

DANIELA MEDEIROS DE CASTRO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas da aluna **Daniela Medeiros de Castro**.

Campinas, 15 de maio de 2002.
Isclia Lopes Cendes
Profa. Dra. Isclia Lopes Cendes
Orientadora

**CARACTERIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES
DE PONTO DO DNA MITOCONDRIAL
EM UM GRUPO DE PACIENTES
COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DANIELA MEDEIROS DE CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES
DE PONTO DO DNA MITOCONDRIAL
EM UM GRUPO DE PACIENTES
COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

*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 Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ISCIA LOPES-CENDES

CAMPINAS

2002

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T1UNICAMP
C279c
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51461
PROC 16.838/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 12/11/02
Nº CPD _____

CM00176427-4

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

318 10 266937

C279c

Castro, Daniela Medeiros de
Caracterização das principais mutações de ponto do DNA
mitocondrial em um grupo de pacientes com doenças
neurodegenerativas / Daniela Medeiros de Castro. Campinas, SP :
[s.n.], 2002.

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

1. *Miopatia Óptica Hereditária de Leber. 2. *Síndrome de
Leigh. 3. *Síndrome de NARP. 4. *Encefalomiopatias
Mitocondriais. 6. *Síndrome de MERRF. 7. Síndrome de Melas. 8.
Doenças neuromusculares. I. Iscia Lopes Cendes. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes

Membros:

1. Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes

2. Profa. Dra. Célia Harumi Tengan

3. Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

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

Data: 15/05/2002

200254413

*Trabalho realizado no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética
Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas*

Apoio financeiro Capes e Faep-Unicamp

DEDICATÓRIA

*A meus pais, Angelina
e Vitor.*

À Profª. Dra. Iscia Lopes-Cendes, pela orientação, confiança e por suas freqüentes palavras de incentivo e apoio ao longo desses anos.

À Daniela Facchin, pela recepção, dedicação e paciência ao me ensinar e, sobretudo, por sua amizade.

À Maria Isabel Moraes, pela valiosa ajuda e colaboração para realização deste projeto, com os pacientes, material clínico e suas explicações.

Ao Fábio, por sua sempre disposição em ajudar, em ensinar, e pela amizade.

À Priscila, pela ajuda na execução da metodologia e por sua simpatia e alegria contagiantes.

À Marilza, pela recepção e pela grande ajuda no dia-a-dia do laboratório.

A Érika, Luciana, Rodrigo, Maria Francisca, pela ajuda, convivência agradável e descontração.

Aos meus colegas de laboratório, pelo convívio alegre e pela ajuda durante esses anos.

À Patrícia e ao pessoal do Boldrine, pela ajuda e pelo auxílio na quantificação.

Aos Prof. Drs. Ana Marli Nucci, Fernando-Cendes, Marilisa Mantovani Guerreiro, e às médicas Lisiane S. Ferreira e Maria Augusta Montenegro, neurologistas do Hospital de Clínicas da Unicamp, pela avaliação clínica e envio de amostra de pacientes estudados neste trabalho.

À Profª. Dra. Andrea T. Maciel Guerra, do Departamento de Genética Médica da Unicamp, pela análise clínica e envio de amostras.

À Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato, pela doação de DNA de pacientes com surdez idiopática.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto, de Minas Gerais, pela colaboração no envio de amostras de pacientes com suspeita de Leber.

À Mara Lúcia Ferreira e ao Hospital Pequeno Príncipe, de Curitiba, pelo envio de amostras.

Aos meus pais, Angelina e Vitor, pelo amor, sustento e pela compreensão, mesmo nos momentos mais difíceis.

A meus irmãos, Victor e Marcello, pela ajuda e pelo cuidado ao longo da minha vida.

Ao meu namorado Sérgio, pela ajuda na elaboração desta tese, pela dedicação, amizade, pelo cuidado, apoio, bom-humor, companheirismo e por me fazer tão feliz.

E, especialmente, a meu Deus e Pai querido, por seu amor incondicional, manifesto através, principalmente, de seu filho, o meu Senhor e Salvador Jesus.

*"Desde a antigüidade não se ouviu,
nem com os ouvidos se percebeu,
nem com os olhos se viu,
um Deus além de ti,
que trabalha para aquele que nele espera"*

Isaías 64:4

	PÁG.
RESUMO	<i>xviii</i>
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Aspectos históricos.....	21
1.2. A mitocôndria e o DNA mitocondrial.....	22
1.2.1. A mitocôndria.....	22
1.2.2. A genética da função mitocondrial.....	23
1.2.3. O DNA mitocondrial.....	24
1.2.4. A herança materna.....	25
1.2.5. Mutações no mtDNA.....	26
1.3. Principais síndromes com mutações de ponto no mtDNA.....	27
1.3.1. LHON.....	27
1.3.2. NARP/MILS.....	29
1.3.3. MELAS.....	29
1.3.4. MERRF.....	31
1.4. Epidemiologia das mutações mitocondriais.....	31
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Seleção da amostra.....	38
3.2. Avaliação genético-clínica.....	38
3.3. Distribuição clínica.....	38

3.4. Análise molecular.....	40
3.4.1. Extração de mtDNA genômico de sangue periférico.....	40
3.4.2. Pesquisa das mutações.....	41
3.4.2.1. Amplificação gênica.....	41
3.4.2.2. Análise de restrição.....	44
3.4.2.3. Seqüenciamento.....	47
3.4.2.4. Quantificação da heteroplasmia.....	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1. Avaliação clínica.....	49
4.2. Avaliação molecular.....	52
4.3. Frequência das mutações em amostra sangüínea.....	54
4.4. Descrição dos pacientes com mutação.....	54
4.4.1. Caso 1.....	54
4.4.2. Caso 6.....	59
4.4.3. Casos 7 e 8.....	61
4.4.4. Caso 9.....	61
4.4.5. Caso 11.....	61
4.4.6. Caso 12.....	62
5. DISCUSSÃO.....	63
5.1. Distribuição clínica da amostra.....	64
5.2. Avaliação clínica.....	64
5.3. Avaliação molecular.....	66
5.4. Frequência das mutações.....	67

5.5. Aconselhamento genético.....	68
5.6. Tratamento para as doenças mitocondriais.....	69
6. CONCLUSÃO.....	70
7. SUMMARY.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9. ANEXOS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

α -dNTP[P ³³]	dNTP marcado com P ³³ em alfa
ng	Nanograma
μ M	Micromolar
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	ATP sintetase
C O	C oxidase
CoQ ₁₀	Coenzima Q ₁₀
CPEO	Oftalmoplegia externa progressiva crônica
CPT	Carnitina palmitol transferase
CPX	Teste de exercício cardiopulmonar
DNA ladder	Marcador de peso molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DNA _n	Ácido desoxirribonucleico nuclear
dNTP	Desoxinucleotideo trifosfato
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Episódios <i>strokelike</i>	Semelhante a derrame cerebral
FAD	Dinucleotideo adenina-flavina
KSS	Síndrome Kearns-Sayre

Leigh	Subacute necrotizing encephalomyopathy
LHON	Leber Hereditary Optic Neuropathy
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes
MERRF	Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MILS	Maternally inherited Leigh syndrome
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NAD	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida
NARP	Neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa
OXPHOS	Oxidação fosforilativa
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PDC	Complexo desidrogenase piruvato
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
RDNPM	Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _r	RNA ribossômico
RNA ^{Leu (UUR)} _t	RNA _t da leucina
RNA ^{Lys} _t	RNA _t da lisina
RNA ^{Ser} _t	RNA _t da serina
RNA _t	RNA transportador
RPM	Rotações por minuto
RRF	Ragged-red fibers

RSB	Tampão à base de cloreto de magnésio e cloreto de potássio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>Taq</i> ®	DNA polimerase <i>Termus aquaticus</i>
<i>Threshold</i>	Efeito limiar
V	Volts
VO ₂ máx	Consumo de oxigênio máximo

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1: Origem genética dos polipeptídeos da OXPHOS.....	23
Tabela 2: Mutações de ponto no mtDNA responsáveis por LHON, NARP, MILS, MELAS e MERRF.....	27
Tabela 3: Classificação dos pacientes quanto ao diagnóstico e/ou suspeita clínica.....	39
Tabela 4: Mutações de ponto no mtDNA investigadas.....	40
Tabela 5: Sequências dos “primers” utilizados.....	41
Tabela 6: Tamanho dos produtos de amplificação.....	42
Tabela 7: Condições das PCRs.....	43
Tabela 8: Enzimas de restrição utilizadas para pesquisa das mutações.....	45
Tabela 9: Produtos da digestão com enzimas de restrição.....	46
Tabela 10a: Frequência das principais características clínicas nas diferentes categorias.....	50
Tabela 10b: Frequência das principais características clínicas nas diferentes categorias.....	51
Tabela 11: Distribuição dos casos com mutação no mtDNA, quanto ao sexo, à suspeita clínica, à idade de aparecimento dos sintomas, à idade atual, à mutação encontrada e à porcentagem de heteroplasmia.....	53

	PÁG.
Figuras 1, 2 e 3: Biópsia muscular.....	55
Figuras 4, 5 e 6: CT de crânio.....	56
Figura 7: Heredograma.....	57
Figura 8: Gel de acrilamida.....	58
Figuras 9 e 10: Lipomas gigantes.....	59
Figuras 11 e 12: Imagens de ressonância magnética.....	60
Figura 13: Gel de Acrilamida.....	60
Figura 14: Gel de Acrilamida.....	62

LISTA DE QUADRO

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1: Classificação genética das doenças mitocondriais.....	24



RESUMO

Doenças mitocondriais são entidades clínica e geneticamente heterogêneas, variando consideravelmente com relação à idade de início, ao quadro clínico e à evolução. São subdivididas entre defeitos do DNA nuclear ou do DNA mitocondrial (mtDNA). Mutações de ponto são comumente encontradas no genoma mitocondrial, e dentre estas, os quadros clínicos mais freqüentemente associados são: MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes), MERRF (myoclonic epilepsy and ragged-red fibers), NARP (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa), MILS (maternally inherited Leigh syndrome) e LHON (Leber hereditary optic neuropathy).

Este projeto teve como objetivos:

- a) pesquisar a presença das principais mutações de ponto no *mtDNA* de pacientes com quadro clínico sugestivo de MELAS, MERRF, NARP, MILS e LHON;
- b) estabelecer a correlação genótipo-fenótipo tendo em vista a significativa variabilidade clínica destas entidades;
- c) quantificar a porcentagem de *mtDNA* mutante e normal em indivíduos afetados.

O DNA foi obtido de amostras de sangue periférico. As regiões de interesse do *mtDNA* foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção das mutações de ponto foi realizada pela triagem com enzimas de restrição e posteriormente confirmadas pelo seqüenciamento manual das regiões envolvidas. A quantificação foi feita pelo sistema Kodak EDAS 290.

Foram triados 120 pacientes para as principais mutações responsáveis pelas síndromes MELAS, MERRF, NARP, MILS e LHON. Em sete pacientes foram observadas mutações de ponto no *mtDNA*. Entre oito pacientes com suspeita de Leber, dois apresentaram a mutação G11778A e um a mutação G3460A. Um paciente com suspeita de MELAS e quatro familiares assintomáticos deste apresentaram a mutação A3243G; uma paciente apresentou a mutação A8344G responsável por MERRF; dois irmãos com suspeita de NARP apresentaram a mutação G11778A responsável por Leber; nenhuma mutação no nucleotídeo 8993 foi encontrada.



1. INTRODUÇÃO

REVISÃO DA LITERATURA

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

LUFT *et al.* (1962), ao descreverem clinicamente uma mulher sueca com um hipermetabolismo severo não relacionado a qualquer disfunção na tireóide, introduziram o conceito de doença mitocondrial baseando-se em três observações:

- 1- anormalidades morfológicas nas mitocôndrias musculares;
- 2- perda do acoplamento entre a oxidação e a fosforilação nas mitocôndrias anormais;
- 3- correlação entre as anormalidades bioquímicas e os sinais clínicos.

ENGEL & CUNNINGHAM (1963) observaram, em biópsias musculares coradas pela técnica de tricrômio de Gomori, fibras vermelhas rajadas ou rotas (RRFs) que são caracterizadas pelo acúmulo de mitocôndrias anormais sob a membrana sarcolemal.

SHAPIRA, HAND, RUSSEL (1977) definiram o conceito de encefalomiopatias baseando-se no fato de cérebro e músculos serem freqüentemente os órgãos mais afetados.

FUKUHARA *et al.* (1980) foram os primeiros a descrever pacientes com epilepsia mioclônica progressiva e RRFs.

A partir de 1988, com as primeiras descrições de mutações patogênicas no DNA mitocondrial (mtDNA) por HOLT, HARDING, MORGAN-HUGHES (1988) e WALLACE *et al.*, (1988), iniciou-se um novo capítulo na genética humana, a genética mitocondrial. Desde então o desenvolvimento nesta área tem sido extraordinário, possibilitando a caracterização de várias novas doenças, com destaque para as neuromusculares, sendo de suma importância para tal um conhecimento detalhado do mtDNA e sua forma de herança (ROSE, 1998).

1.2. A MITOCÔNDRIA E O DNA MITOCONDRIAL

1.2.1. A mitocôndria

A mitocôndria é uma organela localizada no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e é responsável por várias funções vitais, tais como, o ciclo do ácido cítrico, a biossíntese de aminoácidos, a oxidação de ácidos graxos e a produção de energia, principalmente adenosinatrifosfato (ATP) (SCHATZ, 1994; DIMAURO *et al.*, 1998; WALLACE, BROWN, LOTT, 1999; NARDIN & JOHNS, 2001).

Os ácidos graxos e carboidratos são os principais substratos para a produção de energia na mitocôndria via acetilcoenzima A (acetil-CoA). Os ácidos graxos livres são transportados para a mitocôndria pela carnitina palmitol tranferase (CPT) I e II na permuta por carnitina livre, e então degradados para acetil-CoA via β oxidação. Os carboidratos sofrem glicólise no citoplasma para produzirem piruvato, que é transportado por meio da membrana mitocondrial e decarboxilado para acetil-CoA pelo complexo enzima desidrogenase piruvato (PDC). A acetil-CoA é então oxidada para dióxido de carbono e água através do ciclo do ácido cítrico. Este processo libera íons de hidrogênio que reduzem o dinucleotídeo adenina-nicotinamida (NAD) e o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD) para NADH e FADH₂ respectivamente, que são então reoxidados pela cadeia respiratória (WALLACE *et al.*, 1999; NARDIN & JOHNS, 2001).

A cadeia respiratória ocorre na membrana mitocondrial interna e compreende quatro complexos. Estes complexos são ligados pelos elétrons móveis carregados pela coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) também chamada ubiquinona ou citocromo c. A cadeia respiratória transfere os elétrons na forma de íons de hidrogênio, para NADH e FADH₂ para o oxigênio molecular produzindo água. Este processo é unido a três sítios ao longo da cadeia respiratória para passagem de prótons transmembrana. Esta passagem gera um potencial elétrico que leva à síntese de ATP da adenosinadifosfato (ADP) pelo complexo V da cadeia respiratória. A produção de ATP pela redução do oxigênio, conhecida como fosforilação oxidativa (OXPHOS) é que gera a energia necessária para o funcionamento celular (TREEM & SOKOL, 1998; WALLACE *et al.*, 1999; NARDIN & JOHNS, 2001).

1.2.2. A genética da função mitocondrial

A OXPHOS é resultado da interação dos genomas nuclear e mitocondrial. Os genes do DNA nuclear (nDNA) codificam a maioria das proteínas mitocondriais. Já os peptídeos da OXPHOS codificados pelo mtDNA incluem subunidades do complexo I (de ND1 a ND6), complexo III, complexo IV ou citocromo C oxidase (CO1, CO2, CO3) e complexo V ou ATP sintetase (ATPase 6 e 8) (Tab.1). O nDNA codifica também o RNA que permite a tradução das intra-organelas mitocondriais e, ainda, produtos genéticos nucleares desconhecidos que coordenariam a perpetuação e expressão do mtDNA (ZEVIANI, TIRANTI, PIANTADOSI, 1998; TREEM & SOKOL, 1998).

Quando um destes componentes da OXPHOS apresenta um defeito genético pode-se desenvolver uma doença mitocondrial devido à redução na produção de energia e ao acúmulo de metabólitos intermediários e/ou produtos tóxicos nas células (Quadro 1). A falta de energia nos tecidos é a maior causa de fraqueza muscular, fadiga e problemas no sistema nervoso, coração, rins, olhos e sistema endócrino. O acúmulo de intermediários tóxicos pode ser responsável por problemas no fígado, câibras musculares, disfunção cerebral ou mesmo danos mitocondriais maiores (TREEM & SOKOL, 1998).

Tabela 1: Origem genética dos polipeptídeos da OXPHOS, modificado de WALLACE, 1993)

	Mitocôndria	Núcleo	Total
Complexo I	7	>40	>47
Complexo II	0	4	4
Complexo III	1	10	11
Complexo IV	3	10	13
Complexo V	2	10	12
Total	13	>74	>87

Quadro 1: Classificação genética das doenças mitocondriais, segundo DIMAURO *et al.*, 1998)

Defeitos no DNA nuclear (herança mendeliana):
A. Defeito nos genes que codificam enzimas ou proteínas estruturais
B. Defeito nas translocases mitocondriais
C. Defeito na importação de proteínas
D. Defeito nos sinais intergenômicos
Defeitos no DNA mitocondrial:
A. Rearranjos esporádicos em larga escala (duplicações e deleções)
B. Mutações pontuais herdadas maternalmente

1.2.3. O DNA mitocondrial

O cromossomo mitocondrial é uma macromolécula circular de 16.569 pares de bases (pb), dupla fita sendo uma fita leve (O_L), rica em pirimidinas e outra pesada (O_H), rica em purinas. Determinou-se sua sequência completa e sabe-se que ele codifica 13 dos mais de 80 polipeptídeos do sistema da OXPHOS, 22 RNAs transportadores (tRNAs) necessários à expressão do seu genoma e dois tipos de RNA ribossômico (rRNA) (TREEM & SOKOL, 1998; ZEVIANI *et al.*, 1998).

O mtDNA é caracterizado por uma compactação extrema, o que aumenta a probabilidade de mutações deletérias. Há poucos íntrons (ou regiões não codificantes entre os genes), segundo MICHAEL (1998), NARDIN & JOHNS (2001) ou nenhum, segundo ZEVIANI *et al.* (1998), que consideram o único trecho não codificante a região D-loop que contém a origem de replicação da fita O_H e os promotores para a transcrição das fitas O_H e O_L .

Todas as células humanas possuem centenas de mitocôndrias, e cada mitocôndria contém várias cópias de mtDNA (poliplasmia). O mtDNA replica-se dentro da mitocôndria e esta se divide por fissão simples. Durante a citocinese, as mitocôndrias distribuem-se aleatoriamente para as células-filhas. Quando uma célula contendo tanto mtDNA mutante quanto normal, (uma condição conhecida por heteroplasmia) se divide, suas células-filhas podem conter apenas mtDNA normal (um caso de homoplasmia), apenas mtDNA mutante (outro caso de homoplasmia) ou os dois. Esta segregação mitótica explica a grande variação da heteroplasmia entre diferentes tecidos ou até entre diferentes células do mesmo tecido. A maioria dos defeitos no mtDNA são heteroplásmicos, enquanto polimorfismos não patogênicos são homoplásmicos (MATTHEWS *et al.*, 1995; DIMAURO *et al.*, 1998; TREEM & SOKOL, 1998; NARDIN & JOHNS, 2001).

A expressão fenotípica de uma mutação no mtDNA depende das proporções relativas de mtDNA normal e mutante; assim, a variabilidade da expressão e o caráter progressivo são uma constante nos heredogramas dos distúrbios mitocondriais. Estudos *in vitro* demonstram que um limiar crítico (“threshold”) de mtDNA mutante precisa ser excedido antes da célula expressar um defeito na cadeia respiratória (CHINNERY *et al.*, 1998). Como a dependência de energia e o efeito limiar variam nos diferentes tecidos, órgãos com grande demanda de energia são freqüentemente mais afetados (DIMAURO *et al.*, 1998; TREEM & SOKOL, 1998).

1.2.4. A herança materna

Uma característica singular do mtDNA é sua herança materna. O ovócito é bem suprido de mitocôndrias, mas o espermatozóide contém poucas e mesmo essas poucas não persistem na progênie (ZEVIANI *et al.*, 1998; NARDIN & JOHNS, 2001). A mãe transmite seu mtDNA a toda prole, mas somente suas filhas transmitirão a mutação. A transmissão materna pode não ser aparente clinicamente devido à heteroplasmia e ao efeito limiar (DIMAURO *et al.*, 1998). Irmãos podem ser gravemente afetados, oligossintomáticos ou mesmo assintomáticos (DIMAURO *et al.*, 1998; CHINNERY *et al.*, 1998).

1.2.5. Mutações do mtDNA

A taxa de mutação observada no mtDNA é cerca de dez vezes maior da apresentada pelo genoma nuclear. Isto decorre da falta de um sistema de reparo eficiente, da ausência de proteínas protetoras como as histonas e da associação do genoma mitocondrial com a membrana mitocondrial interna, na qual radicais de oxigênio altamente mutagênicos são gerados como subprodutos da OXPHOS (WARNER & SCHAPIRA, 1997; TREEM & SOKOL, 1998; ZEVIANI *et al.*, 1998).

As mutações no mtDNA são classificadas em dois grupos: rearranjos (deleções e duplicações) e mutações de ponto. A maioria dos rearranjos do mtDNA são esporádicos, não sendo transmitidos para as gerações subseqüentes. Em contraste, mutações de ponto do mtDNA são geralmente herdadas maternalmente com transmissão vertical (WARNER & SCHAPIRA, 1997; CHINNERY *et al.*, 1998; ZEVIANI *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1999).

A classificação clínica das desordens conseqüentes das mutações no mtDNA tende a ser complexa pois há uma grande sobreposição entre essas patologias já que defeitos genéticos diferentes podem produzir a mesma síndrome clínica e síndromes clinicamente diferentes podem estar associadas com o mesmo defeito genético (AUSTIN *et al.* 1998). Dentre os principais fenótipos associados a mutações de ponto no mtDNA citam-se as síndromes: Leber hereditary optic neuropathy (LHON), neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP), maternally inherited Leigh syndrome (MILS), mitochondria encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS) e myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) (DI MAURO *et al.*, 1998; ZEVIANI *et al.*, 1998), (Tab. 2).

Tabela 2: Mutações de ponto no mtDNA responsáveis por LHON, NARP, MILS MELAS e MERRF, modificado de ZEVIANI *et al.*, 1998

Fenótipo	Mutuação	Gene afetado
MELAS	3243 A-G	tRNA ^{Leu(UUR)}
MELAS	3252 A-G	tRNA ^{Leu(UUR)}
MELAS	3271 T-C	tRNA ^{Leu(UUR)}
MELAS	3291 T-C	tRNA ^{Leu(UUR)}
LHON	3460 G-A	ND1
MERRF/MELAS	7512 T-C	tRNA ^{Ser(UCN)}
MERRF	8344 A-G	tRNA ^{Lys}
MERRF/MELAS	8356 T-C	tRNA ^{Leu(UUR)}
NARP/MILS	8993 T-G	ATPase 6
NARP/MILS	8993 T-C	ATPase 6
LHON	11778 G-A	ND4
LHON	14484 T-C	ND6

1.3. PRINCIPAIS SÍNDROMES COM MUTAÇÕES DE PONTO NO mtDNA

1.3.1. Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)

Pacientes com LHON apresentam perda aguda ou subaguda da visão central devido à atrofia óptica, o que leva a um escotoma central e à amaurose. A fundoscopia clássica revela, telangiectasia, microangiopatia, atrofia óptica, entre outros. O eletrocardiograma pode apresentar-se anormal. Alguns pacientes desenvolvem uma síndrome neurológica severa além dos sinais ópticos. Defeitos na condução cardíaca (NIKOSKELAINEN, WANNE, DAHL, 1985), ataxia, distonia, disartria, neuropatia sensorial e reflexos alterados podem ser observados como sintomas secundários (CHALMERS & SCHAPIRA, 1999).

No início do século XIX foram feitas as primeiras descrições de perda visual bilateral subaguda em adultos jovens masculinos, mas foram pobremente documentadas. VON GRAEFE (1858) baseando-se nesses relatos descreveu uma forma de neuropatia óptica hereditária. THEODOR LEBER (1871) foi o primeiro a descrever acuradamente as características clínicas dessa forma de neuropatia óptica hereditária que atualmente recebe seu nome (neuropatia óptica de Leber). WALLACE *et al.* (1988) foram os primeiros a confirmar a hipótese de que um defeito no mtDNA seria o responsável pela doença ao identificar a mutação G11778A no gene ND4 do mtDNA em nove de 11 famílias com LHON na Finlândia e nos EUA.

Atualmente a doença é associada a 18 mutações de ponto no mtDNA. As mutações G3460A no gene ND1, G11778A no gene ND4 e T14484C no gene ND6 são consideradas mutações primárias e ocorrem em pelo menos 90% das famílias afetadas. Estas mutações são suficientes para causar perda visual e estão presentes nas formas homo e heteroplásmica (MARJA-LISA, 1995; RIORDAN-EVA & HARDING, 1995; ZEVIANI *et al.*, 1998). Nove substituições no mtDNA presentes em um pequeno número de pacientes com LHON são consideradas secundárias por não serem suficientes para causar perda visual, mas somente quando associadas a outras mutações no indivíduo. São observadas sempre na forma homoplásmica (BROWN *et al.*, 1992; MARJA-LISA, 1995; RIORDAN-EVA & HARDING, 1995; VERGANI *et al.*, 1995; ZEVIANI *et al.*, 1998).

LHON é responsável por cerca de 3% dos casos de amaurose em adultos jovens masculinos. Aproximadamente 11% dos pacientes com neuropatia/atrofia óptica bilateral de etiologia incerta parecem sofrer de LHON e os casos isolados representam por volta de 8% (CHAN, MACKEY, BYRNE, 1996). A maior parte dos pacientes são homens, mas cerca de 15% são mulheres (OOSTRA *et al.*, 1996). A prevalência masculina ainda não é explicada, mas não é mais aceita como resultado de um *locus* de susceptibilidade ligado ao cromossomo X (CHALMERS *et al.*, 1996; OOSTRA *et al.*, 1996; PEGORARO *et al.*, 1996). A penetrância é reduzida mesmo em famílias homoplásmicas. Fatores externos, como álcool e tabaco apresentam influência na clínica dos portadores das mutações G3460A e T14484C. Indivíduos com doenças autoimunes apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento dos sintomas (CHALMERS & SCHAPIRA, 1999).

1.3.2. Neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP) / Maternally inherited Leigh syndrome (MILS)

Neuropatia sensorial, ataxia, retinite pigmentosa, demência, epilepsia, fraqueza muscular neurogênica proximal entre outros fazem parte do quadro clínico de NARP (DI MAURO *et al.*, 1998).

Pacientes com MILS apresentam altos níveis de lactato, piruvato e alanina, necrose dos gânglios da base, facilmente observada na ressonância magnética, regressão neurológica, espasmos infantis, paralisia cerebral, falha nas funções cerebelares, morte ou estado vegetativo poucos meses após o nascimento (SANTORELLI *et al.*, 1997).

HOLT *et al.* (1990) descreveram uma família com vários indivíduos afetados por manifestações clínicas variáveis, dentre as quais, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, retinite pigmentosa, demência, epilepsias, ataxia, fraqueza muscular neurogênica proximal e neuropatia sensorial com transmissão materna. Posteriormente essa síndrome foi denominada NARP. A análise seqüencial identificou a mutação de ponto T8993G na posição 156 da subunidade 6 da ATPase mitocondrial, reduzindo à metade a atividade desta enzima. O fenótipo é variável, mas o quadro clínico mais comum inclui fraqueza muscular neurogênica, ataxia e retinite pigmentosa (NARP), ou uma doença neurodegenerativa que cursa com altos níveis de lactato, piruvato e alanina- MILS (maternally inherited Leigh syndrome). Acredita-se que esta forma mais grave esteja relacionada a altas taxas de mtDNA mutante (80-90%). Uma segunda mutação T8993C, menos freqüente também possui associação com MILS. Juntas, NARP e MILS, representam as mutações mitocondriais mais freqüentes em crianças (SANTORELLI *et al.*, 1997).

1.3.3. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS)

O início dos sintomas se dá geralmente antes dos quarenta anos e se caracteriza por episódios “strokelike”, RRF, intolerância a exercícios, acidose láctica, convulsões, (KIMATA *et al.*, 1998) e demência ocorrem em mais de 90% dos casos; baixa estatura,

cefaléia, perda auditiva, vômitos, fraqueza dos membros e hemianopsia aparecem em 75% a 89% dos casos (DIMAURO *et al.*, 1998).

Menos freqüentemente podem estar presentes sinais de oftalmoplegia, retinite pigmentosa, deficiência na audição sensoneural, epilepsia, doença da substância branca cerebral, calcificação dos gânglios da base, cardiomiopatia hipertrófica, ou ataxia (DE VRIES *et al.*, 1994).

Em diabéticos a mutação A3243G está presente em cerca de 4% dos pacientes, sendo que em populações asiática sua freqüência é ainda maior, chegando a 8%. Destes 61% também apresentam surdez (REARDON *et al.*, 1992; TSUKUDA *et al.*, 1997).

A primeira descrição clínica de uma entidade que incluiu episódios “strokelike”, acidemia láctica e RRF foi de SHAPIRA *et al.* (1975). PAVLAKIS *et al.* (1984) descreveram vários pacientes introduzindo o acrônimo MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and strokelike episodes). Publicações posteriores estabeleceram o papel central da disfunção da cadeia respiratória na patogênese da desordem (DIMAURO *et al.*, 1989). GOTO, NONAKA, HORAI (1990) identificaram uma mutação pontual no gene do RNA transportador da leucina na posição 3243 com a troca de uma adenina por uma guanina em alguns pacientes com MELAS.

HIRANO & PAVLAKIS (1994) publicaram um artigo relatando a revisão de 110 pacientes com encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódio “strokelike” definindo o espectro clínico da doença.

Posteriormente a associação de novas mutações pontuais a MELAS indicou tratar-se de uma patologia geneticamente heterogênea entretanto, em 80% dos casos o fenótipo é devido à mutação do tRNA mitocondrial no nucleotídeo 3243 (ENTER *et al.*, 1991; DI MAURO *et al.*, 1998) e em 10% à mutação de ponto no nucleotídeo 3271 (GOTO, NONAKA, HORAI, 1991; KIMATA *et al.*, 1998).

1.3.4. Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF)

MERRF é uma encefalopatia que foi descrita por FUKUHARA *et al.* (1980), sendo conhecida também como doença de Fukuhara, ou epilepsia com fibras vermelhas rotas. ROSING *et al.* (1985) criaram o acrônimo MERRF e relacionaram a doença à forma de herança materna. É caracterizada por crises mioclônicas e tônico-clônicas associadas à disfunção neurológica progressiva, especialmente demência e ataxia cerebelar e por anormalidades mitocondriais no músculo esquelético como alterações morfológicas, RRF e defeitos bioquímicos variáveis nos complexos respiratórios mitocondriais (ROSIING *et al.*, 1985). Disartria, atrofia óptica, retardo no crescimento e surdez podem também ocorrer.

SHOFFNER *et al.* (1990) encontraram a mutação de ponto A8344G no gene do RNA transportador da Lys em pacientes com MERRF. A mutação A8344G é a mais comum em pacientes com MERRF (DIMAURO *et al.*, 1998) e é quase exclusivamente associada a esta. Porém, há a descrição de uma família com 19 membros apresentando esta mesma mutação mas com um quadro clínico de ataxia, miopatia, perda de audição e neuropatia, juntamente com lipomas axiais, *diabetes mellitus* e hipertensão. E ainda outra família com dois indivíduos com regressão neurológica e necrose dos gânglios da base e um com quadro clínico predominante de neuropatia periférica compatível com diagnóstico de Charcot-Marie-Tooth (AUSTIN *et al.*, 1998).

1.4. EPIDEMIOLOGIA DAS MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS

Segundo MAJAMAA *et al.* (1998) e UUSIMAA *et al.* (2000) a frequência de doenças mitocondriais entre pacientes com encefalopatias e miopatias não é conhecida uma vez que uma estimativa mais exata fica dificultada devido à grande variabilidade na apresentação clínica destas patologias. Na população brasileira dados sobre a frequência de doenças mitocondriais não são conhecidos.

Em 2001 DARIN *et al.* completaram um estudo sobre a incidência de encefalomiopatias mitocondriais em crianças do Oeste da Suécia. Através da pesquisa de registros e revisões médicas identificaram 32 pacientes com menos de 16 anos com

diagnóstico clínico de encefalomiopatia mitocondrial em um estudo de populações feito entre 1º de janeiro de 84 e 31 de dezembro de 98. Obtiveram a incidência de uma em 11.000 crianças abaixo dos 6 anos com encefalomiopatia mitocondrial; já em crianças abaixo dos 16 anos a incidência caiu para uma em 21.000. A incidência da síndrome de Leigh foi de 1 em 32.000. Dentre os 32, eles identificaram quatro pacientes com mutações de ponto no mtDNA, dois com deleções e dois com mutações nucleares no gene SURF1. Concluíram que as encefalomiopatias mitocondriais são desordens neurometabólicas relativamente comuns na infância.

UUSIMAA *et al.* (2000) avaliaram a frequência das anormalidades mitocondriais em músculos, em defeitos na atividade da cadeia respiratória e em mutações no mtDNA em crianças com retardamento psicomotor no Norte da Finlândia. Um total de 116 pacientes com encefalopatias e miopatias de etiologia desconhecida foram registrados durante um período de sete anos. Alterações ultraestruturais em biópsia muscular estavam presentes em 71% dos casos, RRF foram observadas em quatro casos. Defeitos na OXPHOS foram encontrados em 26 crianças (28%). Defeitos no complexo I e no complexo IV foram os mais comuns. Quinze por cento dos pacientes (n=17/116) tinham provavelmente doença mitocondrial. Mutações patogênicas no mtDNA foram encontradas em apenas um caso (9%). Eles concluíram que as mutações no mtDNA são raramente as causas de encefalomiopatias em crianças, em contraste com a alta frequência das mutações responsáveis por MELAS em adultos da mesma região, como descrito por MAJAMAA *et al.* (1998) que encontraram na população adulta da Finlândia com clínica de MELAS a mutação A3243G com uma incidência de 16,3 em 100.000 adultos, constituindo uma das maiores categorias de diagnóstico de doenças neurogenéticas.

APPLEGARTH, TOONE, LOWRY (2000) em um estudo da incidência de erros inatos do metabolismo no período de 1969 a 1996 na Columbia britânica observaram em aproximadamente três de cada 100.000 nascidos vivos (7-8%) o desenvolvimento de doença mitocondrial. Do ano de 1988 ao ano de 1996 houveram 408.667 nascimentos, destes, dois apresentaram defeitos no complexo I, três no complexo IV, três casos em ambos os complexos I e IV, e defeitos nos complexos I e III associados em um caso. Observou-se a mutação T8993G em um caso de NARP.

PANG *et al.* (1999) em um estudo epidemiológico sobre a frequência das mutações no mtDNA em 127 pacientes com doença mitocondrial, desenvolvido em Taiwan durante oito anos, revelaram que 32 apresentaram a mutação A3243G, incluindo 25 com MELAS, um com a síndrome Kearns-Sayre (KSS), um com *diabetes mellitus* e surdez e cinco com CPEO. A mutação A8344G foi encontrada em nove pacientes com MERRF, a mutação G11778A em 18 dentre 22 pacientes com Leber. As mutações T8993C e T8993G foram observadas em um e dois pacientes com Leigh, respectivamente. Um paciente com MELAS e dois com MERRF apresentaram deleções de larga escala no mtDNA.

As publicações a respeito de mutações de ponto em pacientes com comprometimento neurológico no Brasil são poucas e não há nenhuma publicação sobre a frequência destas até o momento.

LEVY *et al.* (1983) descreveram clinicamente um paciente de dez anos de idade que apresentou miopatia congênita posteriormente diagnosticada como miopatia mitocondrial.

WERNECK, ABDALLA, LOHR (1987) descreveram clinicamente um paciente brasileiro, masculino, de 12 anos de idade, com MELAS. Este apresentava acidose láctica, episódios “stroke-like” e calcificação dos gânglios da base. A biópsia muscular revelou a presença de RRF.

WERNECK & DIMAURO (1989) relataram uma paciente brasileira de 24 anos de idade, com perda progressiva da força muscular desde os 10 anos, cuja suspeita foi um possível defeito no complexo II da cadeia respiratória.

DIAS-TOSTA (1988a) estudou as alterações morfológicas e citoquímicas observadas em biópsias musculares de 37 pacientes com CPEO e as alterações encontradas em biópsia muscular de 34 pacientes com CPEO sob microscopia eletrônica (DIAS-TOSTA, 1988b).

KIYOMOTO *et al.* (1991) relataram 12 pacientes com miopatia mitocondrial, sendo nove masculinos e três femininos. Dez dos pacientes apresentaram oftalmoplegia, ptose e fraqueza muscular e uma intolerância a exercícios.

WAJNER *et al.* (1992) relataram um paciente brasileiro com hipotonia generalizada, alterações do EEG e crises de acidose metabólica que apresentava uma deficiência de 3-Quetotiolase devido a um defeito da proteína mitocondrial tiolase acetoacetil-CoA.

FERRAZ & ANDRADE (1992) em estudo clínico de 46 pacientes brasileiros com distonia sintomática encontraram apenas um cuja causa foi devida à doença mitocondrial.

MARIE *et al.* (1994) descreveram uma família brasileira descendente de portugueses e italianos com a mutação T3271C, que é a segunda mais freqüente em portadores de MELAS.

KIYOMOTO *et al.* (1997) encontraram 11 pacientes com deleções no mtDNA dentre 13 que apresentavam oftalmoplegia externa progressiva crônica (CPEO) e RRF, em um estudo que apresentou uma alta freqüência de deleções no mtDNA de pacientes brasileiros com CPEO. Não encontraram correlação entre a severidade clínica, os achados morfológicos e o tamanho ou quantia de mtDNA mutado no músculo, sugerindo que existem fatores desconhecidos influenciando o fenótipo da doença.

SILVA *et al.* (1998) avaliaram pacientes brasileiros quanto ao teste de exercício cardiopulmonar (CPX) para o diagnóstico de miopatias e observaram que pacientes com doença mitocondrial apresentavam diferenças significativas para a força de trabalho e para o consumo de oxigênio máximo (VO₂ max) e valores significativamente menores do limiar anaeróbico quando comparados aos controles.

MARIE *et al.* (1999) apresentaram a síndrome KSS, confirmada pela presença de deleção no mtDNA obtido do músculo esquelético, associada à distonia, em um paciente brasileiro.

As doenças mitocondriais têm despertado bastante interesse de pesquisadores no Brasil, inclusive já foram realizadas uma dissertação de Mestrado e teses de Doutorado abordando doenças mitocondriais ou aspectos relacionados a elas (VALENTE, 1981; PLUT, 1994; MARIE, 1996; KIYOMOTO, 1997; TENGAN, 1997).



2. OBJETIVOS

- 1) Determinar a frequência relativa das principais mutações de ponto do mtDNA em pacientes com doença neurodegenerativa.
- 2) Investigar as possíveis correlações entre o tipo de mutação identificada (genótipo) e o quadro clínico dos indivíduos afetados (fenótipo).
- 3) Quantificar a heteroplasmia em indivíduos afetados e correlacioná-la à gravidade do quadro clínico.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra para o estudo foi selecionada entre indivíduos com doenças neurodegenerativas nos quais a etiologia mitocondrial foi suspeita. Esses pacientes foram recrutados nos ambulatórios de Epilepsia Infantil, Epilepsia, Doenças Neuromusculares e Neurogenética do HC-Unicamp, e em diversos ambulatórios de colaboradores externos. Os pacientes selecionados foram convidados a participar deste projeto de pesquisa e foi solicitada a assinatura de um formulário de consentimento pós-informação para coleta da amostra de sangue (ANEXO 1). Cada família foi informada de que, além de uma possível contribuição ao conhecimento destas síndromes, sua participação poderia ser útil na confirmação do diagnóstico, bem como poderia trazer subsídios para um aconselhamento genético mais adequado.

O presente estudo foi submetido à análise e aprovação do Comitê de Ética da FCM, previamente a sua realização (ANEXO 2).

3.2. AVALIAÇÃO GENÉTICO-CLÍNICA

Os dados anamnésicos foram revistos pela orientadora deste trabalho, Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes, e colaboradores, com determinação da genealogia, obtenção de informações necessárias à elaboração dos heredogramas e caracterização do quadro clínico. Foi elaborado um formulário clínico que foi devidamente preenchido pelos médicos responsáveis (ANEXO 3). As genitoras dos indivíduos afetados também foram sistematicamente avaliadas, quando possível e, sempre que necessário, havendo possibilidade, outros familiares foram convocados para avaliação.

3.3. DISTRIBUIÇÃO CLÍNICA

A amostra constituiu-se de 120 pacientes pertencentes a 106 famílias não relacionadas com suspeita clínica de doença mitocondrial, divididos nas categorias seguintes: 27% dos pacientes com epilepsia mioclônica progressiva (n=32), 23% com

encefalo e/ou miopatia de possível etiologia mitocondrial (n=28), 23% com surdez idiopática (n=28), 6,7% com neuropatia óptica compatível com Leber (n=8), 5,0% com diagnóstico clínico de MELAS (n=6), 5,0% com ataxia de etiologia desconhecida (n=6), 4,0% com suspeita clínica de doença da Leigh (n=5), 2,5% com suspeita de MERRF (n=3), 2,5% com diagnóstico clínico de NARP (n=3) e 0,8% com amaurose e diabetes (n=1). Foram avaliadas também sete familiares assintomáticos pertencentes a quatro famílias não relacionadas (Tab. 3).

Tabela 3: Classificação dos pacientes quanto ao diagnóstico e/ou suspeita clínica

nº Pacientes	Diagnóstico ou suspeita clínica
32	Epilepsia mioclônica progressiva
28	Mio e/ou encefalopatia de possível etiologia mitocondrial
28	Surdez idiopática
8	Leber
6	MELAS
6	Ataxia
5	Leigh
3	MERRF
3	NARP
1	Amaurose e diabetes
TOTAL=120 pacientes	
7	Familiares assintomáticos
TOTAL=127 indivíduos	

Todos os pacientes e os sete familiares assintomáticos foram submetidos à investigação clínica e molecular para as principais mutações de ponto do mtDNA, excetuando-se para as mutações responsáveis por LHON, que foram testadas apenas em pacientes com alterações visuais. Os pacientes com surdez idiopática foram testados somente para a mutação A3243G que está relacionada à perda de audição em pacientes diabéticos (Tab. 4).

Tabela 4: Mutações de ponto no mtDNA investigadas

Fenótipo	Mutação	Gene afetado
MELAS	3243 A-G	tRNA ^{Leu(UR)}
LHON	3460 G-A	ND1
MERRF	8344 A-G	tRNA ^{Lys}
NARP/MILS	8993 T-G	ATPase 6
NARP/MILS	8993 T-C	ATPase 6
LHON	11778 G-A	ND4
LHON	14484 T-C	ND6

3.4. ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada pela executora do projeto, no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica (DGM), FCM-Unicamp.

3.4.1. Extração de mtDNA genômico de sangue periférico

A extração do mtDNA genômico das amostras colhidas foi feita utilizando-se protocolos manuais de extração de DNA com fenol e clorofórmio. Vinte a 30 ml de sangue venoso foram colhidos de cada indivíduo recrutado para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 min. E a parte intermediária na qual estão localizados os leucócitos foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas soluções RSB 1x (completando um volume de 11ml) e Nonidet (60µl). A solução foi centrifugada a 2500 rpm por 10 min. e o sobrenadante descartado. Foram

adicionados 3,0 ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100 mg/ml) e as amostras incubadas a 37°C por 24h. Após incubação foram acrescentados 3ml de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 min. e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5 ml de fenol e 1,5 ml de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado com 6,0 ml de etanol absoluto. Esse método propiciou a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700 µg).

3.4.2. Pesquisa das mutações

3.4.2.1. Amplificação gênica

A amplificação foi feita pela reação da polimerase em cadeia utilizando-se as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) (Tab. 5). Os fragmentos amplificados compreenderam as regiões que continham as sete mutações de ponto pesquisadas neste trabalho (Tab. 6), (MORAES *et al.*, 1992; JUVONEN *et al.*, 1994; ZEVIANI *et al.*, 1991; UZIEL *et al.*, 1997; SANTORELLI *et al.*, 1997; WISSINGER *et al.*, 1997).

Tabela 5: Seqüências dos “primers” utilizados

Mutação	Primers
A3243G	sense: cct ccc tgt acg aaa gga c anti-sense: gcg att aga atg ggt aca atg
G3460A	sense: ggc tac aac cct tct tcg c anti-sense: ggc tct ttg gtg aag agt tt
A8344G	sense: cta ccc cct cta gag ccc ac anti-sense: gta gta ttt agt tgg ggc att tca ctg taa agc cgt gtt gg
T8993G/C	sense: cta atc acc acc caa caa tga cta at anti-sense: tac tag aag tgt gaa aac gta ggc tt
T8993G	sense: gcc cta gcc cac ttc tta cca ca anti-sense: agg ccg gag gtc att agg agg act
G11778A	sense: aac tac gaa cgc act cac ag anti-sense: gaa gtc ctt gag aga gga tta
T14484C	sense: gta gta tat cca aag ata acc a anti-sense: ctt cta agc ctt ctc cta t

Tabela 6: Tamanho dos produtos de amplificação

Mutação	tamanho dos produtos de amplificação
A3243G	238pb
G3460A	49pb
A8344G	108pb
T8993G	530pb e 402pb
T8993C	530pb
G11778A	49pb
T14484C	154pb

Para todas as reações de amplificação a mistura da reação, com volume total de 25 µl, consistiu de: 2,0 µl da amostra de DNA (200 ηg), 2,5 µl da solução tampão 10X sem MgCl₂) para a enzima *Taq* polimerase (Gibco®), 0,75 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 2,0 µl de cada “primer” (0,01 µg/µl), 5,0 µl de dNTP (1,25mM), 0,3 µl de *Taq* polimerase (Gibco®), 1,3 µl de albumina e 9,15 µl de água bidestilada.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Gene Amp PCR System 2400 - Perkin Elmer®). Consistiram de repetidos ciclos de aquecimento a 94° C para denaturação do DNA, seguido da temperatura de anelamento específica para cada par de “primers”, e então de 72° C para a extensão das novas fitas amplificação. As condições da PCR, estão resumidas na tab. 7, (MORAES *et al.*, 1992; JUVONEN *et al.*, 1994; ZEVIANI *et al.*, 1991; UZIEL *et al.*, 1997; SANTORELLI *et al.*, 1997; WISSINGER *et al.*, 1997).

Tabela 7: Condições das PCRs

Mutação	n° de Ciclos	Temperatura	Tempo
A3243G	25ciclos	94° C -	1min.
		55° C -	1min.
		72° C -	45s
G3460A	25ciclos	94° C -	30s.
		55° C -	30s.
		72° C -	30s
A8344G	25ciclos	94° C -	1,5min.
		55° C -	1,5min.
		72° C -	1min.
T8993G/C	35ciclos	94° C -	1min.
		58° C -	1min.
		72° C -	1min.
T8993G	25ciclos	94° C -	20s.
		60° C -	20s.
		72° C -	45s
G11778A	25ciclos	94° C -	30s.
		54° C -	30s.
		72° C -	30s
T14484C	30ciclos	94° C -	1min.
		51° C	1min.
		72° C -	1min.

A verificação da amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 2% posteriormente corado com brometo de etídeo. O gel foi constituído de: 100 ml de tampão TBE (Tris, Ác. Bórico, EDTA). Misturaram-se 5,0 µl das amostras amplificadas a 2,0 µl de tampão de corrida (glicose 50%, azul de bromofenol 0,25%). Foram utilizados marcadores de peso molecular (DNA Ladder) de 25pb ou 50pb (Gibco -BRL®), de acordo com o tamanho do produto de amplificação. A corrida eletroforética deu-se a 150 V por aproximadamente 30 min. O gel foi então levado ao transiluminador com lâmpada ultravioleta para visualização.

3.4.2.2. Análise de restrição

Para pesquisa das mutações de ponto responsáveis por MELAS (mutação A3243G), MERRF (mutação A8344G), NARP e MILS (mutações T8993G/C) e LHON (mutações G3460A, G11778A, T14484C) foi realizada análise por enzimas de restrição. As regiões amplificadas foram digeridas com as enzimas de restrição específicas de acordo com a tab. 8. As amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em géis de acrilamida 12% (TBE 10 X, bis acrilamida 40%, persulfato de amônio 10%, temed e água deionizada) ou agarose 2% a 150 V, com tempos de corrida específicos para o tamanho dos fragmentos. Após a corrida eletroforética os géis foram corados com brometo de etídeo e levados ao transiluminador com lâmpada ultravioleta. Para documentação foi utilizado o sistema Polaroid® de fotografia instantânea.

Para a análise de restrição da mutação A3243G do mtDNA, os produtos de 238pb obtidos pela reação da PCR foram digeridos com a enzima *Hae* III. Na presença da mutação, além de fragmentos de 32pb, 37pb e 169pb presentes em indivíduos normais devido a dois sítios naturais para a enzima *Hae* III, notam-se duas bandas adicionais, uma de 97pb e outra de 72pb.

Para a análise de restrição da mutação G3460A os fragmentos amplificados de 49pb pela PCR foram digeridos com a enzima *Bsa* HI, o sítio de restrição é abolido na presença da mutação. Na ausência de mutação são observados fragmentos de 22 e 27 pb.

A enzima *Bgl* I foi utilizada para pesquisa da mutação A8344G. Na presença da mutação o amplificado de 108pb é clivado em fragmentos de 73pb e 35pb.

As enzimas *Ava* I e *Hpa* II, na presença das mutações T8993G/C, respectivamente, clivam o fragmento de 530pb em fragmentos de 187pb e 343pb. A enzima *Msp* I também foi utilizada na pesquisa de T8993G, o fragmento de 402pb é clivado em fragmentos de 6pb, 96pb e 300pb na presença de mutação.

Para a análise da mutação G11778A do mtDNA os fragmentos de 49pb obtidos pela reação da PCR foram digeridos com a enzima *Sfa* NI. A mutação abole o sítio de restrição. Em indivíduos normais são criados fragmentos de 17pb e de 32pb.

A enzima *Bsa* BI foi utilizada para pesquisa da mutação T14484C. Na ausência de mutação o fragmento amplificado de 154 pb é clivado em fragmentos de 19pb e 135pb.

Em cada uma das digestões também são observados nos indivíduos com mutação fragmentos de tamanho normal devido à heteroplasmia (Tab.9).

Tabela 8: Enzimas de restrição utilizadas para pesquisa das mutações

Mutação	Enzima de restrição
A3243G	<i>Hae</i> III
G3460A	<i>Bsa</i> HI
A8344G	<i>Bgl</i> I
T8993G	<i>Ava</i> I e <i>Msp</i> I
T8993C	<i>Hpa</i> II
G11778A	<i>Sfa</i> NI
T14484C	<i>Bsa</i> BI

Tabela 9: Produtos da digestão com enzimas de restrição. Os produtos de amplificação após submetidos à digestão pelas enzimas específicas apresentam fragmentos de digestão de diferentes tamanhos. Os números em negrito correspondem a fragmentos de tamanho normal que devido à heteroplasmia também são observados em pacientes com mutação

Mutação	Tamanho dos produtos de amplificação	Enzima de restrição	Tamanho dos produtos de digestão
A3243G	238pb	<i>Hae</i> III	sem mutação: 32pb, 37pb, 169pb com mutação: 32pb, 37pb, 72pb, 97pb e 169pb
G3460A	49pb	<i>Bsa</i> HI	sem mutação: 22pb e 27pb com mutação: 22pb, 27pb e 49pb
A8344G	108pb	<i>Bgl</i> I	sem mutação: 108pb com mutação: 35pb, 73pb e 108pb
T8993G	530pb	<i>Ava</i> I	sem mutação: 530pb com mutação: 187pb, 343pb e 530pb
T8993G	402pb	<i>Msp</i> I	sem mutação: 402pb, com mutação: 6pb, 96pb, 300pb e 402pb
T8993C	530pb	<i>Hpa</i> II	sem mutação: 108pb com mutação: 35pb, 73pb e 108pb
G11778A	49pb	<i>Sfa</i> NI	sem mutação: 22pb e 27pb com mutação: 22pb, 27pb e 49pb
T14484C	154pb	<i>Bsa</i> BI	sem mutação: 19pb, 135pb com mutação: 19pb, 135pb e 154pb

3.4.2.3. Seqüenciamento

As mutações encontradas foram confirmadas pelo seqüenciamento manual das regiões críticas do mtDNA para as síndromes citadas. O seqüenciamento dos produtos da PCR foi realizado com a utilização do kit da *Thermo Sequenase* (Amersham/Pharmacia/Biotech®). Os fragmentos amplificados foram tratados com exonuclease por 30min. e em seguida foram feitas reações sense e anti-sense utilizando-se em cada uma os “primers” específicos juntamente com nucleotídeos radioativos (α -dNTP P^{33}) e o mix dGTP. O seqüenciamento se deu em aparelho termociclador. Foram misturados 4,0 μ l dos produtos do seqüenciamento a 8,0 μ l de “stop solution” (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol, xileno ciamol e água deionizada) e aplicados em géis de seqüenciamento (uréia, bis acrilamida 40%, persulfato 25%, temed, TBE 20X e água deionizada). A leitura dos alelos foi feita por autoradiografia após aproximadamente três dias de exposição a filmes de raio-X sob temperatura ambiente.

3.4.2.4. Quantificação da heteroplasmia

A proporção de mtDNA mutante e normal foi determinada nos produtos da PCR após a digestão com as enzimas de restrição específicas e eletroforese em gel de acrilamida 12% corado com brometo de etídeo (modificado de MATTHEWS *et al.*, 1995). O gel foi fotografado com a Câmara Digital Kodak (DC 290 Zoom) sob iluminação UV. O brometo de etídeo intercala-se com o DNA e o complexo assim formado emite fluorescência sob radiação UV. A intensidade de fluorescência é proporcional ao total de DNA em cada banda no gel de acrilamida. A imagem foi analisada e processada com o uso do sistema Kodak EDAS 290 (electrophoresis documentation analysis system) e a porcentagem de mtDNA mutante foi calculada pela análise da densidade relativa das bandas captadas pelo aparelho.



4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os pacientes foram avaliados separadamente dentro de suas categorias clínicas (ver Tab.3). Os achados mais freqüentes em pacientes com diagnóstico de epilepsia mioclônica progressiva (n=32) foram: 84% (n = 27) com crises motoras tônico-clônicas; 81% (n= 26) com alterações cognitivas; 44% (n= 14) com diminuição da acuidade visual; 50% (n= 16) com disartria; 60% (n= 19) com incoordenação de membros e 66% (n= 21) da marcha; 53% (n=17) com tremores; 66% (n= 21) com movimentos involuntários; 44% (n= 14) com ataxia.

Em pacientes com suspeita de encéfalo e/ou miopatia mitocondrial (n= 28) os aspectos clínicos de maior incidência foram: crises motoras tônico-clônicas em 43% (n= 12); alterações cognitivas em 46% (n= 13); diminuição da acuidade visual em 46% (n= 13).

Para os pacientes que apresentaram uma clínica mais fechada para Leber, MELAS, Leigh, MERRF e NARP a freqüência das principais características clínicas avaliadas em cada categoria encontram-se distribuídas na tab.10a, 10b.

Tabela 10a: Frequência das principais características clínicas nas diferentes categorias

Avaliação clínica	Leber	MELAS	Leigh	MERRF	NARP
Número de indivíduos	8	6	5	3	3
Famílias	6	6	5	3	2
Idade de início dos sintomas	14,5	7,85	4,4	18,3	36,3
Faixa da idade de início	7-20	3m-24a	6m-18	7m-35	29-50
Feminino/Masculino	3/5	2/4	2/3	1/2	1/2
Ep. mioclônica progressiva	0	≈16%(1)	0	100%	0
“Strokelike”	0	100%	20%(1)	0	0
Alterações cognitivas	0	≈67%(4)	40%	100%	0
Crises tônico-clônicas		≈50%(4)	20%(1)	não aval.	0
Nistagmo	25%(2)	0	50%	≈33%(1)	≈33%(1)
Oftalmoplegia					100%
↓ Acuidade visual	100%	83%(5)	20%(1)	≈33%(1)	≈67%(2)
Atrofia óptica	100%		20%(1)		≈33%(1)
Alterações retinianas	≈37%(3)				
Retinite pigmentosa	25%(2)				0
↓ Acuidade auditiva	0%	50%		≈33%(1)	≈33(1)
Disartria		≈ 33%(2)			≈33(1)
Disfagia		≈ 33% (2)			

Tabela 10b: Frequência das principais características clínicas nas diferentes categorias

Avaliação clínica	Leber	MELAS	Leigh	MERRF	NARP
Incoordenação de membros		12,5% (1)	20%(1)		≈67%(2)
Incoordenação da marcha		≈ 17% (1)		100%	100%
Tremores			≈ 17% (1)		≈ 33% (1)
Cãibras			50% (3)		≈ 33%(1)
Distonia		50% (3)	20% (1)		
Miotonia			40% (2)		
Necrose dos gânglios da base			40%(2)		
Hipotonia		≈17% (1)		100%	
Raged-red fibers		≈17% (1)			
Demência		≈33% (2)			
Neuropatia					100%
Hemiparesia		≈33%(2)			
Cefaléia			≈17%(1)		
AVC		50%			
Vômito		50%		1	
↑ Lactato		50%	20%(1)		
Ataxia					100%
Mutação/nº de famílias	37,5%/(3)/3	≈17%(1)/1	0	≈33%(1)/1	≈ 67% (2)/1

(): número de indivíduos; AVC: acidente vascular; ↑:aumento

4.2. AVALIAÇÃO MOLECULAR

Foram encontradas mutações em 12 indivíduos: cinco, pertencentes à mesma família, apresentaram mutações A3243G: um paciente com quadro clínico compatível com MELAS (caso 1) e quatro familiares assintomáticos (mãe: caso 2, irmãs casos 3-5); a mutação A8344G foi encontrada em uma paciente com doença neurodegenerativa e lipomas gigantes (caso 6); cinco indivíduos apresentaram a mutação G11778A, sendo dois irmãos com doença neurodegenerativa (casos 7 e 8), um paciente com diagnóstico de Leber (caso 9) e sua mãe assintomática (caso 10) e um caso isolado (caso 11); um paciente com Leber apresentou a mutação G3460A (caso 12) (tab.11). As mutações T8993G/C e T14484C não foram encontradas.

Tabela 11: Distribuição dos casos com mutação no mtDNA, quanto ao sexo, à suspeita clínica, à idade de aparecimento dos sintomas, à idade atual, à mutação encontrada e à porcentagem de heteroplasmia

Casos/ Família	Sexo	Clínica	Idade de início dos sintomas	Idade atual	Mutação encontrada	mtDNA mutante
1/1	M	MELAS	7	15 anos	A3243G	44%
2/1	F	assint.	-	39 anos	A3243G	6,0%
3/1	F	assint.	-	19 anos	A3243G	<5,0%
4/1	F	assint.	-	18 anos	A3243G	38%
5/1	F	assint.	-	06 anos	A3243G	<5,0%
6/2	F	MERRF	36 anos	41 anos	A8344G	80%
7/3	F	NARP	30 anos	40 anos	G11778A	65%
8/3	M	NARP	29anos	35 anos	G11778A	60%
9/4	M	LEBER	15 anos	16 anos	G11778A	100%
10/4	F	assint.		45 anos	G11778A	100%
11/5	M	LEBER	15 anos	17 anos	G11778A	100%
12/6	M	LEBER	18 anos	19 anos	G3460A	100%

M: masculino; F: feminino; assint.: assintomático.

4.3. FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM AMOSTRA SANGÜÍNEA

A mutação A3243G responsável por MELAS e por surdez em pacientes com *diabetes mellitus*, herdada maternalmente, foi observada em um paciente e representou uma frequência de 16,5 % em relação aos casos de suspeita clínica de MELAS (n=6) e de 0,8% em relação à amostra total de pacientes (n=120). Considerando-se apenas os pacientes com doenças neurodegenerativas (n=92), isto é, não incluindo-se os pacientes com surdez idiopática, a frequência observada foi de 1,1%. A mutação A8344G responsável por MERRF, um caso, representou a frequência de 33% em relação aos casos de suspeita clínica de MERRF (n=3) e 1,1 % da amostra de pacientes com doenças neurodegenerativas (n=92). A mutação G11778A responsável por Leber foi observada em dois pacientes com Leber com frequência de 25% na categoria clínica de suspeita de Leber (n=8) e em dois casos com suspeita de NARP; a frequência da mutação em relação à amostra (n=92) foi de 4,3%. A mutação G3460A, em um caso, representou uma frequência de 12,5% em relação à categoria (n=8) e 1,1% em relação à amostra (n=92).

A frequência relativa das mutações encontradas em relação às famílias (n=106) para a mutação A3243G foi de 0,94% (1/106). Para as demais mutações os pacientes com surdez idiopática não foram incluídos, sendo o total de famílias de n=78. A mutação A8344G foi observada em uma família representando uma frequência de 1,28% (1/78), a mutação G11778A foi observada em três famílias perfazendo uma frequência de 3,8% (3/78). A mutação G3460A foi encontrada em uma família representando a frequência de 1,28% (1/78).

4.4. DESCRIÇÃO DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO

4.4.1. Caso 1

No indivíduo portador da mutação A3243G a história clínica revelou que a partir dos sete anos de idade este apresentou crises epiléticas parciais complexas com generalização secundária, involução do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), níveis elevados de lactato e enzimas musculares. A biópsia muscular revelou fibras vermelhas

rajadas (Figs. 1, 2 e 3) e a neuroimagem mostrou hipoatenuação do sinal em região parietoccipital bilateralmente (Figs. 4, 5 e 6). Atualmente, a criança apresenta déficit cognitivo, hipoacusia, visão subnormal, hiporreflexia, ataxia apendicular e axial. O ponto de mutação A3243G foi detectado em condições de heteroplasmia no caso índice, em três irmãs (19, 18 e 6 anos de idade) e na mãe (39 anos de idade) (Figs. 7 e 8.), sendo que estas são assintomáticas até o momento.

Figura 1: Biópsia muscular corada com SDH evidenciando as fibras vermelhas rajadas (RRF), devido ao acúmulo de mitocôndrias anormais

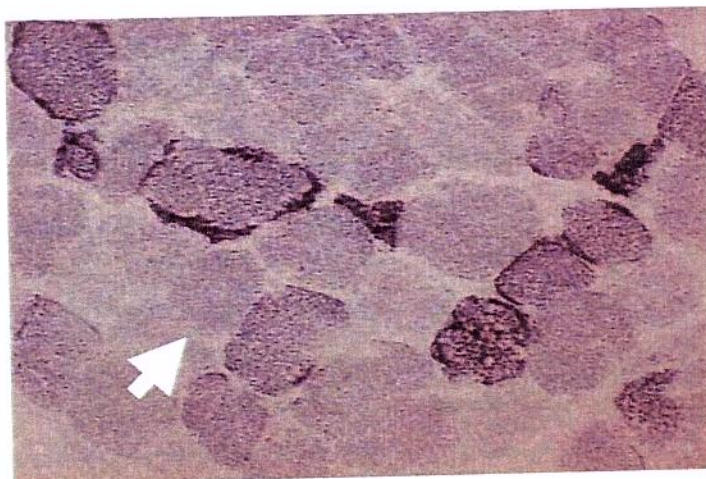


Figura 2: Biópsia muscular corada com tricrômio de Gomori evidenciando o acúmulo de mitocôndrias anormais na membrana sarcolemal

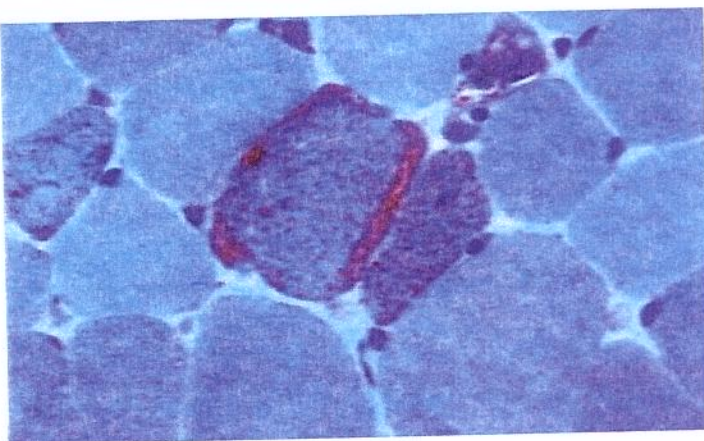
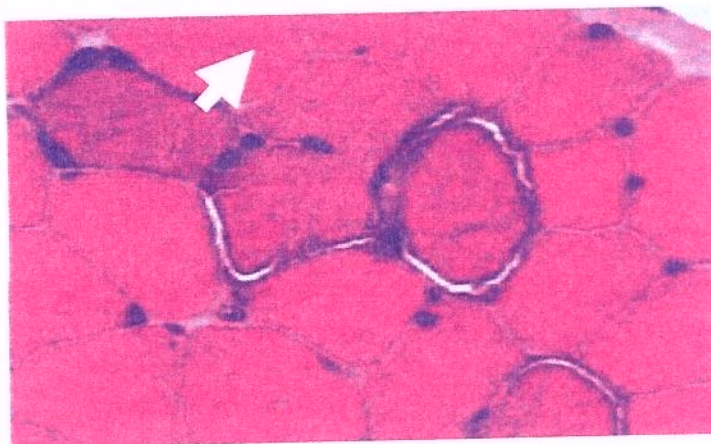
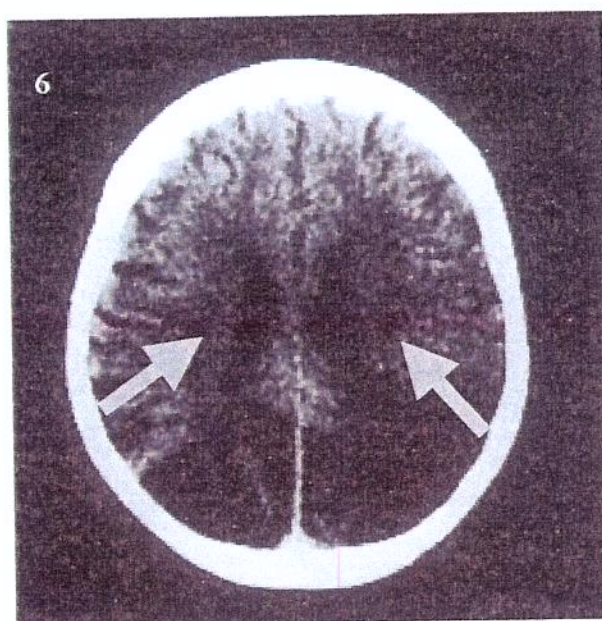
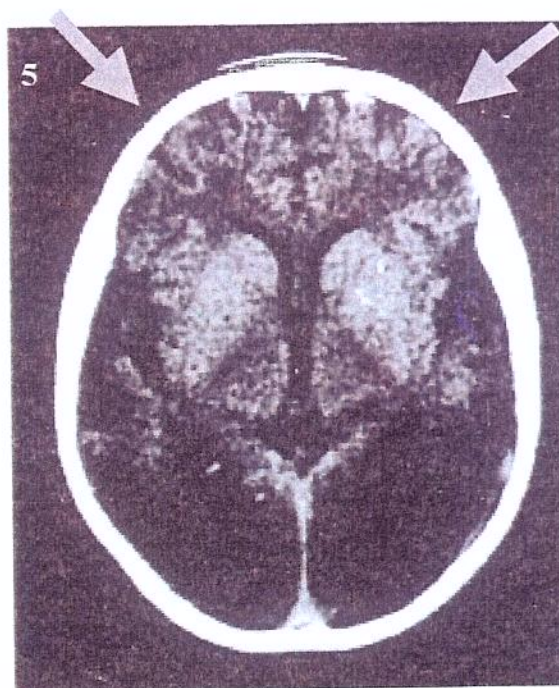
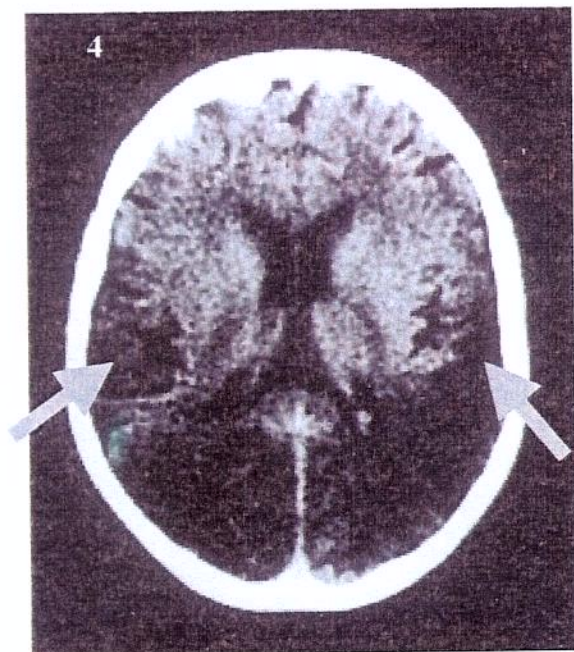
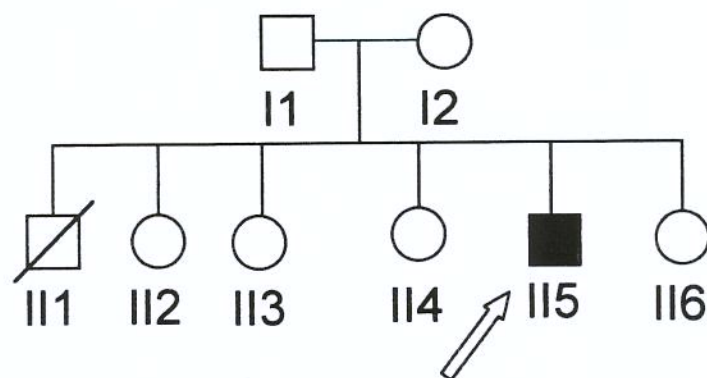


Figura 3: Biópsia muscular corada com hematoxilina/eosina evidenciando as RRFs





Figuras 4, 5 e 6: CT de crânio: quadro de acidente vascular isquêmico em território de artérias cerebrais posteriores em fase subaguda com quebra de barreira



■ MELAS

Figura7: Heredograma. O indivíduo II.5 apresenta a mutação A3243G e clínica de MELAS. I.2, II.3, II.4 e II.6 são assintomáticas, mas apresentam a mutação A3243G. O indivíduo II.2 não foi testado. O indivíduo II.1 faleceu em decorrência de uma pneumonia

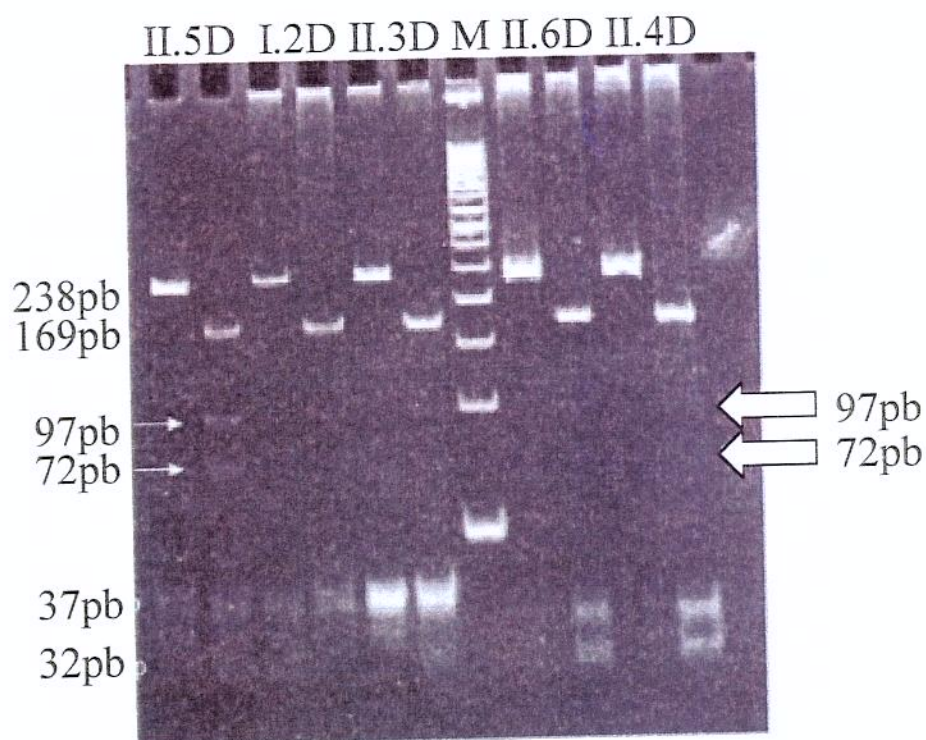


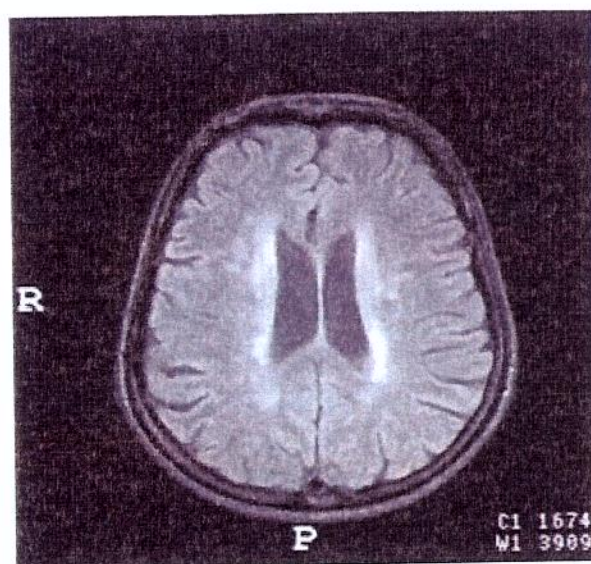
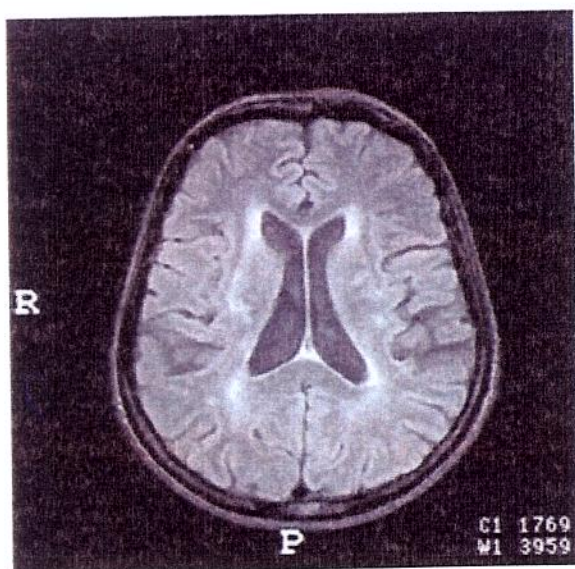
Figura 8: Gel de acrilamida 12% mostrando a análise de restrição para mutação A3243G do mtDNA. Fragmentos de 238pb foram obtidos pela reação da PCR. Os produtos amplificados foram digeridos com a enzima *Hae* III. Na presença da mutação notam-se duas bandas adicionais: 97 e 72pb, indicadas pelas setas. D: amostra digerida; M: marcador de peso molecular de 50pb

4.4.2. Caso 6

Paciente de 41 anos que há cinco anos vem apresentando crises mioclônicas, crises tônico-clônicas generalizadas, declínio cognitivo, ataxia e diminuição da acuidade auditiva. O exame físico revelou ainda a presença de múltiplos lipomas por todo o corpo e lipoma gigante em região cervical (Figs. 9 e 10). A ressonância magnética de crânio revelou alteração de sinal em substância branca periventricular; atrofia de bulbo, medula, cervical e cerebelo e vários pontos de hipersinal em tronco cerebral (Figs. 11 e 12). A paciente relata que nunca conseguiu engravidar. O ponto de mutação A8344G foi detectado e fragmentos de 108pb, 73pb e 35pb foram identificados, evidenciando a presença de heteroplasmia (Fig. 13).



Figuras 9 e 10: Lipomas gigantes. Fotos mostrando lipomas cervicais gigantes evidenciando a exuberância da apresentação clínica desta paciente



Figuras 11 e 12: Imagens de ressonância magnética em um aparelho de alta resolução 2T, mostram cortes axiais com evidentes alterações de substância branca

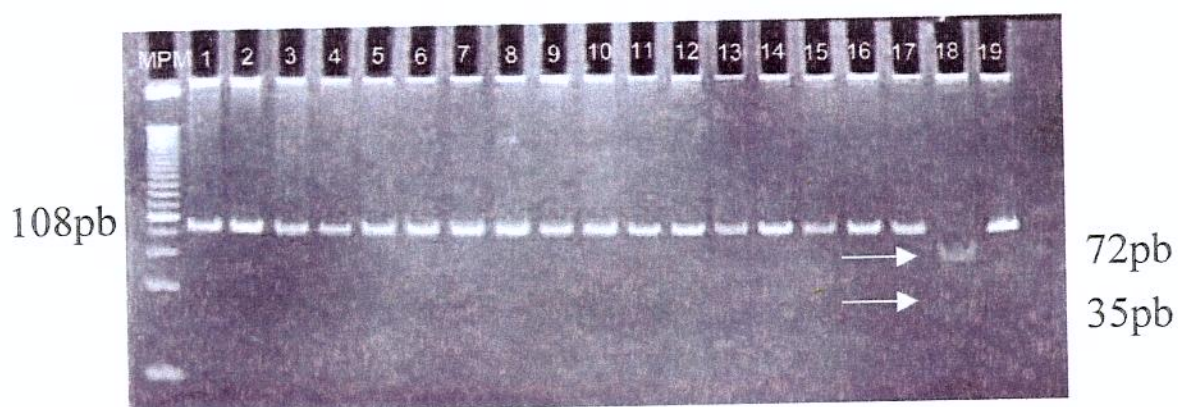


Figura 13: Gel de acrilamida mostrando a análise de restrição para a mutação A8344G. A amostra 18 corresponde ao caso 6, que apresenta a mutação em heteroplasma

4.4.3. Casos 7 e 8

Dois irmãos, filhos de pais consangüíneos, apresentando doença neurodegenerativa de início na idade adulta. O homem de 35 anos apresentou, de forma progressiva, a partir dos 29 anos de idade, dificuldade na marcha, alteração da coordenação motora em membros, diminuição da força muscular, oftalmoplegia e alterações de sensibilidade nos membros inferiores. A fundoscopia não revelou atrofia óptica ou outras alterações retinianas. Os exames de neuroimagem demonstraram atrofia cortical e cerebelar. A irmã, de 40 anos, iniciou com queixas a partir dos 30 anos de idade, e apresentou de forma também progressiva: ptose palpebral bilateral, desequilíbrio e alterações de sensibilidade em pés e mãos. O exame de fundo de olho revelou atrofia óptica e cicatrizes de coriorretinite. O ponto de mutação G11778A foi detectado em ambos os irmãos. Foram obtidos fragmentos de 49pb, 32pb e 17pb evidenciando a presença de heteroplasmia no sangue em ambos os pacientes (Fig.14).

4.4.4. Caso 9

O paciente de 16 anos L.S.A. apresentou perda aguda da acuidade visual aos 15 anos. Atualmente apresenta atrofia óptica e foi encaminhado para teste molecular com suspeita clínica de Leber. A hipótese foi confirmada pela presença da mutação G11778A em homoplasmia. A mãe de 45 anos (caso 10) também apresentou a mutação em homoplasmia no sangue, mas até o momento é assintomática (Fig.14).

4.4.5. Caso 11

Paciente com suspeita de Leber, atualmente com 17 anos, apresentou a partir dos 15 anos baixa acuidade visual, que atualmente é de 20/400 em ambos os olhos; Ishihara 0/6 ambos os olhos e papilas pálidas. A análise do DNA revelou a mutação G11778A em homoplasmia no sangue (Fig.14).

4.4.6. Caso 12

O paciente apresentou baixa acuidade visual lenta e progressiva desde os 18 anos, primeiro no olho direito e depois no esquerdo. Não possui visão de cores, apresenta edema de papila bilateral e hiperemia. O exame molecular revelou a mutação G3460A em homoplasmia no sangue (Fig. 14).

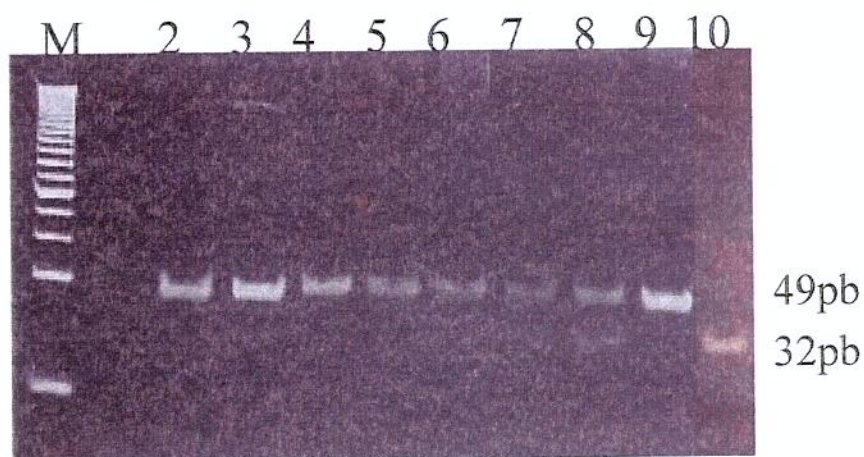


Figura 14: Gel de acrilamida ilustrando a análise de restrição. M: marcador de peso molecular de 25 pb. Em 2 (caso 12) a mutação G3460A está presente em homoplasmia, em 3 produto da PCR sem digestão. Em 4 (caso 11), 5 (caso 10) e 6 (caso 9) apenas um fragmento de 49 pb é visualizado indicando a presença da mutação G11778A em homoplasmia. Em 7 (caso 7) e 8 (caso 8) ocorre heteroplasmia. Em nove produto de PCR sem digestão e em 10 o controle normal



5. DISCUSSÃO

5.1. DISTRIBUIÇÃO CLÍNICA DA AMOSTRA

As doenças mitocondriais constituem uma das mais freqüentes entidades clínicas encontradas no grupo das doenças neurodegenerativas dos adultos (MAJAMAA *et al.*, 1998). As síndromes MELAS, MERRF, NARP, MILS e LHON são entidades herdadas maternalmente e vem sendo, na última década, extensivamente estudadas do ponto de vista clínico, mas a variabilidade fenotípica de tais patologias muitas vezes impede uma conclusão diagnóstica definitiva, dificultando o aconselhamento genético (DE VRIES *et al.*, 1994; SANTORELLI *et al.*, 1997; MAJAMAA *et al.*, 1998).

A amostra estudada refletiu este fato pela dificuldade no fechamento dos diagnósticos. Uma parte significativa desta foi formada por pacientes com encéfalo e/ou miopatia de etiologia desconhecida (n=28). Em alguns casos a suspeita foi mais forte para alguma síndrome específica, como Leber (n=8), MELAS (n=6), Leigh (n=5), MERRF (n=3) e NARP (n=3). Destes apenas um possuía biópsia muscular e apresentou RRFs direcionando a suspeita para as síndromes de MELAS e MERRF.

Nos pacientes com surdez idiopática (n=28) foi pesquisada a mutação A3243G, pois esta está associada a casos de *diabetes mellitus* e perda de audição sensorineural (REARDON *et al.*, 1992; VAN DEN OUWELAND *et al.*, 1992). Estes pacientes já haviam sido testados para as mutações nos genes da conexina 26 (35delG), da miosina 15, da miosina 7a, Mites, Pax e COCH, em pesquisas desenvolvidas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) sob orientação da Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato. Porém não havia informações quanto a estes serem ou não diabéticos.

5.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Muitos pacientes apresentaram como característica principal a síndrome de epilepsia mioclônica progressiva (n=32). Estas formam um grupo heterogêneo de desordens hereditárias primariamente caracterizadas por crises mioclônicas e tônico-clônicas, ataxia, deterioração intelectual progressiva e degeneração neuronal. (MENKES, 1995). Estes achados clínicos correspondem aos dos pacientes analisados dentro da categoria de

epilepsias mioclônicas progressivas: crises motoras tônico-clônicas foram observadas em 84% dos pacientes, alterações cognitivas em 81%, diminuição da acuidade visual em 44%; disartria em 50% e ataxia em 44%. Nenhum dos 32 pacientes neste grupo apresentou a mutação A8344G responsável por MERRF, o que não foge ao esperado, já que este grupo inclui, além da síndrome de MERRF, a doença de Lafora, as lipofuscinoses-ceróides neuronais, as sialidosis, a doença de Unverricht- Lundborg e outras dezenas de causas específicas (MENKES, 1995; GUERREIRO & GUERREIRO, 1996).

Embora a mutação A3243G esteja associada a MELAS, um crescente número de indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos que carregam o gene mutante tem sido descrito. Até o momento não é possível determinar quais portadores irão desenvolver a doença. Em geral, a heteroplasmia está correlacionada ao quadro clínico de portadores de mutações de ponto envolvendo genes de tRNA, havendo evidências da relação entre a severidade clínica e altas porcentagens de mtDNA mutante (CHOMYN *et al.* 1991; CIAFALONI, RICCI, SHANSKE, 1992; CHINNERY *et al.*, 1997). As irmãs e a mãe do propósito embora sejam assintomáticas apresentam a mutação, e a irmã de 18 anos de idade (caso 4) possui uma proporção de mtDNA mutante semelhante ao do paciente (caso 1), cuja clínica de MELAS é exuberante. O que está em acordo com a literatura já que em MELAS a porcentagem de heteroplasmia encontrada no sangue não corresponde necessariamente à severidade do quadro clínico e pode apresentar-se menor do que a taxa de heteroplasmia obtida no músculo (SUOMALAINEN *et al.*, 1993; SUE *et al.*, 1998; TAYLOR *et al.*, 1998), além disto, a detecção de mtDNA no sangue de pacientes com MELAS parece ser dependente da idade (SUE *et al.*, 1998). Diferentemente do que ocorre em MELAS, nas síndromes de MERRF e NARP a porcentagem de heteroplasmia encontrada no sangue é proporcional à severidade do quadro clínico (SUOMALAINEN *et al.*, 1993; SUE *et al.*, 1998; TAYLOR *et al.*, 1998).

O fato de um único filho ser afetado nesta família concorda com um estudo de CHINNERY *et al.* (1997) em que mães com mtDNA mutante no sangue com valores abaixo de 20% apresentam uma incidência de filhos afetados de 25%, já que a mãe (caso2) apresenta menos que 5,0% de mtDNA mutante.

Apesar da paciente que apresentou a mutação A8344G possuir quadro clínico típico de MERRF os achados de alterações de substância branca nos exames de neuroimagem são pouco usuais em pacientes com a síndrome de MERRF, evidenciando a grande heterogeneidade clínica envolvida nesses casos.

Conquanto o quadro clínico apresentado pelos dois irmãos com a mutação G11778A seja o de uma doença neurodegenerativa disseminada mais compatível com o diagnóstico de NARP, a mutação mitocondrial encontrada foi a associada a atrofia óptica de Leber. Além disso, o fato de nossos pacientes serem filhos de pais consanguíneos poderia ter sugerido inicialmente a presença de doença autossômica recessiva. Tal achado demonstra que a pesquisa de mutações mitocondriais deve ser realizada sempre que esse diagnóstico for suspeito, uma vez que a correlação entre fenótipo e genótipo é muito complexa nesses pacientes.

5.3. AVALIAÇÃO MOLECULAR

A identificação das mutações de ponto nestes pacientes teve grande importância para a definição diagnóstica, uma vez que o quadro clínico das diferentes síndromes mostrou-se bastante variável e sobreponível.

Dos cinco pacientes com suspeita clínica de síndrome de Leigh nenhum apresentou as mutações T8993G/C no mtDNA responsáveis pela doença de Leigh herdada maternalmente (MILS). Este resultado está dentro do esperado já que, além desta síndrome ser rara com incidência de uma em 32.000 crianças com menos de seis anos (DARIN *et al.*, 2001), apresenta heterogeneidade genética, com herança autossômica recessiva em vários *loci*, como por exemplo mutações no genes nucleares *surfeit-1*, e no gene *SDHA* e com herança recessiva ligada ao X (DI MAURO & DE VIVO, 1996; ZHU *et al.*, 1998).

Os dois pacientes com Leber e a mutação G11778A e o paciente com a mutação G3460A apresentaram o início dos sintomas antes dos 20 anos de idade, sendo os três do sexo masculino e homoplásmicos. Dados de literatura mostram que 73% dos afetados são homens e apenas 14% apresentam heteroplasmia (NEWMAN, LOTT, WALLACE, 1991;

CHALMERS & SCHAPIRA, 1999). Os indivíduos afetados apresentam a idade de início de 27,6 anos, com uma amplitude de início dos 8 aos 60 anos. Aproximadamente 58% dos pacientes apresentam sintomas oftalmológicos adicionais. Um total de 55% dos pacientes apresentam início simultâneo de perda de visão em ambos os olhos (NEWMAN *et al.*, 1991). LHON geralmente é associada a mutações homoplásmicas tanto nos pacientes quanto nos parentes da mesma linhagem materna assintomáticos. Mesmo naqueles heteroplásmicos não há correlação entre heteroplasmia e quadro clínico (ZEVIANI *et al.*, 1998).

A mãe (caso 10) de um dos pacientes (caso 9) apresentou-se homoplásmica e assintomática, indicando uma penetrância reduzida e o maior acometimento de indivíduos do sexo masculino conforme relatos na literatura (CHALMERS & SCHAPIRA, 1999).

5.4. FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES

Na amostra total de 120 pacientes pesquisada neste estudo obteve-se a confirmação molecular em 5,8% (n=7/120). Desconsiderando-se os casos de surdez idiopática, isto é, nos pacientes com doenças neurodegenerativas de possível etiologia mitocondrial, a confirmação molecular subiu para 7,6% (n=7/92).

Em um grande estudo sobre a incidência de erros inatos do metabolismo, realizado na Columbia Britânica, Canadá, com dados obtidos de registros do principal centro de referência para diagnósticos metabólicos, foi observada apenas uma mutação de ponto no mtDNA (T8993G) em 408.667 nascimentos (APPLEGARTH *et al.*, 2000). Em outro estudo que abrangeu um período de sete anos, foram avaliados 116 pacientes com encefalopatias e miopatias de causa indefinida na única unidade de neurologia do Norte da Finlândia que possui uma população pediátrica de 97.609. Apenas um paciente apresentou uma mutação no mtDNA ($\approx 0,86\%$), (UUSIMAA *et al.*, 2000).

Em um estudo de revisão com dados a partir de registros do Oeste da Suécia, DARIN *et al.* (2001) avaliaram 32 pacientes com menos de 16 anos e encontraram quatro casos de mutação de ponto no mtDNA (12,5%).

Neste estudo a amostra de pacientes obtida não foi excessiva em se tratando de um hospital universitário (HC-Unicamp) que atende população pediátrica e adulta composta por pacientes de diagnóstico complexo como referido a um centro terciário de atenção à saúde.

Embora a frequência de mutações de ponto no mtDNA encontrada ter sido relativamente baixa (7,6%) em pacientes com doença neurodegenerativa de possível etiologia mitocondrial, a presença das mutações foi decisiva na condução clínica dos pacientes positivos, principalmente no que se refere ao aconselhamento genético do paciente e familiares.

5.5. ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Mesmo com os avanços na genética mitocondrial, o diagnóstico pré-natal não está disponível para a maioria das doenças mitocondriais herdadas maternalmente pois não é possível prever com segurança como se dará a segregação de mtDNA heteroplásmico para os diferentes tecidos. Os riscos de recorrência para os diversos fenótipos têm sido estimados com base nos níveis de mtDNA mutante materno (POULTON & MARCHINGTON, 2000).

Teoricamente a transmissão de mtDNA pode ocorrer para toda a prole, mas há evidências de que isto nem sempre ocorre. LARSSON *et al.* (1992) publicaram um estudo em que mães com a mutação A8344G em menos que 33% do seu mtDNA passam esta para apenas 50% dos filhos, embora o número de indivíduos avaliados no estudo tenha sido pequeno.

CHINNERY *et al.* (1998) publicaram um estudo em que mães com mtDNA mutante no sangue com valores abaixo de 20% apresentam uma incidência de filhos afetados de 25%.

Nos pacientes com Leber a detecção de uma das três principais mutações no sangue é importante tanto na confirmação do diagnóstico quanto no prognóstico. Em um estudo em 85 famílias com LHON calcularam-se os riscos de recorrência para parentes de indivíduos afetados. Os valores foram: 30% para irmãos, 8% para irmãs, 46% para sobrinhos, 10% para sobrinhas, 31% para primos em primeiro grau e 6% para primas em primeiro grau (HARDIN *et al.*, 1995).

5.6. TRATAMENTO PARA AS DOENÇAS MITOCONDRIAIS

Infelizmente não há tratamento curativo para as doenças mitocondriais com manifestações neuromusculares. A principal forma de tratamento tem sido a terapia de apoio que busca a melhora da qualidade de vida do paciente, como por exemplo a cirurgia para ptose e a colocação de marcapasso em pacientes com defeitos de condução cardíaca.

O desenvolvimento de exercícios aeróbicos parecem melhorar a capacidade aeróbica e baixar o nível de lactato sangüíneo já que aumentam o número de mitocôndrias e a atividade enzimática e combatem o declínio da função mitocondrial relacionado à idade (NARDIN & JOHNS, 2001).



6. CONCLUSÃO

A amostra deste estudo foi ampla permitindo um estudo da frequência das mutações de ponto no mtDNA em um grande número de pacientes com doenças neurodegenerativas.

O teste molecular a partir de amostra sanguínea apresentou-se como uma excelente ferramenta no fechamento dos diagnósticos dos casos positivos, além de apresentar vantagens em relação à biópsia muscular por ser um processo simples, fácil e não invasivo. Foram detectadas mutações de ponto mesmo em indivíduos assintomáticos.

A oportunidade de confirmação diagnóstica baseada na análise molecular, em particular nos casos leves e nos sem comprometimento neurológico, é de grande valia no aconselhamento genético de indivíduos afetados e (ou) seus familiares.

O quadro clínico pouco usual de três pacientes reforça a importância de investigação dos pontos de mutação no mtDNA em casos de doença neurodegenerativa progressiva, mesmo na ausência de quadro clínico típico.

Este estudo tem grande relevância, pois não há nenhuma publicação na literatura quanto à frequência das diferentes mutações mitocondriais de ponto em pacientes brasileiros portadores de doenças neurodegenerativas.

As frequências observadas reforçam a contribuição significativa das doenças mitocondriais em portadores de doenças neurodegenerativas.

A ausência das mutações pesquisadas nos pacientes restantes, principalmente naqueles com fortes evidências clínicas, confirma a grande heterogeneidade genética associada a essas patologias.

A presença da mutação A3243G na mãe e em três irmãs assintomáticas do paciente com MELAS, e na mãe de um paciente com Leber, reforça a importância da realização do exame molecular do DNA mitocondrial em mulheres assintomáticas relacionadas a portadores de mitocondriopatias, para posterior aconselhamento genético.



7. SUMMARY

Mitochondrial diseases are genetic and clinically heterogeneous entities that are variable in age of onset, clinical severity and evolution. They are classified in abnormalities of nuclear DNA or mitochondrial DNA (mtDNA). Point mutations are found in mitochondrial genomes and most frequent phenotypes are MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), MERRF (myoclonic epilepsy and ragged-red fibers), NARP (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa), MILS (maternally inherited Leigh syndrome) and LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy).

The objectives of this study were:

- a-) To search for the presence of the most frequently described point mutations in the mtDNA in patients with clinical features suggesting MELAS, MERRF, NARP, MILS or LHON.
- b-) To study the relationship between genotype and phenotype in patients with mutation.
- c-) Quantify the heteroplasmy in affected individuals.

Mitochondrial DNA was isolated from peripheral leukocytes and was purified by use of the phenol chloroform method. PCR was used to amplify the critical regions. Restriction-fragment analysis was used to screen for mtDNA point mutations, that was confirmed by DNA sequencing. The percentage of mutant mtDNA was determined by the system Kodak EDAS 290.

We screened 120 patients for seven points of mutation responsible for MELAS, MERRF, NARP, MILS and LHON and we identified seven patients with a mtDNA point mutation. Eight patients were suspected of Leber disease, in two of them, we found the G11778 mutation, and another patient presented the G3460A mutation. One patient with the clinical diagnosis of MELAS, as well as his mother and three asymptomatic sisters, showed the A3243G mutation. One patient had the A8344G mutation responsible for MERRF and two brothers with NARP features had the G11778A mutation that was associated with Leber disease. No mutation at 8993 nucleotide was observed.



8. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- APPLEGARTH, D. A.; TOONE, J. R.; LOWRY, R. B.- Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-96. **Pediatrics**, **105** (1): 1-10, 2000.
- AUSTIN, S. A.; VRIESENDORP, F. J.; THANDROYEN, F. T.; HECHT, J. T.; JONES, O. T.; JOHNS, D. R.- Expanding the phenotype of the 8344 transfer RNA^{lysine} mitochondrial DNA mutation. **Neurology**, **51**: 1447-50, 1998.
- BROWN, M. D.; VOLJAVEC, A. S.; LOTT, M. T.; TORRONI, A.; YANG, C-C.; WALLACE, D. C.- Mitochondrial DNA Complex I e III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Genetics**, **130**: 163-73, 1992.
- CHALMERS, R. M.; DAVIS, M. B.; SWEENEY, M. G.; WOOD, N. W.; HARDING, A. E.- Evidence against an X-linked visual loss susceptibility *locus* in Leber hereditary optic neuropathy. **Am J Hum Genet**, **59**: 103-8, 1996.
- CHALMERS, R. M. & SCHAPIRA, A. H. V.- Clinical, biochemical in the molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. **Biochim Biophys Acta**, **1410**: 147-58, 1999.
- CHAN, C.; MACKEY, D. A.; BYRNE, E.- Sporadic Leber hereditary optic neuropathy in Australia and New Zeland. **Aus NZ J Ophthalmol**, **24**: 7-14, 1996.
- CHINNERY, P. F.; HOWELL, N.; LIGHTOWLERS, R. N.; TURNBULL, D. M.- MELAS and MERRF. The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. **Brain**, **12** (10): 1889-94, 1998.
- CHINNERY, P. F.; HOWELL, N.; LIGHTOWLERS, R. N.; TURNBULL, D. M.- Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. **Brain**, **120** (10): 1713-21, 1997.
- CHOMYN, A.; MEOLA, G.; BRESOLIN, N.; LAI, S. T.; SCARLATO, G.; ATTARDI, G.- In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. **Cell Biol**, **11**: 2236-44, 1991.
- CIAFALONI, E.; RICCI, E.; SHANSKE, S.- MELAS: Clinical features, biochemistry and molecular genetics. **Ann Neurol**, **31**: 391-8, 1992.

- DARIN, N.; OLDFORS, A.; MOSLEMI A. R.; HOLME, E.; TULINIUS, M.- The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. **Ann Neurol**, **49** (3): 377-83, 2001.
- DE VRIES, D.; DE WIJS, I.; RUINTENBEEK, W.; BEGEER, J.; SMIT, P.; BENTLAGE, H.; VAN OOST, B.- Extreme variability of clinical symptoms among sibs in a MELAS family correlated with heteroplasmy for the mitochondrial A3243G mutation. **J Neurol Sci N**, **124**: 77-82, 1994.
- DIAS-TOSTA, E.- Chronic progressive external ophthalmoplegia. I. A quantitative histochemical study of skeletal muscles. **Arq Neuropsiquiatr**, **46** (2): 133-42, 1988a.
- DIAS-TOSTA, E.- Chronic progressive external ophthalmoplegia. II. A qualitative and quantitative electronmicroscopy study of skeletal muscles. **Arq Neuropsiquiatr**, **46** (2): 143-55, 1988b.
- DIMAURO, S.; BONILLA, E.; DAVIDSON, M.; HIRANO, M.; SCHON, E. A.- Mitochondria in neuromuscular disorders. **Biochim Biophys Acta**, **1366**: 199-210, 1998.
- DIMAURO, S. & DE VIVO, D. C.- Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. (Letter). **Ann Neurol**, **40**: 5-7, 1996.
- DIMAURO, S.; ZEVIANI, M.; MORAES, C. T.; NAKASE, H.; RIZZUTO, R.; LOMBES, A.; SHANSKE, S.; SCHON, E. A.- Mitochondrial encephalomyopathies. **Prog Clin Biol Res**, **306**: 117-28, 1989.
- ENGEL, W. K. & CUNNINGHAM, G. G.- Rapid examination of muscle tissue: an improved trichome stain method for mesoprogen biopsy sections. **Neurology**, **13**: 919, 1963.
- ENTER, C.; MULLER-HOCKER, J.; ZIERZ, S.; KURLEMANN, G.; PONGRATZ, D.; FORSTER, C.; OBERMAIER-KUSSER, B.; GERBITZ, K. D.- A specific point mutation in the mitochondrial genome of caucasians with MELAS. **Hum Genet**, **88**: 233-6, 1991.

- FERRAZ, H. B. & ANDRADE, L. A.- Symptomatic dystonia: clinical profile of 46 Brazilian patients. **Can J Neurol Sci**, **19** (4): 504-7, 1992.
- FUKUHARA, N.; TOKIGUCHI, S.; SHIRAKAWA, K.; TSUBAKI, T.- Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): diseases entity or a syndrome? Light- and electron -microscopic studies of two cases and a review of the literature. **J Neurol Sci**, **47**: 117-33, 1980.
- GOTO, Y. I.; NONAKA, I.; HORAI, S.- A Mutation in the tRNA Leu (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. **Nature**, **384**: 651-3, 1990.
- GOTO, Y. I.; NONAKA, I.; HORAI, S.- A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). **Biochem Biophys Acta**, **1097** (3): 238-40, 1991.
- GUERREIRO, C. A. M. & GUERREIRO, M. M.- **Epilepsia**, 2th ed. S. Paulo, Lemos Editorial, pp 263-70, 1996.
- HARDING, A. E.; SWEENEY, M. G.; GOVAN, G. G.; RIORDAN-EVA, P.- Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. **Am J Hum Genet**, **57**: 77-86, 1995.
- HIRANO, M. & PAVLAKIS, S. G.- Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): current concepts. **J Child Neurol**, **9**: 4-13, 1994.
- HOLT, I. J.; HARDING, A. E.; MORGAN-HUGHES, J. A.- Deletion of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. **Nature**, **331**: 717-9, 1988.
- HOLT, I. J.; HARDING, A. E.; PETTY, R. K. H.; MORGAN-HUGHES, J. A.- A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. **Am J Hum Genet**, **46**: 428-33, 1990.

- JUVONEN, V.; HUOPONEN, K.; SYVÄNEN, A. C.; NIKOSKELAINEN, E.; SAVONTAUS, M. L.- Quantification of point mutations associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy by solid-phase minisequencing. **Hum Genet**, **93**: 16-20, 1994.
- KIMATA, K. G.; GORDAN, L.; AJAX, E. T.; DAVIS, P. H.; GRABOWSKI, T.- A case of late-onset MELAS. **Arch Neurol**, **55**: 722-5, 1998.
- KIYOMOTO, B. H.- **Mutações do DNA mitocondrial na oftalmoplegia externa progressiva crônica: estudo clínico, molecular e morfológico em biópsias musculares**. São Paulo, 1977. [tese- Doutorado- Unifesp- EPM]
- KIYOMOTO, B. H.; GABBAI, A. A.; OLIVEIRA, A. S.; SCHMIDT, B.; LIMA, J. G.- Mitochondrial myopathy: report of 12 cases with histochemical study of the skeletal muscle. **Arq Neuropsiquiatr**, **49** (3): 272-8, 1991.
- KIYOMOTO, B. H.; TENGAN, C. H.; MORAES, C. T.; OLIVEIRA, A. S.; GABBAI, A. A.- Mitochondrial DNA defects in Brazilian patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. **J Neurol Sci**, **152** (2): 160-5, 1997.
- LARSSON, N-G.; TULINIUS, M. H.; OLDFORS, A.; ANDERSEN, O.; WAHLSTRÖM, J.; AASLY, J.- Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA^{Lys} A→G⁽⁸³⁴⁴⁾ mutation of myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. **Am J Hum Genet**, **51**: 1201-12, 1992.
- LEBER, T.- Ueber hereditäre und congenital Angelegte sehnervenleiden. **Graefes Arch Ophthalm**, **17**: 249-91, 1871.
- LEVY, J. A.; TSANACLIS, A. M.; SARAIVA, P. A.; MION, C. C.; SALUM, P. N.- Mitochondrial myopathy with respiratory muscle involvement: a case report. **Arq Neuropsiquiatr**, **41** (1): 86-90, 1983.
- LUFT, R.; IKKOS, D.; PLAMIERI, G.; ERNESTERN, L.; AFZELIUS, B.- A Case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated, clinical, biochemical, and morphological study. **J Clin Invest**, **41**: 1776-804, 1962.

- MAJAMAA, K.; MOILANEN, J. S.; UIMONEN, S.; REMES, A. M.; SALMELA, P. I.; KARPPA, M.; MAJAMAA-VOLTTI, K. A.; RUSANEN, H.; SORRI, M.; PEUHKURINEN, K. J.; HASSINEN, I. E.- Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidoses, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. **Am J Hum Genet**, **63** (2): 447-54, 1998.
- MARIE, S. K.- **Mitocondriopatias: contribuição para o estudo de mutações do DNA mitocondrial**. São Paulo, 1996. [tese- Doutorado- USP]
- MARIE, S. K.; CARVALHO, A. A.; FONSECA, L.F.; CARVALHO, M. S.; REED, U. C.; SCAFF, M.- Kearn-Sayre syndrome "plus". classical clinical findings and dystonia. **Arq Neuropsiquiatr**, **57** (4): 1017-23, 1999.
- MARIE, S. K.; GOTO, Y.; PASSOS-BUENO, M. R.; ZATS, M.; CARVALHO, A. A.; CARVALHO, M.; LEVY, J. A.; PALOU, V. B.; CAMPIOTTO, S., HORAI, S.- A caucasian family with the 3271 mutation in mitochondrial DNA. **Biochem Med Metab Biol**, **52** (2): 136-9, 1994.
- MARJA-LISA, S.- mtDNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. **Biochim Biophys Acta**, **1271**: 261-3, 1995.
- MATTHEWS, P. M.; BROWN, R. M.; MORTEN, K.; MARCHINGTON, D.; POULTON, J.; BROWN, G.- Intracellular heteroplasmy for disease-associated point mutations in mtDNA: implications for disease expression and evidence for mitotic segregation of heteroplasmic units of mtDNA. **Hum Genet**, **96**: 261-8, 1995.
- MENKES, J. H.- **Textbook of Child Neurology**, 5th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, pp 109-11, 1995.
- MICHAEL, R. R.- Mitochondrial myopathies. **Neurolog Ver**, **55**: 17-24, 1998.
- MORAES, C., T.; RICCI, E.; BONILLA, E.; DIMAURO, S.; SCHON, E., A.- The mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. **Am J Hum Genet**, **50**: 934-49, 1992.

- NARDIN, R.A. & JOHNS, D. R.- Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. **Muscle & Nerve**, **24**: 170-91, 2001.
- NEWMAN, N. J.; LOTT, M. T.; WALLACE, D. C.- The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. **Am J Ophtalm**, **111** (6): 750-62, 1991.
- NIKOSKELAINEN, E.; WANNE, O.; DAHL, M.- Pre-excitation syndrome and Leber's hereditary optic neuropathy. **Lancet**, **2**: 1474, 1985.
- OOSTRA, R. J.; KEMP, S.; BOLHUIS, P. A.; BLEEKER-WAGEMAKERS, E. M.- No evidence for 'skewed' inactivation of the X-chromosome as cause of Leber's hereditary optic neuropathy in female carriers. **Hum Genet**, **97**: 500-5, 1996.
- PANG, C. Y.; HUANG, C. C.; YEN, M. Y.; WANG, E. K.; KAO, K. P.; CHEN, S. S.; WEI, Y.H.- Molecular epidemiologic study of mitochondrial DNA mutations in patients with mitochondrial diseases in Taiwan. **J Formos Med Assoc**, **98** (5): 326-34, 1999.
- PAVLAKIS, S. G.; PHILLIPS, P. C.; DIMAURO, S.; DE VIVO, D. C.; ROWLAND, L. P.- Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. **Ann Neurol**, **16**: 481-8, 1984.
- PEGORARO, E.; CARELLI, V.; ZEVIANI, M.; CORTELLI, P.; MONTAGNA, P.; BARBONI, P.; ANGELINI, C.; HOFFMAN, E. P.- X-inactivation patterns in female Leber's hereditary optic neuropathy patients do not support a strong X-linked determinant. **Am J Med Genet**, **61** (4): 356-62, 1996.
- POULTON, J. & MARCHINGTON, D. R.- Progress in genetic counselling and prenatal diagnosis of maternally inherited mtDNA diseases. **Neuromusc Disor**, **10**: 484-7, 2000.
- PLUT, M.- **Alterações oculares em pacientes portadores de desordens mitocondriais**. São Paulo, 1994. [tese- Mestrado- Unifesp- EPM]
- REARDON, W.; ROSS, R. J.; SWEENEY, M. G.; LUXON, L. M.; PEMBREY, M. E.; HARDING, A. E.; TREMBATH, R. C.- Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. **Lancet**, **340**: 1376-9, 1992.

- RIORDAN-EVA, P. & HARDING, A. E.- Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. **J Med Genet**, **32**: 81-7, 1995.
- ROSE, M. R.- Mitochondrial myopathies. **Arch Neurol**, **55**: 17-24, 1988.
- ROISING, H. S.; HAPKINS, L. C.; WALLACE, D. C.; EPSTEIN, C. M.; WEIDENHEIM, K.-Maternally inherited mitochondrial myopathy and myoclonic epilepsy. **Ann Neurol**, **17**: 228-37, 1985.
- SANTORELLI, F. M.; TANJI, K.; SHANSKE, S.; DIMAURO, S.- Heterogeneous clinical presentation of the mtDNA NARP/T8993G mutation. **Neurology**, **49**: 270-3, 1997.
- SCCHATZ, G.- Mitochondria - the next 100 years. **Karger Gaz**, **58**: 1-2, 1994.
- SHAPIRA, Y.; CEDERBAUM, S. D., CANCELLA, P. A. NIELSEN, D.; CIPPE, B. M.- Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy and lactic acidemia. **Neurology**, **25**: 614-21, 1975.
- SHAPIRA, Y.; HAND, S.; RUSSEL, A.- Mitochondrial in encephalomyopathies: a group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. **Isr J Med Sci**, **13**: 161, 1977.
- SHOFFNER, J. M.; LOTT, M. T.; LEZZA, A. M. S.; SEIBEL, P.; BALLINGER, S. W.; WALLACE, D. C.- Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MEERF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA-lys mutation. **Cell**, **61**: 931-7, 1990.
- SILVA, H. C.; LEITE J. J. ; CARVALHO, M. S.; SALUM, PN, VARGAS, F. S.; LEVY, J. A.- Cardiopulmonare exercise testing for evaluation of muscle diseases. **Arq Neuropsiquiatr**, **56** (2): 258-6, 1998.
- SMITH, P. R.; BAIN, S. C.; GOOD, P. A.; HATTERSLEY, A. T.; BARNETT, A. H.; GIBSON, J. M.; DODSON, P. M.- Pigmentary retinal dystrophy and the syndrome of maternally inherited diabetes and deafness caused by the mitochondrial DNA 3243 tRNA^{Leu} A to G mutation. **Ophthalmology**, **106**: 1101-8, 1999.
- SUE, C. M.; QUIGLEY, A.; KATSABANIS, S.; KAPSA, R.; CRIMMINS, D. S.; BYRNE, E.; MORRIS, J. G. L.- Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. **J Neurol Sci**, **161**: 36-9, 1998.

- SUOMALAINEN, A.; MAJANDER, A.; PIHKO, H.; PELTONEN, L.; SYVÄNEN A-C.- Quantification of tRNA^{Leu} 3243 point mutation of mitochondrial DNA in MELAS patients and its effects on mitochondrial transcription. **Hum Mol Genet**, **5**: 525-34, 1993.
- TAYLOR, R. W.; TAYLOR, G. A.; MORRIS, C. M.; EDWARDSON, J. M.; DOUGLASS, M. T.- Diagnosis of mitochondrial disease: assessment of mitochondrial DNA heteroplasmy in blood. **Biochem Biophys Res Commun**, **251**: 883-7, 1998.
- TENGAN, C. H.- **Deleções do DNA mitocondrial no envelhecimento: efeito da disfunção na fosforilação oxidativa**. São Paulo, 1997. [tese- Doutorado- Unifesp-EPM]
- TREEM, W. R. & SOKOL, R. J.- Disorders of the mitochondria. **Sem Liv Dis**, **18** (3): 237-53, 1998.
- TSUKUDA, K.; SUZUKI, Y.; KAMEOKA, K.; OSAWA, N.; GOTO, Y.; KATAGIRI, H.; ASANO, T.; YAZAKI, Y.; OKA, Y.- Screening of patients with maternally transmitted diabetes for mitochondrial gene mutations in the tRNA^{Leu} (UUR) region. **Diab Med**, **14**: 1032-7, 1997.
- UUSIMAA, J.; REMES, A. M.; RANTALA, H.; VAINIONPAA, L.; HERVA, R.; VUOPALA, K.; NUUTINEN, M.; MAJAMAA, K.; HASSINEN, I. E.- Childhood encephalopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. **Pediatrics**, **105** (3): 598-603, 2000.
- UZIEL, G.; MORONI, I.; LAMANTEA, E.; FRATTA, G., M.; CICERI, E.; CARRARA, F.; ZEVIANI, M.- Mitochondrial disease associated with the T8993G mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene: a clinical, biochemical, and molecular study in six families. **J Neurol Neuros Psych**, **63**: 16-22, 1997.
- VALENTE, O.- **Alterações mitocondriais na doença de Basedow graves**. São Paulo, 1981. [tese- Doutorado- Unifesp-EPM]

- VAN DEN OUWELAND, J. M. W.; LEMKES, H. H. P. J.; RUITENBEEK, W.; SANDKUIJL, L. A.; DE VIJLDER, M. F.; STRUYVENBERG, P. A. A.; VAN DE KAMP, J. J. P., MAASSEN, J. A. - Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. **Nat Genet**, 1: 368-71, 1992.
- VERGANI, L.; MARTINUZZI, A.; CARELLI, V.; CORTELLI, P.; MONTGNA, P.; SCHIEVANO, G.; CARROZZO, R.; ANGELINI, C.; LUGARESI, E.- mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. **Biochim Biophys Res Commun**, 210 (3): 880-8, 1995.
- VON GRAEFE, A.- Ein Ungewoehnlicher fall von hereditaere Amaurose. **Arch Ophthal**, 4: 266-8, 1858.
- WJNER, M.; SANSEVERINO, M. T.; GIUGLIANI, R.; SWETMAN, L.; YAMAGUCHI, S.; FUKAO, T.; SHIH, V. E.- Biochemical investigation of a Brazilian patient with a defect in mitochondrial acetoacetylcoenzyme-A thiolase. **Clin Genet**, 41 (4): 202-5, 1992.
- WALLACE, D. C.; BROWN, M. D.; LOTT, M. T.- Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. **Gene**, 238: 211- 30, 1999.
- WALLACE, D. C.; SINGH, G.; LOTT, M. T.; HODGE, J. A.; SCHURR, T. G.; LEZZA, A. M.; ELSAS, L. J.; NIKOSKELAINEN, E. K.- Mitochondrial DNA mutation association with Leber's hereditary optic neuropathy. **Science**, 242: 1427-30, 1988.
- WALLACE, D.C.- Mitochondrial diseases - genotype versus phenotype. **Trends Genet**, 9: 128-33, 1993.
- WARNER, T. T. & SCHAPIRA, A.. H. V.- Genetic counselling in mitochondrial diseases. **Curr Opin Neurol**, 10: 408-12, 1997.
- WERNECK, L. C.; ABDALLA, H.; LOHR, A.- MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidoses and stroke-like episodes): report of a case. **Arq Neuropsiquiatr**, 45 (3): 288-94, 1987.

- WERNECK, L. C. & DIMAURO, S.- Myopathy due to succinate cytochrome C oxidoreductase deficiency: possible defect of complex II of the respiratory chain. **Arq Neuropsiquiatr**, **47** (4): 461-7, 1989.
- WISSINGER, B.; BESCH, D.; BAUMANN, B.; FAUSER, S.; CHRIST-ADLER, M.; JURKLIES, B.; ZRENNER, E.; LEO-KOTTLER, B.- Mutation analysis of the ND6 gene in patients with Lebers hereditary optic neuropathy. **Biochem Biophys Res Commun**, **234**: 511-5, 1997.
- ZEVIANI, M.; AMATI, P.; BRESOLIN, N.; ANTOZZI, C.; PICCOLO, G.; TOSCANO, A. DIDONATO, S.- Rapid detection of the A→G⁽⁸³⁴⁴⁾ mutation of mtDNA in italian families with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). **Am J Hum Genet**, **48**: 203-11, 1991.
- ZEVIANI, M.; TIRANTI, V.; PIANTADOSI, C.- Mitochondrial disorders. **Medicine**, **77**: 59-72, 1998.
- ZHU, Z.; YAO, J.; JONHS, T.; FU, K.; DE BIE, I.; MACMILLAN, C.; CUTHBERT, A. P.; NEWBOLD, R. F.; WANG, J.; CHEVRETTE, M.; BROWN, G. K.; BROWN, R. M.; SHOUBBRIDGE, E. A. - SURF1 encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome C oxidase, is mutated in Leigh syndrome. **Nature Genet**, **20**: 337-43, 1998.



9. ANEXOS

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos nas Doenças Mitocondriais

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

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 doença mitocondrial. O objetivo geral do estudo é o de determinar a frequência de algumas mutações encontradas em pacientes com doença mitocondrial. Esses estudos poderão levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado das doenças mitocondriais de modo geral. Tanto as amostras de DNA, de linhas celulares 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 doenças mitocondriais. Podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa sobre doenças mitocondriais. 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), eletroneuromiografia e biópsia muscular. 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 doença mitocondrial. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro do primeiro ano após o meu consentimento em participar no estudo, porém a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderão ser feitas durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 a 30 ml de sangue 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.

Título do projeto: Estudos Genéticos nas Doenças Mitocondriais

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

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) 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) 788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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) 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.

Título do projeto: Estudos Genéticos nas Doenças Mitocondriais

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____

me explicou 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

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas - S.P.
(019) 289.3749 ou 7232
(019) 289.3114 fax
cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER: Nº 108/98

PESQUISA: DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS DUAS PRINCIPAIS
MUTAÇÕES PONTUAIS DO mtDNA NAS DOENÇAS
MITOCONDRIAIS

PESQUISADOR: Profa. Iscia T. Lopes - Cendes

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós-Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 02/09/98


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

FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇAS MITOCONDRIAIS

1. Nome _____
 2. HC: _____ 3. DGM: _____
 4. Data da consulta: _____ 5. Número no heredograma: _____
 6. Origem étnica dos avós: 6.1. maternos _____
 6.2. paternos _____
 7. Herança genética: (caso isolado, autossômica recessiva, autossômica dominante, herança materna, herança ligada ao cromossomo X): _____

8. História médica pregressa:

8.1. Diagnóstico de doença mitocondrial: Sim () Não () Idade: _____
 8.2. Primeiros sintomas: _____ Idade de aparecimento: _____
 8.3. Episódios *strokelike*: Sim () Não () Idade de aparecimento: _____
 8.4. Epilepsia mioclônica: Sim () Não () Idade de aparecimento: _____
 8.5. Outros sintomas neurológicos: _____
 8.6. Outras condições médicas (ex. diabetes, hipertensão, etc.): _____

9. Uso de drogas ou medicações:

9.1 Bebida alcoólica: _____
 9.2 Medicação em uso (incluir dose e por quanto tempo vem tomando): _____

10. Achados neurológicos:	Sim	Não	Idade de Aparecimento
10.1. Crises motoras, tônico-clônicas	_____	_____	_____
10.2. Alterações cognitivas:	_____	_____	_____
10.3. Movimentos oculares anormais:	_____	_____	_____
10.2.1. Nistagmo:	_____	_____	_____
10.2.2. Movimentos sacádicos lentos	_____	_____	_____
10.3. Diminuição da acuidade visual	_____	_____	_____
10.4. Atrofia óptica	_____	_____	_____
10.5. Retinite pigmentosa	_____	_____	_____
10.6. Diminuição da acuidade auditiva	_____	_____	_____
10.7. Disartria	_____	_____	_____
10.8. Disfagia	_____	_____	_____
10.9. Incoordenação:			
10.9.1. Membros superiores	_____	_____	_____
10.9.2. Membros inferiores	_____	_____	_____
10.9.3. Marcha	_____	_____	_____
10.10. Tremor	_____	_____	_____
10.11. Câibras musculares	_____	_____	_____
10.12. Fasciculações:			
10.12.1. Membros	_____	_____	_____
10.12.2. Facial	_____	_____	_____
10.12.3. Perioral	_____	_____	_____
10.12.4. Lingual	_____	_____	_____
10.13. Sinais extrapiramidais	_____	_____	_____
10.14. Movimentos involuntários	_____	_____	_____
10.15. Distonia	_____	_____	_____

10.17. Força muscular: _____

10.18. Sensibilidade: _____

10.19. CT: _____

10.20. MRI: _____

10.21. ENMG: _____

10.22. EEG : _____

10.23 Biópsia muscular: _____

10.24. Autopsia: _____