Tanto as amostras de DNA, e a informação médica a meu respeito, bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com Epilepsia Mioclônica Progressiva . Podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa sobre Epilepsia Mioclônica Progressiva. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

### PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para confirmar meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a exames subsidiários laboratoriais, de imagem (como tomografia computadorizada ou a uma ressonância magnética de crânio), eletroencefalografia, biópsia muscular e de pele. Sabemos que as Epilepsias Mioclônicas Progressivas compreendem

várias doenças que podem ser diferenciadas através de análise patológica da biópsia muscular e/ou pele, enfatizando a necessidade destes exames, os quais já fazem parte da rotina para o diagnóstico e são feitos nos principais centros de estudo da doença no mundo. Uma amostra de sangue venoso será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, com exceção da coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com Epilepsia Mioclônica Progressiva. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro do primeiro ano após o meu consentimento em participar no estudo. O uso posterior do material colhido, para outra pesquisa, somente será realizado mediante aprovação pelo comitê de ética em pesquisa.

#### RISCO E DESCONFORTO:

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

## FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: Estudos Genéticos nas Epilepsias Mioclônicas Progressivas

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Dra. Maria Isabel C. R. Morais

### VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares obtidos, serão disponíveis através do meu acompanhamento no Ambulatório de Neurogenética que funciona toda Segunda-feira das 08:30 as 12:00h no 2º andar do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (019)3 788 8908. Este ambulatório oferece um atendimento multidisciplinar com a participação de geneticista, neurologista, psicólogo (a), assistente social e fisioterapeuta. É importante salientar que qualquer membro de minha família que desejar obter orientação genética poderá ser atendido no Ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP.

### SIGILO:

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

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

#### FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 3788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria do comitê de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019)3 788-8936.

#### RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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

## FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: Estudos Genéticos nas Epilepsias Mioclônicas Progressivas

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Dra. Maria Isabel C. R. Morais

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_

explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar

\_\_\_\_\_  
Nome do participante ou responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou responsável

data

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a \_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador ou associado

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador ou associado

\_\_\_\_\_  
data

## **SCA-7 disease presenting as Progressive Myoclonic Epilepsy in childhood**

Maria Isabel C. R. Morais, MD<sup>1</sup>; Marilisa M. Guerreiro, MD, PhD<sup>1</sup>; Fernando Cendes, MD, PhD<sup>1</sup>; Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD<sup>2</sup>

Departaments of Neurology and Medical Genetics;

University of Campinas(Unicamp)-Brazil

## Introduction:

The autosomal dominant cerebellar ataxias (ADCAs) or SCA, are a heterogeneous group of hereditary neurodegenerative disorders with overlapping phenotypes. Characterized by variable dysfunction of the cerebellum, basal ganglia, brainstem, spinal cord and peripheral nerves. Association with macular degeneration and autosomal dominant inheritance, a distinct form of ADCA, SCA-7<sup>1</sup>.

The genetic defect causing SCA-7 is an expanded, unstable stretch of DNA with a repeating CAG segment in first exon of the *SCA-7* gene<sup>2</sup> (chromosomal locus 3p21.1-p12). Affected individuals contains between 37 and more than 200 CAG repeats; the normal alleles contains 4 to 35 repeats. Anticipation, or the earlier onset of symptoms and more severe disease in successive generations, has been described in SCA-7, particularly on paternal transmission of the disease.

SCA-7 is characterized by progressive cerebellar ataxia, including dysarthria, dysphagia and retinal dystrophy with progressive central visual loss resulting in blindness. Onset in early childhood or infancy has an especially rapid and aggressive course often associated with weight loss and regression of motor milestones. In children, clinical diagnosis may be difficult because ataxia and visual loss are not obvious, and failure to thrive and loss of motor milestones may be the earliest finding<sup>3</sup>.

Epileptic seizures are not frequent in patients with SCA-7. We report in detail, the clinical, EEG and laboratory finding of a 10-year-old boy, with triad classical of progressive myoclonic epilepsy (PME- myoclonus and seizures, ataxia and dementia). We performed the molecular study for SCA-7 and confirm diagnosis, finding a CAG repeats expansion of 60 triplets.

## Case report

The patient is a 10-year-old boy with normal birth and early development milestones, was normal until age 6, our parents were unrelated and others brothers are normal. Four years ago, he started with impairment visual, with bilateral ophthalmoplegia, ptoses, gait ataxia, cognitive decline, severe myoclonus and rare tonic-clonic generalized

seizures. In the last two years the patient became wheel-chair bound and blind. At the time of first clinical assessment, there was no family history of other affected individuals.

The EEG interictal showed slowed background and generalized spike-wave discharges and non-epileptiform generalized discharges. Neurologic examination demonstrated ophthalmoplegia bilateral, blind, truncal and limbs ataxia, dysarthria, dysphagia and jerks myoclonics for all body. Hyperreflexivity with spasticity were presents. Treatment with clobazam and valproate was started, with tonic-clonic seizure control, but myoclonus jerks persisted. Fundoscopy were normal initial disease and visual acuity reduced.

#### Laboratory Findings:

Routine hematologic and biochemical investigation were normal. Interictal scalp EEG (Figure 1) showed widespread slow background activity and generalized epileptiform discharges with predominance in the left hemisphere. Electroretinograms (ERG) and Potencial evoked visual (PEV) no demonstraed potencial, indicating severe degeneration retinal. Muscle biopsy of brachial biceps showed hypotrophic fibers, but with normal diameter, was normal limits. Nerve conduction velocities were normal. Molecular analyses for mitochondrial encephalopathies disease were negative. MRI showed severe atrophy in pons, brainstem and cerebellum (Figure 2).

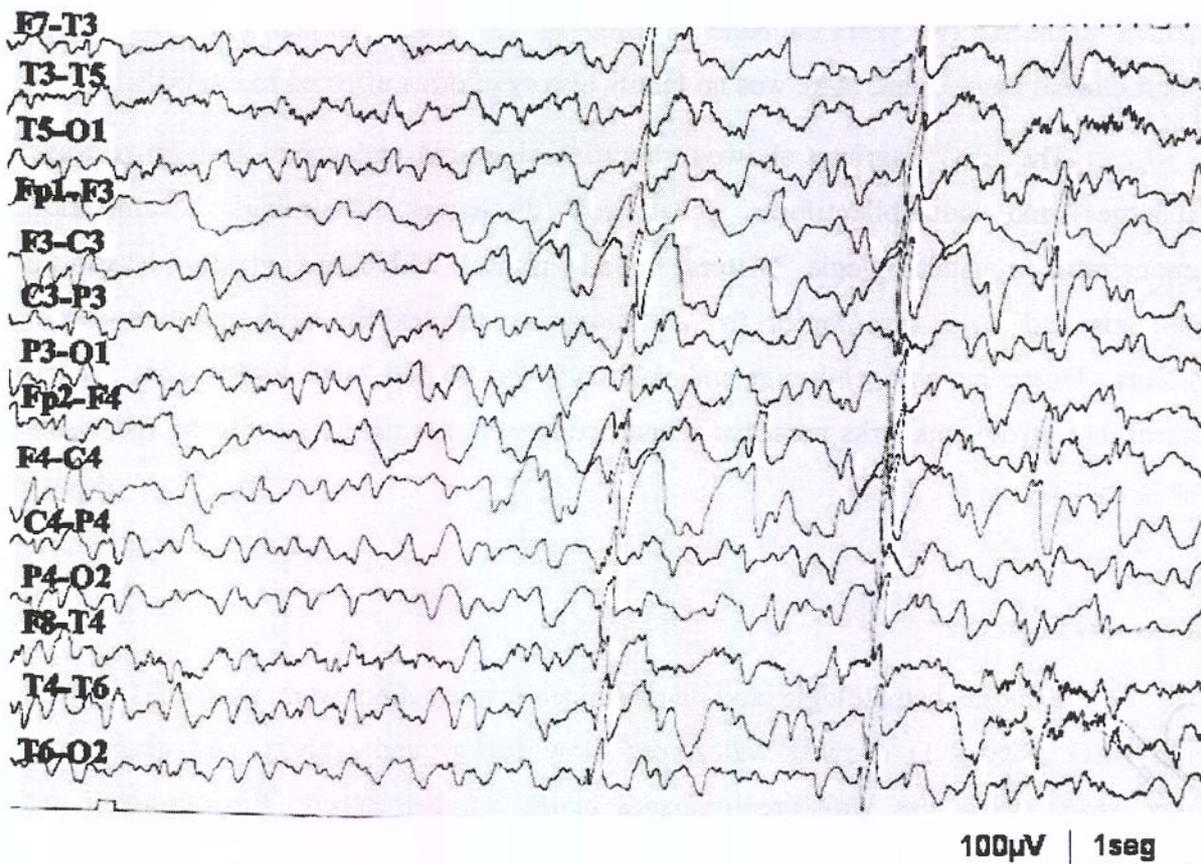
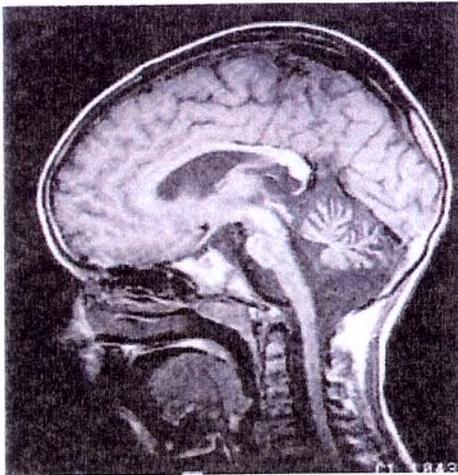
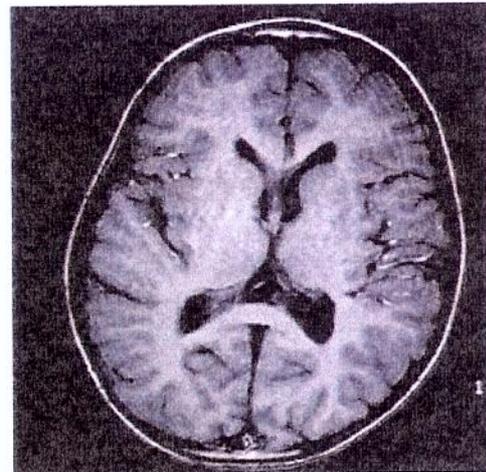


Figura 1 – EEG demonstrated slow background and spike wave generalized, confirmed activit epileptiform in patient with SCA-7.



**Figura 2A**



**Figura 2B**

**Figure 2** – The patient 10-year-old, MRI showed moderate to severe atrophy in cerebellum and pons.

Follow-up:

Eighth months of follow-up, his mother age 30, started with an unstable gait. In the past year, she developed mild gait and limb ataxia, dysarthria, bilateral ophthalmoplegia and started to complain of progressive visual loss. The diagnosis of autosomal dominant ataxia was performed and first hypothesis was SCA-7.

Methods:

Molecular genetic analyses. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of the patient and his mother. The method fenol/cloroform was used. Genomic DNA was amplified by PCR, using primers specifics. Amplification was performed in Peltier Effect Thermal Cycles ( MJ Research, Watertow, MA) as follows: 5 minutes at 95°C for initial denaturation followed 32 cycles consisting of 1 minute at 95°C, 1 minute aneling at 55°C, 1 minute extension at 72°C, and a final extension of 5 minutes at 72°C. An aliquot of each reaction was loading on a 6% polyacrylamide-urea denaturing gel. The amplified products were detected by autoradiography. Alleles sizes were determined by comparing migration relative the other patient positive and with sequency determined <sup>2</sup>.

Results:

The molecular analyses, confirm diagnosis of SCA-7 for patient and his mother. Our patient had alleles with 10 and 60 CAGs and his mother had 10 and 38 CAG units (Figure 3).

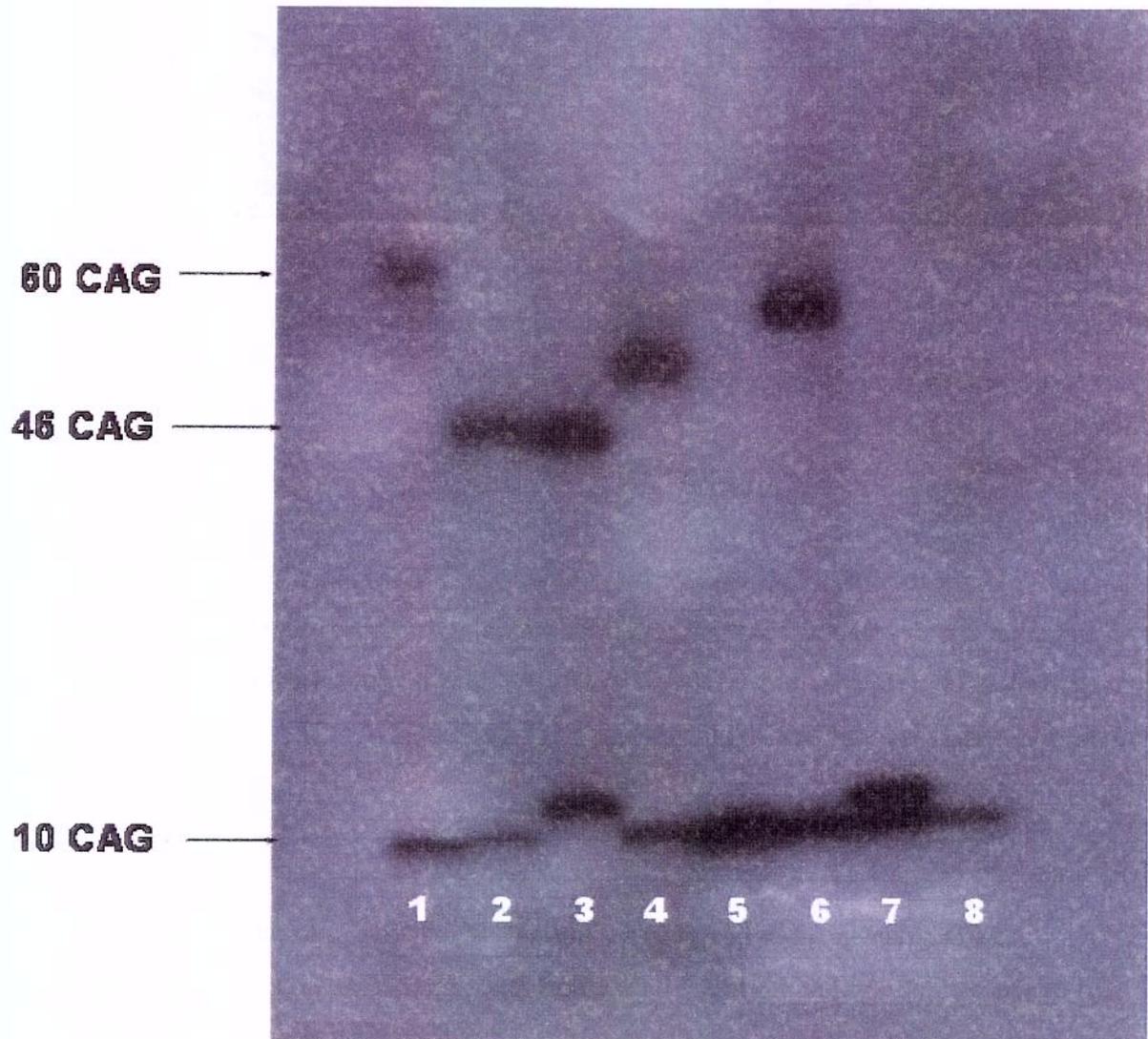


Fig.3 – Analyses of polymerase chain reaction products of some spinocerebellar ataxia type 7 patients. Our patient and his mother were number 1 and 2 respectively.

## Discussion:

The SCA-7 in children symptoms are similar with adults forms, however, the progression of disease is often more rapid and aggressive than in adults<sup>2-4</sup>. The diagnosis may be confused with neuronal ceroid lipofuscinoses or mitochondrial encephalopathies. In SCA-7, anticipation in a family may be so dramatic<sup>5</sup>, that a child may be diagnosed before his parent becomes symptomatic and the seizures in SCA-7, are not described frequently.

The anticipation or the earlier onset of symptoms, has been described particularly on paternal transmission, with biologic explanation.

This case represents atypical form the SCA-7 because the myoclonus was hallmark the apresentation clinic and illustrates that myoclonus and seizures may occur in cases the SCA-7. These features are different from those of most previously reported SCA-7 patients where predominant maculopathies and central scotomas. Diagnosis of the PME was performed but specific disease was not possible without molecular analyses for specific disorders that realized, because a family history is often missed in many patients. The patient was not very large CAG repeats expansion but the apresentation was exuberant e incomum. Outro aspecto interessante é que a antecipação ocorreu vinda da linhagem materna, outro ponto pouco usual para esta patologia.

This paper alert for atypical form the SCA-7 and rare form the PME tha was possible

References:

1. Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH et al. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nature Genetics* 1995; 10:89-93.
2. David G, Abbas N, Stevanin G et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genetics* 1997, 17: 65-70.
3. Benton CS, de Silva R, Rutledge SL, Bohlega S, Ashizawa T, Zoghbi HY. Molecular and clinical studies in SCA7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. *Neurology* 1998, 51: 1081-6.
4. Johansson J, Forsgren L, Sandgren O, Brice A, Holmgren G, Holmberg M. Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 171-176.
5. Gouw LG, Castaneda MA, McKenna CK, et al. Analysis of the dynamic mutation in SCA7 gene shows marked parental effects on CAG repeat transmission. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 525-532.